

2 株产气肠杆菌临床株对厄他培南耐药机制的研究

张 肖, 宋诗铎, 祁 伟, 王淑香, 郭文学

(天津医科大学第二医院 天津市感染性疾病研究所, 天津 300211)

[摘 要] **目的** 研究 2 株产气肠杆菌临床株 Ea293 和 Ea2880 对厄他培南耐药的机制。**方法** 采用微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(MIC), 应用 K-B 法检测菌株对美罗培南、亚胺培南及厄他培南的耐药性, 改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶; 聚合酶链反应(PCR)扩增碳青霉烯酶基因(*KPC*, *IMP*-1、2 组, *VIM*)和广谱及超广谱 β -内酰胺酶基因(*TEM*, *SHV*, *CTX-M*-1、2、9 组 ESBLs), 并进行序列分析; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行细菌外膜蛋白分析, 并对外膜蛋白基因 *OmpE36* 进行 PCR 扩增及序列分析。**结果** 药物敏感试验显示, 产气肠杆菌 Ea293 和 Ea2880 均对厄他培南耐药。PCR 扩增 4 种碳青霉烯酶基因和 5 种广谱及超广谱 β -内酰胺酶基因, 仅 Ea2880 的 *SHV* 和 *CTX-M*-9 组 ESBLs 基因阳性, *SHV* 基因的 PCR 产物测序为 *SHV*-11 型广谱酶。细菌外膜蛋白 SDS-PAGE 结果显示, 与碳青霉烯类抗生素敏感的产气肠杆菌 Ea1885 相比, Ea293 和 Ea2880 均缺失 42 kD 左右的条带, 即 *OmpE36*。PCR 扩增外膜蛋白基因 *OmpE36*, Ea2880 可见预期片段, DNA 序列分析显示其与 GenBank 公布的产气肠杆菌标准株 ATCC 13048 的相似性为 87%, 氨基酸序列的相似性亦为 87%; 而 Ea293 未扩增出预期片段。**结论** 产气肠杆菌临床株 Ea293 与 Ea2880 对厄他培南耐药的主要原因可能是外膜蛋白基因 *OmpE36* 缺失, 同时 Ea2880 可能还有 *CTX-M*-9 组 ESBLs 参与。

[关键词] 产气肠杆菌; 厄他培南; 碳青霉烯酶; 超广谱 β -内酰胺酶; 基因; 外膜蛋白基因; 序列分析; 抗药性, 微生物

[中图分类号] R969.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)06-0408-06

Study on resistant mechanism of two clinical strains of *Enterobacter aerogenes* to ertapenem

ZHANG Xiao, SONG Shi-duo, QI Wei, WANG Shu-xiang, GUO Wen-xue (Tianjin Institute of Infectious Diseases, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[Abstract] **Objective** To study resistant mechanisms of two clinical strains of *Enterobacter aerogenes* (Ea293 and Ea2880) to ertapenem. **Methods** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents were determined by microbroth dilution method, drug resistance of strains to imipenem, meropenem, and ertapenem were determined by K-B test; carbapenemase was confirmed by modified Hodge test, carbapenemase genes (*KPC*, *IMP*-1 group, *IMP*-2 group, *VIM*), broad-spectrum and extended-spectrum β -lactamases genes (*TEM*, *SHV*, *CTX-M*-1 group, *CTX-M*-2 group, *CTX-M*-9 group) were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and sequences were analysed; Outer membrane protein (Omp) was analyzed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the coding gene *OmpE36* was amplified by PCR. **Results** Antimicrobial susceptibility test showed that Ea293 and Ea2880 were all resistant to ertapenem. Among amplified 4 carbapenemase genes and 5 broad-spectrum and extended-spectrum genes, only *blaSHV* and *blaCTX-M*-9 group ESBLs in Ea2880 were positive. *BlaSHV* DNA sequence was *SHV*-11 type. SDS-PAGE showed that compared with ertapenem-sensitive isolate Ea1885, ertapenem-resistant isolate Ea293 and Ea2880 lacked the protein band with 42kD which might be the outer membrane protein gene *OmpE36*. *OmpE36* was amplified by PCR, Ea2880 appeared the expected bands, but Ea293 didn't. The similarity of DNA and amino acid sequences of *OmpE36* of Ea2880 with the standard *Enterobacter aerogenes* ATCC13048 from GenBank were both 87%. **Conclusion** The resistance of clinical strains of *Enterobacter*

