

携带 SHV 类超广谱 β -内酰胺酶的 吉戈非肠杆菌北京株的研究*

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 用接合转移的遗传学方法证实了临床分离菌株吉戈非肠杆菌 (*Enterobacter gergoviae*) 3773 含有一约 60kb 的可转移质粒, 又用测耐药表型、酶水解率及基因片段杂交等方法证实了该质粒上有一编码产生超广谱 β -内酰胺酶 (ESbla) 的基因。其大肠杆菌接合子除了头霉甲氧塞吩 (cefotaxime) 和亚胺硫霉素 (imipenem) 外, 几乎对所有测定的 β -内酰胺类药物都表现耐药, β -内酰胺酶抑制剂——棒酸 (clavulanate) 可抑制此 ESbla 的活性。携带此 ESbla 基因的质粒的一段可与 SHV-1 的一结构基因片段杂交, 说明此酶是 SHV 类的 ESbla。

关键词 吉戈非肠杆菌, SHV 类超广谱 β -内酰胺酶

产生 β -内酰胺酶是细菌耐 β -内酰胺类抗菌素的主要机制, 头孢噻甲羧肟 (cef-tazidime, caz) 等三代头孢菌素为新一代 β -内酰胺类抗菌素, 它们是为了对付产生各种染色体的或质粒介导的 β -内酰胺酶的革兰氏阴性杆菌而设计的。由于它们中大多数对原有的 β -内酰胺酶相当稳定, 因而在上市初期表现十分有效^[1,2]。我们医院 1988 年开始使用 caz, 1988 年下半年开始从病人标本中零星检测出个别耐 caz 的菌株。从我们的药物监测结果来看, 临床分离菌株的耐 caz 发生率在绿脓杆菌和肠杆菌属中呈上升趋势。本文对 1991 年从我院住院病人分离的一耐 caz 的 *Ent. gergoviae* 做了初步研究, 证实耐 caz 是由于产生了 SHV 类的 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

限制性内切酶由中国医学科学院基础医学研究所强伯勤教授赠送。溶菌酶购自中国科学院生物物理研究所生化厂; dNTP、DNA 酶 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), 系沱滨药厂生产; 奈啶酸 (nalidixic acid), 博山药厂; 氨苄青霉素 (ampicillin), 上海第四药厂; 头孢噻啉 (cephaloridine)、头孢唑啉 (cefazolin) 均为沱滨

* 国家自然科学基金资助项目。

** 军事医学科学院五所。

本文于 1992 年 11 月 6 日收到。

药厂产品; 头孢呋肟(cefuroxime)、头孢噻甲羧肟(ceftazidime)均为葛兰素公司产品; 头孢拉啶(cefradin), 施贵宝公司; 头孢哌酮(cefoperazone), Pfizer 公司; 头孢三嗪肟(ceftriaxone), 罗氏公司; 头孢氨噻肟(cefotaxime), 长征药厂; 头霉素甲氧噻吩(cefoxitin), 默沙东公司; 棒酸(clavulanate), Beechamcaz 公司。

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>Ent. gergoviae</i> 3773	pC3773	crx, cfp, ctr, ctx, caz, tmp-smz, kan, str, gen.	从本院住院病人分离 Clinical isolate
<i>E. coli</i> JP559		rif, nal	J. Pittart
<i>E. coli</i> JP559-C3773	pC3773	crx, cfp, ctr, ctx, caz, tmp-smz, kan, str, gen, rif nal	本工作 This work
<i>E. coli</i> HB101	pMON38	amp (SHV-1), cm	G. A. Jacoby ^[12]
<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, 头孢氨噻肟; caz, 头孢噻甲羧肟; fox, 头霉素甲氧噻吩; tmp-smz, 甲氧苄啶-磺胺甲氧唑; kan, 卡那霉素; str, 链霉素; gen, 庆大霉素; rif, 利福平; nal, 奈啶酸; 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]

以耐 caz 的临床分离菌株 *Ent. gergoviae* 3773 为供体菌, 以 *E. coli* JP559(耐 rifampicin 和 nalidixic acid) 为受体菌, 用含 caz (12 μ g/ml)、rifampicin (380 μ g/ml) 以及 nalidixic acid (380 μ g/ml) 的平皿选择接合子。

1.4 药物敏感性试验

采用改良的 Kirby-Bauer 法^[4]; 最小抑菌浓度(MICs)测定采用 Baxter 诊断公司的 Microscan MIC 板进行, 按说明书规定判定结果^[5,11]。

1.5 多种头孢菌素的相对水解率的测定^[6-8]

