

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(1):99-104; 4 January 2013  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 携带 $bla_{NDM-1}$ 的质粒 pNDM-BJ01 在鲁氏不动杆菌中的适应度代价

徐丽<sup>1,2</sup>, 吕瑞辰<sup>2</sup>, 王海燕<sup>3</sup>, 胡红焱<sup>3</sup>, 赵向娜<sup>2</sup>, 杨瑞馥<sup>2</sup>, 赵建宏<sup>1\*</sup>, 宋亚军<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>河北医科大学第二医院, 河北省临床检验中心, 石家庄 050000

<sup>2</sup>病原微生物生物安全国家重点实验室, 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071

<sup>3</sup>武警总医院检验科, 北京 100039

**摘要:**【目的】了解编码新德里金属- $\beta$ -内酰胺酶-1 ( $bla_{NDM-1}$ ) 的质粒 pNDM-BJ01 在鲁氏不动杆菌 10621 菌株中的适应度代价, 进而评估该质粒在鲁氏不动杆菌群体中存续和扩散的潜能。【方法】通过不含亚胺培南的液体培养基连续传代培养, 获得抗性质粒丢失的 10621 衍生菌株, 利用生长曲线、生物被膜、无营养生存时间等体外适应度测量实验, 分析 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 及质粒缺失的 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 之间的适应度差异。【结果】pNDM-BJ01 在 10621 菌株中不稳定, 连续传代 11 次即在群体中完全丢失。在 26℃ 和 37℃ 下, 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 与 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株的生长曲线无显著性差异。在 26℃ 条件下, 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株形成生物被膜的能力明显强于 10621<sub>NDM-1(+)</sub>, 而在 37℃ 条件下, 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 强于 10621<sub>NDM-1(-)</sub>。在无营养的 PBS 缓冲液中, 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株生存能力明显高于 10621<sub>NDM-1(+)</sub>。【结论】编码  $bla_{NDM-1}$  的质粒 pNDM-BJ01 在鲁氏不动杆菌中具有较大的适应度代价, 缺失这一质粒的菌株在外界环境中的生存能力强于抗性菌株, pNDM-BJ01 在鲁氏不动杆菌存续与扩散的能力有限。

**关键词:** 鲁氏不动杆菌, 新德里金属- $\beta$ -内酰胺酶-1, 生物被膜, 适应度代价

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 01-0099-06

新德里金属- $\beta$ -内酰胺酶-1 (New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase-1,  $bla_{NDM-1}$ ) 是 2009 年在肺炎克雷伯氏菌中发现的一种新型  $\beta$ -内酰胺酶, 对包括碳青霉烯类在内的各种  $\beta$ -内酰胺类抗生素具有广谱水解作用<sup>[1]</sup>。2010 年, 英国科学家发现了一些携带  $bla_{NDM-1}$  的肺炎克雷伯氏菌和大肠杆菌对几乎所有一线治疗重症感染的广谱抗生素都具有抗性, 因此被媒体称为“超级细菌”, 在世界范围内引起了一定的恐

慌<sup>[2]</sup>。随后, 在世界各地都发现了携带  $bla_{NDM-1}$  的细菌, 我国也陆续在不动杆菌、大肠杆菌、嗜麦芽寡食单胞菌等中发现了  $bla_{NDM-1}$ <sup>[3]</sup>。目前所发现的  $bla_{NDM-1}$  编码基因多位于质粒上, 可以通过水平转移扩散到其他细菌中, 存在耐药性蔓延的风险<sup>[4]</sup>。

适应度 (Fitness) 在指某种环境条件下, 某已知基因型的个体将其基因传递到其后代基因库中的相对能力。适应度是衡量个体存活和生殖机会的尺

基金项目: 病原微生物生物安全国家重点实验室课题 (SKLPBS-4201)

\* 通信作者。宋亚军, Tel: +86-10-66948582, E-mail: songyajun88@gmail.com; 赵建宏, Tel: +86-311-66002711, E-mail: zhaojh\_2002@yahoo.com

