

致病性大肠埃希氏菌 ESBLs 基因型的检测 及其抑制剂的抑酶保护作用

张春辉^{1,2}, 张晓根¹, 张晓风¹, 王建华²

(1 郑州牧业工程高等专科学校 药物工程系, 河南 郑州 450011; 2 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】检测致病性大肠埃希氏菌中超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的基因型, 初步研究 β -内酰胺酶抑制剂(BLI)-他唑巴坦的抑酶保护作用。【方法】对产生 ESBLs 的 5 株致病性大肠埃希氏菌, 设计并合成 TEM-1 和 SHV-1 2 对引物, 用 PCR 方法进行了 ESBLs 的 DNA 扩增、测序和基因型分析; 用试管二倍稀释法测定头孢噻呋与 BLI-他唑巴坦钠以不同配比对产生 ESBLs 大肠埃希氏菌的最小抑菌浓度。【结果】从产生 ESBLs 细菌中均扩增出了 TEM 型 ESBLs 产物, 但未扩增出 SHV 型 ESBLs 产物; 头孢噻呋与 BLI-他唑巴坦钠(质量比 1 : 1~8 : 1)联合使用, 对产生 ESBLs 的大肠埃希氏菌的最小抑菌浓度较头孢噻呋单独使用基本降低, 最高可降低 16 倍。【结论】国内畜禽产生 ESBLs 的大肠埃希氏菌未通过质粒进行细菌间耐药基因的交换, ESBLs 的产生与生物种属没有关系, BLI-他唑巴坦有较强的抑制 ESBLs 作用。

【关键词】 β -内酰胺酶; BLI-他唑巴坦; 大肠埃希氏菌; 耐药性; 基因型

【中图分类号】S855.1; Q781

【文献标识码】A

【文章编号】1671-9387(2009)05-0024-05

Genotype detection of extend spectrum β -lactamase of pathogenic *Escherichia coli* and the inhibitive effect of BLI- tazobactam

ZHANG Chun-hui^{1,2}, ZHANG Xiao-gen¹, ZHANG Xiao-feng¹, WANG Jian-hua²

(1 Department of Animal Medicine, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450011, China;

2 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study was to detect genotype of extend spectrum β -lactamase in pathogenic Enterobacteriaceae, and to study the inhibitive effect of Tazobactam, a β -lactamases inhibitor (BLI). 【Method】For five *Enterobacteriaceae* tested for ESBLs by double-disk method, two primers were designed and synthesized; TEM-1 and SHV-1, ESBLs gene type was amplified, sequenced and analyzed by PCR; the minimal inhibitory concentrations (MICs) of Cefiofur combined BLI-Tazobactam to the five *Enterobacteriaceae* according to different proportions were carried out with two fold dilution method. 【Result】The produced bacteria ESBLs were amplified TEM type ESBLs fully, but no SHV type ESBLs; the minimal inhibitory concentrations (MICs) of BLI-Tazobactam combined Cefiofur according to different mass ratios (1 : 1—8 : 1) to the ESBLs bacteria reduced sixteen times compared with Cefiofur. 【Conclusion】①ESBLs bacteria have not transmitted resistant gene through plasmids; ②The production of ESBLs has no relation with animal genus; ③The BLI-Tazobactam has better activity to inhibit ESBLs.

Key words: β -lactamase; BLI-Tazobactam; *Enterobacteriaceae*; resistance; gene

* [收稿日期] 2008-08-05

[基金项目] 河南省教育厅资助项目(2006230004); 河南省科技厅资助项目(072102130009)

