

大肠埃希菌临床菌株优势 β -内酰胺酶基因型及其诱导表达与抑制的研究

谈潘莉 汪浙炯 孙爱华 严杰 赵金方

【摘要】 目的 了解浙江地区大肠埃希菌临床菌株优势 β -内酰胺酶基因型及其携带模式、 β -内酰胺类抗生素诱导 β -内酰胺酶基因表达及组氨酸激酶抑制剂氯氟碘柳胺(CLO)抑制其表达的作用。方法 采用微量稀释法和E-test检测大肠埃希菌临床菌株对 β -内酰胺类抗生素耐药率和最低抑菌浓度(MIC)。采用PCR及其产物测序法检测大肠埃希菌耐药菌株 β -内酰胺酶基因型及携带模式。采用实时荧光定量RT-PCR和 β -内酰胺酶确证试验分别检测1/4 MIC头孢噻肟或青霉素及CLO对大肠埃希菌耐药菌株 β -内酰胺酶基因转录和表达的影响。结果 浙江地区61.7% (285/462)大肠埃希菌对青霉素、氨苄青霉素、头孢西丁、头孢噻肟和头孢他啶耐药。285株耐药菌株中,TEM和CTX-M基因检出率(83.2%和75.1%)显著高于KPC、SHV和OXA基因(1.4%~10.2%)($P<0.01$),两种以上 β -内酰胺酶基因携带率(68.8%)显著高于单基因(31.2%)($P<0.01$),其中61.4%菌株携带TEM+CTX-M基因($P<0.01$)。除KPC基因外,1/4 MIC头孢噻肟和青霉素能诱导89株 β -内酰胺酶单基因菌株TEM、CTX-M、SHV和OXA mRNA水平迅速升高($P<0.01$),但可被50~500 $\mu\text{g/ml}$ CLO所抑制($P<0.01$)。100 $\mu\text{g/ml}$ CLO预处理后,82.8%~85.6%耐药菌株对上述抗生素敏感($P<0.01$), β -内酰胺酶检出率也从95.1%下降至16.1%($P<0.01$)。结论 TEM和CTX-M是浙江地区大肠埃希菌临床菌株优势 β -内酰胺酶基因型,并以TEM-1+CTX-M为优势携带模式。低浓度头孢噻肟和青霉素可经细菌二元信号系统上调 β -内酰胺酶基因表达,但可被组氨酸激酶抑制剂CLO所抑制。

【关键词】 大肠埃希菌; β -内酰胺类抗生素; 耐药性; β -内酰胺酶/基因型/表达; 组氨酸激酶/抑制剂

Predominant β -lactamase genotypes of *Escherichia coli* isolates and induction and inhibition mechanisms of β -lactamase gene expression Tan Panli¹, Wang Zhejiang¹, Sun Aihua², Yan Jie³, Zhao Jinfang¹. 1 Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicine University, Hangzhou 310006, China; 2 Zhejiang Medical College; 3 Department of Medical Microbiology and Parasitology, Medical School of Zhejiang University

Corresponding author: Zhao Jinfang, Email: xinqiuzh@163.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81271893), National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY12H19002) and Science and Technique Research Project of Health Bureau of Zhejiang Province (No. 2011KYA005).

【Abstract】 Objective To understand the predominant β -lactamase genotypes and their carrying modes of *Escherichia coli* isolates in Zhejiang province, and the effects of β -lactam antibiotics on inducing or histidine kinase inhibitor closantel (CLO) on inhibiting the expression of β -lactamase genes. **Methods** Micro-dilution method and E-test were applied to measure the resistant rate and minimal inhibitory concentration (MIC) in *E. coli* isolates against β -lactam antibiotics. PCR and sequence analysis of PCR products were conducted to detect the β -lactamase genotypes and their carrying modes. Real-time fluorescent quantitative RT-PCR and β -lactamase confirmation test were performed to determine the influence of 1/4 MIC penicillin and cefotaxime, and CLO on the

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.05.016

基金项目:国家自然科学基金(81271893);浙江省自然科学基金(LY12H19002);浙江省卫生厅科研项目(2011KYA005)

作者单位:310006 杭州,浙江中医药大学附属第一医院检验科(谈潘莉、汪浙炯、赵金方);浙江医学高等专科学校(孙爱华);浙江大学医学院病原生物学系(严杰)

