维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)06-0781-03

肠杆菌科产超广谱 β-内酰胺酶菌株的耐药性及基因型分析

胥 飚,曹 何,余显书

(重庆医科大学临床学院检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:了解我院临床分离的产超广谱 β-内酰胺酶(ESBL)的肠杆菌科常见菌的耐药状况及 ESBLs 的基因型。方法:对 2002 年 9 月至 2003 年 10 月我院临床分离的 257 株肠杆菌科常见细菌参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)M100-S9 文件的确认试验测定 ESBLs;将产 ESBLs 的 63 株细菌再利用生物梅里埃公司的 ATB G-5 药敏卡进行耐药性分析;并分别用 SHV、TEM、CTX-M 型基因的特异性引物进行 PCR 扩增,以确定 ESBLs 的基因型。结果:63 株产 ESBLs 菌对亚胺培南、美洛匹林、头孢西丁、头孢吡肟、头孢他啶、阿米卡星、头孢噻肟、环丙沙星的耐药率分别为:1.6%、1.6%、38.1%、39.7%、46.0%、55.6%、63.5%、95.2%;携带 SHV、TEM、CTX-M 型 ESBLs 的比率分别为:84.1%、47.6%、25.4%。结论:我院产 ESBLs 菌的多重耐药现象明显,亚胺培南、美洛匹林仍是治疗产 ESBLs 菌感染的首选药物;SHV 型为主要产酶型别,我院存在 CTX-M 酶的流行。

【关键词】肠杆菌科细菌;超广谱 β-内酰胺酶;耐药;基因型

【中国图书分类法分类号】R378.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-04-11

Analysis of drug resistance and genotype of extended-spectrum β-lactamase producing Enterobacteriaceae bacteria

XU Biao, et al

(*Department of Laboratory, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the drug resistance and genotypes of extended-spectrum β-lactamase(ESBL)-producing Enterobacteriaceae bacteria in our hospital. *Methods*: 257 strains of Enterobacteriaceae bacteria were isolated from clinical specimens in our hospital from Sept. 2002 to Oct. 2003. Sixty-three strains of ESBLs-producing isolates were detected by phenotypic confirmatory test according to NCCLS M100-S9. The susceptibility test of them to the antibiotics were detected with Bio-Merieux ATB G-5. The SHV-type, TEM-type, CTX-M-type encoding genes were amplified by PCR. *Results*: The resistant rates of the 63 strains to IMP, MERO, CXT, FEP, CAZ, AKN, CTX and CIP were 1.6%, 1.6%, 38.1%, 39.7%, 46.0%, 55.6%, 63.5% and 95.2%, repectively. The rates of Enterobacteriaceae bacteria carrying SHV-type, TEM-type, CTX-M-type ESBLs were 84.1%, 47.6% and 25.4%, repectively. *Conclusion*: Multidrug resistance of the ESBLs-producing strains in our hospital is obvious. IMP and MERO are still the best choices for treatment of the infections caused by ESBLs-producing bacteria. Most of the ESBLs-producing strains carry SHV-type. CTX-M-type β-lactamase exists prevalently in our hospital.

【Key words】Enterobacteriaceae; Extended-spectrum β-lactamase; Drug resistance; Genotype

自 1983 年德国首次报道产超广谱 β-内酰胺酶(ESBL)的臭鼻克雷伯菌以来,产 ESBL 细菌的流行在世界各地被广泛报道[1,2],由于 ESBL 可通过质粒传递给其他细菌,易造成医院感染的爆发流行,其产生菌与耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、耐万古霉素的肠球菌一起,已成为临床抗感染治疗的难题。目前 ESBLs 主要分为:SHV、TEM、CTX-M、OXA 型及其他,以 SHV 型和 TEM 型最多见。本研究对我院临床标本分离出的产 ESBLs 菌进行检测,以了解其对临床常用抗生素的耐药情况及产 ESBLs 的类型。

作者介绍:胥 飚(1969-),男,主管技师,主要研究方向:临床实验室诊断。

1 材料与方法

1.1 菌株

为我院 2002 年 9 月至 2003 年 10 月期间,从住院患者标本中分离的大肠埃希菌 170 株,肺炎克雷伯菌 69 株,阴沟

维普资讯 http://www.cqvip.com

肠杆菌 18 株;质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

1.2 仪器和试剂

细菌鉴定和药敏试验使用法国生物梅里埃公司的 ATB Expression 系统及 ID32E 鉴定卡和 ATB G-5 药敏卡;ESBLs 检测所用抗生素纸片为头孢他啶(30μg)、头孢他啶/棒酸(30μg/10μg)、头孢噻肟(30μg)、头孢噻肟/棒酸(30μg/10μg),均为 Oxoid 公司产品;基因扩增仪为 PE9600 型,寡核苷酸引物由上海生工合成,TaqDNA 聚合酶、dNTP 为华美生物公司提供。