超声破碎细菌, 离心, 获得 β -内酰胺酶粗提液。以 cephaloridine 为底物测粗酶液的酶活力。规定在 37 $^{\circ}$ C、pH7.0 条件下, 每分钟水解 1 μ mol cephaloridine 为 1 个酶活力单

位。

头孢菌素在 260nm 左右有一与 β -内酰胺环相关的吸收峰,当被酶水解后 β -内酰胺环破裂,此处吸收峰降低。因此,测定头孢菌素经酶水解前后的 OD 值,并以 cephaloridine 为标准,即可计算出相对水解率。测定时,先用紫外分光光度计扫描,并参照文献[6—8],选择最适测定波长如下:cephaloridine, 255;cefazolin, 265;cefuroxime, 265;cefoperazone, 275;ceftriaxone, 257;cefotaxime, 257;ceftazidime, 257;cefoxitin, 260。

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

1.6 质粒 DNA 的提取

对于 >15kb 的大质粒(pC3773),采用温和的 SDS 裂解法,对于 <15kb 的小质粒(如 pBR322)采用碱法裂解,然后用 CsCl-E. B 不连续梯度平衡离心法纯化质粒 DNA^[9]。

1.7 Southern 杂交

酶切和回收探针片段采用缺口翻译法,以 [α -³²P]dATP 标记探针^[9],在高强度的条件下杂交^[10]。

2 结果

2.1 接合实验

在接合实验中,我们发现临床分离菌很容易自发突变成耐 rifampicin 或 nalidixic acid,因此,为了减轻筛选工作,我们选用了既耐 rifampicin,又耐 nalidixic acid 的受体菌,然后在选择平皿中加了 caz、nalidixic acid 和 rifampicin 三种抗生素。从这样的选择平皿上获得了临床分离菌株 *Ent. gergoviae* 3773 的接合子 *E. coli* C3773。

从图 1 可见, *E. coli* C3773 与供体菌有一相同的质粒带,说明临床分离菌株 *Ent. gergoviae* 3773 含有一可转移质粒,大小约为 60kb,命名为 pC3773,其上有耐 caz 的基因。药敏试验表明,随着耐 caz 等 β -内酰胺类特性的转移, *Ent. gergoviae* 3773 耐 streptomycin、kanamycin、gentamicin 和 tmp-smz 的特性也同时转移至其接合子中。

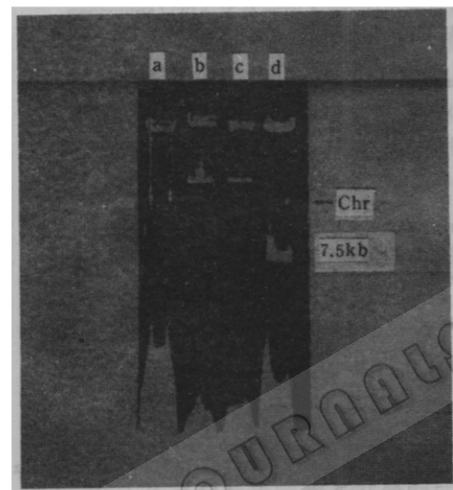


图 1 供体菌、受体菌及接合子质粒粗提液的琼脂糖凝胶电泳分析

a, *E. coli* JP559 受体株; b, *E. coli* C3773 接合子; c, *Ent. gergoviae* 3773 供体株; d, pMON21(分子大小标准)。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of crude lysates of donor, recipient and transconjugant. Lanes: a, Recipient, *E. coli* JP559; b, Transconjugant, *E. coli* C3773; c, Donor, *Ent. gergoviae* 3773; d, pMON21 used as size marker.

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 2。

表 2 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 2 MICs($\mu\text{g/ml}$) 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>				
	JP559 (pC3773)	HB101 (pMON38)	JP559	HB101	ATCC 25922
氨苄 Ampicillin	>2048	2048	4	4	4
* + 棒酸 Clavulanate	16	4	2	2	2
头孢唑啉 Cefazolin	256	8	2	2	1
* + 棒酸 Clavulanate	1	0.5	0.5	0.5	0.5
头孢拉定 Cefradin	256	16	8	8	8
* + 棒酸 Clavulanate	16	8	8	8	8
头孢呋肟 Cefuroxime	128	4	4	1	4
* + 棒酸 Clavulanate	84	2	2	1	2
头孢噻甲羧肟 Ceftazidime	16	1	0.125	<0.06	<0.06
* + 棒酸 Clavulanate	1	0.125	<0.06	<0.06	<0.06
头孢三嗪 Ceftriaxone	32	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
* + 棒酸 Clavulanate	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
头孢氨苄肟 Cefotaxime	32	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
* + 棒酸 Clavulanate	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
头孢哌酮 Cefoperazone	64	4	0.125	0.125	0.25
* + 棒酸 Clavulanate	0.5	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
头霉素甲氧噻吩 Cefoxitin	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
* + 棒酸 Clavulanate	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
亚胺硫霉素 Imipenem	≤ 0.5	—	—	—	—
噻肟单酰胺菌素 Aztreonam	8	—	—	—	—