谈潘莉、汪浙炯同为第一作者

通信作者:赵金方, Email: xinqiuzh@163.com

transcription and expression of β -lactamase genes in the resistant *E. coli* isolates. **Results** Among the 462 *E. coli* strains isolated in Zhejiang, 285 (61.7%) were resistant to penicillin, ampicillin, cefoxitin, cefotaxim and ceftazidime. In the 285 resistant isolates, the detection rate of TEM or CTX-M β -lactamase gene (83.2% or 75.1%) was significantly higher than that of KPC, SHV or OXA β -lactamase gene (1.4%–10.2%) ($P < 0.01$) and the carrying rate of two or more β -lactamase genes (68.8%) was also significantly higher than that of single β -lactamase gene (31.2%) ($P < 0.01$), and 61.4% of the resistant isolates carried TEM + CTX-M genes ($P < 0.01$). Except KPC gene, 1/4 MIC of cefotaxim and penicillin induced a rapid increase of TEM-mRNA, CTX-M-mRNA, SHV-mRNA or OXA-mRNA levels ($P < 0.01$), but 50–500 $\mu\text{g/ml}$ CLO inhibited these levels ($P < 0.01$). After pre-treatment with 100 $\mu\text{g/ml}$ CLO, 82.8%–85.6% of the resistant isolates became sensitive to β -lactam antibiotics ($P < 0.01$), while the detection rate of β -lactamases was also decreased from 95.1% to 16.1% ($P < 0.01$). **Conclusion** TEM and CTX-M are the predominant β -lactamase genotypes in *E. coli* isolates in Zhejiang and TEM + CTX-M is the predominant carrying mode of β -lactamase genes. Low concentrations of β -lactam antibiotics can up-regulate the expression levels of β -lactamase genes in *E. coli* through bacterial two-component signaling systems, but this effect can be inhibited by CLO, a histidine kinase inhibitor.

【Key words】 *Escherichia coli*; β -lactam antibiotics; Resistance; β -lactamase/genotype/expression; Histidine kinase/inhibitor

大肠埃希菌(*E. coli*)常作为条件致病菌引起尿道炎、败血症、肺炎和新生儿脑膜炎等疾病^[1]。临床上通常采用 β -内酰胺类头孢菌素治疗*E. coli*感染性疾病,但该菌对 β -内酰胺类抗生素有较高耐药率,其机制主要是产生 β -内酰胺酶^[2-4]。 β -内酰胺酶有多种类型,其中以KPC、TEM、CTX-M、SHV和OXA较为常见,但不同地区*E. coli*的优势 β -内酰胺酶基因型有一定差异^[5-8]。近年发现,通常由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和应答调节蛋白(response regulatory protein, RRP)组成的细菌二元信号系统(two-component signaling system, TCSS)与细菌耐药性密切相关^[9-10]。为此本研究对分离自浙江省部分地区的*E. coli*临床菌株检测 β -内酰胺类抗生素耐药性及其 β -内酰胺酶基因型,探讨 β -内酰胺类抗生素诱导细菌 β -内酰胺酶基因表达以及HK抑制剂氯氰碘柳胺(closantel, CLO)抑制细菌耐药性的作用,以了解当地优势 β -内酰胺酶基因型及其携带模式,也可为抗细菌耐药新药研发提供依据。

材料与方法

1. 菌株来源及鉴定:462株*E. coli*临床分离菌株来自浙江省杭州、宁波和金华地区8家医院的下呼吸道感染病例痰液、感染性胸膜炎病例胸水、新生儿脑膜炎脑脊液、菌血症或败血症病例外周血、泌尿道重度感染病例尿液。上述菌株均经VITEK Compact 2型全自动细菌检测分析系统及其配套的细菌鉴定卡GNI鉴定。质控菌株为*E. coli* ATCC25922株由浙江大学医学院病原生物学系严杰教授惠赠。

2. 药物敏感试验:采用美国国家临床实验室标

准委员会(NCCLS)推荐的微量稀释法检测上述临床菌株对青霉素(CPN)、氨苄青霉素(AMP)、头孢西丁(CFX)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)的最低抑菌浓度(MIC)^[11]。

3. β -内酰胺酶及其基因检测:采用NCCLS推荐的纸片法 β -内酰胺酶确证试验^[11]。将*E. coli*耐药菌株涂布于M-H琼脂平板,贴上CAZ、CAZ/克拉维酸(CA)或CTX、CTX/CA纸片(bioMerieux),35℃培养24h后观察结果,若复合药物纸片抑菌环直径较相应单一药物纸片抑菌环直径 ≥ 5 mm为 β -内酰胺酶确证试验阳性。

