

大肠杆菌中一种新类型的超广谱 β -内酰胺酶

程玉林 李银太** 陈民钧

(中国医学科学院北京协和医院 北京 100730)

摘 要 出现于北京协和医院的一耐头孢噻甲羧肟的临床分离菌株大肠杆菌(*E. coli* 5518), 含有一约 7.5kb 的耐药质粒, 编码产生一种新类型的超广谱 β -内酰胺酶(ESbla)。除了头霉甲氧噻吩和亚胺硫霉素外, 产酶菌株对所测定的多种 β -内酰胺类药物都耐药。该菌株耐 β -内酰胺类药物的特性可接合传递给 *E. coli* JP559 菌株, 与之一起转移的还有耐氨基糖甙类和磺胺类药物的特性。 β -内酰胺酶抑制剂棒酸能抑制此酶的活性。此 ESbla 基因既不与 SHV-1 也不与 TEM-1 的结构基因片段杂交。

关键词 大肠杆菌, 超广谱 β -内酰胺酶, Southern 杂交

超广谱 β -内酰胺酶(ESbla)是一类质粒介导的酶, 除了能水解老一代的 β -内酰胺类药物外, 尤其是能水解三代头孢菌素及噻肟单酰胺菌素等新一代 β -内酰胺类药物。目前已发现了至少 16 种 TEM 类的 ESbla、4 种 SHV 类 ESbla^[1-2] 及少数不常见的源自染色体酶 AmpC 的 ESbla。本文报道不属于以上三种类型的一种新类型的 ESbla。

1 材料和方法

1.1 菌株

与本实验有关的菌株及质粒见表 1。

1.2 主要试剂与抗菌素

DNA 限制性内切酶、溶菌酶、dNTP、DNAase I、RNase A、DNA 聚合酶 I 购自华美生物技术公司; [α -³²P]dATP 购自福瑞公司。

利福平(rifampicin, rif, 沱滨药厂), 奈啶酸(clavulanate, cla, 博山药厂), 氨苄青霉素(ampicillin, amp, 上海第四药厂), 头孢噻肟(cephaloridine, cer)、头孢唑啉(cefazolin, czl)均为沱滨药厂产品, 头孢呋肟(cefuroxime, cxm)、头孢他啶(ceftazidime, caz)均为 Glaxo 公司产品, 头孢拉啶(cefradin, crd, Squibb 公司), 头孢哌酮(cefoperazone, cpz, Pfizer 公司), 头孢三嗪(ceftriaxone, cft, F. Hoffmanla-Roche 公司), 头孢氨噻肟(cefotaxime, ctx, 长征药厂), 头霉甲氧噻吩(cefaoxitin, fox, MSD 公司), 棒酸(clavulanate, cla, Beecham 公司)。

• 本题系国家自然科学基金资助项目。

** 军事医学科学院。

本文于 1992 年 11 月 6 日收到。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmid

菌 株 Strain	质 粒 Plasmid	有关耐药标志 relevant markers	来 源 Sources
<i>E. coli</i> 5518	pC5518	crx, cfp, ctr, ctx, caz, tmp-smz, kan, str, gen,	本院住院病人分离 Clinical isolate
<i>E. coli</i> JP559		rif, nal	J. Pittat
<i>E. coli</i> JP559	pC5518	caz, kan, str, gen, tmp-smz, rif, nal	本工作 This work
<i>E. coli</i> HB101	pMON38	amp(SHV-1), cm	G. A. Jacoby ^[14]
<i>E. coli</i> C600	pBR322	amp(TEM-1), tet	G. A. Jacoby ^[13]
<i>E. coli</i> ATCC 25922			美国国家菌种库 ATCC

缩写, crx, 头孢呋肟; cfp, 头孢哌酮; ctr, 头孢三嗪; ctx, 头孢噻肟; caz, 头孢噻甲羧肟; fox, 头霉甲氧噻吩; tmp-smz, 甲氧苄氨嘧啶-磺胺异噻唑类; kan, 卡那霉素; str, 链霉素; gen, 庆大霉素; rif, 利福平; nal, 奈哌酸; amp, 氨苄青霉素; cm, 氯霉素; tet, 四环素。

Abbrev., crx, cefuroxime; cfp, cefoperazone; ctr, ceftriaxone; ctx, cefotaxime; caz, ceftazidime; fox, cefoxitin; tmp-smz, trimethoprim-sulfamethoxazole; kan, kanamycin; str, streptomycin; gen, gentamicin; rif, rifampicin; nal, nalidixic acid; amp, ampicillin; cm, chloramphenicol; tet, tetracycline.

