

• 基础论著 •

产 ACT-2 型头孢菌素酶和 CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶及携带 I 类整合子的大肠埃希菌

叶英 高建国 李家斌

【摘要】 目的 分析大肠埃希菌临床分离菌(E1)携带的 β -内酰胺酶基因(AmpC, ESBLs)及 I 类整合子基因的存在情况。**方法** 应用琼脂稀释法测定 E1 菌的耐药表型,应用聚合酶链反应及序列分析法分析其 AmpC, ESBLs 和整合子的基因类型,并进行质粒接合转移实验。**结果** E1 仅对亚胺培南、环丙沙星、左旋氧氟沙星和阿米卡星敏感,同时携带 CTX-M-13、SHV-1、TEM-1 和 ACT-2 型 β -内酰胺酶基因, I 类整合子基因呈阳性。**结论** 大肠埃希菌耐药机制复杂,可同时携带多种 β -内酰胺酶,并已成功地将 AmpC 和 ESBL 接合在一起,对此类产酶菌应首选碳青霉烯类药物进行治疗,并应高度重视整合子对多重耐药形成的作用。

【关键词】 大肠埃希菌; β -内酰胺酶; 基因; 整合子; 耐药性

Clinical isolate of *Escherichia coli* producing ACT-2 type cephalosporinase accompanied with CTX-M β -lactamases and class I integron YE Ying, GAO Jianguo, LI Jia-bin. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: LI Jia-bin, Email: lijiaabin948@sohu.com

【Abstract】 Objective To detect the genes of plasmid-mediated AmpC and ESBL β -lactamases and Class I integron in clinical isolate of *Escherichia coli*. **Methods** The bacterial susceptibility to antimicrobial agents for strain E1 was determined by agar dilution method. The genes of AmpC, ESBLs and integron were analyzed by PCR and verified by DNA sequencing. Conjugation experiment was carried out to study the transfer of drug resistance. **Results** The strain was susceptible to imipenem, ciprofloxacin, levofloxacin and amikacin. ACT-2, SHV-1, TEM-1, CTX-M-13 and integron I genes were positive. **Conclusions** It has complicated mechanism of drug resistance. Some of clinical strains producing plasmid-mediated AmpC β -lactamase were accompanied by extensively producing ESBLs. Carbapenems is the best

基金项目:国家自然科学基金项目(30772286);安徽省自然科学基金项目(070413110)

作者单位:230022 合肥市, 安徽医科大学第一附属医院感染病科

通讯作者:李家斌 Email: lijiaabin948@sohu.com

choice for treatment infection caused by strains producing ESACs. More attention should be paid to integron which plays an important role in multi-resistance.

【Key words】 *Escherichia coli*; β -lactamase; Gene; Integron; Resistance

大肠埃希菌是医院感染最常见和最重要的病原菌之一,其高耐药水平及产超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum β -lactamases, ESBLs)和AmpC 头孢菌素酶菌株的逐年增加给临床治疗带来了极大困难。更加严重的是目前在同一株细菌携带的质粒上同时发现了ESBLs和AmpC基因,被命名为产超广谱 β -内酰胺酶(Extended-spectrum AmpC β -lactamases, ESACs)菌株^[1],这进一步造成了细菌的多重耐药性,使临床抗感染治疗面临重大威胁。本研究在对多重耐药大肠埃希菌进行耐药基因检测时发现了一株同时产ACT-2型头孢菌素酶和CTX-M型超广谱 β -内酰胺酶的大肠埃希菌,且ACT-2型头孢菌素酶是在国内首次发现。现报道如下。

材料与方法

一、材料

1. 菌株来源:第1号大肠埃希菌(简称E1),原始菌株分离于安徽淮南矿工二院一患儿的大便标本;质控菌株:大肠埃希菌ATCC25922;接合实验受体菌:*E. coli* C600 Lac-Str^r;多重PCR阳性对照菌:产质粒ACT-1型AmpC酶*E. coli* DH5 α 。