采用细菌基因组DNA提取试剂盒(Axygen)提取*E. coli*耐药菌株基因组DNA,紫外分光光度法测定其浓度和纯度^[12]。根据文献报道的KPC、TEM、CTX-M、SHV和OXA基因通用引物序列^[13-17],委托上海Invitrogen公司合成各引物(表1)。采用高保真PCR试剂盒(TaKaRa)检测各菌株 β -内酰胺酶基因。PCR反应总体积为100 μl ,内含2.5 mol/L dNTP、200 nmol/L各引物、20 mol/L MgCl_2 、2.5 U EX-Taq DNA聚合酶、100 ng DNA模板和1 \times PCR缓冲液(pH 8.3)。PCR参数:94℃ 5 min;94℃ 30 s、52℃或55℃ 30 s、72℃ 120 s,30个循环;72℃ 10 min。采用溴乙锭预染色的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR结果,KPC、TEM、CTX-M、SHV和OXA基因扩增片段分别为1 050、972、882、1 017和441 bp。采用PCR产物纯化试剂盒(TaKaRa)回收各靶基因扩增片段,采用T-A克隆试剂盒(TaKaRa)将其克隆至pMD-19T质粒中。重组pMD-19T电转化入*E. coli* DH5 α (Invitrogen),然后在含AMP(Sigma)LB培养液(bioMerieux)中扩增。采用质粒提取试剂盒

表 1 PCR 和 qRT-PCR 引物

引物序列(5'→3')	用途	产物 (bp)
KPC-1		
F:GCTACACCTAGCTCCACCTCC R:TCAGTGCTCTACAGAAAACC	KPC 基因检测	1 050
KPC-2		
F:TGATTGGCTAAAGGGAAACACG R:TGCCATACACTCCGCAGGTT	KPC-mRNA 检测	104
TEM-1		
F:TCGGGCAAATGTGCG R:TGCTTAATCAGTGAGGCACC	TEM 基因检测	972
TEM-2		
F:AGCCATACCAAACGACGAGC R:GCAACTTTATCCGCCTCCAT	TEM-mRNA 检测	138
CTX-M-1		
F:GTTACAGCCCTTCGGCGATGATC R:GCGCATGGTGACAAAGAGAGTGCA	CTX-M 基因检测	882
CTX-M-2		
F:GGATCGCACTGAACCTACGC R:CTTTGAGCCACGTCACCAACT	CTX-M-mRNA 检测	152
SHV-1		
F:GCCGGTTATTTTATTGTGCG R:TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA	SHV 基因检测	1 017
SHV-2		
F:TGACGGTCGGCGAACTCT R:CAAGCGGGTGACGTTGT	SHV-mRNA 检测	138
OXA-1		
F:CTGTTGTTTGGGTTTCGCAAG R:CTTGCGCTTTATGCTTGATG	OXA 基因检测	441
OXA-2		
F:TATGGCATTGATGCGGAAA R:GCGAAACCCAAACAACAGAAA	OXA-mRNA 检测	134
16S RNA		
F:AGAGCAAGCGGACCTCATAAA R:AACGTATTACCGTGACATTCTG	qRT-PCR 内参照	113

注:F:上游引物;R:下游引物

(Axygen) 提取 *E. coli* DH5 α 中扩增的重组 pMD-19T, 委托上海 Invitrogen 公司测序, 采用 BLAST 软件将测序结果与 GenBank 中相应序列进行比较, 确定其 β -内酰胺酶基因型^[12]。

4. E-test: 采用法国 bioMerieux 公司 CTX 和 CPN 纸片及其实验流程, 以获得携带 β -内酰胺酶单基因耐药菌株更精确的 MIC。

5. 抗生素作用前后 β -内酰胺酶基因 mRNA 检测: 用 1/4 MIC 头孢噻肟或青霉素 (Sigma) 分别作用于 89 株携带 β -内酰胺酶单基因耐药菌株 0.5、1、2 和 4 h, 8 000 r/min 离心 10 min (4 °C), 细菌沉淀用 PBS 洗涤、离心 3 次。取细菌沉淀用 TRIzol 试剂 (Sigma) 提取总 RNA, 分光光度法测定其浓度和纯度^[12]。采用反转录试剂盒 (TaKaRa) 将等量各细菌总 RNA 反

转录后获得 cDNA。KPC、TEM、CTX-M、SHV、OXA 基因以及作为内参照的 16S rRNA 基因实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR) 引物见表 1, 引物由上海 Invitrogen 公司合成。采用 SYBR Premix Ex-Taq™ 荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa) 及 ABI-7500 型实时荧光定量 PCR 仪, 对各反转录产物进行扩增。反应体系 20 μ l, 引物浓度为 0.2 μ mol/L, 2 μ l 反转录产物为模板。反应参数: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。获得的 qRT-PCR 数据用 REST2005 软件及 $\Delta\Delta$ CT 相对定量法进行定量, 并与抗生素作用前 β -内酰胺酶基因 mRNA 水平进行比较^[18]。采用 *E. coli* 16S RNA 基因作为内参照 (表 1)^[17]。

