

医院内鼠伤寒沙门氏菌流行株耐药质粒的分析

陈民钧 任玫娜 林晓慧 牛晓洪 冯智鹤*

(中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京)

采用质粒及其酶切片段的指纹分析, 配合以生化反应、血清学鉴定、最小抑菌浓度 (MIC) 测定, 就我院一次鼠伤寒沙门氏菌的暴发流行中任选的 7 个菌株进行了分子分析。所有流行株均有相同的生化反应谱, 血清学鉴定均属 O₁H_i 型。按 MIC 结果及质粒指纹分析, 可将这七个株分成两组, 甲组: 5 个株耐青霉素 (PC, >500mg/ml), 氨苄青霉素 (Ap, >500μg/ml), 头孢唑啉 (Cz, 16μg/ml), 红霉素 (Er, >500μg/ml), 氯霉素 (Cm, 250μg/ml), 链霉素 (Sm, >500μg/ml), 卡那霉素 (Km, >500μg/ml) 及四环素 (Tc, >500μg/ml) 8 种抗生素。乙组: 2 个菌株, 对 6 种药的 MIC 与甲组完全相同, 但对 Km 及 Cz 的 MIC 分别为 8μg/ml 及 1μg/ml。通过质粒转化试验, 证明这些耐药基因均集中于—139kb 的大质粒 p139 上。乙组耐药基因集中于—121kb 的大质粒 p121 上。菌株 SM48³ 的变异株缺 p139 质粒, 它的表型也呈全敏感状态, 仅对红霉素仍有部分耐药性 (64μg/ml)。乙组株的 p121 质粒比甲组株的 p139 质粒少 18Kb, 使该菌对 Km 及 Cz 由耐药变为敏感。将含 p139 及 p121 的二个转化子再经 *EcoRI* 及 *Hind III* 内切酶切割, 证实它们的绝大部分片段是相同的。用 *EcoRI* 切出的 p121 中 24Kb 片段不存在于 p139 中, 而 p139 中有 3.5、12.5 及 26kb 的新片段, 说明 p121 的 24kb 片段插入了抗 Km 及 Cf 基因的 18kb, 后者具有 2 个 *E. coli* 切点。以上结果说明在流行中质粒有演变。即使是甲组株中同是 p139 质粒, 酶切后也发现有的株缺少 1kb。

关键词 鼠伤寒沙门氏菌; R-质粒演变; 医院性感染; 酶切分析

近 10 年来, 国外常用质粒指纹技术来研究医院性感染, 它能补充传统的生化学鉴定、血清学分型及噬菌体分型, 以进一步了解是否有质粒流行。以后又逐渐开始采用内切酶切割质粒方法来深入分析质粒之间的酶切片段的同源性, 不同大小质粒有相同片段, 相同大小质粒也会有不同片段。Kopecko^[1] 指出耐药质粒在致病菌的流行过程中是一个严重问题, 这些质粒通过转座子、DNA 序列的倒位或缺失而发生不正常或正常的重组, 从而出现细菌之间及细菌个体内部的质粒演变、播散, 这些论点已被许多文章所证实。本文采用质粒及其酶切片段的指纹分析技术进一步研究我院 1984 年 3 月的一次鼠伤寒沙门氏菌 (*S.*

typhimurium, SM) 的爆发流行^[2], 结果证明流行中质粒发生了演变, 本文就此演变进行了讨论。

材料和方法

(一) 菌种及其来源 (表 1)

试验所用的七株 *S. typhimurium* 流行株是 1984 年 3 月间从我院妇产科、儿科、外科和内科 4 个病房的血、便和痰标本中分离的 23 个菌株中任意选出的, 这些菌株对利福平 (100 μg/ml) 均敏感, 但对常用的许多种抗生素均有抵抗力。

接合试验所用的受体菌为大肠杆菌 (*E. coli*)

