

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.009

毛细管 PCR 芯片电泳快速检测 NDM-1 耐药菌方法的建立*

王秋平

(南华大学附属第一医院检验科,湖南衡阳 421001)

摘要:目的 建立一种毛细管聚合酶链反应(PCR)芯片电泳方法,实现快速、准确地检测新德里金属- β -内酰胺酶(NDM-1)耐药菌。方法 根据 NDM-1 基因设计 1 对特异引物,对临床微生物检测的 80 株耐药肠道杆菌和 60 株鲍曼不动杆菌的细菌培养液进行毛细管振荡流 PCR 扩增,芯片电泳快速检测 PCR 产物。将 NDM-1 阳性标本进行测序验证,同时对 NDM-1 阳性菌细菌悬液定量梯度稀释进行 PCR,考察免核酸提取 PCR 的敏感度。结果 毛细管 PCR 芯片电泳方法检测出 2 例阳性标本,其产物经测序验证,确定携带 NDM-1 基因,阳性率为 100%。该方法在 40 min 内实现产 NDM-1 耐药菌扩增产物的快速分离检测,细菌检测线为 1.15×10^1 CFU/mL。结论 毛细管 PCR 芯片电泳方法检测 NDM-1 基因准确性高、特异性强,具有快速、廉价等特点,适合 NDM-1 阳性菌的早期快速现场诊断。

关键词:新德里金属- β -内酰胺酶; 芯片电泳; 聚合酶链反应

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)24-3674-05

Rapid detection of NDM-1 resistant bacteria by capillary chip electrophoresis PCR*

WANG Qiuping

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To establish a method based on microfluidic chip electrophoresis combined PCR for rapid detect bacteria carrying New Delhi Metallo-beta-Lactamase (NDM-1). **Methods** A pair of specific primers were designed according to the gene of NDM-1, the capillary oscillatory flow PCR was used to amplify 80 strains of drug-resistant Enterobacter and 60 strains of Acinetobacter baumannii cultures, and the PCR products were rapidly detected by chip electrophoresis. The NDM-1 positive samples were sequenced and validated. At the same time, the quantitative gradient dilution of NDM-1 positive bacterial suspension was carried out by PCR, and the sensitivity of DNA-free extraction of PCR was investigated. **Results** Two positive samples were detected by capillary polymerase chain reaction chip electrophoresis. The product was confirmed to carry NDM-1 gene by sequencing. The positive rate was 100%. The rapid isolation and detection of NDM-1-resistant bacterial amplification products were achieved within 40 min. The bacterial detection line was 1.15×10^1 CFU/mL. **Conclusion** Capillary PCR chip electrophoresis is a rapid and inexpensive method with high accuracy and specificity for NDM-1 gene detection. It is suitable for early and rapid field diagnosis of NDM-1 positive bacteria.

Key words: NDM-1; microchip electrophoresis; PCR

滥用抗生素的问题由来已久,2000 年出现了多重耐药假单胞菌和肺炎克雷伯菌。2010 年 8 月 The Lancet Infectious Diseases 杂志报道了抗生素抗新德里金属- β -内酰胺酶(NDM-1)超级细菌。NDM-1 是一种新鉴定的对 β -内酰胺类抗生素具有广谱水解作用的酶,是编码碳青霉烯类酶基因家族成员之一。NDM-1 可以水解碳青霉烯类抗生素,以及头孢菌素和

青霉素。携带该基因的细菌对几乎所有一线治疗重症感染的广谱抗生素,如青霉素类、头孢菌素类、头霉素类等 β -内酰胺和碳青霉烯类抗生素均耐药,仅对多黏菌素 E 及米诺环素衍生物——替加环素敏感,被称为“超级细菌”^[1-2]。由于这类细菌的广谱耐药特性,有必要进行早期快速鉴定,从而为控制医院内感染和临床治疗提供及时准确的指导^[3]。传统细菌耐药基