2. 试剂:ExTaq DNA聚合酶,dNTP,DNA Marker DL2000为TaKaRa公司产品;溴化乙锭干粉为Sigma公司产品;琼脂糖为Promega公司产品;质粒抽提试剂如饱和酚、氯仿、Tris碱、SDS、RNA酶等购自上海生物工程有限公司。

3. 抗菌药物:哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢西丁、头孢呋辛、头孢吡肟、亚胺培南、环丙沙星、左旋氧氟沙星、阿米卡星,均购于中国药品生物制品检定所。

二、方法

1. 抗菌药物敏感实验:采用琼脂稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)值,实验过程及结果判定参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)的标准^[2]。

2. 接合实验:E1接合实验参照文献^[3]进行。*E. coli* C600 Lac-Str^r为接合实验的受体菌。选择性平板为含链霉素(500 mg/L)、头孢噻肟(2 mg/L)和头孢西丁(64 mg/L)的麦康凯平板,在麦康凯平板上生长的白色小菌落,则为E1接合子(简称E1T),并传代3次。对E1T进行抗菌药物的MIC、ESBLs和AmpC基因检测。

3. 模板制备:E1和E1T的质粒提取采用碱裂解法^[4],置-20℃冰箱备用。

4. 多重PCR实验:多重PCR引物(见表1),50 μ l的反应体系及反应条件均参照文献进行^[5]。高产ACT-1型质粒AmpC酶*E. coli* DH5 α 作为阳性对照菌株,蒸馏水代替模板作为空白对照。PCR产物用含溴化乙锭的1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

5. EBC 型 AmpC 酶全编码基因的 PCR 扩增: EBC 型质粒介导 AmpC 酶全编码基因引物见表 1, 50 μl PCR 反应体系见表 2。PCR 条件: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 进行 30 次循环, 最后延伸 7 min。

表 1 Amp C 多重 PCR 和 EBC 型全编码基因的引物序列

引物	序列	扩增长度(bp)	核苷酸位置(bp)	GenBank 号
MMOX-F	5'-GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT-3'	520	358 ~ 378	D13304
MMOX-R	5'-CACATTGACATAGGTGTGCTGC-3'		877 ~ 856	
MCIT-F	5'-TGGCCAGAACTGACAGGCAAA-3'	462	478 ~ 498	X78117
MCIT-R	5'-TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC-3'		939 ~ 919	
MDHA-F	5'-AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT-3'	405	1244 ~ 1256	Y16410
MDHA-R	5'-CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'		1648 ~ 1628	
MACC-F	5'-AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA-3'	346	861 ~ 881	AJ133121
MACC-R	5'-TTCGCCGCAATCATCCCTAGC-3'		1206 ~ 1186	
MEBC-F	5'-TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG-3'	302	1115 ~ 1135	M37839
MEBC-R	5'-CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT-3'		1416 ~ 1396	
MFOX-F	5'-AACATGGGGTATCAGGGAGATG-3'	190	1475 ~ 1496	X77455
MFOX-R	5'-CAAAGCGCGTAACCGGATTGG-3'		1664 ~ 1644	
EBC-F	5'-CCTTGAAGTCTATTACGGA-3'	1191	2 ~ 27	M37839
EBC-R	5'-CGCCACCCGCAATGTTTAC-3'		1192 ~ 1173	

表 2 EBC 型 AmpC 酶全编码基因 PCR 体系(μl)

总体积	模板 DNA	10 × 扩增缓冲液	dNTP (2.5 mmol/L)	上游引物	下游引物	ExTaq DNA 聚合酶 (1.25 U)	无菌水
50	2	5	4	2.5	2.5	0.25	33.75

6. ESBLs 基因的 PCR 扩增: ESBLs 基因的多对引物见表 3, PCR 反应体系见表 4。SHV 型的扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 再延伸 8 min, 4℃ 保存。其余各类型的扩增条件除退火温度见上表外, 其他均与 SHV 型的扩增条件相同。

8. 序列分析: 所有 PCR 产物由大连 TaKaRa 生物公司纯化后采用 ABI PRISM 377 测序仪进行测序, 所测序列应用 BLAST 程序进行分析比对。