本文于 1986 年 9 月 26 日收到。

本文系由中国科学院生物学部科学资金所资助的研究题。

* 军事医学科学院五所。

表 1 菌种及其特征
Table 1 Bacterial strains and characters

菌种 Strain	特点 Character	时间 Date
<i>S. typhimurium</i> 464	clinic isolate from Stool	9. Mar. 1984
<i>S. typhimurium</i> 458	clinic isolate from Sputum	5. Mar. 1984
<i>S. typhimurium</i> 460	clinic isolate from Blood	1. Mar. 1984
<i>S. typhimurium</i> 459	clinic isolate from Blood	3. Mar. 1984
<i>S. typhimurium</i> 463	clinic isolate from Stool	7. Mar. 1984
<i>S. typhimurium</i> 489	clinic isolate from Blood	19. Mar. 1984
<i>S. typhimurium</i> 465	clinic isolate from Stool	8. Mar. 1984
<i>E. coli</i> K12 JP995	Prototroph, Rif	
<i>K. pneumoniae</i> 44	Clin. Isolate, Rif	
<i>S. marcescens</i> 46	Clin. Isolate, Rif	
<i>E. cloacae</i> 47	Clin. Isolate, Rif	
<i>E. coli</i> V517	pVA517A-pVA517H, Clin. Isolate, M. W. standard	
<i>E. coli</i> HB101	Plasmids none, recipient	
<i>E. coli</i> R27	Tc, M. W. standard, 170kb-plasmid	

K12 JP995, 在染色体上有耐利福平基因。其它受体菌有肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*) 44、粘质沙雷氏菌 (*S. marcescens*) 46, 和阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) 47。这些菌的染色体 DNA 上有耐利福平基因。

质粒电泳中所用的标准对照菌株为 *E. coli* V517, 它带有 8 个质粒, 其分子大小依次为 54.2、7.3、5.6、5.2、3.9、3.0、2.7 和 2.1kb。另一标准菌为 *E. coli* R27, 它只有一个 170kb 质粒。转化试验所用的受体菌为 *E. coli* HB101。

(二) 流行株的鉴定

生物型鉴定采用微量技术^[3], 共 15 种生化反应。37℃ 培养 4—6 小时, 用 5 位数码分析法判定结果。血清学分型系用纯化的单个菌落与卫生部生物制品研究所出售的沙门氏菌属因子血清作玻片凝集试验。

(三) 最小抑菌浓度测定

最小抑菌浓度 (MIC) 采用微量技术^[4], 选用的抗生素为链霉素 (Sm)、青霉素 (Pc)、氨苄青霉素 (Ap)、四环素 (Tc)、头孢唑啉 (Cz)、卡那霉素 (Km)、庆大霉素 (Gm)、氯霉素 (Cm)、托布那霉素 (Tm)、丁胺卡那 (Ak)、红霉素 (Er) 及利福平 (Rif)。

(四) 质粒 DNA 的提取、纯化和酶切

系采用 Takahashi 及 Nagano 所介绍的方

法^[5], 个别地方作了修改, 即溶菌液中 NaOH 最终浓度改为 0.15mol/L。所用限制性内切酶 *EcoRI* 及 *HindIII* 均系由中国协和医科大学基础医学研究所生化系强伯勤教授供给, 酶切条件均按产品说明上的要求进行, 但由于质粒纯化后仍有少量线性染色体及线性质粒 DNA, 还有大量 RNA, 质粒分子量大, 切点多, 因此限制性内切酶的用量要增大许多倍。

(五) 质粒的结合传递

将流行株供体和 JP995 等受体菌分别接种至营养肉汤中, 35℃ 培养 6 小时, 按等比例接种于杂交肉汤中 (肉汤中含 0.05% 琼脂糖), 37℃ 培养, 第 4 及 16 小时取样移种到含 Rif (100μg/ml) 及 Cm (8μg/ml) 的营养琼脂上, 37℃ 培养 18 小时或两天后观察有无结合子的形成。

(六) 质粒的转化

受体菌生长至 OD_{550nm} 为 0.2 时, 速冷并在低温下离心收集菌渣, 菌渣用 0.1mol/L CaCl₂ 洗一次, 重悬于含 0.1mol/L CaCl₂ 和 0.05mol/L MgCl₂ 溶液中, 体积为原量的 1/4, 置冰水中 20 分钟, 低温下再离心收集菌渣, 重悬于原液量 1/4 的 0.1mol/L CaCl₂ 中, 此时受体菌成为感受态。将一定量的质粒 DNA 与 0.3ml 感受态菌混合, 冰水中置 20 分钟, 此质粒 DNA 量随菌而异, 且用前要用冷 0.1mol/L CaCl₂ 调匀。转化完成后

