

• 论 著 •

产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌的耐药机制研究韩松涛^{1,2}, 曾德鹏¹, 徐 梅¹, 谭玉洁^{1,2△}

(1. 贵州医科大学附属白云医院检验科, 贵阳 550014; 2. 贵州医科大学附属医院中心实验室, 贵阳 550001)

摘 要:目的 了解贵阳地区医院内检出的大肠埃希菌产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)菌株的耐药性及基因型,为指导临床合理用药提供依据。方法 由贵州医科大学附属白云医院 ATB 系统完成菌株鉴定及药敏试验检测,采用纸片扩散法进行 ESBLs 表型确证试验,采用碱裂解法提取产 ESBLs 菌的质粒 DNA,采用聚合酶链反应扩增 TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 型和 CTX-M-9 组基因。结果 产 ESBLs 大肠埃希菌阳性率为 66.7%(279/418);对阿米卡星耐药率为 4.3%;对青霉素类,头孢菌素第 1、2 代药物耐药率均为 100.0%;庆大霉素、妥布霉素、喹诺酮类、磺胺类药物耐药率在 60.6%~84.9%;对亚胺培南和美罗培南仍保持较高的敏感度。116 株产 ESBLs 大肠埃希菌基因型有 113 株(97.4%)为 CTX-M 型,其中 CTX-M-9 亚型 68 株(58.6%),CTX-M-1 亚型 67 株(57.8%);TEM 型有 86 株(74.1%);未检出 SHV 型。结论 产 ESBLs 阳性的大肠埃希菌的耐药率明显高于产 ESBLs 阴性的大肠埃希菌,且具有多重耐药性。贵州医科大学附属白云医院产 ESBLs 大肠埃希菌的基因型以 CTX-M 型为主;碳青霉烯类为最敏感的药物,但本研究中发现亚胺培南耐药菌株,需引起临床重视。

关键词: 大肠埃希菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 耐药性; 基因型**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2016.12.016 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)12-1638-03Research on antibiotic resistance of *Escherichia coli* producing ESBLsHAN Songtao^{1,2}, ZENG Depeng¹, XU Mei¹, TAN Yujie^{1,2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Baiyun Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550014, China; 2. Department of Central Laboratory, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550001, China)

Abstract: Objective To investigate the genotype and antimicrobial resistance of ESBLs-producing *Escherichia coli* (E. coli) in this hospital to provide basis of reasonable drug usage. **Methods** ATB system was used to identify strains and drug sensitivity test. ESBLs-producing E. coli isolates were screened by phenotypic confirmatory test. The plasmid DNAs of ESBLs-producing strains were extracted by alkaline lysis. Nucleotide sequences of TEM, SHV, CTX-M-1 and CTX-M-9 genes in the ESBL-producing strains isolated were amplified by PCR. **Results** The positive rate of ESBLs-producing was 66.7% in 418 strains of E. coli (279/418); the drug resistance rates to amikacin was 4.3%; to penicillin, the antibiotic resistance of first and two generation cephalosporins were 100.0%; to gentamicin, tobramycin, quinolones and sulfonamides, the antibiotic resistance varied from 60.6% to 84.9%; still maintain a high sensitivity to imipenem and meropenem. There were 113 strains of CTX-M type (97.4%) in 116 strains of ESBLs-producing E. coli genotype, including 68 strains in CTX-M-9 type (58.6%), 67 strains in CTX-M-1 type (57.8%), 86 strains in TEM type (74.1%), SHV was not detected. **Conclusion** Antimicrobial resistances of E. coli might be more sensitive ESBLs-producing than non ESBLs-producing E. coli, and with multi drug resistance. The predominant genotype of ESBLs-producing strains is CTX-M. ESBLs-producing E. coli remains susceptible to carbapenems. Moreover, the imipenem-resistant strains are detected in the study, which is worth heeding.