作者简介: 徐丽 (1986-), 女, 河北沧州人, 硕士研究生, 主要从事鲍曼不动杆菌的分子流行病学研究。E-mail: xuli0404d@163.com

收稿日期: 2012-09-10; 修回日期: 2012-10-30

度,适应度越大,存活和生殖机会越高。细菌在面对抗生素选择压力时,可以通过突变、基因水平转移等各种变异机制获得耐药性;而当抗生素压力解除时,抗性菌株中的某些耐药机制(如酶的产生、外排泵系统的高表达等)会成为菌株的额外负担,其适应度可能小于野生型菌株,这一现象被称为适应度代价(Fitness costs)<sup>[5]</sup>。如果某一耐药机制的适应度代价很大,那么在抗生素压力不存在的情况下,耐药菌株无法与野生型菌株竞争,将会很快被从群体中清除。因此,对特定菌株的特定耐药机制进行适应度代价评估,将有助于了解这一机制在群体中被固定以及继续扩散的潜力。

鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)为非发酵性革兰氏阴性杆菌,广泛存在于自然界中,属于条件致病菌,也是医院感染的重要病原菌之一<sup>[6]</sup>。近年来,鲁氏不动杆菌在临床标本中的分离率有增加趋势,其分离率在2010年居我国临床分离非发酵革兰氏阴性杆菌的第五位,且耐药性逐年上升<sup>[7]</sup>。鲁氏不动杆菌10621是2010年分离的一株多重耐药菌株,其 $bla_{NDM-1}$ 编码基因位于pNDM-BJ01质粒(47.2kb)上;接合实验表明,pNDM-BJ01可以高频转移到大肠杆菌中<sup>[8]</sup>。为评价pNDM-BJ01质粒扩散的风险,我们对其在鲁氏不动杆菌中的适应度代价进行了初步研究,现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

dNTPs、RNase 和 GoldView 染料购自北京欣经科生物有限公司, *Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker DL2000 购自 TaKaRa 公司, Mueller Hinton Broth

(MH) 培养基购自 Oxoid 公司,亚胺培南(Imipenem, IPM) 购自北京药品检定所,琼脂粉购自 GeneTech 公司,PTC-100 热循环仪购自 BIO-RAD 公司,DYY-7 电泳仪购自北京六一仪器厂,生物安全柜购自 Thermo 公司,Beck DU600 紫外分光光度计购自 BECKMA 公司,HZQ-X100 型恒温震荡培养箱购自江苏太仓市实验设备厂。

### 1.2 抗性丢失菌株制备

携带  $bla_{NDM-1}$  的鲁氏不动杆菌 10621 菌株(10621<sub>NDM-1(+)</sub>)由武警总医院提供<sup>[8-9]</sup>。10621<sub>NDM-1(+)</sub>在 MH 液体培养基中振荡过夜培养,取培养物按 1:50 比例接种新鲜 MH 液体培养基;并将培养液稀释至适宜稀释度,分别涂于含 IPM (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及不含 IPM 的 MH 固体培养基上进行菌落计数,并计算抗性菌落比例(含 IPM 培养基菌落数/不含 IPM 培养基菌落数)。连续重复上述传代及计数过程,直至含 IPM 培养基上无菌落生长,从不含 IPM 的 MH 培养基上获取单菌落,即为抗性丢失的菌株(10621<sub>NDM-1(-)</sub>)。

### 1.3 PCR 验证

根据 10621 菌株  $bla_{NDM-1}$  所在质粒 pNDM-BJ01 的序列(登录号 JQ001791)<sup>[8]</sup>,设计覆盖不同区域的引物(表 1),验证 10621<sub>NDM-1(-)</sub>菌株中 pNDM-BJ01 的缺失。PCR 反应总体积 30  $\mu\text{L}$ ,其中 10  $\times$  PCR buffer 3  $\mu\text{L}$ , 20 mmol/L dNTP 0.1  $\mu\text{L}$ , 5U / $\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mmol}/\text{L}$  上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,模板 5  $\mu\text{L}$ (10 ng/ $\mu\text{L}$ ),去离子水 20.7  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为,95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s,56 $^{\circ}\text{C}$  退火 40 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 50 s,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min。

表 1 pNDM-BJ01 质粒引物序列及相关信息

Table 1 Primers used for amplifying fragments plasmid of pNDM-BJ01

Primers	Sequences (5' $\rightarrow$ 3')	Size/bp	Region <sup>*</sup>
P1	CGACAACGCATTGGCATAAG	262	$bla_{NDM-1}$
P2	CTGGCAGCACACTTCCTATC		
P3	TGAGCCCGTACTTCGTCA	719	13406 - 14124
P4	GCCGTGCTTCTGGTCTTCGTT		
P5	AAGATGGCGGCTATGGA	1334	9940 - 10773
P6	CGGCAACATTCGTCCGATTTA		
P7	ATACGCATCTAAACGAGTAATAAGCCT	2591	45374 - 668 <sup>**</sup>
P8	ATCAGTAGCCCATGACGGTAAAT		

<sup>\*</sup>: Position of primers on plasmid pNDM-BJ01; <sup>\*\*</sup>: Covering the annotated position "0" of plasmid pNDM-BJ01.

