文章编号:1000-5404(2006)16-1685-03

论著

产超广谱β-内酰胺酶大肠杆菌耐药性及基因型检测

程训民[1], 李 敏[1], 徐元宏[2], 张 琪[1], 朱素珍[1] ([1]淮北市人民医院检验科, 淮北 235000; [2]安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022)

提 要: 目的 探讨产超广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamases, ESBLs)大肠埃希菌的分子流行病学及对常用抗菌药物的耐药情况。**方法** 产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌的初筛试验采用纸片法,并用确证试验加以确认;用PCR的方法扩增其ESBLs基因片段;用K-B琼脂扩散法进行菌株的药敏试验。**结果** 124株大肠埃希菌中共检出54株产ESBLs(43.5%)。在耐药性检测中,其对哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南的耐药率分别为3.7%、0.0%和5.6%,PCR扩增基因型阳性结果为TEM型23株、SHV型13株、CTX-M型41株、OXA型8株,其基因型以CTX-M型为主。**结论** 本院大肠埃希菌产ESBLs率显著升高,应引起重视;基因型以CTX-M型为主,有些菌株同时携带两种或两种以上耐药基因;其治疗首选药物建议使用亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦和哌拉西林/他唑巴坦。

关键词: 大肠埃希菌; 超广谱β-内酰胺酶; 基因型; 耐药性
中图法分类号: R378.21;R394.2;R915 **文献标识码**: A

Detection of drug resistance and genotype of extended-spectrum β-lactamases producing *Escherichia coli*

CHENG Xun-min[1], LI Min[1], XU Yuan-hong[2], ZHANG Qi[1], ZHU Su-zhen[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, Huaibei People's Hospital, Huaibei 235000, [2]Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Abstract: Objective To explore the molecular epidemiology and antimicrobial resistance of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli*. **Methods** The strains of ESBLs-producing *Escherichia coli* were identified by disk diffusion method and confirmatory test. The ESBLs encoding genes were amplified by PCR. The antibiotic susceptibility of clinical isolates were tested by Kirby-Bauer method. **Results** In 124 clinical isolates of *Escherichia coli* analyzed, 54 ESBLs-producing isolates were detected (43.5%). The resistance rates of *Escherichia coli* to piperacillin/tazobactam, cefoperazone/sulbactam, imipenem were 3.7%, 0.0% and 5.6% respectively. In 54 ESBLs-producing strains, TEM-type, SHV-type, CTX-M-type, OXA-type accounted for 23, 13, 41, 8 respectively, and ESBLs encoding gene mainly belonged to CTX-M-type. **Conclusion** The fact that the occurrence of ESBLs-producing *Escherichia coli* increased significantly in the region should be paid more attention to. The major ESBLs encoding gene is CTX-M-type, and some strains carrying two or more than two types of drug resistance genes. Piperacillin/tazobactam, cefoperazone/sulbactam, imipenem are suitable in managing the infection caused by ESBLs-producing *Escherichia coli* strains.

Key words: *Escherichia coli*; extended-spectrum β-lactamases; genotype; drug resistance

近年来,随着抗生素的大量应用和不合理以及滥用抗生素,大肠埃希菌产ESBLs菌株逐年增多,ESBLs在菌株间转移和传播[1],更增强了细菌的耐药和多重耐药性,使其耐药性成为突出问题。为更好的了解产超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌基因型分布及对常用抗生素的耐药情况,本研究将我院产ESBLs大肠埃希菌的检测结果及耐药性分析如下,供临床治疗参考应用。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

124株大肠埃希菌来源为2002年11月至2005年3月我

基金项目:安徽省卫生厅自然科研基金资助项目(2002A012),淮北市科技局科研基金资助项目(030131)
Supported by the Natural Science Foundation of Bureau of Public Health of Anhui Province (2002A012) and the Research Funds of Sci & Tech Bureau of Huaibei (030131)

作者简介:程训民(1965-),男,安徽省砀山县人,副主任检验师,主要从事细菌的耐药性方面的研究,发表论文8篇。电话:(0561)3380738, E-mail: cxm669@ah163.com