1.3 接合试验^[3-4]

将 0.2ml 供体菌 *E. coli* 5518(pC5518) (耐 caz) 的过液培养物, 与 1.8ml 受体菌 *E. coli* JP559(耐 rif 和 nal) 的过夜培养物混合, 加到滤膜上($\Phi 0.45\mu\text{m}$), 将滤膜放到脑心浸液琼脂平皿上, 培养 2 小时。再将滤膜上的细菌用肉汤洗下, 经适当稀释后涂到选择平皿上(含 caz $15\mu\text{g/ml}$, rif $385\mu\text{g/ml}$ 和 nal $380\mu\text{g/ml}$) 选择接合子。

1.4 药物敏感性试验

采用改良的 Kirby-Bauer 法^[5]。最小抑菌浓度(MIC₅₀)的测定采用琼脂稀释法^[6]或用 Baxter 公司的 Microscan MIC 板, 按其说明书操作。

1.5 多种头孢菌素相对水解率的测定^[7-8]

将细菌接入含 amp $15\mu\text{g/ml}$ 的肉汤中, 37°C 培养过夜。在冰浴条件下超声破碎细菌, 4°C 条件下 22000r/min 离心 30 分钟, 上清液即为 β -内酰胺酶粗提液。以 cer 为底物, 测粗酶液的酶活力。

头孢菌素有一 β -内酰胺环, 因而在波长 260nm 左右有一与之有关的吸收峰, 当被酶水解 β -内酰胺环破裂后, 此处吸收峰降低。测定头孢菌素经酶水解前后的 OD 值, 并以 cer 为标准, 计算出相对水解率。测定时, 用紫外分光光度计扫描, 并参照文献^[7-8], 选择最适测定波长(nm)如下: cer, 255; czl, 265; cxm, 265; cpz, 275; cft, 257; ctx, 257; caz, 257, fox, 260。

$$\text{相对水解率} = \frac{\text{其它头孢菌素反应前后的 } \Delta\text{OD}}{\text{cer 反应前后的 } \Delta\text{OD}} \times 100\%$$

1.6 质粒 DNA 的提取

质粒 DNA 提取方法见文献[9—10]。大量提取时,采用碱法裂解,然后用 CsCl-EB,不连续梯度平衡离心法纯化质粒 DNA。

1.7 Southern 杂交

探针片段的酶切、回收均参见文献[10]。采用缺口翻译法,以 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 标记探针。杂交后按如下步骤漂洗杂交膜^[13]: $1\times\text{SSPE}$ -0.1%SDS 室温洗 10 分钟; $0.1\times\text{SSPE}$ -0.1%SDS 65℃洗 30 分钟; $0.1\times\text{SSPE}$ -0.1%SDS 室温洗 10 分钟; 3mmol/L Tris-碱(pH9.5)洗 10 分钟。

2 结果

2.1 接合实验

在接合实验中,为了有利于筛选,选用了既耐 rif 又耐 nal 的 *E. coli* JP559 做为受体菌,然后在选择平皿中加了 rif、nal 和 caz 三种抗生素。从这样的选择平皿上,得到了临床分离菌株 *E. coli* 5518 的接合子 *E. coli* JP559(pC5518)。

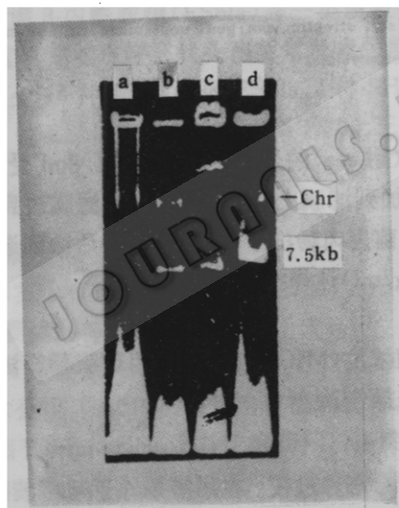


图 1 供体菌、受体菌及接合子质粒 DNA 粗提液的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of crude lysates of donor recipient and transconjugant lanes: a, Recipient, *E. coli* JP559; b, Transconjugant of *E. coli* 5518; c, Donor, *E. coli* 5518; d, Marker, pMON21.

