

• 基础实验研究 •

大肠埃希菌 ESBLs 的携带情况及药敏分析

施锦杰, 丁媛媛, 李永明, 范列英

(同济大学附属上海市东方医院检验科 200120)

摘要:目的 调查产 ESBLs 大肠埃希菌的耐药基因型别分布情况, 并对其药敏结果进行分析。方法 对临床收集到的 227 株大肠埃希菌进行常见的 6 种 ESBLs 基因 PCR 扩增, 产物利用变性高效液相色谱法进行检测。结果 TEM 型的总检出率最高, 并且 63% 以上携带两种以上耐药基因。药敏结果提示, 碳青霉烯类抗生素表现 100% 敏感。结论 本研究的调查结果与国内统计资料基本符合, 但也表现出一定差异。

关键词: 色谱法, 高效液相; 埃希氏菌属; 微生物敏感性实验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0053-02

The situation of *Escherichia coli* carrying ESBLs and its drug sensitivity

Shi Jinjie, Ding Yuanyuan, Li Yongming, Fan Lieying

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai East Hospital, Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China)

Abstract: Objective To investigate the drug-resistance genotype distribution of *Escherichia coli* producing ESBLs and analysis its drug sensitivity. **Methods** PCR were used to amplify 6 ESBLs common gene of *E. coli* collected from clinic. PCR amplification products were detected using DHPLC technology. **Results** The overall detection rate of TEM subtype is the highest, of which more than 63% carrying 2 resistance genes. Drug sensitivity suggests that Carbapenems showed 100% sensitivity. **Conclusion** The findings of this study basically consistent with the national statistical data, but also show some difference.

Key words: chromatograph, high pressure liquid; *Escherichia coli*; antibiotic sensitivity test

病原菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药机制主要是由细菌产生能够水解该类抗生素的 β -内酰胺酶所引起。20 世纪 80 年代, 1 种被称为超广谱 β -内酰胺酶 (extended spectrum β -lactamases, ESBLs) 的新型 β -内酰胺酶在希腊被首先发现, 该酶是由质粒编码具有水解多种 β -内酰胺类抗生素的能力。随着临床 β -内酰胺类抗生素的广泛应用, ESBLs 所引起的耐药性, 特别是肠杆菌科细菌感染引起的, 在全球范围内都有传播, 目前已知的 ESBLs 型别已超过 400 种, 大多数是由于基因的点突变引起^[1]。大肠埃希菌是临床十分常见的致病菌之一, 同时也是携带 ESBLs 耐药基因比较普遍的 1 种致病菌。由于其可同时携带多种耐药基因而且相应耐药基因常发生突变, 因此具有广泛的耐药性。来自于欧洲的统计资料显示, 大肠埃希菌的 ESBLs 检出率约 9.8%, 在美国的检出率约 6.0%^[2-3]。目前, 临床对 ESBLs 的检测主要还是依照美国 CLSI 推荐的 K-B 双纸片协同实验或 E-test 方法, 由于方法简单易行, 因此被广为采用^[4]。但是上述方法依赖于培养过程, 所以耗时过长, 而且不能区分型别。随着分子生物学技术的发展, 特别是基因体外扩增技术的不断成熟, PCR 技术也被大量用于进行 ESBLs 基因的检测。由于在进行 PCR 扩增时可以针对不同 ESBLs 基因设计不同的引物, 扩增产物可根据片段长度的差异等特征进行区分, 所以基于 PCR 技术的 ESBLs 基因检测能达到分型的目的, 十分适合于流行病学调查。虽然借助 PCR 技术能够在一定程度上缩短检测周期, 但是传统的电泳检测或杂交分析技术对 PCR 产物的检测并不十分经济, 因此如能在产物检测方面引入更加经济有效的手段将对推动该方面的研究具有重要意义。变性高效液相色谱法 (DHPLC) 是近年建立并迅速发展起来的 1 种新型基因突变筛查技术, 它具有检测通量高、灵敏度和特异性好、易于自动化、检测片段长度范围广、相对价廉等优点^[5-6]; 其还可实现快速检测已知和未知突变。因此, 本文将利用 DHPLC 对来自大肠埃希菌的 ESBLs 耐药基因扩增产物进行分析, 以了解其携带情况, 并结合药敏实验结果对大肠埃希