[作者简介] 张春辉(1975—), 女, 河南漯河人, 讲师, 在读博士, 主要从事新兽药研发及安全性评价。

E-mail: chunhuizhang@126.com

[通信作者] 王建华(1948—), 男, 河南南阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。

动物专用的第 3 代头孢类抗生素,如头孢噻唑(又名塞得福),抗菌谱广、抗菌活性强,生物利用度高,在国内外正逐渐广泛应用于畜禽疾病的治疗。但近年来,随着第 3 代头孢菌素的广泛应用和滥用,细菌尤其革兰氏阴性菌迫于生存压力对其已经产生了耐药性,耐药菌株逐年增多,且呈交叉耐药和多重耐药之趋势。研究表明,革兰氏阴性埃希氏菌对第 3 代头孢类抗生素和新的 β -内酰胺环类抗生素耐药的主要机制,是产生了超广谱 β -内酰胺酶(Extend spectrum β -lactamase, ESBLs)和 AmpC 酶(AmpC β -lactamase)^[1]。ESBLs 属于 Ambler 分类中 A 类分子,Bush 分类中被定义为水解氧亚氨基类头孢菌素等的酶^[2]。大肠埃希氏菌和克雷伯氏菌是 ESBLs 的主要携带者^[3]。张晓根等^[4]在鸡源大肠埃希菌中检测到了 ESBLs。根据 ESBLs 的基因同源性差异,目前可将其分为:TEM 型、SHV 型、CTX-M 型、OXA 型和其他类型^[5]。由于不同国家耐药菌 β -内酰胺酶的种类和基因型较复杂,产生 ESBLs 的细菌所携带的 ESBLs 质粒,可能还携带了耐喹诺酮类、氨基糖苷类和磺胺类等药物的多种耐药基因,故使耐药菌存在多种耐药表型,给临床治疗带来严重的威胁^[6]。

抑制 ESBLs 活性是克服细菌该类耐药性的有效手段。目前已开发利用的 β -内酰胺酶抑制剂(β -lactamase Inhibitor, BLI)有克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦,其中 BLI-他唑巴坦的稳定性优于克拉维酸,作用优于舒巴坦^[7]。但在兽医临床上对 ESBLs 和 BLI 的研究还较少。本研究对已经检测到产生 ESBLs 的菌株进行 PCR 扩增和序列分析,同时对 BLI-他唑巴坦抑制 ESBLs 的作用进行了初步分析,旨在阐明产生 ESBLs 大肠埃希菌的耐药机制,为头孢噻唑的复方制剂开发研制,及 ESBLs 产生细菌引起的感染性疾病控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与菌株 注射用头孢噻唑冻干粉(批号:20050101),河南普莱客公司产品;他唑巴坦钠(批号:20050510),齐鲁制药有限公司产品。

大肠埃希氏菌标准菌株:猪源 C₈₃₉₀₇ 和鸡源 C₈₃₈₄₅ 均购于中国兽药监察所。

大肠埃希氏菌临床分离菌株:开封鸡大肠埃希氏菌(T-1)、荥阳鸡大肠埃希氏菌(T-2)、原阳鸡大肠埃希氏菌(T-3)、洛阳猪大肠埃希氏菌(T-4)和山

东鸡大肠埃希氏菌(T-5),用双纸片协同法检测均产生 ESBLs^[8]。

1.1.2 主要试剂及仪器 微量质粒提取试剂盒、DNA 片段凝胶回收试剂盒,北京三博远志生物技术有限责任公司产品;GoldView 型核酸染色剂、D2000 DNAladder,北京索莱宝科技有限公司产品;dNTP、*Taq* 酶,大连宝生物工程有限公产品;DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪、水平微型电泳槽,北京市六一仪器厂产品;MILLIPORE-21JO 纯水机,美国 MILLIPORE 公司产品;UVI 紫外凝胶成像系统,英国 UVItec ST John's Innovation Centre 产品;YEAR2000 PCR 仪,德国 Biometra 公司产品;3K30 高速冷冻离心机,美国 SIGMA 公司产品。