2.2 最小抑菌浓度(MICs)

菌株对多种 β -内酰胺类药物的 MICs 见表 3。其中敏感菌 *E. coli* ATCC 25922 为质控菌株,实验测得的此菌对多种 β -内酰胺类药物的 MICs 与文献上的一致^[12]。

E. coli JP559(pC5518)与供体菌有一相同的质粒带(图 1),说明临床分离菌株 *E. coli* 5518 含有一可转移质粒,命名为 pC5518,其上有耐 caz 的基因。药物敏感性试验的结果显示(表 2),随着耐 caz 特性的转移,*E. coli* 5518 的耐其它 β -内酰胺类药物、链霉素、卡那霉素、庆大霉素和 TMP-SMZ 的特性也同时转移至其接合子 *E. coli* JP559(pC5518)。

从图 1 中还可见到,供体菌 *E. coli* 5518 含有大小不同的两种质粒,仅小质粒 pC5518 才出现在接合子中,此质粒小于 10kb (约 7.5kb),很可能不属于自转移类的质粒,可能需要在与之共存的大质粒协助下才能转移^[11]。

表 2 供体菌、受体菌和接合子间耐药谱的差别

Table 2 The resistance profile differences among donors, recipients & transconjugants

菌株 Strain	链霉素 Streptomycin		卡那霉素 Kanamycin		庆大霉素 Gentamicin		黄胺类 TMP-SMZ		头孢噻甲羧肟 Ceftazidime	
<i>E. coli</i> 5518	R	6 [#]	R	6	R	6	R	6	R	9
<i>E. coli</i> JP559(pC5518)	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10
<i>E. coli</i> JP559	S	21	S	23	S	21	S	25	S	27

R:耐药;S:敏感; #:抑菌圈直径(mm)。Abbrev.: R:resistant; S:sensitive; #:inhibition diameter(mm).

表 3 β -内酰胺类抗菌素对不产或产各种质粒介导的 β -内酰胺酶的大肠杆菌菌株的最小抑菌浓度

Table 3 MICs(μ g/ml) of β -Lactams for *E. coli* and its derivatives producing different plasmid-mediated β -Lactamases

β -内酰胺类药物 β -Lactams	<i>E. coli</i>					
	5518 (pC5518)	JP559 (pC5518)	HB101 (pMON38)	JP559	HB101	ATCC 25922
氨苄青霉素 Ampicillin	>2048	>2048	2048	4	4	4
* + 棒酸 Clavulanate	64	32	4	2	2	2
头孢唑啉 Cefazolin	1024	512	8	2	2	1
* + 棒酸 Clavulanate	2	1	0.5	0.5	0.5	0.5
头孢拉定 Cefradin	256	256	16	8	8	8
* + 棒酸 Clavulanate	8	8	8	8	8	8
头孢呋肟 Cefuroxime	256	256	4	4	1	4
* + 棒酸 Clavulanate	8	4	2	2	1	2
头孢噻甲羧肟 Ceftazidime	128	128	1	0.125	<0.06	<0.06
* + 棒酸 Clavulanate	1	1	0.125	<0.06	<0.06	<0.06
头孢三嗪 Ceftriaxone	>64	>64	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
* + 棒酸 Clavulanate	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
头孢氨噻肟 Cefotaxime	>64	>64	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
* + 棒酸 Clavulanate	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
头孢哌酮 Cefoperazone	128	64	4	0.125	0.125	0.25
* + 棒酸 Clavulanate	0.25	0.25	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
头孢甲氧噻肟 Cefoxitin	2	2	2	2	2	2
* + 棒酸 Clavulanate	2	2	2	2	2	2
亚胺硫霉素 imipenem	\leq 0.5	\leq 0.5	—	—	—	—
噻肟单酰胺菌素 aztreonam	64	32	—	—	—	—

* 代表上一行的抗生素。
棒酸的浓度均为 2 μ g/ml。The conc. of clavulanate is a constant 2 μ g/ml.

含质粒 pMON38 的菌株(产 SHV-1)对二代、三代头孢菌素的 MICs 在 $4\mu\text{g/ml}$ 以下,敏感。对属于青霉素类的氨苄青霉素的 MICs 则较高,为 $2048\mu\text{g/ml}$,加入 β -内酰胺酶抑制剂棒酸后则降为 $4\mu\text{g/ml}$ 。

与之相比,含质粒 pC5518 的菌株对一、二及三代头孢菌素的 MICs 为 $\geq 64\mu\text{g/ml}$,耐药;对噻吩单酰胺菌素的敏感性也降低(MICs 为 $32\mu\text{g/ml}$);对亚胺硫霉素和头霉甲氧噻吩的 MICs 分别为 $0.5\mu\text{g/ml}$ 和 $4\mu\text{g/ml}$,敏感。加入 β -内酰胺酶抑制剂棒酸后,菌株对三代头孢菌素的 MICs 降至 $1\mu\text{g/ml}$ 以下,甚至对于属于一代头孢菌素的头孢唑啉, MICs 也降至 $1\mu\text{g/ml}$ 。表明棒酸对出现在我院的这种 ESbla 有极强的抑制作用。

