

肠毒素质粒的研究

III. 耐药性产肠毒素大肠杆菌的质粒电泳分析

戴庚孙 占丽钦 严世方 程锦珍

(福建医学院微生物学教研室, 福州)

林成水 郭维植 曾凝梅

(福建省卫生防疫站, 福州)

对 20 株人源耐药性产肠毒素大肠杆菌所进行的药敏, 接合, 质粒电泳及肠毒素检测结果表明: 目前我省尚未发现天然形成的 Ent-R 重组质粒。在抗生素的选择压力下, 12 株多重耐药菌株中有 8 株其 R 质粒可与 Ent 质粒共传递给受体菌, 使后者获得与供体一样的抗性与产毒性能, 并在电泳中显示与供体一样的两条大质粒带, 一条为分子量大于 F 质粒的 R 质粒带, 另一为大小相当于 F 质粒的 Ent 质粒带。在一多重耐药菌株中发现一接合子, 多次电泳仅显示一条大于 Ent 质粒的质粒带, 但兼具供体的抗性与产毒两种性能。此接合子在含药与不含药肉汤中连续传代以及再传递给另一受体菌后, 其质粒带及两种性状均保持稳定。据此, 我们推测此质粒带系由转座子插入而形成的 Ent-R 质粒重组体。多重耐药性质粒与肠毒素质粒的共传递及其重组体的形成都将给腹泻的防治带来更大的困难, 应予以重视。

关键词 产肠毒素大肠杆菌; 质粒; 凝胶电泳

产肠毒素大肠杆菌是人类腹泻的重要病原菌之一, 其肠毒素的产生系由质粒 (pEnt) 指令。兼具毒素产生和药物抗性的大肠杆菌可同时带有 pEnt 与 R 质粒。近年来已有资料证明 R 质粒可与 pEnt 一起传递^[1], 也有天然形成的 Ent-R 质粒^[2]及采用转座子人工建成这种类型质粒的报道^{[3][4]}。pEnt 与 R 质粒的共传递或其重组体的形成无疑将给人类带来更大的危害。为探讨福建地区人源大肠杆菌中 pEnt 与 R 质粒的关系, 我们对本省分离的产肠毒素大肠杆菌在药敏试验的基础上, 进行了接合传递和质粒电泳等试验。

材料与方法

(一) 菌种

受检 *E. coli* 菌株 33 株, 由省卫生防疫站于

1974—1982 年从福建地区腹泻病人粪便标本中分离、鉴定, 兔肠阳性者冷冻干燥保存备用(表 1)。

接合传递试验的受体菌 *E. coli* C 600F⁻ Rif^r 及 *E. coli* BF⁻ NaI^r 分别由复旦大学遗传所及中国科学院植物生理研究所惠赠并经我室诱变获得抗性标记。

(二) 药物敏感试验

采用平板稀释法, 详见包幼迪等人的报道^[5]。用以测定磺胺药敏的培养基配方是: 干酪素 1 克, 甘氨酸 1 克, 丙氨酸 1 克, 天冬素 3 克, Na₂HPO₄ 1.5 克, KH₂PO₄ 1 克, 醋酸钠 5 克, 水 1000ml, pH 7.6。所用抗菌药品和浓度分别为: 链霉素 (SM) 20μg/ml, 氯霉素 (CM) 20μg/ml, 四环素 (TC) 40μg/ml, 磺胺嘧啶 (SD) 1000μg/ml, 痢特灵 (Fu) 12 μg/ml, 氨苄青霉素 (AP)