[收稿日期] 2010-05-24

[作者简介] 张肖(1984-), 女(汉族), 河北省石家庄市人, 硕士研究生, 主要从事细菌耐药与致病性研究。

[通讯作者] 宋诗铎 E-mail: shiduosong1@yahoo.com.cn

aerogenes Ea293 and Ea2880 to ertapenem might be associated with the loss of outer membrane protein gene *OmpE36*. Furthermore, Ea2880 might be associated with production of CTX-M-9 group ESBLs.

[Key words] *Enterobacter aerogenes*; ertapenem; carbapenemases; extended-spectrum β -lactamases; genes; outer membrane protein gene; sequence analysis; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2010, 9(6): 408 - 413]

产气肠杆菌引起的医院感染在不断增加,随着抗菌药物的广泛应用,多重耐药菌株陆续出现。碳青霉烯类抗生素是治疗此类多重耐药细菌的一线药物。由于该类抗生素应用的增多,多重耐药菌株的分离率增加,这对临床选择抗生素带来严重压力。目前肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制主要归结于产生碳青霉烯酶,包括新型的碳青霉烯酶——KPC 酶、IMI 酶、金属酶(IMP 酶、VIM 酶等)等^[1-2],以及细菌的外膜机制^[1,3]。后者指与药物转运有关的外膜孔道蛋白的缺失或数量的减少,此外伴或不伴高水平 β -内酰胺酶(AmpC 酶、ESBLs 等)的产生也起一定作用。本研究主要探讨 2 株对厄他培南耐药的临床产气肠杆菌对厄他培南耐药的机制。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验株:产气肠杆菌 Ea293 和 Ea2880,均分离自患者痰液;对照株:产气肠杆菌 Ea1885,为分离自临床的厄他培南敏感株;大肠埃希菌 ATCC 25922 为本院细菌室保存菌种;大肠埃希菌 EcKPC 对厄他培南耐药,产 KPC 酶阳性,由浙江大学医学院附属第一医院俞云松教授赠送。

1.2 试剂与材料 LB 培养基由胰蛋白胨、酵母浸粉(购于中国药品生物制品检定所)、氯化钠(购于天津市华东试剂厂)按说明书配制;M-H 培养基由 M-H 琼脂培养基(购于中国药品生物制品检定所)按说明书配制。左氧氟沙星(LVX)、环丙沙星(CIP)、头孢吡肟(FEP)、头孢他啶(CAZ)、氧氟沙星(OFX)、阿米卡星(AMK)、哌拉西林(PFP)、头孢噻肟(CTX)、头孢哌酮(CFP)、头孢曲松(CRO)、头孢哌酮/舒巴坦(SCF)、庆大霉素(GEN)等 12 种抗菌药物,为中国药品生物制品检定所标准品。美罗培南、亚胺培南及厄他培南纸片由默沙东制药有限公司赠送。聚合酶链反应(PCR)引物由 Invitrogen 公司合成, Premix (PerfectShot™ Taq) 购于 TaKaRa 公司, DL 2000 DNA Marker 购于上海生工生物工程有限公司,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电

泳(SDS-PAGE)相关试剂购于碧云天生物技术研究

所。
1.3 药物敏感试验 采用微量肉汤稀释法测定菌株对 12 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC);应用 K-B 法检测细菌对美罗培南、亚胺培南及厄他培南的敏感性,具体方法及判定标准参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2009 年标准。

1.4 改良 Hodge 试验^[1] 参照 CLSI(2009 年)推荐的方法。

1.5 细菌总 DNA 的提取 以煮沸法制备细菌总 DNA。

1.6 PCR 扩增 β -内酰胺酶基因 根据 GenBank 公布的序列自行设计引物,扩增 4 种碳青霉烯酶基因(KPC, IMP-1,2 组, VIM)和 5 种广谱及超广谱 β -内酰胺酶基因(TEM, SHV, CTX-M-1,2,9 组 ESBLs)片段;引物序列由 Invitrogen 公司合成,详见表 1。