* 基金项目:湖南省教育厅科学研究资助项目(16C1390)。

作者简介:王秋平,女,主管技师,主要从事细菌耐药检测方面的研究。

因检测通常采用细菌分离培养和药物敏感性试验^[3], 这些方法虽然有效, 但由于检测时间较长, 难以实现快速检测, 临床工作中急需快速有效的 NDM-1 阳性细菌鉴定方法。采用毛细管聚合酶链反应(PCR)扩增试剂可以简化操作并缩短分析时间, 满足快速检测的需要。本研究采用直接 PCR 扩增试剂 MightyAmp DNA Polymerase, 尝试将直接 PCR 扩增与微流控芯片电泳技术结合用于 NDM-1 阳性细菌快速鉴定, 拟建立一种快速、高灵敏的检测方法, 实现早期指导临床用药和控制医院内感染, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)标本来源:收集本院 2016—2017 年对碳青霉烯类抗生素不敏感的 80 株肠道杆菌(美罗培南 MIC \geq 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 60 株鲍曼不动杆菌(亚胺培南 MIC \geq 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。所有菌株使用法国梅里埃公司 VITEK-2 Compact 全自动细菌鉴定药敏分析仪进行鉴定和药敏试验检测。以大肠埃希菌 ATCC 25922 及铜绿假单胞菌 ATCC 27853 作为质量控制菌株。(2)引物设计:根据参考文献[2]按基因序列(FN396876)设计 PCR 特异引物序列, 上游:5'-GGCGGAATGGCTCATCACGA-3', 下游:5'-CG-CAACACA GCCTGACTTTC-3', 扩增片段长度 286 bp。PCR 引物由上海生物工程公司合成。

1.2 试剂与仪器 宝生物工程(大连)有限公司的 MightyAmp DNA Polymerase 试剂盒, DL2000 DNA Marker, 琼脂糖。江苏兴化宏泰硅氟制品厂的聚四氟乙烯毛细管, 美国 Bio-Rad 公司 MyCycler PCR 扩增仪、电泳仪, 英国 UVI 公司凝胶成像分析仪和紫外分析仪。美国贝克曼库尔特公司台式冷冻离心机, 法国梅里埃公司 VITEK-2 Compact 全自动细菌鉴定药敏分析仪。研究采用塑型十字架结构聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)电泳芯片^[4], 芯片的有效分离通道长度设定为 4 cm, 电泳分析激光诱导在荧光芯片分析仪上完成。该仪器由芯片电泳平台、光学检测系统、高压电源控制和操作软件组成, 检测方式为共聚焦激光诱导荧光。毛细管 PCR 装置参考文献[4-5]。

1.3 方法

1.3.1 产 NDM-1 细菌的实验室筛查和表型确认 采用 K-B 纸片扩散法, (1)按照美国临床和实验室标准化协会的改良方法进行, 制备菌液浓度为 0.5 麦氏浊度, 采用无菌棉签取已制备好的菌液, 在水解酪蛋白(M-H)琼脂表面均匀涂布接种 3 次, 每次平板旋转 60°, 最后沿平板内缘涂抹 1 周。平板置室温干燥 3~5 min 后用无菌镊子取美罗培南(10 μg)和亚胺培南(10 μg)纸片, 检测美罗培南和亚胺培南的抑菌环直径。(2)乙二胺四乙酸(EDTA)协同试验筛选金

属酶表型, 0.5 麦氏单位的待检菌涂布 M-H 平板, 贴 2 张亚胺培南纸片, 相距 1.0~1.5 cm, 其中一张纸片上面滴加 0.5 mol/L EDTA 10 μL 。35 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 亚胺培南加 EDTA 与亚胺培南纸片抑菌圈之差 \geq 5 mm 者为金属酶阳性。