1.3 ESBLs 的检测

参照 NCCLS 的 M100-S9 文件[3]的确认试验测定。

1.4 SHV、TEM、CTX-M 型酶基因的 PCR 扩增

根据 GeneBank 公布的 bla_{SHV}、bla_{TEM}、bla_{CTX-M} DNA 序列设计合成 3 对特异性寡核苷酸引物:T1:5'-AGTGGGTTACATCGAACTGGA-3'(128~148bp),T2:5'-TCATCCATAGTTGCCTGA-3'(797~814bp);S1:5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3'(1~20bp),S2:5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCGA-3'(842~861bp);C1:5'-ACGCTTTCCAATGTGCAGTA-3'(201~220bp),C2:5'-ACGTCACCAACTGCGCCC-3'(620~637bp)。细菌质粒 DNA 模板的制备参照文献[4]。PCR 扩增体系为 50μl,其中质粒 DNA 模板 2μl,引物均为 2μl(10μmol/L),dNTP 终浓度为 200μmol/L,$MgCl_2$ 终浓度为 1.5mmol/L,TaqDNA 聚合酶 0.4μl(5U/μl)。循环条件为:bla_{SHV} 及 bla_{TEM} 预变性 94℃ 3min 后,94℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。bla_{CTX-M} 预变性 94℃ 3min 后,94℃ 1min,62℃ 1min,72℃ 1min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。扩增时以大肠埃希菌 ATCC25922 作为阴性对照。将扩增产物行琼脂糖凝胶电泳后,溴化乙啶染色,紫外灯下观察结果。

2 结 果

2.1 ESBLs 的检测及耐药性分析

ESBLs 的检出率大肠埃希菌为 21.2%(26/170),肺炎克雷伯菌为 34.8%(24/69),阴沟肠杆菌为 16.7%(3/18)。产 ESBLs 菌对 20 种抗生素的耐药情况见表 1。

2.2 PCR 扩增结果

分别用 3 对特异性引物对每株产 ESBLs 菌行 PCR 扩增,结果表明 63 株产 ESBLs 菌中携带 SHV 型、TEM 型、CTX-M 型 β-内酰胺酶基因的菌株分别为 53 株(84.1%)、30 株(47.6%)、16 株(25.1%),其中有 11 株(17.5%)同时携带 SHV 和 TEM 型 β-内酰胺酶基因,7 株(11.1%)同时携带 SHV 和 CTX-M 型,3 株(4.8%)同时携带 TEM 型和 CTX-M 型,2 株同时携带 SHV 型、TEM 型和 CTX-M 型。

表 1 63 株产 ESBLs 菌对 20 种抗生素的耐药情况

	敏感(株)	中介(株)	耐药(株)	耐药率(%)
阿莫西林	0	2	61	96.8
阿莫西林/棒酸	1	4	58	92.1
哌拉西林	4	0	59	93.7
哌拉西林/他唑巴坦	11	0	52	82.5
替卡西林	5	0	58	92.1
替卡西林/棒酸	12	0	51	81.0
头孢噻吩	9	0	54	85.7
头孢西丁	39	0	24	38.1
头孢噻肟	12	11	40	63.5
头孢他啶	30	4	29	46.0
头孢吡肟	31	7	25	39.7
头孢呋辛	13	0	50	79.4
美洛匹林	62	0	1	1.6
亚胺培南	61	1	1	1.6
复方磺胺	2	0	61	96.8
妥布霉素	13	0	50	79.4
阿米卡星	28	0	35	55.6
庆大霉素	23	0	40	63.5
奈替米星	12	0	51	81.0
环丙沙星	2	1	60	95.2

3 讨 论

ESBLs 是由质粒介导,往往由普通的 β-内酰胺酶基因(TEM-1、TEM-2、SHV-1)突变而来[5],根据 Bush-Jacoby-Medeires 功能分类属 2be 组,对三代头孢和氨曲南均有不同程度的耐药,但对碳青霉烯和头霉烯类一般没有影响[6],我们的实验结果也与此相符。按照美国 NCCLS 的规定,临床分离到大肠埃希菌和克雷伯菌,均应检测是否产生 ESBLs,如确认为产 ESBLs 菌株,不管体外药敏试验的结果如何,对所有三代头孢和氨曲南均应报告耐药。在本研究中可以看出,从我院分离出的产 ESBLs 肠杆菌科细菌对第三代头孢菌素中的头孢他啶和头孢噻肟的耐药率较高,分别为:63.5% 和 46.0%,虽然第四代头孢对 ESBLs 相对稳定,不易被其降解,但本研究中产 ESBLs 菌对头孢吡肟的耐药率仍高达 39.6%,因此提醒临床用头孢吡肟治疗产 ESBLs 菌仍需慎重。头孢西丁虽不被 ESBLs 水解,但耐药率也高达 38.1%,可能为产酶菌株同时高产 AmpC 酶或膜通透性降低所致。对环丙沙星和阿米卡星的

