

· 论 著 ·

产 ESBLs 大肠埃希菌氨基糖苷类抗菌药耐药性及修饰酶基因的研究*

黄永茂, 游春芳[#], 张馨琢, 邓敏, 陈枫, 钟利, 陈庄

(泸州医学院附属医院感染科, 四川 646000)

摘要:目的 了解本地超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌对氨基糖苷类抗菌药(AGs)的耐药情况,并分析其氨基糖苷类修饰酶(AMEs)基因的检出情况。**方法** 对临床分离的 75 株大肠埃希菌用表型确证试验检测 ESBLs,用 KB 纸片扩散法对 6 种 AGs 做药敏试验以及采用 PCR 技术检测 AMEs 基因。**结果** 在临床分离的 75 株大肠埃希菌中共检出产 ESBLs 菌 37 株(49.33%)。产 ESBLs 菌耐药情况:依次为庆大霉素(78.38%)、链霉素(70.27%)、卡那霉素(62.16%)、妥布霉素(50.05%)、奈替米星(18.92%)、阿米卡星(10.81%)。与非产 ESBLs 菌株比较,除奈替米星和阿米卡星外差异均有统计学意义,且产 ESBLs 菌中耐多药模式明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。产 ESBLs 菌携带 AMEs 基因检出情况:共检出 5 种基因,其中以 aac(3)-II (64.86%)和 aac(6')-I (45.95%)为主,未检出 aac(6')-II。除 ant(2'')-I 和 aac(3)-I 外,其余 3 种基因检出率高于非产 ESBLs 菌株,且两基因携带率也明显高于非产 ESBLs 菌株($P < 0.05$)。**结论** ESBLs 的产生可使大肠埃希菌对 AGs 的耐药情况加重。

关键词: 大肠埃希菌;超广谱 β -内酰胺酶;氨基糖苷类修饰酶;基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.005

中图分类号:R378.21;R969.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1948-03

Study on aminoglycosides resistance and aminoglycosides modifying enzymes genes of extended spectrum β -lactamases-producing strains in escherichia coli*

HUANG Yong-mao, YOU Chun-fang[#], ZHANG Xin-zhuo, et al.

(Department of Infection, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To study the resistance to aminoglycosides(AGs) in Escherichia coli that produce extended spectrum β -lactamases(ESBLs), and analyze the aminoglycosides modifying enzymes(AMEs) genes in this area. **Methods** The ESBLs-producing strains were detected by confirmatory test from 75 strains of E. coli; the susceptibility of 75 strains to 6 kinds of AGs were detected by disk diffusion; and the genotypes of AMEs were detected by PCR. **Results** In 75 strains of E. coli, 37(49.33%) ESBLs-producing strains were confirmed. 1. The resistance to AGs in ESBLs-producing strains: Gentamicin (78.38%), Streptomycin (70.27%), Kanamycin (62.16%), Tobramycin (50.05%), Netilmicin (18.92%), Amikacin (10.81%). Compared with non-ESBLs-producing strains, there were obviously differences in these aminoglycosides except Netilmicin and Amikacin and also in the modes of resistance to three and more kinds of AGs ($P < 0.05$). 2. Five kinds of AMEs genes were detected in the ESBLs-producing strains and the more were aac(3)-II (64.86%) and aac(6')-I (45.95%); aac(6')-II wasn't been detected. Compared with non-ESBLs-producing strains, the positive rates were obviously differences in aac(3)-II, aac(6')-I, ant(3'')-I and double genes' modes ($P < 0.05$). **Conclusion** With the producing of ESBLs in E. coli, the resistance to AGs become more serious.

Key words: escherichia coli; extended spectrum β -lactamases(ESBLs); aminoglycosides modifying enzymes(AMEs); gene

大肠埃希菌是临床分离的革兰阴性杆菌中最常见的菌种,其作为重要的条件致病菌广泛存在于自然界中。超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是能水解青霉素类、头孢菌素类以及单环类抗菌药的一类酶^[1]。其可由质粒介导,通过接合转移引起耐药基因在细菌间的传播,因此,产 ESBLs 菌易引起医院感染的暴发流行。氨基糖苷类抗菌药(AGs)是一种治疗革兰阴性菌(如大肠埃希菌)感染(尤其是医院感染)的重要抗菌药,细菌对该类药物耐药主要是通过产氨基糖苷类修饰酶(AMEs),AMEs 按功能可分成氨基糖苷乙酰转移酶(aac)、氨基糖苷磷酸转移酶(aph)和氨基糖苷核糖转移酶(ant)3类。本研究收集 2007 年 7 月至 2008 年 7 月本院临床分离的 75 株大肠埃希菌,通过 ESBLs 检测以及对 AGs 耐药情况分析,了解本地区大肠埃希菌产 ESBLs 发生率,分析产 ESBLs 菌株对 AGs 的耐药表型和修饰酶基因的检测情况,进而为临床合理选用抗菌药物提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 菌株 75 株大肠埃希菌临床分离株(不含同一病例相同部位重复分离株)来自本院 2007 年 7 月至 2008 年 7 月非肠道大肠埃希菌感染患者,全部菌株均重新经 VITEK 系统(BioMerieux,法国)鉴定确认。标准菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922(购自国家临床检验中心)。

