

• 调查报告 •

多重耐药大肠埃希菌的基因分型及耐药分析*

黄建宏, 何锦文, 林 心, 禰彩云, 黄 琳, 詹永聪, 田洁玲

(暨南大学附属珠海医院检验科, 广东珠海 519000)

摘要:目的 探讨分离自该院患者临床标本的 24 株多重耐药大肠埃希菌的基因分型、耐药情况及在院内科室的分布情况, 为临床合理使用抗菌药物提供依据。方法 通过 MIC 法分析大肠埃希菌对抗菌药物的敏感性, 采用肠杆菌科基因间重复性一致序列 (ERIC)-聚合酶链反应 (PCR) 对筛选出多重耐药的大肠埃希菌进行基因分型。结果 24 株多重耐药大肠埃希菌分为 A 型和 B2 型两个基因型, 来源于呼吸科的为 10 株, 泌尿外科 6 株, ICU 5 株 (B2 型 3 株), 血液肿瘤科 3 株 (B2 型 1 株)。药敏试验显示 4 株 B2 型大肠埃希菌对头孢西丁、头孢他啶、阿米卡星、替卡西林+克拉维酸等全部耐药。24 株大肠埃希菌对阿莫西林、头孢噻吩、庆大霉素、替卡西林、哌拉西林的耐药率均达 70% 以上。结论 B2 型大肠埃希菌表现为多重耐药性, 致病性强, 并且主要分布在 ICU 及血液肿瘤科中, 应该根据患者感染不同基因型的大肠埃希菌来合理调整抗菌药物的使用。

关键词: 大肠埃希菌; 基因分型; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)18-2476-02

Genotyping and drug resistance analysis of multiple drug resistant *Escherichia coli**

Huang Jianhong, He Jinwen, Lin Xin, Xuan Caiyun, Huang Lin, Zhan Yongcong, Tian Jieli

(Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Hospital Affiliated to Jinnan University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: Objective To investigate the genotype, distribution and drug resistance of 24 multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from the patients in the hospital. 24 cases of multi-drug resistant genotyping and resistance, the distribution of its departments in the hospital, to provide basis for rational use of antibiotics in clinical patients. **Methods** By MIC method to analyze antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli*, Enterobacter Genetics adopt consistent between repetitive sequences (ERIC)-polymerase chain reaction (PCR) screening carried out the multi-drug resistant *Escherichia coli* genotyping. **Results** Statistics showed that the hospital were isolated 24 strains were divided into two types A and B2 type genotype. Distribution is 10 in respiratory, 6 in urology, 5 in ICU (B2 type 3), 3 in hematology and oncology (B2 type 1). Drug susceptibility results of 4 type B2, for cefoxitin, ceftazidime, amikacin, ticarcillin + clavulanic acid are all manifestations of resistance. 24 strains of *Escherichia coli*, amoxicillin, cephalothin, gentamicin, ticarcillin, piperacillin resistance rate reached more than 70%. **Conclusion** B2-type strain showed multidrug resistance, pathogenicity strong, and mainly in the ICU and hematology and oncology, the use of antibiotics should be based on reasonable adjustments in patients infected with different genotypes of *Escherichia coli*.

Key words: *Escherichia coli*; genotype; drug resistance

大肠埃希菌在临床分离的革兰阴性杆菌中居于首位, 其感染类型呈多样化, 感染部位也较广泛, 且耐药机制种类繁多变化迅速, 其中产 β -内酰胺酶是其对 β -内酰胺类抗菌药物耐药的主要机制^[1]。超广谱 β -内酰胺酶能够水解广谱青霉、第 3 代头孢菌素及单环菌素的 β -内酰胺酶, 但对于头霉素、碳青霉烯类抗菌药物及酶抑制剂 (如克拉维酸等) 敏感。产 ESBL 的肠杆菌科的耐药问题是当前全球最重要的医院内耐药问题之一^[2], 将本院分离的 24 株多重耐药的大肠埃希菌进行基因分析, 本文结合基因及耐药的情况, 向临床合理使用抗菌药物提供更有有效的建议。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 24 株多重耐药的大肠埃希菌分离自 2013 年 1~12 月本院患者的痰液、血液、尿液等标本, 标准质控菌株采用大肠埃希菌 ATCC25922, 铜绿假单胞菌 ATCC27853 和金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