42℃ 下置 5 分钟, 立即用预热过的 LB 肉汤 (含 0.2% 葡萄糖) 稀释, 置 37℃ 下 90 分钟表达, 然后离心沉积细菌, 菌渣重悬于 0.2ml 肉汤中, 涂在含 Km 或 Cm 的平皿上, 24—26 小时后挑选长出的菌落, 经纯化后即为转化子。

(七) 电泳

用 0.7% 琼脂糖 TBE 铺板 (89mmol/L Tris, 8.9mmol/L 硼酸, 2.5mmol/L EDTA, pH 8.0), 在水平电泳槽 TBE 中电泳, 40μl 标本混以 10μl 示踪染料, 然后点入孔中进行潜水电泳, 90V, 4 小时后在溴化乙锭液 (1μg/ml) 中染色 15 分钟, 紫外灯下照相。

结果与讨论

(一) 生物型及血清型鉴定

所有流行株的 15 种生化反应结果经 5 位数码分析确定为沙门氏菌属, 血清型为 O₄Hi, 即 *S. typhimurium*。

(二) 抗生素最小抑菌浓度测定

所有爆发期间分离出的 *S. typhimurium* 均为多重耐药株 (表 2), 按其耐药谱及 MIC 浓度与 JP995 相比可分为两组: 第一组为 SM460、SM463、SM465、SM459、

表 2 流行株及变异株耐药谱

Table 2 The sensitivity patterns of epidemic and mutant strains

菌株 Strain	Ap	Ak	Er	Cm	Gm	Km	Pc	Sm	Cz	Tm	Tc	Rif
SM460, SM463, SM465 SM459, SM489	>500	2	>500	250	8	>500	>500	>500	16	4	>500	<1
SM464, SM458	>500	2	>500	250	8	8	>500	250	1	2	250	<1
SM489 mutant	4	2	63	8	8	8	4	4	2	2	8	<1
<i>E. coli</i> K12 JP995	4	2	16	2	1-	1-	16	1-	1-	1-	2	>500

SM489 五株, 耐 8 种抗菌素: Ap、Er、Cm、Km、Pc、Sm、Cz 和 Tc。第二组为 SM464 和 SM458 两株, 耐药谱与第一组相似, 但 Km MIC 在第二组为 8μg/ml, 第一组为 >500μg/ml; Cz MIC 在第二组为 1μg/ml, 而第一组为 16μg/ml。SM489 株在而第一组为 16μg/ml。SM489 株在传代过程中成为变异株, 耐药谱发生了显著的全面的改变, 由一个多重耐药株演变成对多种抗生素敏感株, 仅耐 Er (MIC 63μg/ml)。

(三) 质粒电泳结果

流行株及变异株质粒电泳结果见图 1。各质粒的分子量计算结果见图 1 说明。所有流行株及变异株均占有 5 个相同质粒, 其分子量分别是 88、10.2、6.9、4.2 和 3.0kb。但是 SM489 变异株缺少 p139 质

粒, SM464 及 SM458 株具有比其他五株共有的 p139 质粒略小的质粒 p121。这与上述 MIC 测试出的表型有一致性。因此可以初步认为 SM489 变异株丢失了一个多重耐药质粒 p139, 引起菌株失去了大部分耐药性, SM464 及 SM458 的大质粒比其他五株的最大质粒小 18Kb, 同时也少了两个耐药性。为了证明这两个大小不一的最大质粒是否有同一性, 需要将此大质粒转移至无质粒受体中, 用酶切方法对片段进行指纹分析。

(四) R-质粒结合转移试验

以所有 *S. typhimurium* 流行株作为供体, 用 *E. coli* K12 JP995, *K. pneumoniae* 44, *S. marcescens* 46 及 *E. cloacae* 47 作为受体菌, 经过肉汤内及琼脂平板上