1.7 外膜蛋白提取和 10% SDS-PAGE 分析 采用超声破碎法提取产气肠杆菌临床株 Ea293、Ea2880 以及对对照株 Ea1885 的外膜蛋白^[4-5],外膜蛋白沉淀与上样缓冲液混合、煮沸,取混合液于垂直电泳仪上进行 SDS-PAGE 分析,所用凝胶为 10% 分离胶和 5% 浓缩胶。120V 恒压电泳 120 min,电泳结束后用考马斯亮蓝快速染色液染色 2 h,置于蒸馏水中脱色过夜。

1.8 *OmpE36* 基因 PCR 扩增及 DNA 序列分析 根据 GenBank 公布的产气肠杆菌外膜蛋白 *OmpE36* 的编码基因序列,自行设计引物: *OmpE36* F (-39~-19) 5'-AACGTAATA-AAGGCATATAAC-3'和 R(+899~+914) 5'-ACGGACGGACGCACAC-3', 预计产物长度约 953 bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下观察结果。将 PCR 产物送 Invitrogen 公司进行序列分析。

2 结果

2.1 药物敏感试验 K-B 法检测显示,产气肠杆菌临床株 Ea293 和 Ea2880 均对厄他培南耐药,抑菌

圈直径分别为 14 mm 和 15 mm;均对美罗培南和亚胺培南敏感;对 12 种抗菌药物的 MIC 值见表 2,显示 Ea2880 除对 AMK 敏感,对 OFX 及 LVX 中介以外,对其余 9 种抗菌药物表现为耐药,为多重耐药

菌株。Ea293 对 LVX、CIP、OFX、GEN 敏感,对 FEP、CAZ、PFP、CFP 耐药,对 AMK、CTX、CRO、SCF 中介。对照株 Ea1885 对 12 种抗菌药物、美罗培南、亚胺培南以及厄他培南均敏感。

表 1 PCR 引物序列、所在位置及预计产物长度

Table 1 Primer sequence, location and length of product in PCR

目标基因	扩增序列(5'—3')	基因位置	基因长度(bp)
KPC	F CGGCTTGCTGGACACAC	+ 261~ + 277	612
	R TTGACGCCAATCCCTCG	+ 855~ + 872	
IMP-1 组	F ACGGGCGGAATAGAGTGG	+ 301~ + 318	397
	R TAACCGCTGCTCTAATGT	+ 679~ + 697	
IMP-2 组	F GTTTTATGTGTATGCTTCC	+ 16~ + 34	724
	R AGTTACTTGGCTGTGATGGT	+ 720~ + 739	
VIM	F GGTGAGTATCCGACAGT	+ 91~ + 107	608
	R GCTTCCGGTAGTG	+ 685~ + 698	
TEM	F TTTCCTGTCGCCCTTAT	+ 15~ + 32	630
	R GCAACTTTATCCGCCTCC	+ 627~ + 644	
SHV	F TCTCCCTGTTAGCCACCCTG	+ 26~ + 45	593
	R CCACTGCAGCAGCTGCCGTT	+ 599~ + 618	
CTX-M-1 组	F ATTAGAGCGGCAGTCGG	+ 117~ + 133	587
	R CCACAACCCAGGAAGCAG	+ 686~ + 703	
CTX-M-2 组	F ACGCTACCCCTGCTATT	+ 46~ + 62	581
	R TGTGCCCGCTGAGTTTC	+ 610~ + 626	
CTX-M-9 组	F ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	+ 1~ + 20	870
	R CCCTTCGGCGATGATTCTC	+ 852~ + 870	

表 2 12 种抗菌药物对产气肠杆菌临床株的 MIC (μg/mL)