1.2 仪器与试剂 菌种的鉴定及药敏分析采用西门子 Walk

96 全自动微生物分析系统及配套试剂。美国 Bio-Rad 公司 PTC220 型聚合酶链反应仪; Bio-Rad Gel Doc XR System 凝胶成像系统; 北京市六一仪器厂 DYy-10C 电泳仪。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 通过 MIC 法对 20 种大肠埃希菌的常见的抗菌药物组合进行耐药谱分析, 采用 CLSI 推荐的头孢哌酮/舒巴坦纸片筛选法补充检测大肠埃希菌产 ESBLs 菌株。药物敏感性试验操作及结果判读参照美国临床实验室标准化协会标准 (CLSI 2013)。

1.3.2 大肠埃希菌株的 DNA 提取 按提取要求和程序步骤进行提取。

1.3.3 PCR 多重反应 参照 Olivier 提取 DNA 的方法, 采用肠杆菌科基因间重复性一致序列 (ERIC)-聚合酶链反应 (PCR) 对目标菌株进行分析, 引物序列具体信息见表 1。PCR 产物跑琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像系统观察电泳结果并拍照记录成像。

* 基金项目: 广东省科技厅资助课题 (2012B031800024)。作者简介: 黄建宏, 男, 主任技师, 主要从事临床免疫工作及研究。

1.3.4 基因分型 依据据扩增产物的电泳结果,通过树型分枝分型法来判断大肠埃希菌的分型^[3],大肠埃希菌分为 A, B1, B2 和 D 型。

表 1 PCR 引物信息

检测基因	引物名称	引物序列(5'~3')
chuA	ChuA.1	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT
	ChuA.2	TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA
YjaA	YjaA.1	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG
	YjaA.2	ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC
TSPE4. C2	TspE4C2.1	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA
	TspE4C2.2	CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG

1.4 统计学处理 利用 WHONET5.6 对收集的大肠埃希菌的药敏结果进行处理。

2 结 果

2.1 DNA 同源性分析结果 24 株大肠埃希菌共分为 2 种类型,其中 20 株为 A 型,4 株为 B2 型,未见其他基因型。

2.2 根据基因分型,对分离菌株在临床科室中的分布情况进行统计,结果显示分别分布于呼吸科 10 株,泌尿外科 6 株,综合 ICU5 株(B2 型 3 株),血液科 3 株(B2 型 1 株)。

2.3 药敏试验 24 株大肠埃希菌株对抗菌药物的耐药情况,见表 2。4 株 B2 型大肠埃希菌对阿莫西林、头孢呋辛、哌拉西林、替卡西林全部耐药,对其他抗菌药物表现为普遍耐药,但对亚胺培南敏感。

表 2 24 株大肠埃希菌株对抗菌药物的耐药谱(%)

抗菌药物	24 株大肠埃希菌株		
	敏感(S)	中介(I)	耐药(R)
阿莫西林	11.8	8.8	79.4
头孢西丁	64.7	8.8	26.5
头孢他啶	59.0	2.6	28.2
头孢噻吩	17.6	73.5	91.2
庆大霉素	35.9	2.6	51.3
环丙沙星	35.9	53.8	89.7
替卡西林	17.9	10.3	71.8
替卡西林+克拉维酸	40.8	10.2	49.0
妥布霉素	43.6	10.2	46.2
头孢呋辛	41.2	8.8	50.0
哌拉西林	17.9	10.3	71.8
奈替米星	58.8	8.8	32.4
哌拉西林/他唑巴坦	79.5	10.2	10.3
头孢吡肟 3 代	51.3	7.7	30.8
美罗培南	100.0	0.0	0.0
阿莫西林+棒酸	50.0	35.3	14.9
头孢噻肟/3 代	50.0	5.9	44.1
阿米卡星	74.4	10.6	15.0
复方磺胺甲唑	35.9	10.3	53.8
亚胺培南	100.0	0.0	0.0