本文于 1984 年 7 月 9 日收到。

本文经包幼迪副教授审阅, 特此致谢。

表 1 33 株大肠杆菌的主要特性与来源

Table 1 Main characteristics and sources of 33 strains of *E. coli*

菌 株 strains	兔肠扎 Rabbit ileal loop test	抗 性 Resistance									来源 Source
		TC	SM	SA	CM	AP	KM	GM	Rif	Nal	
EC 7910-2	- +	++	++	++	++	-	-	-	-	-	人
EC 7915-1											
EC 7926											
EC 7931											
EC 80165											
EC 82100											
EC 7914	- +	++	++	++	-	-	-	-	-	-	人
EC 7920											
EC 7929-2											
EC 80194											
EC A19											
EC 7930	+	++	++	-	++	-	-	-	-	-	人
EC 7904-2	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	人
EC 7922	+	-	++	++	-	-	-	-	-	-	人
EC 7939-1	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	人
EC 7939-2	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	人
EC 7904-1	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	人
EC 7921	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	人
EC 7927	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	人
EC 肖 1	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	人
EC 周 1	- +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	人
EC 8074											
EC 913											
EC 915											
EC 327											
EC 432											
EC 477											
EC 7909											
EC 7911											
EC 7932-1											
EC 7932-2											
EC 7950											
EC 80166											
EC 7930/C600 (No. 1)	+	++	++	-	++	-	-	-	-	-	本文
EC 7930/C600 (No. 4)	-	++	++	-	++	-	-	-	-	-	本文
EC 7930/C600 (No. 3)	+	++	++	-	++	-	-	-	-	-	本文

100 μg/ml, 卡那霉素 (KM) 15 μg/ml, 庆大霉素 (GM) 6 μg/ml 和利福平 (Rif) 100 μg/ml。上述药品均系国产。

(三) 接合传递试验

供体、受体菌分别在普通肉汤中活化六小时后, 接种供体菌液 0.1 ml 和受体菌液 0.4 ml 于

0.5ml 肉汤中混和, 置 37℃ 保温过夜, 然后取 0.1ml 划线在含有利福平 (或喹啉酸) 和四环素 (或链霉素) 的中国蓝平板上 37℃ 过夜, 利用供体的四环素 (或链霉素) 标记和受体的利福平 (或喹啉酸) 标记选择接合子。随机选取 10 个接合子进行药敏和质粒电泳检测。

(四) 质粒电泳检测

按包幼迪等人改良的 *EcKhardt* 法进行^[6], 以 *E. coli* K12-W1485 F⁺ 及 *E. coli* C600 pBR322 为大、小质粒对照。

(五) 肠毒素的检测

选取电泳中出现一条和二条大质粒带的传递接合子, 按林成水等人报道的方法进行^[7]。

结 果

(一) 药敏和接合传递试验

受检 33 株产肠毒素大肠杆菌中, 对一种以上药品耐药的菌株占 20 株 (60.6%)。20 株中对三种与四种药物耐药的各占 6 株, 共 12 株, 称为多重耐药菌株, 占耐药菌株的 60%, 其耐药类型基本一致, 分别为 TC, SM, SD (EC 7930 为 TC, SM, CM) 及 TC, SM, CM, SD。耐一种及二种药物的菌株中未检出可传递的耐药性质粒, 12 株多重耐药菌株中可整体传递所具抗性者占 10 株 (R⁺ 菌株), 尤以耐四种药物的菌株均可传递。接合传递后的接合子所获得的抗性类型与供体菌完全一致。

(二) 多重耐药菌株及其相应传递接合子的质粒电泳

所有多重耐药菌株 (12 株) 均显示两条大质粒带, 其分子量分别大于及相当于 F 质粒 (见图 1)。耐三种药物的菌株有的可同时检出 1—3 条小质粒带, 耐四种药物的菌株均未检出小质粒带。

10 株 R⁺ 菌株的相应传递接合子中, 每株各随机选取 10 个接合子进行质粒电泳结果发现: 10 株中有 8 株, 各自的 10 个接合子中, 有的检出与供体相同的二条大

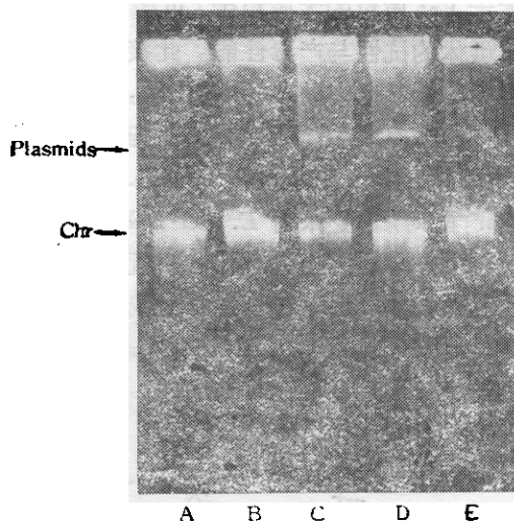


图 1 多重耐药产毒大肠杆菌及其接合子电泳图例
Fig. 1 Gel electrophoresis of enterotoxigenic, multi-resistant *E. coli* and their conjugants