2.3 β -内酰胺酶的测定

相对水解率的结果见表 4。酶活力单位定义为:规定在 37°C 、 $\text{pH}7.0$ 条件下,每分钟水解 $1\mu\text{mol}$ cer 为 1 个酶活力单位。从表 4 可见,相对水解率的结果与 MICs 的结果基本相符,也与文献上报道的结果基本相符^[7]。ESbla 对一、二、三代头孢菌素的水解率均在 65% 以上,但不能水解头霉甲氧噻吩;与之相比,除了头孢哌酮外,广谱酶类 SHV-1 对其它三代头孢菌素几乎不水解,对二代头孢菌素头孢呋肟的水解率也较低。因头孢哌酮对酶很不稳定,所以对这两种酶的水解率都很高。

表 4 β -内酰胺酶粗提液对各种头孢菌素的水解实验
Table 4 The hydrolysis of β -lactams by β -lactamase crude extracts

酶来源 Sources of enzymes	酶活力 bla activity (U/ml)	相对水解率(cfr=100) Relative rate of hydrolysis (cfr=100)							
		cfr	czl	crx	cfp	ctr	ctx	caz	fox
<i>E. coli</i> JP559 (pC5518, ESbla)	6.1	100	93	72	87	77	75	66	5
<i>E. coli</i> HB101 (pMON38, SHV-1)	6.9	100	70	12	65	8	4	6	6

缩写: cfr, 头孢噻吩; czl, 头孢唑啉; crx, 头孢呋肟; cfp, 头孢哌酮; ctr, 头孢三嗪; ctx, 头孢噻肟; caz, 头孢噻唑; fox, 头霉甲氧噻吩。

Abbrev.: cfr, cephaloridine; czl, cefazolin; crx, cefuroxime; cfp, cefoperazone; ctr, ceftriaxone; ctx, cefotaxime; caz, ceftazidime; fox, ceftoxitin.

2.4 Southern 杂交

用 Bgl I 和 Hinc I 酶切质粒 pBR322, 回收 0.42kb 的片段, 此片段位于 TEM-1 的结构基因内^[13]; 同样用 pvu I 酶切质粒 pMON38, 回收 0.36kb 的片段, 此片段位于 SHV-1 的结构基因内^[14]。用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 标记这两个片段, 作为探针, 与耐药质粒 pC5518 杂交, 所得结果见图 2。在高强度的条件下(stringent condition), 质粒 pC5518 的酶切片段与 TEM-1 探针及 SHV-1 探针均无杂交信号, 说明耐药质粒 pC5518 上的 ESbla 基因既不属于 TEM 类也不属于 SHV 类, 究竟属于哪一类酶还有待进一步研究。

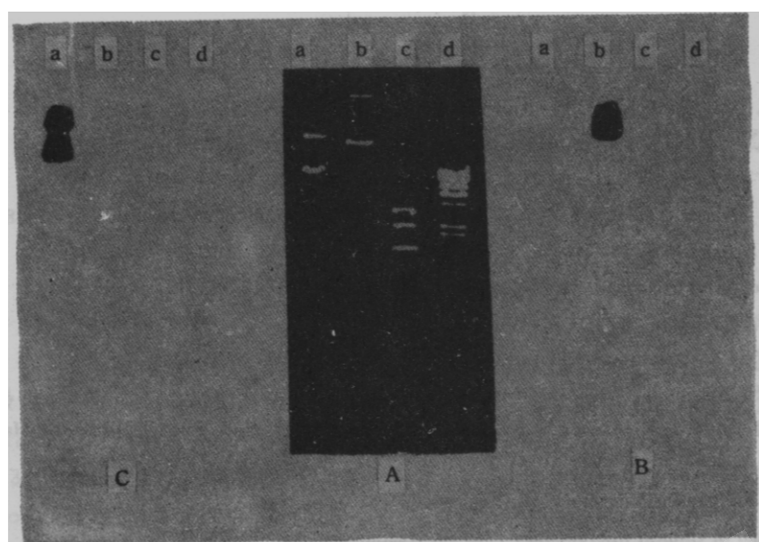


图 2 编码 ESbla 的耐药质粒的 Southern 杂交分析

(A). 经溴化乙锭染色的凝胶;

(B). 凝胶(A)与 TEM-1 探针杂交的放射自显影图;

(C). 凝胶(A)与 SHV-1 探针杂交的放射自显影图.