6. CLO 毒性试验: 100 株耐药菌株中加入 25、50、100、250 或 500 μ g/ml 的 CLO (Sigma) 后 37 °C 作用 0.5 h^[19], 然后分别采用微量稀释法及 NCCLS 介绍的最低杀菌浓度 (MBC) 检测方法分别测定 CLO 对 *E. coli* 的 MIC 和 MBC^[11]。以 CLO 未作用的菌株作为对照。

7. CLO 作用前后抗生素诱导 β -内酰胺酶基因 mRNA 水平检测: 89 株携带 β -内酰胺酶单基因的耐药菌株用 25、50、100、250 或 500 μ g/ml 的 CLO (Sigma) 37 °C 作用 0.5 h。上述抗生素作用前后 β -内酰胺酶基因 mRNA 检测显示, 除 KPC 基因外, 上述 1/4 MIC 头孢噻肟或青霉素作用 1、2 或 4 h 时 TEM、CTX-M、SHV 和 OXA 基因 mRNA 升高水平相似, 故各菌株 CLO 预处理后加入 1/4 MIC 的 CTX 或 CPN 后 37 °C 作用 1 h, 然后采用上述 qRT-PCR 检测细菌 KPC、TEM、CTX-M、SHV 和 OXA 基因 mRNA 水平变化。同样以 CLO 未作用菌株作为对照。

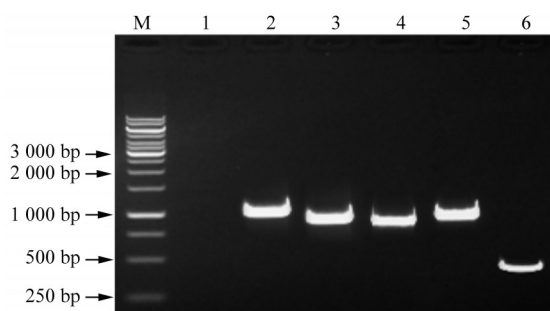
8. CLO 抑制 β -内酰胺酶表达及协同抑菌作用的检测: 根据上述 CLO 毒性试验及 CLO 相关 qRT-PCR 检测结果, 先用 100 μ g/ml 的 CLO (Sigma) 37 °C 作用耐药菌株 0.5 h, 然后用上述微量稀释法和 β -内酰胺酶确证试验分别检测 5 种 β -内酰胺类抗生素对细菌 MIC 及 β -内酰胺酶活性变化, 检测结果与 CLO 未作用菌株进行比较。以 *E. coli* ATCC25922 为质控菌株。

9. 统计学分析: 采用 SPSS 13.0 软件分别对细菌耐药率、 β -内酰胺酶及其基因检出率、 β -内酰胺酶 mRNA 水平进行 χ^2 和 *t* 检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 耐药菌株 β -内酰胺酶检测: 采用微量稀释法

测定,462株 *E. coli* 中有61.7% (285/462) 的菌株对CPN、AMP、CFX、CTX和CAZ耐药。285株β-内酰胺类抗生素耐药菌株中有93.3% (266/285) 的菌株β-内酰胺酶确证试验为阳性,采用PCR,285株β-内酰胺类抗生素耐药菌株可检出KPC、TEM、SHV、CTX-M、SHV和/或OXA基因(图1),与GenBank中公布的相应β-内酰胺酶基因序列比较,其序列相似性高达99.6%~100%。



注:M:DNA Marker(TaKaRa); 1:空白对照; 2~6:分别为KPC(1 050 bp)、TEM(972 bp)、CTX-M(882 bp)、SHV(1 017 bp)和OXA(441 bp)基因扩增条带

图1 *E. coli* 临床分离株的β-内酰胺酶基因扩增条带

2. CLO作用后细菌耐药性和β-内酰胺酶阳性率变化:CLO对 *E. coli* 的MIC和MBC均>500 μg/ml。与100 μg/ml CLO作用前比较,285株耐药菌株经CLO作用后有82.8% (236株)、84.9% (242株)、83.5% (238株)、85.3% (243株)和85.6% (244株)菌株转为对CPN、AMP、CFX、CTX和CAZ敏感($P < 0.01$);β-内酰胺酶确证试验阳性率也从CLO作用前的95.1% (271/285)降低至作用后的16.1% (46/285) ($P < 0.01$)。见表2。