- A. *E. coli* K12 W1485 F⁺ (F plasmid)
- B. *E. coli* 7930 (R and Ent plasmids)
- C. *E. coli* 7930/C600 (No. 1) (R and Ent plasmids)
- D. *E. coli* 7930/C600 (No. 4) (R plasmid)
- E. *E. coli* 7930/C600 (No. 3) (Ent-R plasmid)

质粒带, 有的则仅检出二条中分子量较大的一条大质粒带 (见图 1)。这 8 株自各的 10 个接合子中出现二条与一条大质粒带的比例波动于 2:8—7:3 之间。10 株中的另 2 株, 各自的 10 个接合子却都只检出分子量较大的一条大质粒带。

凡出现两条大质粒带的接合子, 除抗性与供体一致外, 兔肠扎均为阳性; 而仅出现一条大质粒带者其抗性与供体一致, 兔肠扎则为阴性 (pEnt 与 R 质粒重组者例外)。据此可见: 10 株中有 8 株可同时传递药物抗性及毒素产生两种性能; 两条大质粒带中分子量较大的一条为 R 质粒带, 而较小的一条为肠毒素质粒带。

(三) pEnt 与 R 质粒重组体的检出

在接合子的质粒电泳中, 发现一接合子 (7930/C600 No.3) 经多次电泳仅见一

大于 Ent 质粒的大质粒带(见图 1),但兼具供体的抗性与产毒性能。此接合子经在含药与不含药肉汤中传 10 代后,电泳显示同样的一条大质粒带,其抗性与产毒性能也保持稳定。将此接合子与 *E. coli* B F⁻ NaI^r 配对后,受体菌 *E. coli* B F⁻ NaI^r 也仅显示一同样大小的质粒带,且兼具原供体菌的药物抗性与产毒性能。我们初步认为:此一分子量大于 pEnt,能编码毒素产生与多重抗性的质粒带为 pEnt-R 重组体(见图 1)。

讨 论

产肠毒素大肠杆菌中多重耐药菌株的出现引起临床学家与细菌学家的严重关注。1976 年 Ørskov 等人检测世界各地收集的 66 株产肠毒素大肠杆菌时仅发现 6 株耐三种药物的菌株(占 9.09%),而 1978 年 Echeverria 等人^[1]检测从远东收集的 176 株产毒大肠杆菌时,耐三种以上药物的菌株竟高达 90 株(51.1%),多重耐药菌株的数量和所耐药品的种类都有明显增加的趋势。他们在进一步对 20 株兼具抗性与产毒两种性能的菌株进行接合传递试验时发现有 7 株可同时传递两种性能,但未进行质粒 DNA 的电泳检测来鉴定质粒和明确 pEnt 与 R 质粒的关系。在我们的实验中,20 株兼具抗性与产毒性能的大肠杆菌中,有 8 株可传递两种性能,这 8 株全是多重耐药菌株。经电泳、药敏、兔肠扎试验鉴定出两条大质粒带分别为 R 质粒与肠毒素质粒,为此两种质粒可共存于同一细胞中,并可共传递给受体菌提供了证据。

McConnell 等人^[8]在研究人源产肠毒素大肠杆菌时,发现一带有 Ap 抗性的菌株,经接合等实验分离出 Ent-Ap, Ent, Ap 及 Col 等质粒,实验结果提出:pEnt-Ap 系由 Ap 转座于 pEnt 上而形成。1981 年 Mazaitis