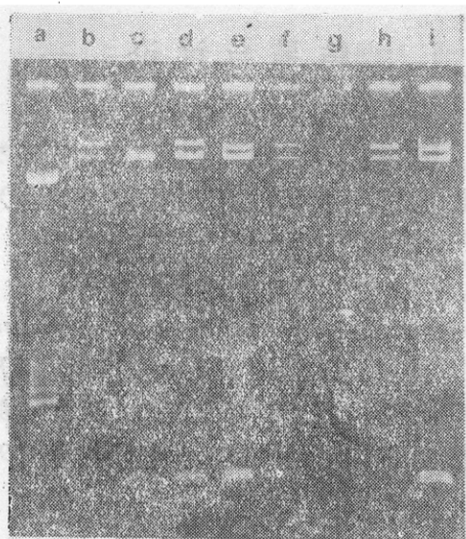


图1 鼠伤寒沙门氏菌流行株质粒 DNA 电泳图谱
Fig. 1 Agarose electrophoresis pattern of plasmids in *S. typhimurium* epidemic strains

a. *E. coli* V517

b. SM489 139, 88, 10.2, 6.9, 4.2, 3.0kb

c. SM489 mutant 88, 10.2, 6.9, 4.2, 3.0

d. SM465 139, 88, 10.2, 6.9, 4.2, 3.0

e. SM464 121, 88, 10.2, 6.9, 4.2, 3.0

f. SM463 139, 88, 10.2, 6.9, 4.2, 3.0

g. SM460 139, 88, 10.2, 6.9, 4.2, 3.0

h. SM459 139, 88, 10.2, 6.9, 4.2, 3.0

i. SM458 121, 88, 10.2, 6.9, 4.2, 3.0

的两种结合试验,耐药质粒转移均未成功,因此可以认为此耐药质粒是不能结合转移的质粒。

(五) R-质粒转化试验

选取 SM460、SM463 及 SM464 三株的全部质粒与受体菌 HB101 进行转化,再用含 Km 或含 Cm 的琼脂平皿选择,通过 SM460 及 SM463 两株的质粒转化均得到了耐 Km 及抗 Cm 的 HB101-p139 转化子。从 SM464 株的质粒转化只得到耐 Cm 的 HB101-p121 的转化子(图 2)。

(六) 转化子的酶切指纹分析

启用 HB101-p139/SM460, HB101-p139/SM463 及 HB101-p121/SM464 三个转化子,培养后提取并提纯大质粒,然后用 *EcoRI* 及 *HindIII* 酶切,酶切电泳指

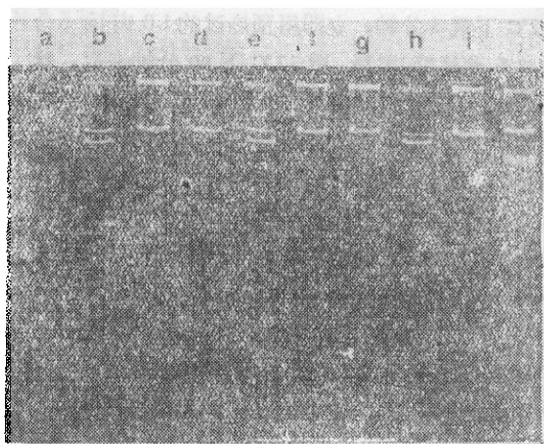


图2 比较流行株及转化子 *E. coli* HB101 耐药质粒 DNA

Fig. 2 Comparison of R-plasmid DNA in epidemic strains with their transformants from *E. coli* HB101