1.3.2 产 NDM-1 细菌基因诊断 采用常规 PCR 检测, PCR 扩增反应体系分别是 MightyAmp DNA Polymerase 酶 0.5 μL , MightyAmp PCR Buffer 12.5 μL , 引物 F(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1.0 μL , 引物 R(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1.0 μL , ddH₂O 8.0 μL , 菌液标本 2.0 μL , 总体积 25.0 μL 。在台式 PCR 仪上反应条件 98 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 40 个循环。高效振荡流毛细管 PCR 检测:毛细管 PCR 反应体系同上, 毛细管 PCR 反应条件:将上述 PCR 反应液振荡, 充分混匀, 毛细管 PCR 装置中毛细管顺序吸入 5 μL 矿物油和 3 μL PCR 反应液。液滴首先运动至 98 $^{\circ}\text{C}$ 区停留 2 min, 继而在 98 $^{\circ}\text{C}$ 和 68 $^{\circ}\text{C}$ 区间往返运动 40 个循环。液滴运动速度为 120 $\mu\text{L}/\text{min}$, 每个循环在 68 $^{\circ}\text{C}$ 区暂停 10 s。毛细管 PCR 产物检测同上。PCR 产物的电泳分析, 琼脂糖电泳分析, 配制 2% 琼脂糖凝胶板, 按试剂标准操作配置 2% 的琼脂糖凝胶。取 DNA 相对分子质量标准液(DL2000) 5 μL , 直接上样。电泳仪电压为 100 V, 约 30 min 后停止电泳。置于 UV 紫外分析仪下观察并照相, 根据扩增产物长度得出判断结果。微流控芯片电泳分析:用实验室自制的激光诱导荧光芯片分析仪检测。将 PCR 产物用无菌双蒸水稀释 20 倍。先利用真空泵让电泳缓冲液各 10 μL 灌满通道, 同时将 10 μL 稀释后的样品加入样品池中。用 1.2% HPMC 作为筛分介质, 缓冲液为 1 \times PCR Buffer, 电泳分离电压为 1.2 kV, 分离时间设定为 300 s。采用 50~800 bp DNA ladder Marker 和待测 PCR 产物按 1:1 比例在相同条件下进行芯片电泳, 根据 500 bp DNA ladder Marker 和内标物(50 bp 和 800 bp DNA 片段)的相对迁移时间确定待测样品中特异 PCR 扩增产物的 DNA 片段。微流控芯片利用 DNA 电泳分析, 通过比较待测样品与标准样品的迁移时间确定 DNA 片段大小。

1.3.3 微流控芯片法检测 NDM-1 耐药菌敏感度 细菌培养和计数-平板涂布计数法:将耐药菌接种于新鲜血平板上, 培养 18~24 h。将培养好的单个菌落从血平板上刮下来, 溶于 2 mL 0.45% 的无菌盐水中, 充分振荡混匀; 分别在 24 个 EP 管内加入 900 μL 无菌生理盐水, 排成 3 排, 按顺序编号。从前面配好的菌液中取出 100 μL 加到第 1 个 EP 管内, 则第 1 个 EP 管内细菌浓度为标本的 1/10; 同法, 从第 1 个 EP 管中取出 100 μL 加到第 2 个 EP 管内, 则第 2 个 EP 管

内细菌浓度为标本的 1/100。依此类推,第 8 个 EP 管细菌浓度为原标本的 1/10⁸。制备好营养培养基,高压消毒灭菌。将培养基溶解,待冷却 50 ℃ 左右,倒入平板。取稀释好的菌液 1 mL 铺皿。35 ℃ 培养 24~28 h 后,看平皿上菌落数。选取细菌数量在 30~300 的菌液浓度进行计数。原菌液标本每毫升的细菌浓度=某一浓度 3 个平板的菌落总数/3×10(该浓度菌液的稀释倍数)(CFU/mL)。敏感度考察:将已经涂布平板中的原菌液标本按 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10⁰ 梯度稀释,分别作为 PCR 模板,PCR 反应体系和循环条件同前。考察免核酸提取 PCR 的敏感度。

1.3.4 测序验证 将免核酸提取 PCR 产物送大连宝生物进行测序,用 chromas145 软件进行分析,并在 Pub Med 上与 FN396876.1 序列进行比对。

1.4 方法学评价及临床标本检测 对毛细管液滴 PCR 反应体系和反应条件进行优化,分析评价该方法的特异度和敏感度;本研究采用碳青霉烯类酶阳性 K-B 纸片法和毛细管 PCR 结合微流控芯片电泳对本院检验科微生物实验室 2016—2017 年收集的 80 株耐药肠道杆菌(美罗培南 MIC≥2 μg/mL)和 60 株鲍曼不动杆菌(亚胺培南 MIC≥64 μg/mL)耐药菌进行筛查,并对耐药菌标本进行 NDM-1 基因检测。