结 果

一、抗菌药物敏感性测定

在琼脂平皿稀释实验中, E1 对哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦、头孢他啶、头孢曲松、头孢噻肟、头孢西丁、头孢呋辛和头孢吡肟均耐药, 对亚胺培南、阿米卡星、环丙沙星和左旋氧氟沙星敏感。E1T 对各种药品的 MIC 值与野生株基本相同。

二、多重 PCR 实验

以 E1 和 E1T 质粒为模板进行多重 PCR, 均扩增出一条约 400 bp 的明亮条带, 再以目的片段均为 400 bp 左右的 4 对单一引物分别进行扩增, 只有 EBC 型引物扩增出阳性条带, 其他型引物和空白对照均未扩增出条带。如图 1 所示。

表3 ESBLs 基因 PCR 扩增的引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度(bp)	退火温度(℃)
CTX-M-1	F: 5' -ACAGCGATAACGTGGCGATG-3'	197	52
	R: 5' -TCACCCAATGCTTTACCCAG-3'		
CTX-M-2	F: 5' -GAAATCAAGAAGACGACCTG-3'	180	54
	R: 5' -CAACGACGAGCAAACG-3'		
CTX-M-8	F: 5' -TTTGCCCGTGGCGATTGG-3'	368	51
	R: 5' -CGACTTTCTGCCTTCTGCTCT-3'		
CTX-M-9	F: 5' -CTGCTTAATCAGCCTGTCTGA-3'	211	52
	R: 5' -TCAGTGGCATCCAGACGAAA-3'		
TEM	F: 5' -GCTATGTGCTGCGGTATT-3'	309	54
	R: 5' -CGCTCGTCGTTTGTGTAT-3'		
SHV	F: 5' -AAGCGAAAGCCAGCTGTCC-3'	176	55
	R: 5' -TTCGCTCCAGCTGTTCCGTC-3'		
OXA-1	F: 5' -TTTTCTGTGTTTGGGTTTT-3'	409	52
	R: 5' -TTTCTTGGCTTTTATGCTTG-3'		
OXA-2	F: 5' -CGCTGTTCTGTATGACTTCC-3'	210	48
	R: 5' -ATCGGCGTTGCCATAGTC-3'		
OXA-10	F: 5' -ATGGTGTCTTCGTGCTTT-3'	299	52
	R: 5' -TCTTACTTCGCCAACTTCT-3'		

表4 ESBLs 基因 PCR 体系

总体积 (μl)	模板 DNA (ng)	10 × 扩增缓冲液 (μl)	dNTP (2.5 mmol/L) (μl)	上游引物 (μl)	下游引物 (μl)	ExTaq DNA 聚合酶 (1.25 U, μl)	无菌水
50	20	5	4	1	1	0.25	补至 50 μl

7. I 类和 II 类整合酶基因的 PCR 扩增: I 类整合酶基因引物序列如下: F: 5' -TGATGGCGACGCACGAC-3' R: 5' -TTGGGCAGCAGCGAAGT-3'; II 类整合酶基因引物序列 F: 5' -CGTGCTGGAGGGAAAGAC-3' R: 5' -CATGACGGTAAGGGTGGG-3'。50 μl 反应体系见表 5。I 类整合酶基因的循环参数: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 45 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。II 类整合酶基因扩增的退火温度为 52℃, 其余参数与 I 类的相同。所得 PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

表5 I 类和 II 类整合酶基因 PCR 体系(μl)

总体积	模板 DNA	10 × 扩增缓冲液	dNTP (2.5 mmol/L)	上游引物	下游引物	ExTaq DNA 聚合酶 (1.25 U)	无菌水
50	2	5	4	5	5	0.25	27.75

三、EBC 型 AmpC 全编码基因的确定

以 EBC 型基因的特异性引物对 E1 和 E1T 进行全编码基因扩增, 如图 1 所示, 扩增出一长约 1000 bp 的目的条带, 产物纯化测序后核苷酸长为 1148 bp, 经