1.2 ESBLs 基因的 PCR 扩增及序列分析比较^[9-10]

1.2.1 引物设计与合成 参照 GenBank 公布的 TEM 和 SHV 型 ESBLs 序列(序列号 AM25988 和 EF035567)分别设计并合成 TEM-1 和 SHV-1 2 对引物。TEM-1:上游引物 5'-GAG TAT TCA ACA TTT CCG TGT CGC-3',下游引物 5'-TAC CAA TGC TTA ATC AGT GAG GC-3';SHV-1:上游引物 5'-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3',下游引物 5'-TTA GCG TTG CCA GTG CTT GAT C-3'。上述引物均由上海宝生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 质粒提取 参照微量质粒提取试剂盒说明书提取质粒:将过夜培养菌液 13 000 r/min 离心 30 s,加入 250 μ L 溶液 P1 重悬菌体,加入 250 μ L 溶液 P2 室温裂解菌体,加入 350 μ L 溶液 P3 混匀冰浴 3~5 分钟,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入吸附柱 AC 中,13 000 r/min 离心 60 s,用漂洗液 WB 清洗吸附柱后,加入适量 EB 溶液洗脱,洗脱液经 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 1 μ g/mL 核酸染色剂)电泳,在 UVI 紫外凝胶成像系统上观察并拍照。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 扩增体系为 50 μ L:10 $\times$ buffer 5 μ L,dNTP 4 μ L,上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L,质粒 0.5 μ L,*Taq* 酶 0.5 μ L,无菌超纯水补足 50 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 反应结束后,取 5 μ L PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 1 μ g/mL 核酸染色剂)进行电泳检测,挑选 PCR 鉴定为阳性的细菌 PCR 产物,在紫外灯下切下目的条带,用 DNA 片段凝胶回收试剂盒回收后进行序列测定。测序反应由大连宝生物工程技术有限公司在 ABI-PRISM 377DNA Sequencer 上完成。

1.2.4 序列分析 利用 DNASTar 等软件对 ESBLs 基因进行同源性分析、多序列比对,构建系统发育树。

1.3 体外抑菌试验

采用试管二倍稀释法^[11],分别测定头孢噻呋及其与 BLI-他唑巴坦钠以不同质量配比(1:1,2:1,3:1,4:1,5:1,6:1,7:1,8:1)联合使用,对产生 ESBLs 大肠埃希氏菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations,MIC)。

2 结果与分析

2.1 大肠埃希氏菌 ESBLs 质粒提取物的检测

用微量质粒提取方法,对用双纸片协同法检测产生 ESBLs 的大肠埃希氏临床菌株进行质粒提取,结果从中均提取到了 ESBLs 耐药质粒(图 1)。

2.2 ESBLs 的 PCR 扩增及序列分析

以 ESBLs 耐药质粒提取物为模板进行 PCR 扩增,在所有样品中均扩增出 1 条与预期大小一致约 860 bp 的 TEM 型 ESBLs 片段,但未扩增出与预期大小一致的 SHV 型 ESBLs 片段(图 2)。用 DNAs-tar 软件,对上述 5 个 ESBLs 基因的同源序列以及

它们基因的分子进化进行分析,结果(图 3 和表 1)发现,荥阳鸡大肠埃希氏菌(T-2)与原阳鸡大肠埃希氏菌(T-3)产生的 ESBLs 关系比较接近;开封鸡大肠埃希氏菌(T-1)与洛阳猪大肠埃希氏菌(T-4)产生的是同一种基因型的 ESBLs;而山东鸡大肠埃希氏菌(T-5)与河南猪、鸡大肠埃希氏菌产生的 ES-
BLs 同源性较低。