2 结 果

2.1 不同酶浓度对毛细管液滴 PCR 效果的影响 本试验比较 4 种酶用量,加入 MightyAmp DNA Polymerase 酶分别是 0.1、0.3、0.5、0.7 μL,结果发现,酶的浓度与毛细管液滴 PCR 效果随酶浓度的增加而升高,当酶加入量为 0.5 μL 时趋向于饱和,因此,本试验酶加入量以 0.5 μL 为最优,见图 1。

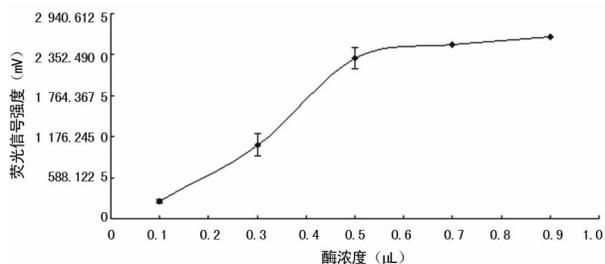


图 1 试验酶加入量对 PCR 的影响

2.2 不同标本量对毛细管液滴 PCR 效果的影响 为了考察 MightyAmp DNA Polymerase 酶的最合适检测标本体积,将不同菌液体积(1、2、3、5、7 μL)进行毛细管 PCR。结果发现,标本加入量到 5 μL 时,PCR 效率有所下降;当标本加入量为 7 μL 时,PCR 受到明显抑制,并且有纤维凝固团产生,见图 2。因此,最合适检测标本的体积为 2 μL。

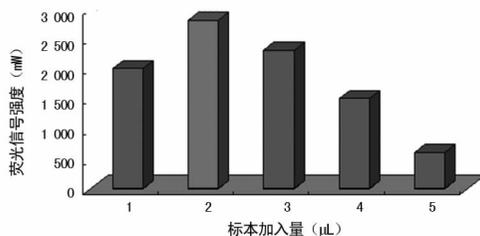


图 2 标本量对毛细管液滴 PCR 的影响

2.3 不同退火温度和延伸时间对毛细管液滴 PCR 效果的影响 为了考察在毛细管液滴 PCR 上退火温度和延伸时间对 PCR 效果的影响,将同一阳性标本采用同样的 PCR 反应体系,退火温度分别为 62、65、68、71、74 ℃,比较芯片电泳荧光信号强弱。发现芯片电泳荧光信号退火温度为 68 ℃ 较强,但不是最理想。每个循环中在 68 ℃ 区暂停 10 s,将退火和延伸加长,从而延长反应时间,芯片电泳荧光信号达最大值,PCR 扩增效果相当成功,见图 3、4。