BLAST 程序分析后证实该目的条带和 ACT-2 型完全一致。

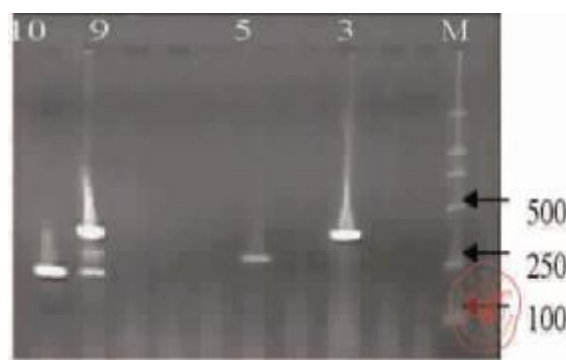


图1 E1 和 E1T Amp C 多重 PCR 和 EBC 全编码基因 PCR 产物电泳

M: 分子标记(从下往上依次为 100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 2000 bp); 1 和 4: E1; 2 和 5: E1T; 3 和 6: 阳性对照; 7: 阴性对照

四、ESBLs 基因的确定

以 E1 质粒为模板进行 ESBLs 基因各型的多对引物扩增, CTX-M-9 型、TEM 型和 SHV 型基因的通用引物均扩增出约 250 bp 的明亮条带, 纯化后经测序比对后证实: TEM 型扩增片段长为 288 bp, 与 TEM-1 完全相同; CTX-M-9 型扩增片断长为 201 bp, 与 GenBank 访问株 EF158301 (CTX-M-13) 有 100% 的同源性; SHV 型片段长为 170 bp, 与 SHV-1 亦完全相同。E1T 质粒 PCR 只有 CTX-M-9 型基因的引物扩增出一条约 200 bp 的明亮条带, 如图 2 所示。



M: 分子标记; 3: E1T-CTX-M; 5: E1-TEM; 9: E1-CTX-M; 10: E1-SHV

图2 E1 和 E1T ESBLs 基因 PCR 电泳图

五、I类和II类整合酶基因的确证

提取 E1 质粒进行 I 类整合酶基因的扩增,在 500 bp 区域扩增出明亮条带,空白对照未扩增出条带。II 类整合酶基因引物亦未能扩增出条带。I 类整合酶基因的 PCR 产物经纯化后测序,片段大小为 524 bp,经比对后发现与 GenBank 数据库中 I 类整合酶基因的同源性为 100%。

讨 论

E1 菌株于 2005 年 9 月分离自安徽淮南矿工二院的一例肠道感染患儿的大便标本。患儿,男,2 岁,因反复发热、腹泻 2 月收住矿工二院儿科,在院外应用阿莫西林、头孢夫辛、头孢曲松。T:38.6℃,体重:10.6 kg,血 WBC:11.4 × 10⁹/L,中性粒细胞比例为 0.86, RBC:3.8 × 10¹²/L,大便常规:WBC(3+), RBC(+),腹平软,无压痛,肝脾肋下未及。入院后,给予头孢哌酮/舒巴坦 0.3 g/次静脉滴注抗感染治疗,每隔 12 小时一次,留取大便标本做细菌培养。治疗 4 天时体温未退,腹泻无好转,仍每日 7~8 次黏液脓便,送检的大便培养报告检出大肠埃希菌,药敏仅对亚胺培南、环丙沙星、左旋氧氟沙星和阿米卡星敏感。更换为亚胺培南 0.5 g/次,每隔 12 小时治疗一次,3 天后体温渐下降至正常,腹泻好转,大便常规 2 次正常后康复出院。

从该患儿大便中分离的 E1,抗菌药物 MIC 测定显示其对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢西丁、头孢呋辛、头孢吡肟及所有三代头孢菌素均耐药,仅对环丙沙星、左旋氧氟沙星、阿米卡星和亚胺培南敏感。推测其对喹诺酮类及氨基糖甙类药物敏感的原因是由于其对儿童患者的不良反应而限制其应用。而其对哌拉西林/他唑巴坦和头孢吡肟均耐药,对亚胺培南敏感,提示该菌很可能为产 ES-ACs 菌株,进而采用分子生物学方法证实其 β-内酰胺酶基因 CTX-M-13、SHV-1、TEM-1 和 ACT-2 阳性,同时携带 I 类整合子,可见其耐药机制非常复杂。