## 1.4 生长曲线绘制

将 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株分别接种至含 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IPM 的 MH 液体培养基和不含 IPM 的 MH 液体培养基, 过夜活化培养后再转接至相应培养基中增菌至  $OD_{600}$  为 1.0。将菌液按 1:20 倍稀释再次转接至不含 IPM 的 MH 液体培养基中, 每隔 1h 测其  $OD_{600}$  值, 连续监测 10 h 并绘制生长曲线, 每株菌重复 3 次。

## 1.5 生物被膜实验

将过夜培养的 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 及 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌液转接至新鲜 MH 液体培养基中, 增菌至  $OD_{600}$  为 1.0 后, 4 $^{\circ}\text{C}$  静置 8h, 1:100 倍稀释转接到新鲜 MH 液体培养基中, 在 26 $^{\circ}\text{C}$  及 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下, 100 r/min 分别振荡培养 48h。经 0.5% 结晶紫溶液染色后, 分别测定菌液的  $OD_{600}$  值及 95% 乙醇脱色后的  $OD_{570}$  值<sup>[10]</sup>, 根据下列公式计算: 生物被膜相对形成量 =  $1000 * OD_{570} / (OD_{600} * A * B)$  (A: 培养基体积; B: 脱色液体积)。重复 3 次实验, 比较两菌株生物被膜形成能力。

## 1.6 无营养生存能力

将过夜培养的 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 及 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌液分别转接至含 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IPM 的 MH 液体培养基和不含 IPM 的 MH 液体培养基中, 26 $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 增菌至  $OD_{600} = 1.0$ , 8000  $\times$  g 离心 5 min 集菌, 弃上清, 用等量 PBS 缓冲液洗菌一次, 再次离心后将菌重悬于 PBS 缓冲液中, 并稀释至适宜稀释度涂布至 MH 固体培养基计数, 记录初始值 (A), 26 $^{\circ}\text{C}$  静置, 每天取样稀释并计数 (B), 计算两菌株的生存率 (B/A)。

## 2 结果

### 2.1 抗性丢失及 PCR 验证

在没有抗生素选择压力的情况下, 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 的抗性表型非常不稳定, 从第 2 代开始, 群体中具有 IPM 抗性的个体在群体中的比例急剧下降, 到第 4 代时, 抗性个体比例已低于 50%; 而传至第 11 代时, IPM 抗性表型已完全消失。利用 pNDM-BJ01 质粒上的 4 对引物扩增 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 的 DNA 模板, 发现不仅 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株中  $bla_{NDM-1}$  编码基因扩增阴性, 其余 3 对引物也无扩增条带。以上结果表明, 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株已经丢失了

pNDM-BJ01 质粒, 导致其表现为亚胺培南敏感表型。

### 2.2 生长曲线

图 1 显示了 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株在相同的培养条件下的生长曲线。可以看到在不含 IPM 的 MH 培养基中, 26 $^{\circ}\text{C}$  培养条件下, 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株在对数期生长略微比丢失抗性的 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株慢, 但差别不显著, 两者到达平台期的时间和菌浓度没有明显差异 (图 1-A)。在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养条件下, 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株与 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株相比, 对数期生长以及到达平台期的时间的差异要大于 26 $^{\circ}\text{C}$  培养条件, 但两菌株之间的差异没有统计学显著性 (图 1-B)。这一结果表明, 在人工培养条件下, 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株的生长特性没有显著性差异。