Fig. 2 Southern blot analysis of R-plasmid encoding ESbla

(A) Gel stained by E. B.; (B) Autoradiogram of gel in

(A) probed with TEM-1; (C) Autoradiogram of gel in (A) probed with SHV-1.

lanes: a, pMON38(SHV-1); b, pBR322(TEM-1); c, pC5518+EcoR I; d, λ DNA+Hind III.

3 讨论

目前已发现了多种 ESbla。它们能水解几乎所有的 β -内酰胺类抗菌素,使得产 ESbla 的菌株对多种 β -内酰胺类药物表现出交叉耐药现象。分布最广的为 TEM 类和 SHV 类的 ESbla,它们都不能水解头霉素,如头霉甲氧噻吩,可被棒酸抑制;但也报道了少数不常见的来源于 ampC 的 ESbla,如 MIR-1,这类酶能水解头霉素,不被棒酸抑制^[1-2]。杂交试验的结果显示,*E. coli* 5518 产生的 ESbla 既非 TEM 也非 SHV;由于它可被棒酸抑制,不能水解头霉甲氧噻吩,因而也不可能是 ampC 类的 ESbla,看来这是一种新类型的酶。其起源如何还有待于进一步证实。

此外,国外文献报道,携带 ESbla 基因的质粒都较大,在 50kb 以上^[2],而出现在我院携带此新类型 ESbla 基因的质粒却很小,不到 10kb。

目前,抗生素广泛应用,在此选择性压力下,在医院中很容易出现多重耐药株。这一现象在我们的实验中也得到了证实。多重耐药质粒是造成多重耐药最主要的原因。上述的研究结果显示,出现在我院的这一约 7.5kb 的小耐药质粒上,除了有 ESbla 基因外,同时还有耐氨基糖甙类及磺胺类药物的基因。多个耐药基因在同一个质粒上的富集过程中,转座子显然起了巨大的作用^[15]。我们正在进一步研究此耐药质粒的起源,企图探讨其形成的分子机制。

参 考 文 献

- [1] Phippon A, Labia R, Jacoby G A. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989, **33**: 1131—1136.
- [2] Jacoby G A, Medeiros A A. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, **35**: 1697—1704.
- [3] Braydley D E, Taylor D E, Cohen D R. *J Bacteriol*, 1980, **143**: 1466—1470.
- [4] Grinsted J, Bennett P M. *Methods in Microbiology*. 2nd ed. London: Academic Press, 1988. 59—60.
- [5] Bauer A W, Kirby W M M, Sherris J C *et al.* *Am J Clin Pathol*, 1966, **45**: 493—496.
- [6] NCCLS. Tentative Standard NCCLS Document M7-T2, Villanova: NCCLS, 1988. 5—11.
- [7] 施耀国, 吴培君, 汪 复, 等. 抗生素, 1985, **10**: 263—267.
- [8] Yang Y, Wu P J, Livermore D M. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, **34**: 755—758.
- [9] Takahashi S, Nagano Y. *J Clin Microbiol*. 1984, **20**: 608—613.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1. 25—1. 52.
- [11] Willetts N, Wilkins B. *Microbiol Rev*, 1984, **48**: 24—41.
- [12] ASM. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington: AMS, 1990. 1114.
- [13] Huovinen S, Huovinen P, Jacoby G A. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988, **32**: 175—179.
- [14] Mercier J, Levesque R C. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, **34**: 1577—1583.
- [15] Harold C N. *Science*, 1992, **257**: 1064—1073.
- [16] Lee K Y, Hopkins J D, Brien T F O' *et al.* *J Bacteriol*, 1990, **172**: 3229—3236.

A NOVEL EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE IN A CEFTAZIDIME-RESISTANT ISOLATE OF *E. coli*

Cheng Yulin Li Yintai Chen Minjun*

(Beijing Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730)

Abstract A novel extended-spectrum β -lactamase (ESbla) encoded on a plasmid of ~7.5kb, conferring resistance to β -lactams tested except cefoxitin and imipenem, was found in a ceftazidime-resistant isolate of *E. coli* from our hospital. The resistance to β -lactams was transferred by conjugation to *E. coli* JP559 together with the aminoglycosides and sulfonamide resistance. Clavulanate, one of β -lactamase inhibitors, inhibited its activity. This ESbla gene hybridized neither with an intra-genic fragment of SHV-1 nor with that of TEM-1. The molecular origin of that novel ESbla needed to be further studied.

Key words *E. coli*, Extended-spectrum β -lactamase, Southern hybridization

* Corresponding author