维普资讯 http://www.cqvip.com

高耐药率说明我院分离出的产 ESBLs 菌株有明显的多重耐药特点，是否与编码 ESBLs 的质粒同时携带了耐多药基因相关，需进一步研究。63 株产酶菌中，对美洛匹林和亚胺培南耐药的各仅有 1 株，中度敏感分别有 3 株、2 株，其余敏感，表明它们对产 ESBLs 菌株仍有良好的抗菌活性，仍是治疗产 ESBLs 菌株的最可靠药物。

PCR 结果表明我院产 ESBLs 肠杆菌科细菌绝大多数产 SHV 型 β－内酰胺酶，而同时携带 2 种或 2 种以上的基因型的菌株也占有较大比例(36.5%，23/63)，原因可能是：①质粒上有 2 种或 2 种以上 ESBLs 的编码基因；②产 ESBLs 菌株同时产 TEM－1、TEM－2 或 SHV－1 型广谱酶。而含 CTX－M 型基因的菌株占 25.4% 的比例，说明 CTX－M 型 ESBL 虽然是近年才发现的 ESBLs 家族中的新成员[7]，但在我院已有流行。但该 CTX－M 型酶属何种类型还需进一步确认。

参 考 文 献

[1] Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended－spectrum beta－lactamases in a tertiary－care medical center[J]. J clin Microbiol, 1997; 35: 2061－2067.

[2] Medeires AA. Evolution and dissemination of β－lactamase accelerated by generations of β－lactama antibiotics[J]. Clin Infect Dis, 1997; 24(Suppl): s19.

[3] NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement [J]. 1999; M100－S9, 19(1): 45－50.

[4] 卢圣栋，主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京：高等教育出版社，1993: 108.

[5] Du Bios SK, Marriatt MS, Amyes SGB. TEM－ and SHV－derived extended－spectrum β－lactamases: relationship between selection, structure and function [J]. J Antimicrob Chemother, 1995; 35: 7－22.

[6] Bush g, Jacoby GA, Medeires AA. A functional classification scheme for β－lactamases and its correlation with molecular structure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995; 39: 1211－1233.

[7] Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, et al. Countrywide spread of CTX－M－3 extended－spectrum β－lactamase－producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002; 46: 151－160.

(上接第 773 页)细胞容易穿透到血管内，给肿瘤转移提供机会[6,7]。肿瘤新生血管这种特殊结构是导致肿瘤转移的重要机制。本实验复发乳腺癌组，无复发乳腺癌组，多原发乳腺癌组 VEGF 阳性表达率间无显著差异。复发乳腺癌组 VEGF 阳性表达程度高于无复发乳腺癌组和多原发乳腺癌组，有显著差异。无复发乳腺癌组 VEGF 阳性表达程度与多原发乳腺癌组无显著差异。复发乳腺癌组 VEGF 阳性表达与肿瘤分期正相关。而乳腺癌临床分期与肿瘤大小、淋巴结转移状况及有无远处转移等指标相关。故表明 VEGF 阳性表达程度强，乳腺癌瘤大，淋巴结转移多，肿瘤易于复发转移。

参 考 文 献

[1] 刘复生，刘彤华. 肿瘤病理学[M]. 第 1 版，北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1997; 1599－1663.

[2] 李树玲. 乳腺肿瘤学[M]. 第 1 版，北京：科学技术文献出版社，2000; 391－397.

[3] Leis HP Jr. Bilateral breast cancer[J]. Surg Clin N Amer, 1987; 58(4): 833－837.

[4] Bochm－Viswanathan T. Is angiogenesis inhibition the Holy Grail of cancer therapy[J]. Curr Opin Oncol, 2000; 12(1): 89－94.

[5] Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, et al. The angiogenic vascular endothelial growth factor/flk－1(KDR) receptor pathy in patients with endometrial carcinoma[J]. Cancer 2001; 92(10): 2569－2577.

[6] Kenneth L, Van Golen, Wu Zhifen, et al. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the in flammatory breast cancer phenotype[J]. Cancer Res, 2000; 60(11): 5832－5838.

[7] Masuya D, Huang CIC, Liu D, et al. The introtumoral expression of vascular endothelial growth factor and interleukin－8 associated with angiogenesis in non－small cell lung carcinoma patients[J]. Cancer, 2001; 92(10): 2628－2638.