菌的耐药情况进行分析, 现报道如下。

1 材料与方法

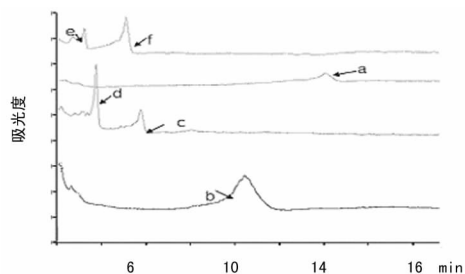
1.1 菌株和试剂 2008 年 4 月至 2010 年 3 月从本院 ICU 病房分离的临床标本中获得 277 株产 ESBLs 大肠埃希菌。其中血标本 32 份, 尿液标本 127 份, 痰标本 109 份, 伤口分泌物 9 份。全部按照 CLSI 推荐的 K-B 双纸片协同实验进行初筛, 判断为 ESBLs 阳性。大肠埃希菌 (ATCC25922) 和肺炎克雷伯菌 (ATCC700603) 作为 ESBLs 阴性和阳性质控菌株, 抗生素敏感实验也同时按照 CLSI 标准的 K-B 双纸片协同实验进行操作。纸片均为英国 OXOID 公司产品。质粒提取试剂盒和 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 大连公司。TEM、SHV、CTX-M-I、CTX-M-II、CTX-M-III、CTX-M-IV 6 种常见 ESBLs 基因特异性引物由 TaKaRa 大连公司合成, 用于聚合酶链反应 (PCR), 对应产物片段长度分别是 1 074、780、499、351、307、474 bp^[7-9]。将每株菌扩增出的 6 种产物各取 4 μ L, 混合到同一管中进行 DHPLC 检测。醋酸三乙铵 (TEAA) 缓冲液为 Transgenomic, Inc 产品。DHPLC 缓冲液: 缓冲溶液 A 为 50 mL TEAA, 250 μ L 乙腈, 定容至 1 000 mL; 缓冲溶液 B 为 50 mL TEAA, 250 mL 乙腈, 定容至 1 000 mL。

1.2 仪器及参数 PCR 仪 (GenAmp2700, 美国 ABI 公司); 变性高效液相色谱仪 (美国环球基因公司)。DHPLC 仪器检测参数如下: 洗脱梯度 $t=0$ min, 56% B; $t=0.5$ min, 60.6% B; $t=6.1$ min, 64.3% B; $t=11.8$ min, 66% B; $t=17.4$ min, 67% B; $t=23$ min, 67.6% B; $t=23.1$ min, 0% B 保持 0.5 min。接着用 56% B 平衡柱子 1 min。流速 0.9 mL/min, 温度 50 $^{\circ}$ C。检测波长为 280 nm。

2 结果

典型的 6 种 ESBLs 基因产物的 DHPLC 色谱图, 见图 1。对 227 株产 ESBLs 大肠埃希菌的 PCR 产物进行 DHPLC 检测结果显示, 超过 63% 的菌株同时携带多个耐药基因, 见表 1。对临床常用的 23 种抗生素的药敏实验结果见表 2, 除碳青霉烯类抗生

素表现为 100% 敏感外,其余抗生素均有不同程度的耐药。



注:a 表示 TEM 型;b 表示 SHV 型;c 表示 CTX-M-I 型;d 表示 CTX-M-II 型;e 表示 CTX-M-III 型;f 表示 CTX-M-IV 型。

图 1 6 种 PCR 产物片段的典型色谱图

表 1 各基因型的检出情况

型别	n	检出率(%)
CTX-M-I	38	16.74
CTX-M-II	9	3.96
CTX-M-III	7	3.08
CTX-M-IV	5	2.20
SHV	16	7.05
TEM	39	17.18
TEM/SHV	64	28.19
CTX-M-IV/TEM	28	12.33
TEM/CTX-M-II	13	5.73
TEM/SHV/CTX-M-III	3	1.32
SHV/CTX-M-IV	3	1.32
CTX-M-I/CTX-M-II	1	0.44
CTX-III/CTX-IV	1	0.44

表 2 抗生素敏感性实验结果

抗生素	敏感(n)	敏感性(%)
头孢唑啉	0	0.00
头孢呋辛	0	0.00
头孢噻肟	7	3.08
头孢曲松	6	2.64
头孢他啶	68	29.96
头孢哌酮	0	0.00
头孢吡肟	57	25.11
头孢西丁	167	73.57
哌拉西林	0	0.00
美洛培南	227	100.00
亚胺培南	227	100.00
氨曲南	49	21.59
庆大霉素	54	23.79
阿米卡星	138	60.79
环丙沙星	9	3.96
左旋氧氟沙星	13	5.73
复方新诺明	13	5.73
四环素	17	7.49
头孢哌酮/舒巴坦	135	59.47
氨苄西林/舒巴坦	13	5.73
阿莫西林/克拉维酸	69	30.40
替卡西林/克拉维酸	23	10.13
哌拉西林/他唑巴坦	189	83.26