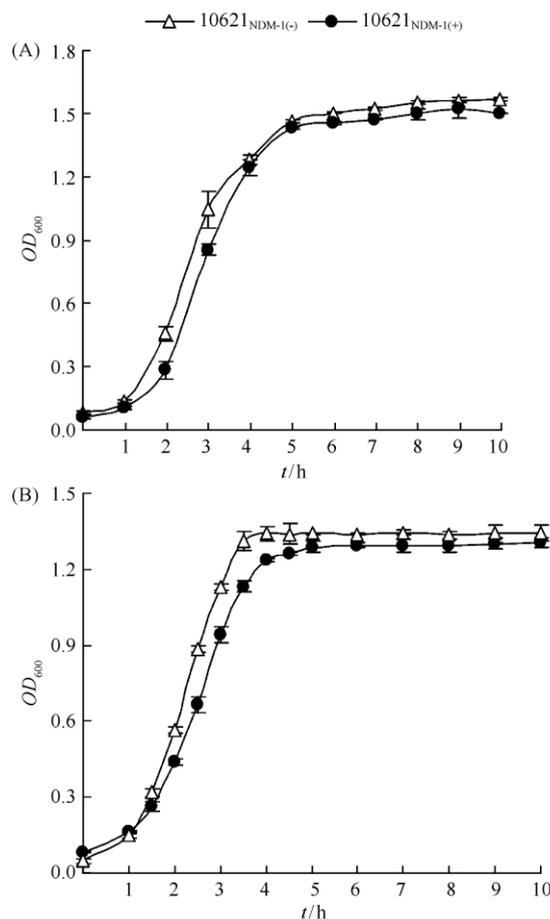


图 1 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株在不含 IPM 的 MH 培养基中的生长曲线

Fig.1 The growth curves of 10621<sub>NDM-1(+)</sub> and 10621<sub>NDM-1(-)</sub> on the imipenem-free MH media. A: 26 $^{\circ}\text{C}$  culture; B: 37 $^{\circ}\text{C}$  culture.

### 2.3 生物被膜形成能力

本文利用经典的结晶紫染色方法对 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株的生物被膜形成能力进行了测试。在 26℃ 培养时, 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株形成生物被膜的能力要强于 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株 (图 2-A,  $P < 0.01$ , 2-tailed t test); 而在 37℃ 培养条件下, 情况正好相反, 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株形成生物被膜的能力要弱于 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株 (图 2-B,  $P < 0.01$ )。

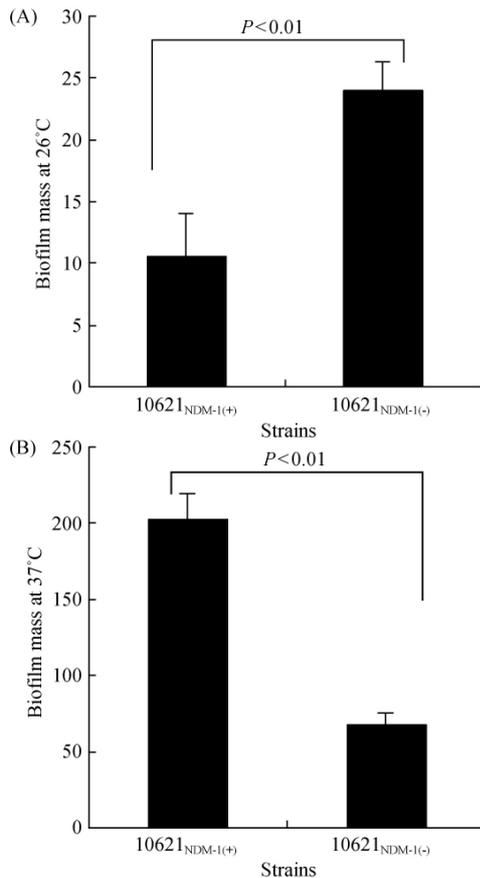


图 2 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株在不含 IPM 的 MH 培养基中的生物被膜相对形成量  
Fig. 2 The biofilm mass of 10621<sub>NDM-1(+)</sub> and 10621<sub>NDM-1(-)</sub> on the imipenem-free MH media. A: culture at 26°C; B: culture at 37°C.

### 2.4 无营养生存时间

本文测试了 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株在无营养的 PBS 缓冲液中的生存时间。如图 3 所示, 在 PBS 缓冲液中, 具有 IPM 抗性的 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株生存能力很弱, 在第 1 天就急剧下降到 5% 以下, 到第 6 天已经无法检测到存活的菌体。而丢失

pNDM-BJ01 质粒、IPM 敏感的 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株在无营养的 PBS 缓冲液中的生存能力明显强于 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株, 在第 1 天有超过 30% 的菌体存活, 而到实验终止的第 7 天, 仍有 5% 左右的生存率。

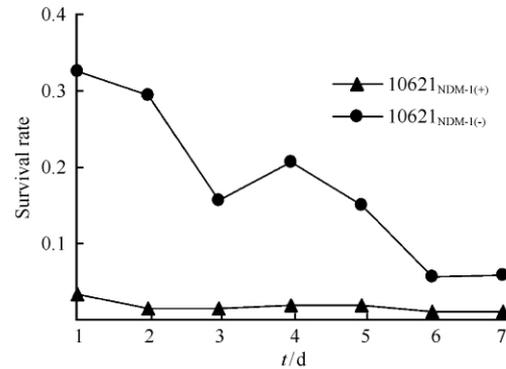


图 3 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 和 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株在 PBS 缓冲液中生存时间的比较。

Fig. 3 The survival rates of 10621<sub>NDM-1(+)</sub> and 10621<sub>NDM-1(-)</sub> in nutrient-free PBS buffer.