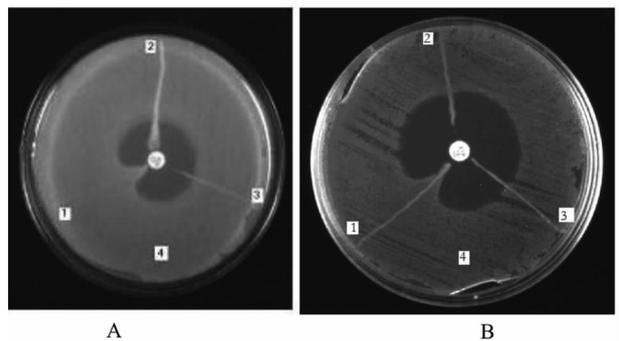
Table 2 Minimal inhibitory concentration of 12 kinds of antimicrobial agents to clinical strains of *Enterobacter aerogenes* (μg/mL)

抗菌药物	MIC		
	Ea293	Ea2880	Ea1885
LVX	1	4	≤0.06
CIP	1	>8	≤0.06
FEP	64	>64	≤0.5
CAZ	64	64	≤0.5
OFX	2	4	≤0.06
AMK	32	8	≤0.5
PFP	256	>256	16
CTX	32	>64	≤0.5
CFP	64	>64	≤0.5
CRO	32	>64	≤0.5
SCF	32	>64	≤1
GEN	4	>64	≤1

2.2 改良 Hodge 试验 图 1 显示,对照株大肠埃希菌 EcKPC 改良 Hodge 试验阳性,为产 KPC 酶菌株;产气肠杆菌临床株 Ea293 和 Ea2880 改良 Hodge 试验阴性,为可能不产碳青霉烯酶菌株。

2.3 PCR 扩增 β-内酰胺酶基因 对产气肠杆菌临床株 Ea2880 进行耐药基因扩增,包括 4 种碳青霉烯酶(KPC, IMP-1、2 组,VIM)和 5 种广谱及超广

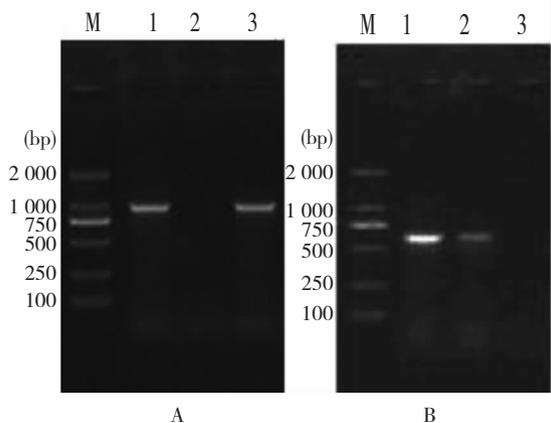
谱 β-内酰胺酶基因(TEM, SHV, CTX-M-1、2、9 组 ESBLs),除 SHV 和 CTX-M-9 组 ESBLs 基因 PCR 扩增结果显示可见相应的扩增产物外,余均阴性。SHV 基因的 PCR 产物经 DNA 测序为 SHV-11 型广谱酶。图 2 为产气肠杆菌 Ea293 和 Ea2880 CTX-M-9 组 ESBLs 和 SHV 基因的 PCR 扩增结果。



中央纸片为厄他培南纸片(10 μg); A: Ea2880 结果(1: EcKPC; 2: Ea1885; 3: Ea2880; 4: ATCC 25922); B: Ea293 结果(1: EcKPC; 2: Ea1885; 3: Ea293; 4: ATCC 25922)

图 1 产气肠杆菌临床株改良 Hodge 试验

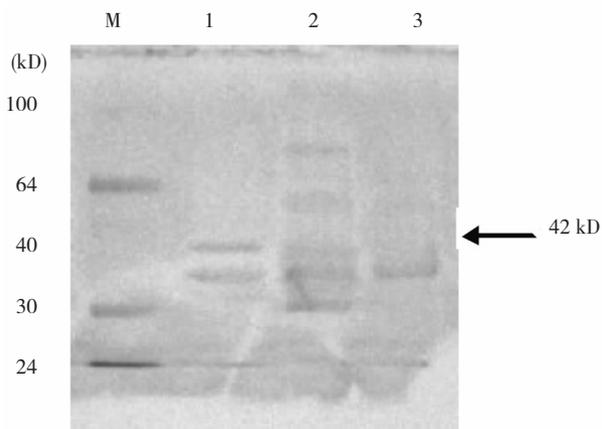
Figure 1 Modified Hodge test for clinical strains of *Enterobacter aerogenes*