3 讨 论

大肠埃希菌是临床引起感染的革兰阴性杆菌中常见致病菌之一,主要有产生灭活抗菌药物的酶、改变药物的作用靶位、减少药物的摄取吸收及最新发现的质粒介导的耐药性等^[4]。其中,常见的耐药机制是通过产 β-内酰胺酶对该类抗菌药物产生水解作用,使产酶在 β-内酰胺类抗菌药物存在的条件下不能生存。随着临床对抗菌药物的广泛使用,各个地区出现不同程度的耐药情况,特别是不同基因型的大肠埃希菌的多重耐药情况并不一样^[5]。了解本院大肠埃希菌的多重耐药基因型分布情况对临床使用抗菌药物有指导意义。

分析结果显示,检出的 24 株大肠埃希菌对阿莫西林、头孢噻吩、庆大霉素、替卡西林、哌拉西林的耐药率达 70% 以上,对头孢西丁、头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦、阿莫西林+棒酸、阿米卡星等药物的敏感性高。4 株 B2 型大肠埃希菌对阿莫西林、头孢呋辛、哌拉西林、替卡西林全部耐药,对其他抗菌药物表现为普遍耐药,与文献^[6]相符。检出的大肠埃希菌均未发现对亚胺培南或美罗培南耐药。在检出的 4 株致病性较强的 B2 型大肠埃希菌主要分布于 ICU 与血液肿瘤科,其引起的感染病情较重,治疗也较为困难,应该引起相关临床科室的重视。引起这种情况可能是这些科室的抗菌药物不合理使用使大肠埃希菌基因更容易发生突变,需要做进一步的调查研究。

大肠埃希菌表现的多重耐药是多种耐药机制共同作用的结果,与细菌染色体基因发生突变及耐药基因水平传播有着重要的联系^[7-9]。大肠埃希菌的多重耐药情况与其基因型密切相关,因此向医生提供患者感染多重耐药的大肠埃希菌的基因分型信息具有指导意义,可以更加有效地控制感染,避免抗菌药物的滥用,降低治疗经济成本。

参考文献

[1] 刘素玲,侯铁英,陈柳勤,等. 大肠埃希菌表型及耐药趋势分析[J]. 新乡医学院学报,2012,29(7):553-555.

[2] Oxacelay C, Ergani A, Naas T, et al. Rapid detection of CTX-M-producing Enterobacteriaceae in urine samples[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(5): 986-989.

[3] Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease; a review[J]. J Med Food, 2002, 5(3): 159-169.

[4] 赵庆英,刘德梦. 大肠埃希菌耐药机制研究进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2010, 31(4): 184-190.

[5] 李彬,黄心宏,傅蕾,等. 多重耐药大肠埃希菌基因分型及其与耐药表型的关系[J]. 福建医科大学学报, 2010, 44(1): 59-61.

[6] 黄建宏,林心,黎华文,等. 大肠埃希菌临床分离株的基因型及耐药性分析[J]. 山西医药杂志, 2012, 41(4): 328-329.

[7] 罗燕萍,李琴春,叶丽艳,等. 104 株大肠埃希菌对 3 种氟喹诺酮类药物突变抑制浓度的比较研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(17): 2242-2244.

[8] 金法祥,俞建洪,糜祖煌. 大肠埃希菌老年患者分离株 β-内酰胺酶基因与毒力基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(4): 374-376.

[9] 苏丹虹,卢鉴财,卓超,等. 广州地区大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌 CTX-M 型产超广谱 β-内酰胺酶基因分型的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(22): 3004-3006.