1.2 试剂

1.2.1 抗菌药药敏纸片 链霉素(S)、卡那霉素(K)、庆大霉素(G)、妥布霉素(T)、阿米卡星(A)、奈替米星(N)、头孢他啶/克拉维酸(CDO₂)、头孢噻肟/克拉维酸(CDO₃)等(购自杭州天和微生物试剂有限公司)。

1.2.2 培养基 M-H 琼脂培养基、LB 培养基等(购自杭州天和微生物试剂有限公司)。

1.2.3 PCR 反应所需试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 引物序列(表 1)、PCR 扩增试剂盒、电泳琼脂糖及 Marker

* 基金项目:四川省重点学科重点建设资助项目(SZD0241)。 # 现在自贡市第一人民医院感染科工作。

(均购自上海生工)等。

表 1 6 种 AMEs 基因引物序列

靶基因	引物序列	产物长度 (bp)
aac(3)-I	P1:5'ACCTACTCCCAACATCAGCC 3'	169
	P2:5'ATATAGATCTCACTACGCGC 3'	
aac(3)-II	P1:5'ACTGTGATGGGATACGCGTC 3'	237
	P2:5'CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA 3'	
aac(6')-I	P1:5'TATGATGGCTAAATCGA 3'	394
	P2:5'CCCCTTTCTCGTAGCA 3'	
aac(6')-II	P1:5'TTCATGTCCGCGAGCACCCC 3'	178
	P2:5'GACTCTTCCGCCATCGCTCT 3'	
ant(2'')-I	P1:5'GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG 3'	320
	P2:5'CTGTTACAACGGACTGGCCGC 3'	
ant(3'')-I	P1:5'TGATTTGCTGTTACGGTGAC 3'	284
	P2:5'CGCTATGTCTCTTGTCTTTG 3'	

1.3 ESBLs 表型确证试验 参照美国临床实验室标准委员会(NCCLS)推荐的纸片确证扩散法标准进行,采用头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸纸片检测,对两组中任何一种药物加与不加克拉维酸的抑菌圈直径差值大于或等于 5 mm 时,可确证该菌株产 ESBLs^[2]。

1.4 药物敏感试验 采用 KB 纸片扩散法测定 75 株大肠埃希菌对 6 种 AGs 的敏感性,药敏结果均按照 NCCLS(2008 年)标准判定。

1.5 PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳 根据 aac(3)-I、aac(3)-II、aac(6')-I、aac(6')-II、ant(2'')-I、ant(3'')-I 的序列设计 6 对引物,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取大肠埃希菌 DNA 用于 PCR 反应模板。PCR 反应体系(25 μL):2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL[包括:0.1 u/μL taq Polymerase、500 mM dNTPeach、20 mM Tris-HCl(pH 8.3)、100 mM KCl、3 mM MgCl₂ 等],上、下游引物(10 μM)各 1 μL,DNA 模板 5 μL,ddH₂O 5.5 μL。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,然后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外线检测仪观察结果,并送上海生工行基因测序。

1.6 统计学方法 数据采用 Excel 表格进行归类分析,率的比较采用 SPSS14.0 统计软件进行 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 产 ESBLs 大肠埃希菌检测结果 75 株大肠埃希菌经表型确证试验共检出产 ESBLs 菌 37 株,检出率为 49.33%。