* 代表上一行抗生素。

棒酸的浓度均为 $2\mu\text{g/ml}$ 。The conc. of clavulanate is a constant $2\mu\text{g/ml}$ 。

在本次实验中,以 *E. coli* ATCC25922 作质控菌株,该菌株对多种 β -内酰胺类药物的 MICs 结果与文献上的一致^[11]。

从表 2 可见, *E. coli* JP559 和 *E. coli* HB101 在不含任何质粒时, 对 β -内酰胺类药物的 MICs 基本相同, 因此含 pC3773 的 *E. coli* JP559 及含 pMON38 的 *E. coli* HB101 间 MICs 的差异, 可以说是由于产生了不同的 β -内酰胺酶造成的。

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, 不表现耐药。对 ampicillin 的 MICs 则很高, 为 $2048\mu\text{g/ml}$, 加入 β -内酰胺酶抑制剂棒酸后则降为 $4\mu\text{g/ml}$ 。

含质粒 pC3773 的 *Ent. gergoviae* 北京株对三代头孢菌素的 MICs 为 $16-64\mu\text{g/ml}$, 判为耐药。对 cefoxitin 和 imipenem 的 MICs 分别为 $\leq 1\mu\text{g/ml}$ 和 $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$, 判为敏感。加入 β -内酰胺酶抑制剂棒酸后, 产酶菌株对三代头孢菌素的 MICs 降至 $1\mu\text{g/ml}$ 以下, 甚至对于一代头孢菌素的 cefazolin MIC 也降至 $1\mu\text{g/ml}$ 。表明棒酸能极强的抑制出现在我们医院的此种 ESb1a。

2.3 β -内酰胺酶的测定

从接合子 *E. coli* C3773(产生 ESb1a) 以及标准菌株 *E. coli* HB101 (产生 SHV-1) 提取的粗酶液所具有的酶活力见表 3, 其中以 SHV-1 为较高。相对水解率的结果与 MICs 的基本相符, 也与文献[6]基本相符。ESb1a 对一、二、三代头孢菌素的水解率均在 60% 以上, 但不能水解 cefoxitin; 除了 cefoperazone 外, SHV-1 对其它三代头孢菌素几乎不水解, 对二代头孢菌素 cefuroxime 的水解率也较低。SHV-1 和 ESb1a 对 cefoperazone 的水解率都很高, 这与它本身对酶很不稳定有关。

2.4 Southern 杂交

用 Pvu I 酶切质粒 pMON 38, 回收 0.36kb 的片段, 此片段位于 SHV-1 的结构基因内^[12]。用 ^{32}P 标记此片段作为探针, 与耐药的接合转移质粒 pC3773 杂交, 所得结果见图 2。在一定的条件下, 质粒 pC3773 的一酶切片段与 SHV-1 探针有极强的杂交信号, 说明耐药接合质粒 pC3773 上的 ESb1a 基因属于 SHV 类。

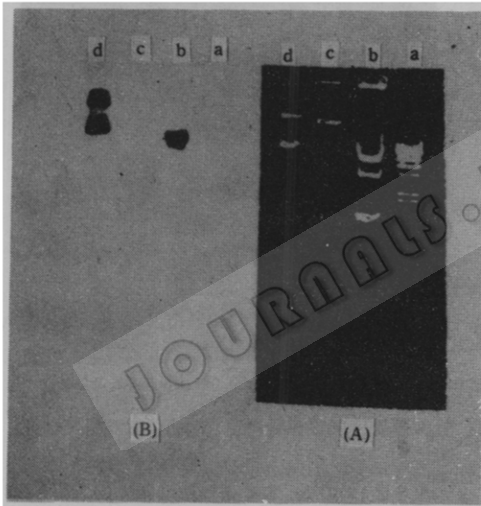


图 2 编码 ESb1a 的耐药质粒的 Southern 杂交分析 (A) 经溴化乙锭染色的凝胶; (B) 与 SHV-1 探针杂交的放射自显影图。

Fig. 2 Southern blot analysis of R-plasmid encoding ESb1a

(A) Gel stained by E. B.; (B) Autoradiogram probed with SHV-1; lanes: a. λ DNA + Hind III as markers; b. pC3773 + BamHI; c. pBR322 (TEM-1) used as control; d. pMON38(SHV-1).