收稿日期:2005-05-18;修回日期:2005-08-15

院临床标本分离所得。标本的采集、送检、实验室接受标本后的处理依据《全国临床检验操作规程》[2]。质控菌株：大肠埃希氏菌 ATCC25922，肺炎克雷伯菌 ATCC700603，标准产酶 *Eco* 菌株 TEM-1、TEM-3 、SHV-5 、CTX-M-3、CTX-M-24、TOHO-1、OXA-1，OXA-2 和 OXA-10 均由安徽医科大学第一附属医院检验科惠赠。

1.2 主要仪器与试剂

采用德国 Biometra 公司 DNA 扩增仪及大连宝生物工程公司 PCR 反应试剂盒进行 DNA 扩增；药敏培养基（Mueller—Hinton 琼脂）、药敏纸片均购自 Oxiod 公司；根据 GenBank 公布的 bla_{TEM}、bla_{SHV}、bla_{CTX-M}、bla_{OXA} 的 DNA 序列设计合成特异性引物，TEM 引物序列分别为 5′-TGCGGTATTATCCCGTGTTG-3′和 5′-TCGTCGTTTGGTA TGGCTTC -3′，SHV 引物序列分别为 5′-TCTCCCTGTTAGCC ACCCTG -3′和 5′-CCACTGCAGCAGCTGC-CGTT -3′，CTX-M 引物序列分别为 5′-ACAGCGATAACGTG-GCGATG-3′，5′- TCACCCAATGCTTTACCCAG -3′，5′- CTGCT-TAATCAGC CTGTCGA -3′，和 5′- TCAGTGCGATCCAGACGAAA -3′，OXA 的引物序列分别为 5′- TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT -3′，5′- TTTCTTGGCTTTTATGCTTG -3′等均由上海生物工程公司合成。

1.3 方法

1.3.1 筛选实验 选用头孢他啶、氨曲南、头孢噻肟、头孢曲松药敏纸片，用 MH 琼脂 35 ℃ 18 h 观察结果，按 NCCLS 标准进行判断[4]。凡头孢他啶的抑菌圈直径≤22 mm，头孢曲松≤25 mm，氨曲南或头孢噻肟≤27 mm 为可疑 ESBLs 菌株。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC700603 。

1.3.2 确证实验 按标准纸片扩散法的规定进行，用 CAZ 和 CAZ/Clav，CTX 和 CTX/Clav 两组纸片做确证试验，含克拉维酸与其相应不含克拉维酸的纸片抑菌圈直径差值≥5 mm，确定为产 ESBLs 菌株。

1.3.3 基因扩增 PCR 反应总体积为 50 μl 含 1×PCR 缓冲液，3.5 mmol/L Mg^{2+}，200 μmol/L dNTPs，500 nmol/L 引物，1 U *Taq* 酶，10～50 ng 待测 DNA 模板。反应参数为开始 5 min 94 ℃解链，继以 94 ℃ 30 s 解链，退火温度依据引物不同为 56～62 ℃ 30 s，再以 72 ℃延伸 1 min，循环 35 次，最后 72 ℃保温 7 min。PCR 扩增产物用 12 g/L 凝胶（含 0.2 μg/ml 溴化乙锭）电泳，在 Tanon-102 凝胶成像系统下分析结果。设 *Eco* ATCC 25922 及空白为阴性对照，标准产酶 *Eco*（TEM-1、SHV-5 、CTX-M-3、CTX-M-24、TOHO-1、OXA-1，OXA-2 和 OXA-10）分别为阳性对照。

1.3.4 药敏实验 采用纸片扩散法即 Kirby-Bauer 法，按统一方案进行药敏试验。并按 NCCLS 标准[3]，用 *E. coli.* ATCC25922 做药敏质控。