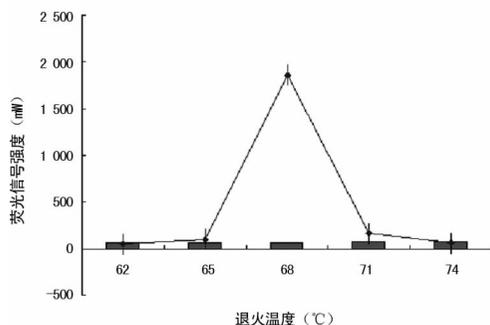


图 3 退火温度对毛细管 PCR 的影响

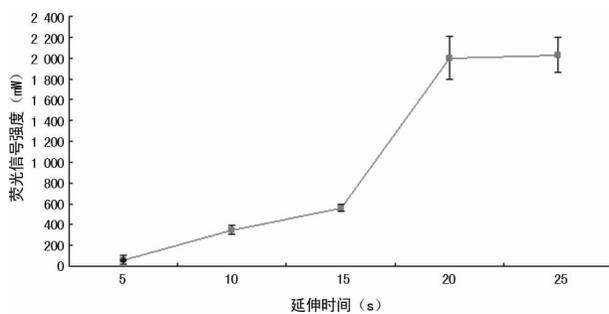


图 4 延伸时间对毛细管 PCR 的影响

2.4 临床耐药菌筛选、表型确认及毛细管 PCR 微流控芯片电泳结果 EDTA 协同试验筛选金属酶结果显示,阳性 6 株,毛细管 PCR 微流控芯片电泳检测 NDM-1 阳性 2 株,同时进行普通 PCR 检测结果也是 2 株 NDM-1 阳性。携带 NDM-1 耐药菌在血平板上的培养情况见图 5A;药敏纸片美罗培南和亚胺培南抑菌圈直径为 6 mm≤22 mm,该耐药菌碳青霉烯类酶阳性,见图 5B;K-B 纸片结果为:EDTA 复合纸片抑菌环直径 25 mm,比单药纸片直径 6 mm 增大≥5 mm,因此该耐药菌金属酶阳性,见图 5C。NDM-1 阳性菌毛细管液滴 PCR 微流控芯片检测结果见图 6;

对应的琼脂糖电泳结果见图 7。

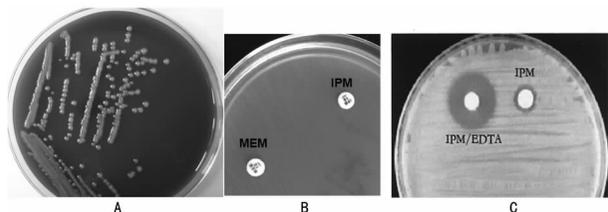
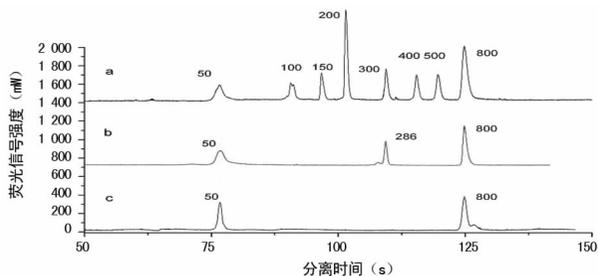
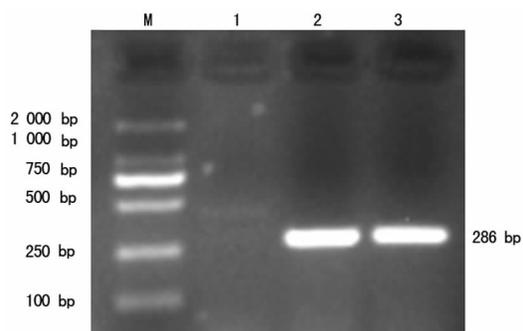


图 5 NDM-1 阳性血平板培养和 K-B 纸片药敏试验结果



注:a 为 DNA marker; b 为有 NDM-1 基因扩增产物; c 为无 NDM-1 基因扩增产物

图 6 NDM-1 基因检测芯片电泳结果



注:M 为 DL2000 Marker; 1 为无 NDM-1 基因扩增产物; 2、3 为有 NDM-1 基因耐药菌扩增产物

图 7 NDM-1 基因检测琼脂糖电泳结果

2.5 芯片毛细管液滴 PCR 特异性考察 经过试验优化,按最优 PCR 反应体系和反应条件,对该阳性 PCR 产物进行测序。芯片检测结果与测序结果在 Pub Med 上与 FN396876.1 序列进行比对,100% 符合。

2.6 芯片毛细管液滴 PCR 检出限考察 将已经涂布平板中的原菌液标本按 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 梯度稀释,分别作为 PCR 模板,PCR 反应体系和循环条件同前。PCR 产物在芯片电泳和 2% 琼脂糖电泳上检测。芯片电泳可以检测到最低菌液浓度为 1.15×10^1 CFU/mL,相比琼脂糖电泳最低菌液浓度 1.5×10^3 CFU/mL 更灵敏。

2.7 临床标本检测 本试验采用碳青霉烯类酶阳性 K-B 纸片法和毛细管 PCR 结合微流控芯片电泳对本院检验科微生物实验室 2016—2017 年收集的 80 株耐药肠道杆菌(美罗培南 MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$)和 60 株鲍曼不动杆菌(亚胺培南 MIC $\geq 64 \mu\text{g/mL}$)耐药菌进行