3 讨论

国内外资料显示,肠杆菌科细菌中的 ESBLs 携带常见于肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌,从遗传特征看,现今流行的 ES-

BLs 大多源于 TEM-1、TEM-2 和 SHV-1 型的突变^[9]。据统计,目前全球范围内至少已经报道了 400 多种 ESBLs。其中 TEM 型最多,其次为 SHV 型,另外还包括 CTX-M、PER、GES、BES、SPO、OXY 型等。不同国家和地区在流行趋势上也有显著差别,欧洲的西班牙主要流行 CTX-M-9 型,英国则以 CTX-M-15 型为主,美洲的加拿大为 CTX-M-1 和 CTX-M-9 型,美国则多见 TEM 和 SHV 型^[10-12]。国内对相关流行型别的报道差异较大,作者的研究结果显示,TEM 型的 ESBLs 在所研究的 227 株大肠埃希菌中占绝对优势,CTX 型次之,此结果与国内部分报道较为类似^[13-14]。但 SHV 型的检出率要高于前两者,很可能是不同医院或不同病区的流行趋势差异所致。从药物敏感性实验结果可以看出,碳青霉烯类抗生素仍然是较好的一线抗 ESBLs 菌感染的药物,多数无酶抑制剂的 β-内酰胺类抗生素对产 ESBLs 的大肠埃希菌抗菌效果不佳。根据美国 CLSI 的建议,产 ESBLs 的菌株应避免使用青霉素类、头孢菌素类。本文的药敏结果完全证实了上述建议的可靠性。与传统的琼脂糖凝胶电泳和毛细管电泳法相比,本实验采用的 PCR 扩增产物检测方法在 16 min 内就可实现对应片段的检测,具有省时、不需要特殊试剂的优点。下一步工作将要利用 DHPLC,分析每种基因是否存在变异,相关研究工作正在进行中。

参考文献

- Jacoby GA, Munoz-Price LS. The New Beta-Lactamases [J]. N Eng J Med, 2005, 352(4): 380-391.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Organisms [J]. J Hosp Infect, 2009, 73(4): 345-354.
- Harris AD, Kotetishvili M, Shurland S, et al. How Important Is Patient-to-Patient Transmission in Extended-Spectrum Beta-Lactamase Escherichia Coli Acquisition [J]. Am J Infect Control, 2007, 35(2): 97-101.
- Mohanty S, Gaiad R, Ranjan R, et al. Use of the cefepime-clavulanate ESBL E-test for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC Co-producing bacteria [J]. J Infect Dev Ctries, 2009, 4(1): 24-29.
- Yu B, Sawyer NA, Chiu C, et al. DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) [J]. Curr Protoc Hum Genet, 2006, Chapter 7: Unit7.
- Costabile M, Quach A, Ferrante A. Molecular approaches in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases [J]. Hum Mutat, 2006, 27(12): 1163-1173.
- Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based enterobacteriaceae in turkey [J]. Jpn J Infect Dis, 2005, 58(3): 162-167.
- Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M-Beta-Lactamases Produced by Escherichia Coli and Klebsiella Spp [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5715-5721.
- Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, et al. Genetic background of escherichia coli and extended-spectrum beta-lactamase type [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(1): 54-61.
- Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero (下转第 86 页)

(上接第 54 页)

L, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing escherichia coli in nonhospitalized patients[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1089-1094.

[11] Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, et al. Community and Hospital Spread of Escherichia Coli Producing CTX-M Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the UK[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(4): 735-743.

[12] Pitout JD, Hanson ND, Church DL, et al. Population-Based Laboratory Surveillance for Escherichia Coli-Pro-

ducing Extended-Spectrum Beta-Lactamases: Importance of Community Isolates With BlaCTX-M Genes[J]. Clin Infect Dis, 2004, 38(12): 1736-1741.

[13] 张捍东, 李旭. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌的基因型分布[J]. 安徽医学, 2009, 30(2): 171-173.

[14] 王运铎, 范艳萍, 张毅华. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌的基因型分型及耐药分析[J]. 大连医科大学学报, 2008, 30(1): 73-77.

(收稿日期: 2010-07-04)