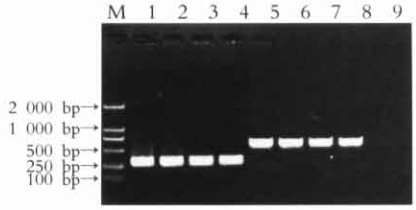
2 结果

2.1 ESBLs 试实结果

本次试验中 124 株大肠埃希菌共检出 54 株产 ESBLS（43.5%）。

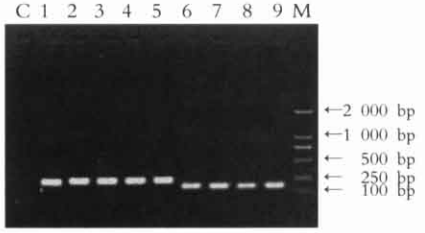
2.2 ESBLs 基因检测结果

对 ESBLs 表型确认实验阳性的 54 株大肠埃希菌进行 PCR 扩增，其结果显示 TEM 型阳性 23 株、SHV 型阳性 13 株、CTX-M 型阳性 41 株、OXA 型阳性 8 株。部分菌株电泳结果见图 1、2。



M：DL2000 DNA 标准（TaKaRa）；1，2 3，5，6，7：临床菌株；4：TEM-1 阳性对照；8：SHV-5 阳性对照；9：空白对照

图 1 部分携带 TEM 和 SHV 型基因菌株 PCR 产物电泳结果



M：DL2000 DNA 标准（TaKaRa）；C：空白对照；1，2，3，4，6，7，8：临床菌株；5：CTX-M-24 阳性对照；9：CTX-M-3 阳性对照；

图 2 部分携带 CTX-M 型基因菌株 PCR 产物电泳结果

2.3 药敏实验结果

54 株产 ESBLS 的大肠埃希菌 对所测的 19 种抗生素以哌拉西林/他唑巴坦和头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南最低。此外，阿米卡星、头孢吡肟、头孢他啶耐药率也较低。具体见表 1。

表 1 54 株大肠埃希菌 ESBLS 阳性株药敏实验结果

抗生素	耐药 R(%)	中介 I(%)	敏感 S(%)
哌拉西林/他唑巴坦	3.7	0.0	96.3
头孢哌酮/舒巴坦	0.0	0.0	100.0
亚胺培南	5.6	0.0	94.4
阿米卡星	16.7	3.7	79.6
环丙沙星	83.3	7.4	9.3
氧氟沙星	74.1	14.8	11.1
诺氟沙星	85.2	9.3	5.5
氨苄西林	88.9	11.1	0.0
哌拉西林	88.9	3.7	7.4
头孢唑林	90.7	5.6	3.7
头孢曲松	66.7	25.9	7.4
头孢呋辛	85.2	7.4	7.4
头孢哌酮	83.3	9.3	7.4
头孢噻肟	79.6	18.5	1.9
头孢他啶	22.2	9.3	68.5
头孢吡肟	20.4	7.4	72.2
氨曲南	44.3	37.0	18.7
庆大霉素	87.0	5.6	7.4
阿莫西林	90.7	7.4	1.9

3　讨论

研究表明，ESBLs 的基因型已发现 4 类共 196 种，其中 TEM 型 114 种，SHV 型 42 种，OXA 型 14 种，CTX-M 型 β-内酰胺酶 26 种；大部分 ESBLs 是 TEM 或 SHV 的衍生物，系这些酶活性中心部位附近的一个或多个位点的氨基酸突变所致。结果显示，54 株大肠埃希菌 ESBLs 阳性株的基因型分别为 TEM 型阳性 23 株、SHV 型阳性 13 株、CTX-M 型阳性 41 株、OXA 型阳性 8 株。因此，我院产 ESBLs 大肠埃希菌绝大多数应该是 CTX-M 型。CTX-M 酶是质粒介导产生的 A 类 β-内酰胺酶，具有 ESBLs 的一般特性，其特点为对头孢噻肟的水解活性远高于头孢他啶，因而被命名为头孢噻肟酶（cefotaximase）。目前，北京、天津、广州、浙江及我国台湾地区均报道出现了 CTX-M 酶，本实验结果显示我院产 ESBLs 大肠埃希菌以 CTX-M 型 β-内酰胺酶为主，可能与我们地区头孢噻肟使用量大有直接的关系。