a. HB101 before transformation b. SM460

c. Transformant HB101-p139/SM460 selected by Km d. Transformant HB101-p139/SM460

selected by Cm e. SM463 f. Transformant

HB101-p139/SM463 selected by Km g. Trans-

formant HB101-p139/SM463 selected by

Cm h. SM464 i. Transformant HB101-p139/

SM464 selected only by Cm j. *E. coli* V517

& R27 plasmids as a marker

纹见图 3, 计算后放大的图谱见示意图。这三个大质粒均占有许多泳动速度完全相等的 DNA 带, 即大部分序列相同。分析 *EcoRI* 切片段, 算出 p121/SM464 有 24Kb 片段, p139/SM460 及 p139/SM463 缺少此片段, 却多出 26、12.6 及 3.5kb 三片段, 此三片段总和为 42.1kb, 与 24kb 相减二者之差约为 18kb。未酶切前此三质粒分子量之差亦为 18kb, 与酶切后片段的计算结果相符。参考 *HindIII* 切的片段指纹, 可以初步推测 p121 中 24kb 片段(图 4-A), 插入了一个 18kb; 又因此碱基上有 *EcoRI* 切点 2 个, 从而形成了 3 个新的片段——26、12.6 及 3.5kb 片段(图 4-B, C, D), 推论插入的 18kb 段应与 Km 有关或也包括 Cz。我们将从凝胶中提取这三个片段, 克隆进入载体, 在 *E. coli* 中表达以证实它

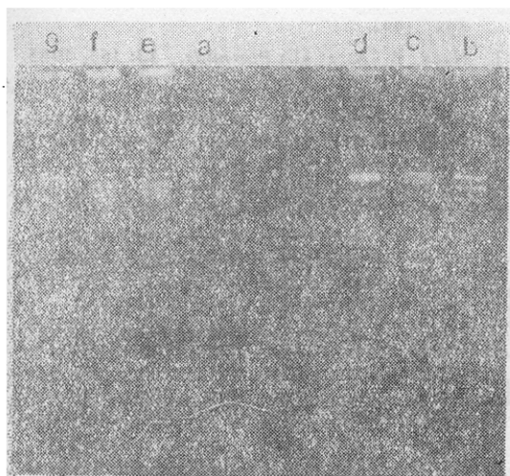


图3 用 *EcoRI* 及 *HindIII* 酶切后的 p139 及 p121 质粒 DNA 指纹

Fig. 3 Restriction endonuclease-cleft fingerprint in p139 and p121 from transformants by *EcoRI* and *HindIII*

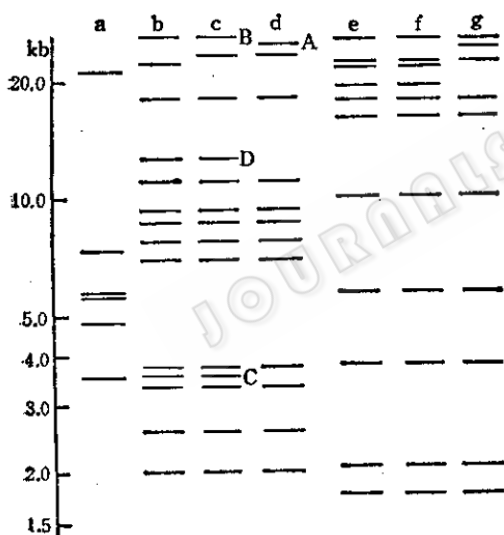


图3 的示意图

Illustration of fig. 3

- Lambda DNA cleft by *EcoRI* as a marker
- p139/SM463 cleft by *EcoRI*
- p139/SM460 cleft by *EcoRI*
- p121/SM464 cleft by *EcoRI*
- p139/SM463 cleft by *HindIII*
- p139/SM460 cleft by *HindIII*
- p121/SM464 cleft by *HindIII*

本图中 A, B, C, D 即图 4 中的 A, B, C, D.
The A, B, C, D here are the same A, B, C, D in fig. 4.

们是否为医院内流行的转座子。

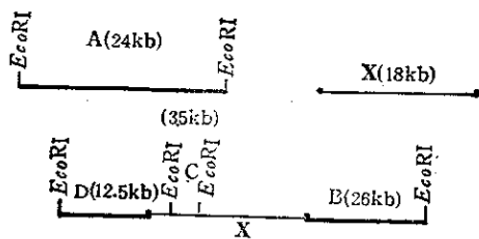


图4 发生在 24kb 片段上一种可能的演变

Fig. 4 A possible evolution emerged on 24kb fragment

- 来自 p121 的 24kb 片段 Fragment from 24kb in p121 X. SM460 及 SM463 株的 p139 质粒上出现的一段序列 A piece of sequence emerged on p139 in SM460 and SM463
- 含部分 A 及部分 X Partial A and partial X
- X 上含有 3.5kb 的 *EcoRI* 酶切片段 3.5kb *EcoRI*-cleft fragment on X
- 部分 A 及部分 X Partial A and partial X