表2 CLO作用后 *E. coli* 耐药性和β-内酰胺酶阳性率变化

实验类型	耐药/敏感或酶阳性/阴性菌株数(%)				
	CPN	AMP	CFX	CTX	CAZ
药物敏感试验					
前	285/0	285/0	285/0	285/0	285/0
后	49/236 (82.8)	43/242 (84.9)	47/238 (83.5)	42/243 (85.3)	41/244 (85.6)
β-内酰胺酶试验					
前		266/19(93.3)			
后		46/239(16.1)			

注:括号内数据为β-内酰胺酶阳性率(%);与CLO作用前比较 $P < 0.01$

3. 优势β-内酰胺酶基因型及其携带模式:285株β-内酰胺类抗生素耐药菌株中1.8% (5/285) 的菌株检出KPC基因、83.2% (237/285) 检出TEM基因、75.1% (214/285) 检出CTX-M基因、10.2% (29/285) 检出SHV基因、1.4% (4/285) 检出OXA基因,TEM

和CTX-M基因检出率显著高于KPC、SHV和OXA基因($P < 0.01$)。31.2% (89/285) 菌株携带KPC、TEM、CTX-M、SHV或OXA单基因,68.8% (196/285) 菌株携带两种以上β-内酰胺酶基因,其检出率显著高于携带β-内酰胺酶单基因菌株($P < 0.01$)。携带两种以上β-内酰胺酶基因菌株中,89.3% (175/196) 菌株同时携带TEM和CTX-M基因(TEM+CTX-M),明显高于TEM+SHV(5.6%, 11/196)、CTX-M+OXA(0.5%, 1/196)、SHV+OXA(0.5%, 1/196)和TEM+CTX-M+SHV(4.1%, 8/196)基因携带模式($P < 0.01$),见表3。

表3 285株 *E. coli* 耐药菌β-内酰胺酶基因类型及携带模式

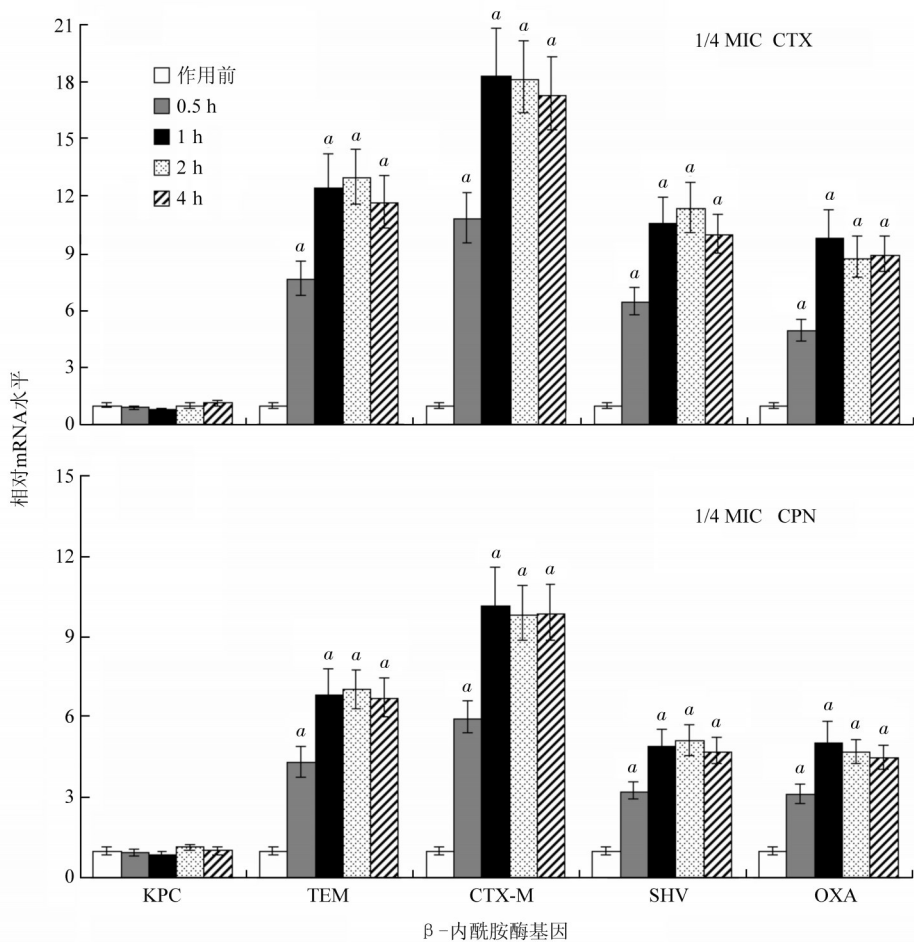
β-内酰胺酶基因种类及携带模式	株数	构成比(%)
KPC	5	1.8
TEM	43	15.1
CTX-M	30	10.5
SHV	9	3.2
OXA	2	0.7
TEM+CTX-M	175	61.4
TEM+SHV	11	3.9
CTX-M+OXA	1	0.3
SHV+OXA	1	0.3
TEM+CTX-M+SHV	8	2.8
合计	285	100.0