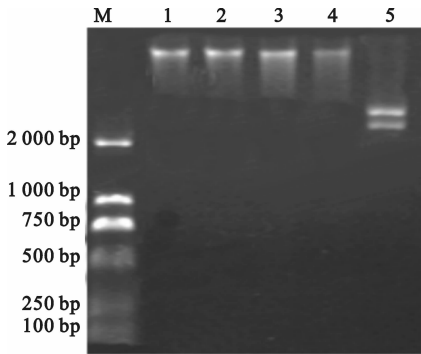


图 1 大肠埃希氏菌 ESBLs 质粒提取物的检测结果
M. Marker ;1~5. T-1、T-2、T-3、T-4 和 T-5
Fig.1 Result of plasmid of *Enterobacteriaceae* extracted of ESBLs
M. Marker;1-5. T-1,T-2,T-3,T-4 and T-5

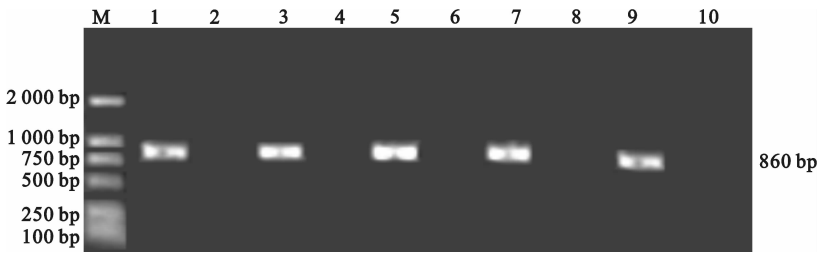


图 2 ESBLs 质粒提取物的 PCR 扩增产物
M. DL2000 Marker;1,3,5,7,9. T-1、T-2、T-3、T-4 和 T-5 的 TEM 引物 PCR 扩增产物;
2,4,6,8,10. T-1、T-2、T-3、T-4 和 T-5 的 SHV 引物 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR amplification of plasmid extracted from ESBLs
M. DL2000 Marker,1,3,5,7,9. PCR amplification of TEM primer of ESBLs for T-1,T-2,T-3,T-4 and T-5; 2,4,6,8,10. PCR amplification of SHV primer of ESBLs for T-1,T-2,T-3,T-4 and T-5

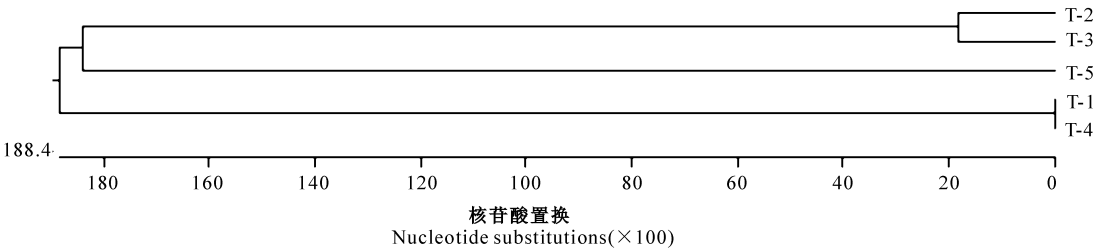


图 3 ESBLs 的序列进化树
Fig.3 Developmental tree of sequences of ESBLs

表 1 ESBLs PCR 扩增产物的序列同源性比较
Table 1 Percent identity about sequences of ESBLs

细菌 Bacterium	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5
T-1	—	25.7	25.8	100.0	23.2
T-2	350.0	—	99.9	25.7	23.0
T-3	421.7	0.1	—	25.8	23.1
T-4	0.0	350.0	421.7	—	23.2
T-5	350.0	350.0	350.0	350.0	—

注:—以上的数据为同源百分率,—以下数据为差异率。
Note: data above— are Percent Identity,data below — are Divergence.