M: DL2000 DNA Marker; A: CTX-M-9 组 ESBLs(1: 阳性对照; 2: Ea293; 3: Ea2880); B: SHV(1: 阳性对照; 2: Ea2880; 3: Ea293)

图 2 产气肠杆菌临床株 β -内酰胺酶基因的 PCR 扩增结果
Figure 2 PCR results of β -lactamase genes for clinical strains of *Enterobacter aerogenes*

2.4 10% SDS-PAGE 细菌外膜蛋白图谱见图 3。与产气肠杆菌敏感株 Ea1885 比较, 发现产气肠杆菌临床株 Ea293 和 Ea2880 均缺失 42 kD 左右的条带, 即 *OmpE36*。

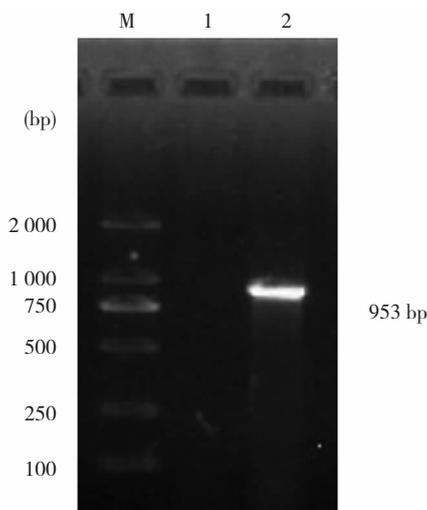


M: 低分子蛋白质标准; 1: 对照株 Ea1885 ; 2: Ea293 ; 3: Ea2880

图 3 产气肠杆菌临床株外膜蛋白 SDS-PAGE 图谱
Figure 3 SDS-PAGE map of out membrane protein in clinical strains of *Enterobacter aerogenes*

2.5 *OmpE36* 基因 PCR 扩增 对产气肠杆菌外膜蛋白 *OmpE36* 基因 PCR 扩增显示, 产气肠杆菌临床株 Ea2880 扩增出约 953 bp 的预期片段, 而 Ea293 未扩增出预期片段, 见图 4。Ea2880 的 *OmpE36* 基因 DNA 序列分析: 所得序列提交 GenBank, 登录号为 GU980831, 与 GenBank 中公布的产气肠杆菌标准株 ATCC 13048 *OmpE36* 基因序列比对, 同源率为 87%, 表现为多处点突变以及若

干小片段的插入和缺失, 主要为 718—732 bp 及 740—756 bp 的缺失, 见图 5。



M: DL2000 DNA Marker; 1: Ea293; 2: Ea2880

图 4 产气肠杆菌临床株外膜蛋白基因 *OmpE36* PCR 扩增结果

Figure 4 PCR result of outer membrane protein gene *OmpE36* in clinical strains of *Enterobacter aerogenes*

由 DNA 序列推导的相应氨基酸序列的同源性为 87%, 主要表现在 225—235 位氨基酸的缺失, 见图 6。应用 PRED-TMBB 软件对推导的氨基酸序列进行跨膜片段的分析, 实验株 Ea2880 与标准株 ATCC 13048 均有 12 个跨膜片段, 其中第 7 个跨膜片段存在差别, 见图 7。

3 讨论

随着广谱抗菌药物的广泛应用, 细菌的耐药性已成为全球医学界关注的问题。在社区及医院感染中, 肠杆菌科细菌是重要的病原菌, 临床上多重耐药株的出现也使其耐药问题日益严峻。在所有 β -内酰胺类抗生素中, 碳青霉烯类抗生素具有最广泛的抗菌活性, 它对革兰阴性菌产生的 ESBLs、AmpC 酶都很稳定, 是治疗革兰阴性杆菌感染的一线药物, 但随着应用的增加, 对其耐药的报道也日渐增多。近年来, 临床上对碳青霉烯类抗生素耐药的细菌常见为非发酵菌, 如鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌、洋葱伯克霍尔德菌和脑膜炎败血黄杆菌等, 肠杆菌科细菌很少见, 但有增加的趋势, 需引起我们的高度重视。目前常用的碳青霉烯类抗生素有亚胺培南、美罗培南及厄他培南等, 根据国外有