4. 低浓度抗生素对β-内酰胺酶mRNA水平的影响:与抗生素作用前比较,89株携带TEM、CTX-M、SHV或OXA单基因的耐药菌株经1/4 MIC的CTX或CPN作用0.5 h后,TEM-mRNA、CTX-M-mRNA、SHV-mRNA和OXA-mRNA水平均显著提高($P < 0.01$),并在作用1或2 h时达到峰值,但KPC-mRNA无明显变化(图2)。

5. CLO抑制抗生素诱导β-内酰胺酶mRNA升高的作用:89株携带TEM、CTX-M、SHV或OXA单基因耐药菌株经采用浓度为50~500 μg/ml CLO作用后,明显抑制了上述1/4 MIC的CTX或CPN可诱导细菌TEM-mRNA、CTX-M-mRNA、SHV-mRNA和OXA-mRNA水平升高现象($P < 0.01$),但对KPC-mRNA无明显影响(图3)。

讨论

β-内酰胺酶根据作用机制不同可分为丝氨酸β-内酰胺酶和金属β-内酰胺酶^[6]。而根据水解抗生素的不同,β-内酰胺酶又可分为广谱(broad-spectrum)和超广谱(extended-spectrum)两类,TEM-1、TEM-2和SHV-1属前者,可使细菌对



注:携带KPC、TEM、CTX-M、SHV和OXA β-内酰胺酶单基因的*E. coli*分别为5、43、30、9和2株; *与1/4 MIC的CTX或CPN未作用菌株靶基因mRNA水平比较 $P < 0.01$

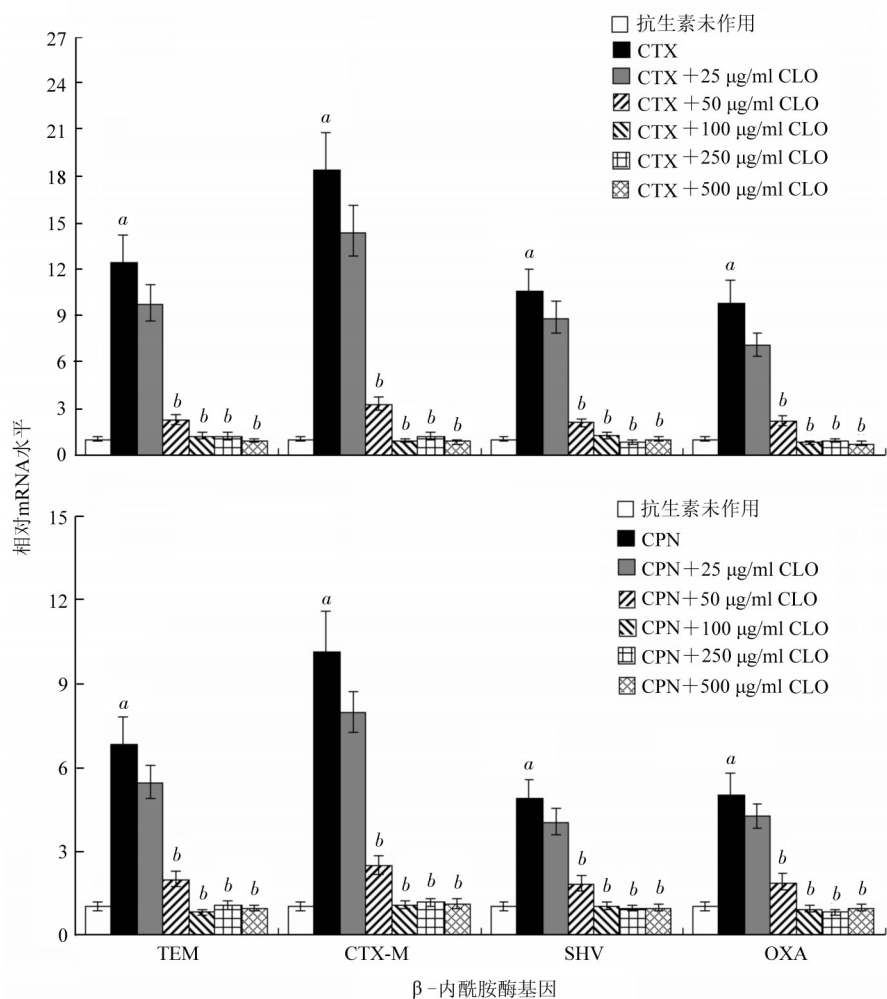
图2 1/4 MIC的CTX和CPN诱导β-内酰胺酶基因转录效果

青霉素类和一代头孢菌素头孢唑林(cefazolin)耐药,其余TEM和SHV以及KPC、CTX-M、OXA为后者,可使细菌耐药谱扩展至二代及以上头孢菌素和氨基糖苷类(aztreonam)^[5,13]。