2.3 BLI-他唑巴坦钠及与头孢噻呋联合使用对产生 ESBLs 大肠埃希氏菌的体外抑菌试验结果
试管二倍稀释法测定的头孢噻呋及其联合 BLI-他唑巴坦钠对产生 ESBLs 大肠埃希氏菌的最小抑菌浓度见表 2。由表 2 可知,头孢噻呋对临床

大肠埃希菌株的 MIC 值是标准菌株的 25~400 倍;头孢噻呋与 BLI-他唑巴坦钠以 8 : 1 质量比联合使用,较头孢噻呋对产生 ESBLs 大肠埃希菌 MIC 值均基本降低,其中最高降低 16 倍,表现出较强的抑酶效果。

表 2 头孢噻呋单独用药及其与 BLI-他唑巴坦钠联合使用对产生 ESBLs 大肠埃希氏菌的 MIC 值 $\mu\text{g/mL}$
Table 2 MIC of Cefiofur and Cefiofur combining BLI-Tazobactam sodium to Enterobacteriaceae producing ESBLs

细菌 Bacterium	头孢噻呋 Cefiofur	BLI-他唑巴坦钠 Tazobactam sodium	$m(\text{头孢噻呋}):m(\text{BLI-他唑巴坦钠})$ Cefiofur/ Tazobactam sodium							
			1 : 1	2 : 1	3 : 1	4 : 1	5 : 1	6 : 1	7 : 1	8 : 1
T-1	10	>128	5	5	5	5	5	10	10	10
T-2	40	>128	10	10	10	10	10	20	20	20
T-3	80	>128	5	5	5	5	5	5	5	5
T-4	80	>128	20	20	20	20	20	20	20	20
T-5	64	>128	10	10	10	10	10	20	20	20
C ₈₃₉₀₇	0.4	160	—	—	—	—	—	—	—	—
C ₈₃₈₄₅	0.2	80	—	—	—	—	—	—	—	—

注:“—”未测定。
Note:“—”no test.

3 讨论与结论

(1) 近年来有关 ESBLs 产生菌的耐药性问题研究,在国内已经引起高度重视。张春辉等^[12]报道,用双纸片协同法检测 ESBLs 的产生菌,具有较高的可靠性。本研究利用 GenBank 上已公布的序列设计 TEM 型和 SHV 型引物,对不同地区分离的 5 株产 ESBLs 大肠埃希菌进行了耐药基因扩增,结果均得到了 TEM 型 ESBLs 片段,与前人报道一致^[12]。

(2) 本研究发现,目前国内畜禽产 ESBLs 大肠埃希氏菌未通过质粒进行细菌间耐药基因的交换。因为从产生 ESBLs 细菌中均能扩增出 TEM 型 ESBLs,而未发现携带 SHV 型 ESBLs 的耐药基因,也未发现同时携带 TEM 型和 SHV 型 ESBLs 耐药基因。这可能与使用头孢类抗生素的种类和频率有关。

(3) 本研究进行序列分析发现:①山东鸡大肠埃希菌(T-5)与河南猪、鸡大肠埃希菌所产生的 ES-
BLs 关系较远,不同地区由于抗生素使用的种类和

数量不同,与之相对应的 ESBLs 流行类型也不相同,这与 Hong 等^[13]的报道一致;② 开封鸡大肠埃希菌与洛阳猪大肠埃希菌产生了同一种 ESBLs,但其与同种属动物鸡中分离到的蒙阳鸡大肠埃希氏菌所产生的 ESBLs 关系较远,可知 ESBLs 的产生与生物种属没有关系。

(4) 尽管动物专用药物头孢噻呋,具有抗菌活性强、药代动力学特征优良、毒副作用小、残留低等优点^[14]。从本研究的体外抑菌试验可以发现,在兽医临床上,第 3 代头孢类抗生素的耐药性已非常严重,与标准菌株相比较,头孢噻呋对临床菌株的最小抑菌浓度值已经提高了 25~400 倍。

本研究中,头孢噻呋与 BLI-他唑巴坦钠以 8 : 1 质量比联合使用较其单独用药,对洛阳猪大肠埃希菌 MIC 可降低 16 倍,BLI-他唑巴坦钠表现出了很强的抑酶效果,与 Wise 等^[15]的报道一致。

[参考文献]