## 3 讨论

自从 2009 年首次被命名以来, *bla*<sub>NDM-1</sub> 及其变异体已经在世界各地出现, 尽管最近受到了极大关注, 从其性质而言, 只是众多能水解碳青霉烯类抗生素的金属-β-内酰胺酶之一<sup>[11]</sup>。已具备非 β-内酰胺类抗生素耐药背景的细菌如果获得 *bla*<sub>NDM-1</sub>, 将出现多药耐药表型, 而单纯携带 *bla*<sub>NDM-1</sub> 的细菌自身并不能成为“超级细菌”。如果排除人员流动等因素的影响, *bla*<sub>NDM-1</sub> 扩散的潜能与其所在质粒的适应度代价密切相关。

本研究表明, 在鲁氏不动杆菌中, 编码 *bla*<sub>NDM-1</sub> 的 pNDM-BJ01 质粒非常不稳定, 解除抗生素压力后, 仅需传代 11 次, 质粒就自行丢失, 恢复 IPM 敏感表型。我们针对所获得的 pNDM-BJ01 质粒缺失 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 菌株, 评价了其在鲁氏不动杆菌中的适应度代价, 旨在了解这一质粒在群体中存续和扩散的潜能。

在 26℃ (模拟自然温度) 及 37℃ (模拟人体温度) 两种环境下, 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 较 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株在对数期时生长速度稍快, 但是差别不太明显, 说明在相同的人工培养条件下两株菌生长特性差别不

大。有趣的是,在模拟外界环境温度和人体温度进行培养时,含有及缺失 pNDM-BJ01 质粒的菌株在生物被膜形成量上却呈现两种截然不同的结果:26℃ 时 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 比 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 形成生物被膜能力强,但在 37℃ 时却相反。生物被膜是由特定细胞外基质包裹微生物群落形成的表面结构,生物被膜的形成过程就是微生物吸取外界营养,抵御外来侵袭,不断增强自身生长与环境适应能力的过程<sup>[12]</sup>。生物被膜实验结果提示,在外界自然环境中,10621<sub>NDM-1(-)</sub> 生存能力可能更强,而在感染过程中,10621<sub>NDM-1(+)</sub> 可能在体内具有更强的生存力,这一现象值得进一步研究。而无营养生存实验进一步表明,缺失 pNDM-BJ01 质粒的 10621<sub>NDM-1(-)</sub> 的生存能力显著高于 10621<sub>NDM-1(+)</sub> 菌株。

由此可见,pNDM-BJ01 质粒对于鲁氏不动杆菌而言具有较大的适应度代价,如果不存在抗生素压力,这一质粒会很快丢失。因此,遏制碳青霉烯类抗生素的滥用是控制  $bla_{NDM-1}$  蔓延的有效手段之一,携带  $bla_{NDM-1}$  的“超级细菌”是可以防控的<sup>[13]</sup>。需要指出的是,本研究只关注了鲁氏不动杆菌中 pNDM-BJ01 质粒与某些适应度表型的关系,我们尚不能确定是否还有其他基因组上的变异与所发现的适应度差异相关,这需要借助全基因组序列测定等分辨率更高的技术手段进行深入分析。