*E. coli*可产生多种广谱和超广谱β-内酰胺酶,且不同地区菌株优势β-内酰胺酶基因型有一定差异,如TEM和SHV型流行于北美和西欧、CTX-M型多见于东欧和亚洲及南美^[2,5,7,20]。我国临床分离菌株β-内酰胺酶基因型,广东地区以CTX-M型为主,山西地区常见TEM型^[3,4,21]。本研究462株临床菌株中,61.7%对多种青霉素类和头孢菌素类抗生素耐药,耐药率与国内其他地区相似^[3-4];285株耐药菌株中,分别有83.2%和75.1%的菌株检出TEM和CTX-M基因,远高于SHV(10.2%)、KPC(1.8%)和OXA(1.4%)基因($P < 0.01$),表明TEM和CTX-M基因均为浙江地区*E. coli*的优势β-内酰胺酶基因型。此外,285株耐药菌株中,68.8%的菌株携带两种以上β-内酰胺酶基因,其中64.2%菌株同时携带TEM

和CTX-M基因(61.4%为TEM+CTX-M,2.8%为TEM+CTX-M+SHV),表明TEM+CTX-M是浙江地区*E. coli*耐药菌株β-内酰胺酶基因主要携带模式。

临床上常将β-内酰胺酶抑制剂与头孢菌素联合应用,治疗β-内酰胺类抗生素耐药菌株感染性疾病,但一些抑制剂可与β-内酰胺酶结合使之失活,不能抑制其表达^[22-23]。业已证明,细菌HK胞外区与环境信号分子结合后发生变构,从而将信号传入胞内并使胞内区激酶催化位点中组氨酸被ATP磷酸化激活,RRP接受HK传递的磷酸基团后也随之活化,具备了与靶基因启动子结合并调控其表达的能力,若HK被抑制或失活,细菌无法对信号分子作出反应^[9]。CLO可特异与细菌HK胞内酶催化区结合,引起HK分子变构、磷酸化障碍而失活,故CLO成为目前实验中常用的细菌HK特异性抑制剂^[24]。β-内酰胺类抗生素主要有头孢菌素和青霉素两大类,本研究选择CTX和CPN。为防止不同β-内酰胺酶基因



注:携带TEM、CTX-M、SHV和OXA β-内酰胺酶单基因的 *E. coli* 分别为43、30、9和2株; ^a与1/4 MIC的CTX或CPN未作用菌株靶基因mRNA水平比较 $P < 0.01$; ^b与CLO未预处理、1/4 MIC的CTX或CPN作用菌株靶基因mRNA水平比较 $P < 0.01$

图3 CLO抑制CTX和CPN诱导β-内酰胺酶mRNA升高的作用

之间可能的干扰,试验中选择携带TEM、CTX-M、SHV或OXA单基因的耐药菌株。与真核细胞不同,原核细胞仅能在转录水平调控基因表达,故mRNA水平可直接反映基因的表达水平^[10]。为了避免较高浓度抗生素时因细菌生长抑制而影响靶基因表达,还采用1/4 MIC的CTX或CPN以探讨其诱导β-内酰胺酶基因mRNA水平升高以及CLO抑制该mRNA升高的作用。qRT-PCR结果显示,在1/4 MIC的CTX或CPN作用下,TEM、CTX-M、SHV和OXA基因mRNA水平迅速显著升高,但可被50~500 µg/ml的CLO抑制,提示低浓度CTX或CPN可能作为外源性信号分子经HK相关TCSS诱导 *E. coli* β-内酰胺酶基因表达。然而,该剂量的CTX或CPN均未显示出可诱导KPC基因mRNA升高的作用,提示这些抗生素可能不是诱导KPC基因表达的外源性信号分子。

为了排除CLO对 *E. coli* 毒性而导致β-内酰胺酶基因mRNA水平降低,本研究还检测了CLO对 *E. coli* 的MIC和MBC,结果显示25~500 µg/ml的CLO均无抑菌或杀菌作用。此外,药敏试验和β-内酰胺酶确证试验表明,经100 µg/ml CLO作用后82.8%~85.6%的耐药菌株转为对5种β-内酰胺类抗生素敏感,β-内酰胺酶检出率也从95.1%降至16.1%,不仅提示CLO具有协同β-内酰胺类抗生素抑菌的作用,同时也从蛋白水平上证实CLO可抑制 *E. coli* 的β-内酰胺酶基因表达。