Key words: *Escherichia coli*; ESBLs; antibiotic resistance; genotype

大肠埃希菌是最常见的社区获得性感染和院内获得性感染的致病菌之一,其感染类型多样,且耐药机制种类繁多^[1]。大肠埃希菌的耐药性在人类之间、人类和动物之间相互传播和转移主要靠质粒介导^[2]。近年来,随着广谱抗菌药物尤其是第 3 代头孢菌素在临床的广泛应用,使大肠埃希菌等革兰阴性菌对它们的耐药性迅速增加,其中最重要的原因是产生超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs),其所产生的多重耐药性给临床抗菌药物治疗造成了极大的困难^[3-4]。目前,由于各个国家和地区使用的抗菌药物不同,大肠埃希菌中流行的 ESBLs 基因型及耐药性也不相同,治疗中所选择的抗菌药物也存在差异^[5-6]。本研究应用分子生物学等手段,检测了大肠埃希菌的耐药性及基因型分布,为指导临床合理应用抗菌药物,控制产 ESBLs 大肠埃希菌的流行提供依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集贵州医科大学附属白云医院 2013 年 4 月至 2014 年 1 月临床标本分离培养的大肠埃希菌共 418 株,标本来源包括:尿液、脓液、痰液分泌物、血液及胆汁等。患者来自神经内科、肾内科、心血管内科、消化内科、重症监护病房等科室的住院患者。

1.2 试剂及药敏纸片 鉴定及药敏试剂条 ID 32E 和 ATB G5 均购自法国生物梅里埃公司;ESBLs 药敏纸片购自美国 BD 公司;质粒小提试剂盒(离心柱型)、 $2 \times$ Taq PCR MasterMix、10 mg/mL 溴化乙锭溶液、100 bp DNA Ladder 均由北京天根生化科技公司生产;标准质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)。

1.3 鉴定及药敏试验 所有菌株经 ATB expression 细菌鉴

定分析仪鉴定到种,药敏试验使用 ATB G5 试剂条测定,ATB 专家系统提示为 ESBLs 的菌株进一步做确证试验。

1.4 ESBLs 表型确证试验 采用美国临床实验室标准化协会推荐的 ESBLs 表型确证试验,按照常规标准纸片扩散法进行操作,使用每片含 30 μg 头孢他啶、头孢噻肟纸片和头孢他啶/克拉维酸(30 μg/10 μg)、头孢噻肟/克拉维酸(30 μg/10 μg)复合物纸片进行试验,当任何一种复合物纸片抑菌环直径大于或等于其单独药敏纸片抑菌环直径 5 mm,可确证该菌株产 ESBLs。

表 1 PCR 引物序列

基因型		引物序列 5'→3'	退火温度(℃)	产物长度(bp)
TEM 型	正向	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT GTC	56.8	851
	反向	TTA ATC AGT GAG GCA CCT ATC TC	58.4	
SHV 型	正向	TTA TAT TCG CCT GTG TAT TAT CTC CC	54.2	856
	反向	GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG	58.9	
CTX-M-1 亚型	正向	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGC CAG	58.6	869
	反向	CCG TCG GTG ACG ATT TTA GCC G	63.8	
CTX-M-9 亚型	正向	GGT GAC AAA GAG AGT GCA ACG G	61.9	868
	反向	CCC TTC GGC GAT GAT TCT CGC	63.9	

1.6 统计学处理 采用 WHONET5.6 软件对细菌耐药率进行统计分析,率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 产 ESBLs 大肠埃希菌的分布情况 2013 年 4 月至 2014 年 1 月贵州医科大学附属白云医院住院患者送检标本中共检出 418 株大肠埃希菌,产 ESBLs 大肠埃希菌 279 株(66.7%),非产 ESBLs 大肠埃希菌 139 株(33.3%)。在各种标本中以尿液标本检出株数最多,占 57.0%(159/279),见表 2。各科室以泌尿外科检出株数最多,占 24.7%(69/279),见表 3。

表 2 产 ESBLs 大肠埃希菌前 4 位的标本分布情况(n=279)

标本类型	ESBLs 阳性(n)	构成比(%)
尿液	159	57.0
痰液	30	10.8
血液	21	7.5
脓液	16	5.7

表 3 产 ESBLs 大肠埃希菌前 6 位的科室分布情况(n=279)

科室	ESBLs 阳性(n)	构成比(%)
泌尿外科	69	24.7
胃肠疾病外科	55	19.7
骨科、胸外科	20	7.2
妇产科	18	6.5
康复科	13	4.7
消化内科	11	3.9

2.2 产 ESBLs 与非产 ESBLs 大肠埃希菌耐药性比较 本研究中,产 ESBLs 大肠埃希菌和非产 ESBLs 大肠埃希菌对亚胺培南、美罗培南、阿米卡星耐药率经连续校正检验和 Fisher 精

1.5 ESBLs 基因检测 按试剂说明提取细菌质粒 DNA 作为模板。参照 ESBLs 耐药基因相关文献[7]中的引物设计方案,PCR 扩增反应体系为质粒 DNA 模板 1 μL,对应引物(10 μmol/L)各 1 μL,2×Taq PCR Master Mix 为 12.5 μL,无菌双蒸水(ddH₂O)9.5 μL,总反应体系为 25 μL。循环参数为94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物在 3%的琼脂糖凝胶上进行电泳,凝胶成像系统下观察结果,然后将扩增产物送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行纯化及测序。引物序列见表 1。