## 参考文献

- [1] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene,  $bla_{NDM-1}$ , and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53 (12): 5046-54.
- [2] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10 (9): 597-602.
- [3] Chen Y, Cui Y, Pu F, Jiang G, Zhao X, Yuan Y, Zhao W. Draft genome sequence of an *Acinetobacter* genomic species 3 strain harboring a  $bla_{NDM-1}$  gene. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (1): 204-5.
- [4] Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11 (5): 355-62.
- [5] Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8 (4): 260-71.
- [6] Turton JF, Shah J, Ozongwu C, Pike R. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48 (4): 1445-9.
- [7] Li Y, Lü Y, Wang S. Mohnarin report 2010: surveillance of antimicrobial resistance in nonfermenting gram-negative bacteria. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2011, 21 (24): 5133-7. (in Chinese)  
李耘, 吕媛, 王珊. 2010 年度卫生部全国细菌耐药监测报告: 非发酵革兰阴性杆菌耐药监测. 中华医院感染学杂志, 2011, 21 (24): 5133-7.
- [8] Hu H, Hu Y, Pan Y, Liang H, Wang H, Wang X, Hao Q. Novel plasmid and its variant harboring both a  $bla_{NDM-1}$  gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56 (4): 1698-702.
- [9] Hu Y, Zhang W, Liang H, Liu L, Peng G, Pan Y, Yang X. Whole-genome sequence of a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter lwoffii*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (19): 5549-50.
- [10] Marti S, Rodriguez-Bano J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H, De E. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Research Notes*, 2011, 4: 5.
- [11] Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2011, 65: 455-78.
- [12] Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros JM, Pachon J, Pascual A. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14 (3): 276-8.
- [13] Yang R. Should we be panicky about the “Super bacteria” bearing the  $bla_{NDM-1}$ ? *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2010, 44 (10): 874-5. (in Chinese)  
杨瑞馥. 携带新德里金属- $\beta$ -内酰胺酶耐药基因的“超级细菌”可怕吗? 中华预防医学杂志, 2010, 44 (10): 874-5.

## Fitness costs of $bla_{NDM-1}$ bearing plasmid pNDM-BJ01 in *Acinetobacter lwoffii*

Li Xu<sup>1,2</sup>, Ruichen Lv<sup>2</sup>, Haiyan Wang<sup>3</sup>, Hongyan Hu<sup>3</sup>, Xiangna Zhao<sup>2</sup>, Ruifu Yang<sup>2</sup>, Jianhong Zhao<sup>1\*</sup>, Yajun Song<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>The Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Provincial Center for Clinical Laboratories, Shijiazhuang 050000, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

<sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, The General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the fitness costs of the New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase-1 ( $bla_{NDM-1}$ ) bearing plasmid pNDM-BJ01 in *Acinetobacter lwoffii* strain 10621, and to evaluate the potentials of the sustainability and expansions among the *Acinetobacter lwoffii* population. [Methods] We obtained the spontaneous mutant of *A. lwoffii* missing pNDM-BJ01, 10621<sub>NDM-1(-)</sub> via serial passages of the wild strain 10621<sub>NDM-1(+)</sub> on the antibiotics-free media. We then compared the *in vitro* fitness of these two strains by measuring the growth curves, the ability of biofilm formation and the survival rates in nutrient-free PBS buffer. [Results] Plasmid pNDM-BJ01 was unstable in *A. lwoffii* strain 10621, and 11 passages will be enough to get it deleted from the ancestral strain. We found no significant difference in the growth curves either at 26 or 37 °C for 10621<sub>NDM-1(+)</sub> and 10621<sub>NDM-1(-)</sub>. The biofilm formation ability of the plasmid free derivative 10621<sub>NDM-1(-)</sub> was significant higher than its resistant ancestor 10621<sub>NDM-1(+)</sub> at 26 °C, whereas the latter showed higher ability of biofilm formation at 37 °C. Strain 10621<sub>NDM-1(+)</sub> was vulnerable in the nutrient-free PBS buffer, with less than 5% survival rate on the first day and dying out on the sixth day, whereas 10621<sub>NDM-1(-)</sub> survived till the seventh day. [Conclusion]  $bla_{NDM-1}$  bearing plasmid pNDM-BJ01 possesses significant fitness costs in *A. lwoffii* strain 10621, and it will get depleted easily if the antibiotic press released. pNDM-BJ01-free 10621<sub>NDM-1(-)</sub> strain has higher fitness than its ancestor, 10621<sub>NDM-1(+)</sub>, which implies the limited expansion potential of plasmid pNDM-BJ01 in *A. lwoffii*.

**Keywords:** *Acinetobacter lwoffii*, New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase-1, biofilm, fitness costs

(本文责编:王晋芳)

Supported by the State Key Laboratory Funds (SKLPBS-1201)

\* Corresponding authors. Yajun Song, Tel: +86-10-66948582, E-mail: songyajun88@gmail.com; Jianhong Zhao, Tel: +86-311-66002711, E-mail: zhaojh\_2002@yahoo.com

Received: 10 September 2012 / Revised: 30 October 2012