The A, B, C, D here are the same A, B, C, D in illustration Fig. 3

此外还可以看到 p139/SM463 与 p139/SM460 的 *EcoRI* 酶切片段有微小不同, 前者 22kb 片段代替了后者的 23kb 片段, 约少 1kb。

任意选择的爆发流行过程中的三株, 其耐药基因的分布量不绝对一致, 早在 Kopecko^[1], Nies^[6] 和 Shlaes^[7] 文章中详细论证过这种多变性, 本文中出现的 Km、Cz18kb 可能是转座子在流行过程中发生了缺失重组成 p121, 也可能是 p121 在流行过程中新插入 18kb 转座子而重组成 p139。

国内 *S. typhimurium* 多只耐 1—3 个抗生素, 本文中流行株耐 7—8 个抗生素, 这是较少见的。如同 Richards^[8] 所报道的那样, 它可能是在医院内治疗过程中从病人肠道内的肠道杆菌中获得的这一多重耐药质粒。

参 考 文 献

- [1] Kopecko D. J. et al.: *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 7: 135, 1980.
- [2] 牛晓洪等: 中华传染病学杂志, 5: 60, 1987.
- [3] 王藏珍等: 中国医学科学院学报, 9: 249, 1987.

- [4] Jones, R. N., et al.: *Manual of Clinical Microbiology*, Chapter 101, Forth edition (ed. Lennette E. H., et al.), ASM WA D. C., p. 972, 1985.
- [5] Takahashi, S. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 20: 608, 1984.
- [6] Nies, B. A. et al.: *Plasmids.*, 13: 163, 1985.
- [7] Shlaes, D. M. et al.: *J. Infect. Dis.*, 148: 1013, 1983.
- [8] Richards, H. et al: *Plasmid.*, 8: 9, 1982.

MOLECULAR ANALYSIS OF R-PLASMIDS HARBURING IN *SALMONELLA TYPHIMURIUM* EPIDEMICS IN HOSPITAL

Chen Minjun Ren Meina Lin Xiaohui Neu Xiaohong Feng Zhehe*

(Beijing Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical sciences, Beijing)

Our purpose in the present report was to analyse the R-plasmids and their fragments harburing in *Salmonella typhimurium* epidemics in hospital to find their molecular differences. 7 strains were randomly studied from 23 wild epidemics of *S. typhimurium*. They were identical in biochemical pattern, their serotype are O₄Hi. According to MIC results and plasmid fingerprints, the 7 strains were arranged into two groups: The first group of 5 strains resistant to penicillin (Pc, >500 µg/ml), Ampicillin (Ap, >500 µg/ml), Cefazolin (Cz, 16 µg/ml), Erythromycin (Er, >500 µg/ml), Chloramphenicol (Cm, 250 µg/ml), Streptomycin (Sm, >500 µg/ml), Kanamycin (Km, >500 µg/ml) and Tetracyclin, (Tc, >500 µg/ml). It was proved by transformation test that the 8 resistant genes were on a 139 kb large plasmid p139. The second group of two strains were resistant to 6 of that 8 antibiotics, but were sensitive to km and Cz with MIC 8 µg/ml and 1 µg/ml respectively. their genes were on a 121 kb large plasmid p121.

The plasmid p121 which was sensitive to km and Cz was less 18 kb than p139. The most of fragments from these two transformants were identical after cutting by *EcoRI* and *HindIII*, but a 24 kb fragment from p121 did not exist in plasmid p139, which had 3 new fragments: 26, 12.5 and 3.5 kb. It suggested that the 24 kb fragment code for Km and Cz transferred into the 18 kb fragment which reformed the 3 new fragments. The plasmids in first group were also not exactly identical, one was showed to be 1 kb longer than the others.

Key words

S. typhimurium; R-plasmid; Nosocomial infection; Molecular analysis

This work was supported by grant 83-340 from Chinese Academy of Sciences

* Post graduate from Chinese Academy of Military Medical Sciences.