等人^[9]采用异源双链电泳术对猪源大肠杆菌的天然带有抗性基因的 pCG 86 肠毒素质粒的基因结构进行深入研究,认为它是由 F_I 组肠毒素质粒与 F_{II} 组耐药性质粒重组而来,或系由一或二个转座子插入而来。我们在实验中所发现的 Ent-R 重组体,来自人源大肠杆菌,且具 TC, CM, SM 三重耐药性,较 Ap 单耐的 Ent 质粒更令人注目。从电泳上看,其分子量远小于 R 质粒与 Ent 质粒之和,仅略大于 Ent 质粒,故推测可能系由 R 质粒上带有抗性基因的 DNA 片段转座子插入而形成。

实验结果提示:在抗生素的选择压力下,不仅可促进 pEnt 与 R 质粒的共传递,甚至可导致 pEnt-R 重组体的形成。此种带有多重耐药基因的 Ent 质粒又可自律传递给其他受体菌,这就有可能随着抗生素的广泛应用而兼具多重耐药性与产毒性能的大肠杆菌菌株日益增多和广为传播,给腹泻病的防治带来更大的困难,应引起有关方面的重视。

我们曾对 33 株产肠毒素大肠杆菌进行了 Col 因子的测定,结果仅一株阳性。还发现一牛源产肠毒素大肠杆菌,其 Col 因子也是阳性。McConnell 等人^[8]所研究的带 Ap 抗性的产毒大肠杆菌,其 Col 因子也呈阳性。Col 因子的利弊尚无定论,它与 pEnt 的关系有待研究。

参 考 文 献

- [1] Echeverria, P. et al.: *Lancet*, 2:589—592, 1978.
- [2] Gyles, C. L. et al.: *Science*, 198: 198—200, 1977.
- [3] So. et al.: *J. Bacteriol.*, 133: 1520, 1978.
- [4] 包幼迪等: 中华微生物学和免疫学杂志, 4(2): 104—106, 1984.
- [5] 包幼迪等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(5): 304—307, 1982.
- [6] 包幼迪等: 中华微生物学和免疫学杂志, 3(4): 257—260, 1983.
- [7] 林成水等: 中华预防医学杂志, 15(2): 101—102, 1981.

[8] McConnell, M. M. et al.: *J. Bacteriol.*, **139**: 346—355, 1979.

[9] Mazaitis, A. J. et al.: *J. Bacteriol.*, **145**: 97—105, 1981.

STUDIES ON ENTEROTOXIN PLASMIDS

III. ANALYSIS OF PLASMIDS IN RESISTANT AND ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* BY GEL ELECTROPHORESIS

Dai Gengsun Zhan Liqing Yan Shifang Chen Jinzhen

(Department of Microbiology, Fujian Medical College, Fuzhou)

Lin Chenshui Guo Weizhi Zeng Ningmei

(Fujian Public Health and Epidemiological Station, Fuzhou)

The results, based on the surveys of drugresistance, transconjugation, gel electrophoresis of plasmid DNA and enterotoxin production of 20 strains of enterotoxigenic and drugresistant *E. coli* of Human Origin, indicated the naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drugresistance has not yet been found in our province. Under the antibiotic selective pressure, R and Ent plasmids can be co-transferred from eight of the twelve enterotoxigenic and multi-resistant strains to their recipients. Thus the recipients acquired enterotoxigenicity and drug-resistance similar to the donors, and showed the same two large plasmid bands as the donors by gel electrophoresis. The larger one was R plasmid and the smaller one was Ent plasmid with its molecular weight corresponding to F plasmid.

We found a transconjugant (7930/C600 No. 3) which showed by gel electrophoresis only a single plasmid band larger than Ent plasmid for several times. But this conjugant had the same enterotoxigenicity and drugresistance as the donor. After continuous cultivation and conjugation to another recipient, the above mentioned three properties were kept unchanged. So we suppose the plasmid band larger than Ent plasmid to be an Ent-R recombinant by transposition. Both the co-transfer and the recombination of R and Ent plasmids will bring more difficulties to prevent and treat diarrhea, hence special attention should be paid to this problem.

Key words

Enterotoxigenic *E. coli*; Plasmid; Gel electrophoresis