对碳青霉烯类抗生素耐药主要表现为 OmpE36 膜孔蛋白的缺失。本实验通过 SDS-PAGE, 对耐厄他培南菌株 Ea293 和 Ea2880 进行外膜蛋白分析, 与对照株 Ea1885 相比, Ea293 和 Ea2880 均缺失分子量为 42 kD 左右的条带, 即 *OmpE36*, 与文献报道基本一致。同时对 Ea293 和 Ea2880 的 *OmpE36* 膜孔蛋白的编码基因 *OmpE36* 进行 PCR 扩增, Ea293 未扩增出预期片段, Ea2880 扩增出预期片段。对于 Ea293, 可能是由于 *OmpE36* 基因变异较大, 用本研究的特异性引物无法扩增出相应片段, 这需要进一步设计引物验证该基因是否缺失。对于 Ea2880, *OmpE36* 基因测序结果与 GenBank 公布的产气肠杆菌标准菌株 ATCC 13048 的 *OmpE36* 基因序列比对, 发现二者相似性为 87%; Ea2880 的 *OmpE36* 基因存在多处点突变以及若干小片段的插入和缺失, 主要表现为 718—732 bp 及 740—756 bp 的缺失。为了进一步研究, 将 Ea2880 及标准菌株 ATCC 13048 的 *OmpE36* 基因序列翻译成相关的氨基酸序列, 通过比对, 发现二者相似性为 87%, 主要表现在 225—235 位氨基酸的缺失。应用 PRED-TMBB 软件对该蛋白质进行跨膜片段的分析, 结果显示, 二者均有 12 个跨膜片段, 其中第 7 个跨膜片段存在差别, 这样就可能引起蛋白功能的变化, 进而影响蛋白的表达, 在 SDS-PAGE 电泳图谱上则表现为蛋白的缺失。

通过相关的实验研究发现, 本实验分离到的耐厄他培南产气肠杆菌对厄他培南耐药的机制可能与 *OmpE36* 膜孔蛋白的变化有关, 其中还可能有 CTX-M-9 组 ESBLs 的参与。耐碳青霉烯类抗生素产气肠杆菌的出现需引起我们的高度重视, 应加强耐药监测, 避免形成流行和扩散。

[参考文献]

- [1] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria [J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(4): 228 - 36.
- [2] Queenan A M, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440 - 458.
- [3] Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, et al. Ertapenem resistance among extended-spectrum-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 969 - 974.
- [4] Cohen S P, McMurry L M, Levy S B. marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1988, 170(12): 5416 - 5422.
- [5] Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39 (3) : 645 - 649.
- [6] Anderson K F, Lonsway D R, Rasheed J K, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45 (8): 2723 - 2725.
- [7] Yigit H, Anderson G J, Biddle J W, et al. Carbapenem persistence in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46 (12): 3817 - 3822.
- [8] Thiolas A, Bornet C, Davin-Régli A, et al. Resistance to imipenem, cefepime, and ceftazidime associated with mutation in Omp36 osmoporin of *Enterobacter aerogenes* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317: 851 - 856.
- [9] 张樱, 陈亚岗, 俞云松, 等. 亚胺培南耐药的产气肠杆菌耐药机制研究[C]. 2007 年浙江省医学病毒学、医学微生物与免疫学学术年会论文汇编. 杭州.

(上接第 407 页)

[参考文献]

- [1] 丛培芳, 荣成市 5106 名饮食从业人员 HBsAg 检测结果分析 [J]. 疾病监测, 2001, 16(7): 262.
- [2] 吴疆, 张卫, 韩莉莉, 等. 北京市人群乙型肝炎血清流行病学研究

[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(6): 555 - 557.

- [3] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组 (全国结核病流行病学抽样调查办公室). 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告 [J]. 中国防痨杂志, 2007, 24(2): 65 - 71.