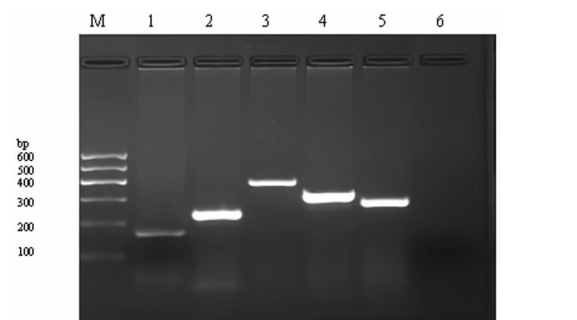
2.2 产 ESBLs 菌对 AGs 药敏情况 37 株产 ESBLs 菌对 AGs 耐药情况:依次为庆大霉素(78.38%)、链霉素(70.27%)、卡那霉素(62.16%)、妥布霉素(50.05%)、奈替米星(18.92%)、阿米卡星(10.81%);与非产 ESBLs 菌株比较,在 6 种 AGs 中除奈替米星和阿米卡星外差异均有统计学意义($P < 0.05$)。联合耐药模式中 GTK 较为常见(16.22%),其次为 GS(13.51%),最低为 GK 和 GSTKA(2.70%);与非产 ESBLs 菌株比较,仅在三药耐药及其以上耐药模式中差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2、3。

表 2 产 ESBLs 菌株与非产 ESBLs 菌株对 AGs 耐药情况比较[n(%)]

药物名称	ESBLs(+)	ESBLs(-)	χ^2	P
链霉素	26(70.27)	17(44.74)	4.996	0.025
卡那霉素	23(62.16)	14(36.84)	4.808	0.028
妥布霉素	20(50.05)	11(28.95)	4.873	0.027
庆大霉素	29(78.38)	20(52.63)	5.487	0.019
奈替米星	7(18.92)	3(7.89)	1.133	0.287
阿米卡星	4(10.81)	3(7.89)	0.001	0.970

表 3 产 ESBLs 菌株与非产 ESBLs 菌株对 AGs 耐药模式比较[n(%)]

耐药模式	ESBLs(+)	ESBLs(-)	χ^2	P
全敏感	3(8.11)	8(21.05)	2.510	0.113
单耐药	4(10.81)	10(26.32)	2.968	0.085
双耐药	8(21.62)	9(23.68)	0.045	0.831
三药耐药及其以上	22(59.46)	11(28.95)	7.083	0.008



1、2、3、4、5 分别表示 aac(3)-I、aac(3)-II、aac(6')-I、ant(2'')-I、ant(3'')-I 基因的扩增条带,分别长 169、237、394、320、284 bp;6:蒸馏水阴性对照;M:DNA Maker,范围为 100~600 bp。

图 1 PCR 电泳图

表 4 产 ESBLs 菌株与非产 ESBLs 菌株修饰酶基因阳性率比较[n(%)]

修饰酶基因	ESBLs(+)	ESBLs(-)	χ^2	P
aac(3)-I	2(5.41)	1(2.63)	0.001	0.981
aac(3)-II	24(64.86)	16(42.11)	3.902	0.048
aac(6')-I	17(45.95)	8(21.05)	5.228	0.022
aac(6')-II	0(0.00)	0(0.00)	—	—
ant(2'')-I	4(10.81)	1(2.63)	0.915	0.339
ant(3'')-I	11(29.73)	4(10.53)	4.321	0.038

—:表示未测。

2.3 产 ESBLs 菌携带 AMEs 基因检出情况 37 株产 ESBLs 大肠埃希菌中各 AMEs 阳性检出率:aac(3)-II 为 64.86%、aac(6')-I 为 45.95%、ant(3'')-I 为 29.73%、ant(2'')-I 为 10.81%、aac(3)-I 为 5.41%、aac(6')-II 为 0,见表 4。与非产 ESBLs 菌株比较,除 aac(3)-I 和 ant(2'')-I 外,其余基因阳性检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 37 株产 ESBLs 菌中有 35 株(94.59%)携带修饰酶基因,其中 19 株(51.35%)同时携

带 2 个基因(以 $aac(3)-II + aac(6')-I$ 为主);且产 ESBLs 菌株两基因携带率明显高于非产 ESBLs 菌株 ($\chi^2 = 0.003, P < 0.05$),见图 1。

3 讨 论

大肠埃希菌是临床各种细菌感染的常见病原菌。目前大肠埃希菌产 ESBLs 引起的耐药问题已变得十分突出,ESBLs 通常由质粒所介导。本研究结果显示,大肠埃希菌 ESBLs 检出率为 49.33%,与文献报道基本一致^[3-6],但比重庆地区资料所示低^[7]。大肠埃希菌对 AGs 的耐药机制主要包括:(1)药物作用靶位的改变;(2)细胞壁通透性改变或细胞内转运异常;(3)AMEs 的产生;(4)16 S rRNA 甲基化酶的产生。其中 AMEs 的产生是其主要的耐药机制。