筛查,结果显示,K-B 纸片法检出碳青霉烯类酶阳性 6 株,其中金属酶阳性 2 株;采用毛细管 PCR 结合微流控芯片电泳方法筛选出 2 株 NDM-1 基因阳性,并经 DNA 测序验证,确证携带 NDM-1 基因。

3 讨论

“超级细菌”最早发现于 2008 年,源自一名印度籍的瑞典患者体内的一种细菌。由于多种抗生素对该细菌均无效,于是一种具有特殊性的基因被检测出来,这个基因就是 NDM-1 编码基因^[6]。碳青霉烯酶抗生素是革兰阴性菌医院内感染最后一线治疗药物,碳青霉烯酶耐药的产生将严重威胁到全球卫生治疗系统^[7]。最近发现的 NDM-1 引起人类的广泛关注,也被大众媒体报道。尽管报道病例数非常少,影响还不是很大,但诊断实验室需要发展一种快速检测的方法,以备将来医院内感染暴发流行时应用。

目前,产 NDM-1 细菌的实验室常规诊断包括 E-test 法表型筛查试验、改良霍奇试验表型确证试验及自动化鉴定与药敏试验等,但是都无法区分耐药类型和耐药基因,且需要时间长,特异度低^[8]。分子诊断检测方法弥补了常规方法的不足,可在 1 h 内完成检测,具有高敏感度和特异度。通常 PCR 前需要消耗大量时间进行标本 DNA 提取和前处理。用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物需要进行琼脂糖凝胶的制备,而且电泳时间需要 30 min 以上,整个 PCR 操作过程不仅费时费力,而且还需要昂贵的仪器。

本研究采用的毛细管振荡流 PCR 装置,使用量注射泵驱动 PCR 液滴在不同恒定温区往返运动,因无需加热模块的升温 and 降温过程,所以大大缩短了 PCR 时间。并且,该系统使用标准毛细管作为 PCR 反应器,价格便宜,且毛细管 PCR 只需 $3 \mu\text{L}$ PCR 反应液,节约试剂,大大降低了检测成本。本研究采用改良型 Mighty Amp DNA 聚合酶,直接从临床标本中扩增目的片段,无需核酸提取预处理,将标本直接进行 PCR,有望实现集成化核酸分析。此外,本研究用微流控芯片电泳分析 PCR 产物,分离检测时间为 300 s,相比常规琼脂糖电泳检测大大缩短了时间,而且本方法检测敏感度高,细菌检测敏感度为 1.15×10^1 CFU/mL。本研究中 K-B 纸片法检出碳青霉烯类酶阳性为 6 株,其中金属酶阳性 2 株;毛细管 PCR 结合微流控芯片电泳筛选出 2 株 NDM-1 基因阳性,同时进行普通 PCR 检测结果也是 2 株 NDM-1 阳性,经 DNA 测序验证,这 2 株确证携带 NDM-1 基因。另外 4 株可能含有碳青霉烯类酶的其他耐药基因型,还需进一步深入研究。本方法检测结果经过测序验证,完全符合,由此说明本方法对 NDM-1 基因检测准确性高、特异性强。

(下转第 3681 页)

愿景的提出,以及 2020 年实现“3 个 90%”防治目标,即:90%的感染者通过检测知道自己的感染状况,90%已经诊断的感染者接受抗病毒治疗,90%接受抗病毒治疗的感染者病毒得到抑制,HIV RNA 载量的高精度检测将具有重要意义。两种精准的定量分析系统对病情的准确判断,特别是对 HIV 阳性产妇的婴儿和处于 HIV 抗体窗口期的感染者等特殊免疫个体^[5-6],在其感染的早期诊断中发挥了重要作用。此外,两种精准的定量分析系统还能指导 AIDS 抗病毒治疗的疗效监控,以尽量清除病毒或抑制病毒复制^[12]。AIDS 患者在很大程度上依赖 HIV RNA 载量的精确测定,因此,只有采用高精度的检测方法才能为临床医生提供更准确可靠的 AIDS 治疗依据。

参考文献

[1] 严延生,颜莘莘,陈亮,等. 艾滋病治疗的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2017,35(5):383-388.
 [2] 刘敏,陈秀英,梅少林,等. 不同核酸提取方法检测 HIV 病毒载量和耐药基因的研究[J]. 中国现代医生,2016,54(20):111-114.
 [3] 黑发欣,张启云,孙伟东,等. 病毒载量检测鉴别诊断 HIV 早期感染[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2008,28(6):557-559.
 [4] KRAJDEN M, COOK D, MAK A, et al. Pooled nucleic acid testing increases the diagnostic yield of acute HIV infections in a high-risk population compared to 3rd and 4th generation HIV enzyme immunoassays[J]. J Clin Vir-

ol,2014,61(1):132-137.