[1] Jacoby G A,Archer G L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agent [J]. Neng Med B,1991,324:601-

- 612.
- [2] Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification scheme for β -Lactamses and its correlation with molecular structure [J]. *Antimicrob Agents chemother*, 1995 (39): 1211-1233.
- [3] Sirotd. Extended-spectrum plasmid mediated β -lactamase [J]. *J Antimicrob Chem*, 1996(A): 19.
- [4] 张晓根, 张春辉, 汪德刚, 等. 鸡源大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶的检测 [J]. *中兽医医药杂志*, 2006(6): 34-35.
Zhang X G, Zhang C H, Wang D G, et al. Detection of Extended Spectrum β -lactamase in *Escherichia coli* isolated from fowls [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2006 (6): 34-35. (in Chinese)
- [5] Yan J, Kow C, Jung YC, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 β -lactamases in a university hospital in Taiwan [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40 (9): 3121-3326.
- [6] Hong G Z, Zhang C H, Yuan L, et al. Detection of β -lactamase and Extended-spectrum β -lactamase and antibiotic susceptibility test analysis of *Pathogens* isolated from pig and chicken and their antibiotics susceptibility test [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2005(11): 1671-2927.
- [7] Bantar C, Vesco E, Heft C, et al. Replacement of broad-spectrum Cephalosporins by piperacillin-tazobactam; impact on sustained high rates of bacterial resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 392-395.
- [8] Thomson K S, Sanders C C. Detection of extend-spectrum β -lactamases in members of the family enterobacteriaceae; comparison of the double-disk and three-dimensional tests [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36: 1877-1882.
- [9] 杨 滨, 孔详圣. 产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌与大肠埃希菌 *qnrB* 基因的检测 [J]. *实用医学杂志*, 2007, 23(24): 3945-3946.
Yang B, Kong X S. Detection of *qnrB* gene in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* which produced Extended Spectrum β -lactamase [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2007(24): 3945-3946. (in Chinese)
- [10] 胡功政, 孙亚伟, 陈红英, 等. 鸡志贺氏菌产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 的分子进化 [J]. *中国农业科学*, 2008(2): 593-598.
Hu G Z, Sun Y W, Chen H Y, et al. Molecular evolution of the Extended Spectrum β -lactamase (ESBLs) produced by the *Shigella* isolated from the fowl [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008(2): 593-598. (in Chinese)
- [11] 张春辉, 周青云, 胡功政. 舒巴坦与常见 β -内酰胺环类抗生素的体外抑菌试验 [J]. *中兽医医药杂志*, 2005(5): 63-37.
Zhang C H, Zhou Q Y, Hu G Z, et al. Antibacterial test of Sulbactam combined with common β -lactam antibiotics *in vitro* [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2005(5): 63-37. (in Chinese)
- [12] 张春辉, 张晓根, 张 华. 兽医临床超广谱 β -内酰胺酶的表型检测方法 [J]. *中兽医医药杂志*, 2006(6): 68-69.
Zhang C H, Zhang X G, Zhang H. The method for phenotypic detection of Extended - spectrum β -lactamases in veterinary clinical [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2006(6): 68-69. (in Chinese)
- [13] Hong F, Christina L, Barbro OL, et al. Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* isolates producing Extended-spectrum β -lactamase for identification of Nosocomial outbreaks in Stockholm, Sweden [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (12): 17-20.
- [14] 王付民, 胡功政, 苑 丽. 新的第三代头孢菌素——头孢噻唑 [J]. *信阳农业高等专科学校学报*, 2001(4): 1-5.
Wang F M, Hu G Z, Yuan L. A new and third generation cephalosporin, Ceftiofur [J]. *Journal of Xinyang Agricultural College*, 2001(4): 1-5. (in Chinese)
- [15] Wise R, Logan M, Cooper M, et al. Pharmacokinetics and tissue penetration of tazobactam administered alone and with piperacillin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36(6): 1997.