确检验后,差异无统计学意义($P>0.05$);但产 ESBLs 大肠埃希菌对其他药物的耐药性明显高于非产 ESBLs 大肠埃希菌,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 产 ESBLs 与非产 ESBLs 大肠埃希菌耐药结果比较[n(%)]

抗菌药物	产 ESBLs (n=279)	ESBLs (n=139)	χ^2	P
阿莫西林	279(100.0)	110(79.1)	62.548	<0.01
哌拉西林	279(100.0)	106(76.3)	71.915	<0.01
替卡西林	278(99.6)	110(79.1)	58.554	<0.01
阿莫西林/克拉维酸	36(12.9)	8(5.8)	5.033	0.025
替卡西林/克拉维酸	237(84.9)	50(35.9)	103.417	<0.01
哌拉西林/他唑巴坦	39(13.9)	5(3.5)	10.616	0.001
头孢噻吩	279(100.0)	82(58.9)	132.475	<0.01
头孢呋辛	279(100.0)	38(27.3)	267.318	<0.01
头孢他啶	106(37.9)	10(7.2)	43.893	<0.01
头孢吡肟	106(37.9)	10(7.2)	43.893	<0.01
头孢西丁	100(35.8)	16(11.5)	27.395	<0.01
亚胺培南	1(0.4)	0(0.0)	—	1.000
美罗培南	0(0.0)	0(0.0)	—	—
阿米卡星	11(3.9)	3(2.2)	0.455	0.505
庆大霉素	184(65.9)	50(35.9)	33.836	<0.01
奈替米星	103(36.9)	21(15.1)	21.151	<0.01
妥布霉素	167(59.8)	39(28.1)	37.534	<0.01
环丙沙星	223(79.9)	50(35.9)	79.127	<0.01
复方磺胺甲噁唑	209(74.9)	67(48.2)	29.506	<0.01

注:—表示无数据。

2.3 116 株大肠埃希菌 ESBLs 基因型检测结果 见表 5。

表 5 产 ESBLs 大肠埃希菌各基因型分布 (n=116)		
基因类型	产 ESBLs 菌株 (n)	检出率 (%)
CTX-M 型	113	97.4
CTX-M-9 亚型	68	58.6
CTX-M-1 亚型	67	57.8
SHV 型	0	0.0
TEM 型	86	74.1

3 讨 论

贵州医科大学附属白云医院 2013 年 4 月至 2014 年 1 月微生物室分离的产 ESBLs 大肠埃希菌主要来源于泌尿外科, 其次为胃肠疾病外科。分析其原因可能是外科病房中感染往往较为严重, 使临床医生经验性使用抗菌药物频率过高, 导致大肠埃希菌在抗菌药物选择压力下产生广谱耐药酶。因不同地区、不同医院得到的阳性率不同, 贵州医科大学附属白云医院产 ESBLs 大肠埃希菌阳性率为 66.7%, 比 2011 年王细宏等^[8]对安徽地区报道的 16.7%, 2011 年王美英^[9]对保定市地区报道的 45.3% 都高, 由此提示贵州医科大学附属白云医院产 ESBLs 大肠埃希菌分布广泛, 耐药情况严重。

质粒介导的 ESBLs 能导致大肠埃希菌水解包括所有青霉素类和头孢菌素在内的大多数 β -内酰胺类抗菌药物, 对头霉素类和碳青霉烯类及酶抑制剂敏感, 而携带编码 ESBLs 质粒的菌株往往同时携带氨基糖苷类、喹诺酮类和磺胺类药物的耐药基因^[10]。本研究中 ESBLs 表型的药敏试验结果与 2004 年章清等^[11]对上海地区和 2007 年叶惠芬等^[12]对广州地区报道的结果基本一致。结果显示, 产酶菌株耐药率明显比非产酶菌株高, 且表现出多重耐药性。相关研究报道显示, 产 ESBLs 菌株对全部青霉素类和头孢菌素第 1、2 代药物的耐药率为 100.0%, 对氨基糖苷类、喹诺酮类和磺胺类药物大多数药物的耐药率在 60.0% 以上, 但对碳青霉烯类及酶抑制剂耐药率为 0.0%。本组药敏试验结果与其他报道也存在差异, 产酶菌株对酶抑制剂药物替卡西林/克拉维酸的耐药率较高 (84.9%), 应避免该药物的使用; 对头孢他啶和头孢吡肟的耐药率较低 (36.7%~38.4%), 可能是因为贵州医科大学附属白云医院对此类药物使用并不频繁, 耐药情况较为乐观; 对氨基糖苷类药物阿米卡星耐药率很低 (4.3%), 可能与其耳毒性有关, 临床上较少使用。值得一提的是, 出现有极少数菌株对亚胺培南耐药的 现象, 需引起临床关注。临床医护人员应重视产 ESBLs 细菌流行的危害性, 规范抗菌药物的使用管理, 尝试抗菌药物交替使用, 对于缓解细菌耐药现状有积极意义。