药敏实验结果显示，产 ESBLs 大肠埃希菌不仅对第三代头孢菌素 CTX、CFP、FRX、CRO、CZL 和 ATM 耐药，而且对氨基糖苷类、奎诺酮类等交叉耐药。抗菌药物的大量使用是形成细菌多重耐药的重要诱因，这可能与本地区的用药的习惯性有关。有研究表明，治疗产 ESBLs 菌感染的药物有：碳青霉烯类抗生素、头霉素类抗生素、阿米卡星以及 β-内酰胺类/β-内酰胺酶抑制剂复方制剂。目前认为碳青霉烯类抗生素如 IMP 是治疗产 ESBLs 菌感染的首选药物，本结果显示，IMP 对产 ESBLs 大肠埃希菌株有良好的抗菌活性，但也出现了个别的耐 IMP 菌株（耐药率 5.6%），与文献[4，5]报道略有差异。产 ESBLs 菌对碳青霉烯类抗生素耐药可能与其缺失的外膜蛋白（OmpK36）有关[6]，细菌外膜蛋白是革兰阴性菌的主要成分，是细菌基因的表达产物，外膜蛋白的缺失将减低细胞的通透性，抗生素不能进入细胞内而产生耐药。第三代头孢菌素 CAZ 和第四代头孢菌素 FEP 对产 ESBLs 大肠埃希菌有一定的抗菌活性（耐药率 20.4% ~22.2%），AMK 系氨基糖苷类抗生素其对产 ESBLs 大肠埃希菌耐的药率 16.7%，因此在选用 CAZ、FEP、AMK 等药物治疗产 ESBLs 大肠埃希菌感染时，应根据药敏结果而进行选择。对于 β-内酰胺类/β-内酰胺酶抑制剂复方制剂如 TZP 和 CPZ，产 ESBLs 大肠埃希菌的耐药率分别为 0.0% 和 3.7%，与孙秋林报道存在较大差异[4]，这可能与产 ESBLs 大肠埃希菌的基因型和广谱酶的产生量有关，也可能是因为我地区 TZP 和 CPZ 的应用较晚有关，应作为本地区治疗产 ESBLs 大肠埃希菌感染时的首选。本研究结果还显示，产 ESBLs 大肠埃希菌对 AMP、NOF、PIP、CZL、FRX、CFP、CTX、GEN 和 AMO 的耐药率在 80% 以上，我们建议在治疗这类感染时不使用这些抗生素。

超广谱 β-内酰胺酶（ESBLs）是由质粒介导的能使细菌对三代头孢菌素类、青霉素类及单酰胺类抗生素耐药的一类酶，ESBLs 主要由肠杆菌科细菌产生，以大肠埃希菌为代表菌属。近年来，大肠埃希菌产 ESBLs 菌株逐年增多，ESBLs 在菌株间的转移和传播，使其耐药性成为突出问题。超广谱 β-内酰胺酶（ESBLs）菌株的检出及耐药状况的进一步明确，对临床的治疗以及感染的控制都是非常重要的[7]。本研究结果提示，抗生素的大量使用和滥用可能是细菌产生 ESBLs 菌株的重要因素。因此，临床医师应严格遵循《抗菌药物临床应用指导原则》，减少抗生素的预防性用药，加强对细菌的耐药性检测，及时、准确地检测出 ESBLs 菌株和药敏试验结果，制定正确的抗生素使用方案，避免 ESBLs 菌株的扩散和流行。

参考文献：

[1] 文细毛，任　南，徐秀华，等. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志，2002，12(4)：241 -244.

[2] 中华人民共和国卫生部医政司编. 全国临床检验操作规程[M]. 第 2 版. 南京：东南大学出版社，1997：452 -471.

[3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement M100-S9[S]. Wayne：NCCLS，1999：32 -75.

[4] 孙秋林，叶冬青，李　旭. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药性研究[J]. 中国抗感染化疗杂志，2004，4(1)：33 -35.

[5] 耿　燕，刘　原，张王刚，等. 超广谱 β-内酰胺酶菌株的分布及耐药性分析[J]. 第四军医大学学报，2003，24(13)：1243 -1245.

[6] 李向阳，杨锦红，陶洪群，等. 阴沟肠杆菌外膜蛋白缺失与头孢西丁耐药的关系[J]. 中华检验医学杂志，2002，25(6)：339 -341.

[7] 程训民，张　琪，沈继录，等. 产超广谱 β-内酰胺酶表型及基因型分布[J]. 中华医院感染学杂志，2005，15(2)：142 -145.

（编辑　栾　嘉）