在对 E1 的 ESBLs 基因进行 9 对通用引物扩增时,发现 CTX-M-13、TEM 和 SHV 型基因并存。ESBLs 种类最多的是 TEM 或 SHV 族酶,常由 TEM-1、-2 及 SHV-1 经 1 至数个氨基酸残基取代衍生而来。本研究,发现的仍是 TEM-1 和 SHV-1 型广谱酶。近年来,一个新质粒介导的 ESBLs 家族-CTX-M(可高度水解头孢噻肟)的数量在不断增加,已成为国内外流行最广的 ESBLs^[6,7]。种系发生研究表明,CTX-M 族可分为四组:第一组包括 CTX-M-1 和 CTX-M-15 等;第二组包括 CTX-M-2 和 CTX-M-4 等;第三组为 CTX-M-9 和 CTX-M-13 等;第四组为 CTX-M-8。本实验中 CTX-M-9 组通用引物扩增出的阳性条带经测序后证实为 CTX-M-13。在对 E1 进行 EBC 家族的 AmpC 全长基因扩增时发现 1 条 1148 bp 的核苷酸序列与 ACT-2 型(注册号:AM076977.1)完全一致。EBC 家族主要的基因型是 MIR-1 和 ACT-1 型。ACT-1 型耐药基因在国内外均有发现,陈轶兰等^[8]于 2002 年在国内首次报道产 ACT-1 的大肠埃希菌,并发现该菌株可诱导性表达 AmpC。宋玮等^[9]报道在大肠埃希菌中流行的质粒介导的 AmpC 酶为 ACT-1,其发生比例为 4.2%。ACT-2 型于 2006 年由意大利学者在板崎肠杆菌中发现^[10],其他国家

和国内尚无发现 ACT-2 型的报道。本研究测定的 1 株 ACT-2 型酶与 AM076977.1 基因完全相同,亦是国内首次报道。

实验中接合子筛选成功且其药敏结果与原始菌株相似,由于接合子受体菌本身不带有 AmpC 和 ESBLs 基因片段,以接合子质粒 DNA 为模板扩增出来的 AmpC 和 ESBLs 基因阳性结果进一步证实了该基因的质粒来源特性,是一株产 ESACs 的菌株。在对同时携带 AmpC 及 ESBLs 基因的质粒研究中发现有些质粒上存在着一种“耐药基因盒-sul I 型整合子”结构^[11],因此提出可能是整合子携带着捕获的多个基因盒插入到质粒中,使细菌产生多重耐药性。本实验整合酶基因 PCR 技术显示 E1 携带了 I 类整合子基因,推测存在整合子捕获并整合多个耐药基因于基因盒的危险性,因此应高度重视整合子的作用。

参 考 文 献

- 1 Hanson ND, Moland ES, Hossain A, et al. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49: 1011-1014.
- 2 Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2005, 25: 1-167.
- 3 Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, et al. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 1151-1158.
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. 质粒 DNA 的小量制备, 碱裂解法. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 26-27.
- 5 Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 2153-2162.
- 6 Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56: 451-454.
- 7 胡云建, 俞云松, 张秀珍, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶细菌的分子流行病学研究. *中华医院感染学杂志*, 2004, 14: 241-244.
- 8 陈轶兰, 王辉, 吴伟元. 大肠埃希氏菌中质粒型 AmpC 基因的检测. *中国抗感染化疗杂志*, 2002, 2: 158-161.
- 9 宋玮, 唐英春, 陆坚. 产质粒介导 I 型头孢菌素酶细菌的耐药性及基因型研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 26: 697-700.
- 10 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide:AM076977.1>
- 11 Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, et al. Horizontal transfer of blaCMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 534-541.

(收稿日期: 2008-05-10)

(本文编辑: 温少芳)

叶英, 高建国, 李家斌. 产 ACT-2 型头孢菌素酶和 CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶及携带 I 类整合子的大肠埃希菌 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2008, 2(4): 264-270.