表 3 β -内酰胺酶粗提液对各种头孢菌素的水解Table 3 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	czi	crx	cfp	ctr	ctx	caz	fox
<i>E. coli</i> c3773 (ESbla)	1.4	100	89	69	82	75	67	61	3
<i>E. coli</i> HB101 (SHV-1)	6.9	100	70	12	65	8	4	6	6

缩写:cfr,头孢噻吩;czi,头孢唑林;crx,头孢呋喃;cfp,头孢哌酮;ctr,头孢三嗪;ctx,头孢噻肟;caz,头孢噻唑肟;fox,头霉甲氧唑吩。

Abbrev. cfr, cephaloridine; czi, cefazolin; crx, cefuroxime; cfp, cefoperazone; ctr, ceftriaxone; ctx, cefotaxime; caz, ceftazidime; fox, cefoxitin.

3 讨论

近年来,随着三代头孢菌素在临床上应用的日益广泛,在某些菌中出现了相应的耐药菌株,且耐药频率有增加之势。细菌耐这些新一代 β -内酰胺类药物的主要原因是:染色体介导的 β -内酰胺酶过量产生或质粒介导的ESbla的产生^[13,14]。据国外文献报道,ESbla最主要的类型是SHV类和TEM-类的酶,它们分别是由质粒介导的SHV-1和TEM-1或TEM-2经点突变而来^[14]。国外已在克雷伯氏菌(*Klebsiella* spp.)、沙门氏菌(*Salmonella* spp.)和其它肠杆菌(*Enterobacter* spp.)等中检测到SHV类的ESbla^[14],本文首次在*Ent. gergoviae*北京株中发现了此类酶的存在。

上述研究表明,从我院分离的耐caz的*Ent. gergoviae*含有一约60kb的可转移质粒,它除携带有耐三代头孢菌素的基因外,还带有耐氨基糖甙类和磺胺类药物的基因。除了cefoxitin以及imipenem外,产生此ESbla的菌株对已测定的 β -内酰胺类药物表现耐药, β -内酰胺酶抑制剂——棒酸可抑制此ESbla的活性,因而可用上述药物来对付产生此ESbla的菌株。

参 考 文 献

- [1] Sanders C C et al. *Reviews of Infectious Diseases*, 1983, 5: 639—648.
- [2] Phippon A R et al. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989, 33: 1131—1136.
- [3] Grinsted J et al. *Methods in Microbiology*, 2nd ed. London, Academic Press, 1988. 59—60.
- [4] Bauer A W et al. *Am J Clin Pathol*, 1966, 45: 493—496.
- [5] NCCLS. Tentative Standard NCCLS Document M7—T2, NCCLS, Villanova, 1988.
- [6] 施耀国,等. 抗生素, 1985, 10: 263—267.
- [7] Yang Y et al. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34: 755—758.
- [8] Quinn J P et al. *Antimicrob Agent Chemother*, 1989, 33: 1451—1456.
- [9] Sambrook J et al. *Molecular Cloning*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Huovinen S et al. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988, 32: 175—179.
- [11] ASM. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. ASM, Washington, 1990.
- [12] Mercier J et al. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34: 1577—1583.

- [13] Sander C C *et al.* *J Infect Dis*, 1986, **154**:792—800.
[14] Jacoby J A *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, **35**:1697—1704.

A PLASMID-MEDIATED SHV TYPE EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE IN BEIJING ISOLATE OF *ENTEROBACTER GERGOVIAE*

Cheng Yulin Li Yintai Chen Minjun

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

Abstract By conjugation experiment, an extended-spectrum β -lactamase (ESb1a) encoded on a transferable plasmid of ~60 Kilobases was found in a clinical strain of *Enterobacter gergoviae* isolated from Peking Union Medical College Hospital. Its *E. coli* transconjugant was resistant to all β -lactams tested except ceftoxitin and imipenem. Clavulanic acid, a classical β -lactamase inhibitor, inhibited its activity. Hybridization with an intragenic probe for SHV-1 revealed that this ESb1a may be related to, or derived from SHV enzyme.

Key words *Enterobacter gergoviae*, SHV type extended-spectrum β -lactamase

JOURNALS . IM . AC . CN