国内许多研究显示, 目前我国主要流行的 ESBLs 基因型为 CTX-M 型, 但流行的亚型不尽相同, 如叶惠芬等^[12]报道, 流行的 ESBLs 基因型主要是 CTX-M-14 和 SHV-12 型; 韩珍等^[13]和季淑娟等^[14]报道, 北京医院和浙江地区主要为 CTX-M-14 型, 其次为 SHV 型。陈枫等^[15]对川南地区产 ESBLs 大肠埃希菌的调查研究表明, 以 TEM 型为主, 其次为 SHV 型。提示目前我国 ESBLs 基因型主要为 CTX-M 型, 少部分地区以 TEM 型为主。本研究结果显示, 贵州医科大学附属白云医院主要 ESBLs 的基因类型为 CTX-M 型, 占 97.4%。比李淑娟等^[14]对上海地区主要几家三甲医院报道的 CTX-M 型检出率 (83.0%) 要高, 这可能与临床上长期以来大量使用头孢噻肟等第 3 代头孢菌素有关。

针对以上情况, 建议临床治疗产 ESBLs 大肠埃希菌引起的重症感染时, 可首选碳青霉烯类抗菌药物 (亚胺培南或美罗

培南), 但病情较轻者应该根据药敏试验结果酌情应用阿米卡星, 再结合患者具体情况实施个体化治疗, 合理规范用药, 在做好细菌耐药性监测的同时防止大肠埃希菌耐药性的产生和传播。

参考文献

[1] 朱锦宏, 王瑶瑶, 金小珍. 医院与社区获得性肺炎患者大肠埃希菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(11): 56-59.

[2] Mazodier P, Petter R, Thompson C. Ontogenetic conjugation between *E. coli* and *streptomyces*[J]. *Bacteria*, 1989, 171(6): 3583-3585.

[3] 童朝辉, 王臻, 王辰, 等. 医院获得性肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌下呼吸道感染及耐药分析[J]. 中华医院感染杂志, 2003, 13(7): 674-676.

[4] 上海市细菌耐药性监测协作组. 上海地区细菌耐药性监测[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2002, 2(1): 1-9.

[5] 陈亚岗, 俞云松, 周伟琳, 等. 浙江省产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌流行情况及耐药性[J]. 中华传染病学杂志, 2000, 20(18): 236-239.

[6] 胡丽华, 周建英, 吴佳丽, 等. 超广谱 β -内酰胺酶分子流行病学研究[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(5): 281-283.

[7] Rubtsova MY, Ulyashova MM, Edelstein MV, et al. Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of extended-spectrum β -lactamases[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(4): 1252-1260.

[8] 王细宏, 罗飞, 陈靖. 池州地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产超广谱 β -内酰胺酶的基因型分布[J]. 安徽医学, 2011, 32(9): 1313-1315.

[9] 王美英. 2006 至 2009 年保定市儿童医院产超广谱 β -内酰胺酶表型及基因型分布的研究[J]. 河北医药, 2011, 33(13): 2047-2048.

[10] Hirakata Y. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) producing bacteria[J]. *Nippon Rinsho*, 2001, 59(4): 694-700.

[11] 章清, 魏丽, 魏光美, 等. 大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌的耐药性变迁[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(2): 220-222.

[12] 叶惠芬, 陈惠玲, 刘平, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药性和基因型分布[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(2): 127-129.

[13] 韩珍, 李向阳, 杨锦红, 等. 临床产 ESBLs 大肠埃希菌耐药表型及基因型的研究[J]. 检验医学, 2008, 23(4): 337-340.

[14] 季淑娟, 陈亚岗, 俞云松, 等. 浙江省产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的基因分型[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(2): 75-78.

[15] 陈枫, 黄永茂, 曹勇, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌耐药性及基因型分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(2): 123-125.