[5] 张艳,程周祥,王毅,等. 病毒载量检测在 HIV 抗体不确定标本诊断中的应用[J]. 中国艾滋病性病,2016,22(4):237-240.
 [6] 赵璇,程绍辉,郑敏娜,等. 病毒载量检测对 HIV 抗体确证实验结果不确定样本的辅助诊断研究[J]. 中华流行病学杂志,2016,37(7):992-995.
 [7] 陈科,马洪滨,李珺等. 罗氏 COBAS AmpliPrep 全自动 PCR 分析仪的应用与维护[J]. 中国医学装备,2013,10(11):125-126.
 [8] 张岭,蒋岩,潘品良,等. HIV-1 病毒载量检测常用技术及研究进展[J]. 传染病信息,2015,12(6):352-356.
 [9] 傅卫辉,张晓燕. 固有免疫与 HIV-1 相互作用的研究进展[J]. 病毒学报,2011,27(5):494-496.
 [10] 路新利,赵宏儒,李巧敏,等. HIV/AIDS 患者病毒载量与 CD4 细胞数相关性研究[J]. 现代预防医学,2011,38(20):4256-4257.
 [11] 李铃,古雪,敬雨佳,等. 人类免疫缺陷病毒,艾滋病毒 I 型艾滋病患者 CD4⁺T 淋巴细胞水平与机会感染及病毒载量的相关性分析[J]. 中国现代医学杂志,2016,26(2):13-18.
 [12] CLUMECK N, POZNIAK A, RAFFI F. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults[J]. HIV Med,2008,9(2):65-71.

(收稿日期:2018-05-29 修回日期:2018-09-06)

(上接第 3677 页)

总之,该方法在 40 min 内实现产 NDM-1 耐药菌扩增产物的快速分离检测,细菌检测敏感度为 1.15×10^1 CFU/mL,对 NDM-1 基因检测准确性高、特异性强,具有快速、廉价等特点,适合超级细菌 NDM-1 的早期快速现场诊断。

参考文献

[1] KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, WALSH T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India. and the UK; a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9):597-602.
 [2] WAILAN A M, PATERSON D L, CAFFERY M, et al. Draft genomes sequence of NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 648 and genetic context of blaNDM-5 in Australia[J]. Genome Announc, 2015, 3(2):e00194.
 [3] CHEN Y, ZHOU Z, JIANG Y N, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(6):1255-1259.
 [4] KARTHIKEYAN K, THIRUNARAYAN M A, KRISHNAN P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from

India[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(10):2253-2254.

[5] LIU D, OU Z, XU M, et al. Simplified transient isotachopheresis/capillary gel electrophoresis method for highly sensitive analysis of polymerase chain reaction samples on a microchip with laser-induced fluorescence detection[J]. J Chromatogr A, 2008, 1214(1/2):165-170.
 [6] SAIZ C, VILLAMIL V, GONZALEZ M M, et al. Enantioselective synthesis of new oxazolidinylthiazolidines as enzyme inhibitors [J]. Tetrahedron Asymmetr, 2017, 28(1):110-117.
 [7] YANG K W, ZHOU Y, GE Y, et al. Real-time activity monitoring of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 in living bacterial cells by UV-Vis spectroscopy [J]. Chem Commun, 2017, 53(57):8014-8017.
 [8] NABARRO L E B, SHANKAR C, PRAGASAM A K, et al. Clinical and bacterial risk factors for mortality in children with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bloodstream infections in India[J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(6):161-166.

(收稿日期:2018-06-02 修回日期:2018-09-08)