参 考 文 献

- [1] Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli* [J]. Virulence, 2012, 3 (1):18-28.
- [2] Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum

- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in non-hospitalized patients[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1089-1094.
- [3] Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. 2011 CHINNET surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chin J Infect Chemother, 2012, 12(5): 321-329. (in Chinese)
胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011年中国CHINNET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(5): 321-329.
- [4] Wang F, Zhu DM, Hu FP, et al. 2012 CHINNET surveillance of bacterial resistance in China [J]. Chin J Infect Chemother, 2013, 13(5): 321-330. (in Chinese)
汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012年中国CHINNET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 321-330.
- [5] Shah AA, Hasan F, Ahmed S, et al. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases [J]. Res Microbiol, 2004, 155(6): 409-421.
- [6] Perez F, Endimiani A, Hujer KM, et al. The continuing challenge of ESBLs[J]. Curr Opin Pharmacol, 2007, 7(5): 459-469.
- [7] Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* [J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(7): 1499-1504.
- [8] Sheng WH, Badal RE, Hsueh PR. Distribution of extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases, and carbapenemases among *Enterobacteriaceae* isolates causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: results of the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(7): 2981-2988.
- [9] Gotoh Y, Eguchi Y, Watanabe T, et al. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria[J]. Curr Opin Microbiol, 2010, 13(2): 232-239.
- [10] Sun AH, Fang JQ, Yan J. Advance and development in research of bacterial drug-resistance signaling mechanism and multiple antigenic peptide-based vaccines [J]. J Zhejiang Univ: Med Sci, 2013, 42(2): 125-130. (in Chinese)
孙爱华, 方佳琪, 严杰. 病原菌耐药信号传导机制及多抗原肽疫苗研究进展与发展趋势[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2013, 42(2): 125-130.
- [11] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. 20th ed. 21th Informational Supplement (M100-S21), NCCLS, Wayne: NCCLS, 2011.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.21-1.52, 2.60-2.80, 7.30-7.35, 9.14-9.22.
- [13] Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 933-951.
- [14] Nuesch-Inderinen MT, Hachler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with E test [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996, 15(5): 398-402.
- [15] Holstein A, Grillon A, Yzon L, et al. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M type producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Bretonneau hospitals (CHRU Tours) [J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(1): 67-69.
- [16] Yu YS, Ji SJ, Chen YG, et al. Resistance of strains producing extended-spectrum β -lactamases and genotype distribution in China [J]. J Infect, 2007, 54(1): 53-57.
- [17] Wu YF, Sun AH, Zhao JF, et al. Distribution of drug inactive enzyme genes in bacterial isolates and mechanism of its induction and inhibition [J]. J Zhejiang Univ: Med Sci, 2013, 42(2): 131-140. (in Chinese)
吴亦斐, 孙爱华, 赵金方, 等. 细菌药物钝化酶基因分布及其表达诱导与抑制机制的研究 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2013, 42(2): 131-140.
- [18] Pfaffl MW, Horgan, GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(9): e36-45.
- [19] Kumagai YM, Cheng ZH, Lin MQ, et al. Biochemical activities of three pairs of *Ehrlichia chaffeensis* two-component regulatory system proteins involved in inhibition of lysosomal fusion [J]. Infect Immun, 2006, 74(9): 5014-5022.
- [20] Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms [J]. J Hosp Infect, 2009, 73(4): 345-354.
- [21] Zhuo C, Su DH, Li HY, et al. Study on CTX-M type ESBLs-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Guangzhou [J]. Chin J Lab Med, 2009, 32(10): 1114-1119. (in Chinese)
卓超, 苏丹虹, 李红玉, 等. 广州地区产CTX-M型超广谱 β 内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(10): 1114-1119.
- [22] Thomson JM, Distler AM, Bonomo RA. Overcoming resistance to β -lactamase inhibitors: comparing sulbactam to novel inhibitors against clavulanate resistant SHV enzymes with substitutions at Ambler position 244 [J]. Biochemistry, 2007, 46(40): 11361-11368.
- [23] Sood S. Comparative evaluation of the *in-vitro* activity of six β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations against Gram negative bacilli [J]. J Clin Diagn Res, 2013, 7(2): 224-228.
- [24] Stephenson K, Yamaguchi Y, Hoch JA. The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems [J]. J Biol Chem, 2000, 275(49): 38900-38904.

(收稿日期: 2014-11-29)

(本文编辑: 张林东)