本地区产 ESBLs 大肠埃希菌对 AGs 的耐药结果依次为庆大霉素(78.38%)、链霉素(70.27%)、卡那霉素(62.16%)、妥布霉素(50.05%)、奈替米星(18.92%)、阿米卡星(10.81%);这可能与 AGs 的使用频率和种类不同有关,以及与大肠埃希菌耐药特性有关。产与非产 ESBLs 菌株比较,在 6 种 AGs 耐药结果中除奈替米星和阿米卡星外差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这可能与产 ESBLs 细菌的质粒在携带 ESBLs 基因同时携带氨基糖苷类耐药基因有关^[8]。而阿米卡星、奈替米星耐药无差异,可能是由于其对修饰酶更稳定,不足以引起明显的差异性。本实验有 90% 以上产 ESBLs 菌株对 AGs 耐药,联合耐药模式中三药耐药及其以上的模式明显多于非产 ESBLs 菌株($P < 0.05$),提示 ESBLs 的产生可能会伴随多重耐药的出现,因此本地区临床医生在经验性选用 AGs 治疗产 ESBLs 大肠埃希菌引起的感染时要慎重。

在产 ESBLs 菌中各 AMEs 基因阳性检出率分别为 $aac(3)-II > aac(6')-I > ant(3'')-I > ant(2'')-I > aac(3)-I$,未检出 $aac(6')-II$ 。产与非产 ESBLs 菌株比较,除 $aac(3)-I$ 和 $ant(2'')-I$ 外其他阳性基因检出率差异有统计学意义,且两基因携带率也明显高于非产 ESBLs 菌株($P < 0.05$)。这可能与产 ESBLs 细菌携带 ESBLs 基因的质粒同时含有 1 个或多个 AMEs 基因有关,带有酶基因的质粒可经接合转移方式在细菌间扩散和传递耐药基因。国内文献也有提示,多数菌种特别是肠杆菌科细菌的酶基因位于质粒或转座子上,并常与 ESBLs 相关导致多重耐药^[9]。国外 Karisik 等^[10]在携带 CTX-M-15 的大肠埃希菌质粒上也发现了 $aac(6')-I b-cr, aac(3)-II a$ 。葡萄牙学者也在产 CTX-M-15 和 OXA-1 的大肠埃希菌中发现带有 $aac(6')-I b-cr-blaOXA-1$ 的基因盒^[11]。在产与非产菌株中 $aac(3)-I$ 和 $ant(2'')-I$ 检出率无差异,可能与其本身检出率低有关。

综上所述,本地区大肠埃希菌产 ESBLs 菌株流行严重,ESBLs 的产生可使大肠埃希菌对 AGs 的耐药情况加重,提示 ESBLs 和 AGs 引起的耐药可能存在一定的相关性,但其具体

原因很复杂,值得进一步探讨和研究。

参考文献:

- [1] Page MG. Extended-spectrum beta-lactamases: structure and kinetic mechanism[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14 (Suppl 1):63.
- [2] Azevedo PA, Goncalves AL, Musskopf MI, et al. Laboratory tests in the detection of extended spectrum beta-lactamase production; National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) screening test, the E-test, the double disk confirmatory test, and ceftioxin susceptibility testing[J]. Braz J Infect Dis, 2004, 8(5):372.
- [3] Muriel G, Jean-Winoc D, Nelly B, et al. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing enterobacteriaceae in france[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2):786.
- [4] Ozgunes I, Erben N, Kiremitci A, et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in clinical isolates and risk factors[J]. Saudi Med J, 2006, 27(5):608.
- [5] 王辉, 陈民钧, 倪语星, 等. 2003~2004 年中国 10 家教学医院革兰阴性杆菌的耐药分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(12):1295.
- [6] 赵晓丽, 胡大春, 周玲, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌的耐药表型及水平传播研究[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(1):55.
- [7] 郭绪平, 李阳. 产超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌的分布及耐药性分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(6):566.
- [8] Manzur A, Tubau F, Pujol M, et al. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing enterobacter cloacae in a cardiothoracic intensive care unit [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8):2365.
- [9] 张卓然, 夏梦岩, 倪语星. 微生物耐药的基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:149.
- [10] Karisik E, Ellington MJ, Pike R, et al. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 β -lactamases from Escherichia coli strains in the United Kingdom[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(3):665.
- [11] Patterson JE. Extended spectrum beta-lactamases: atherapeutic dilemma[J]. Pediatr Infect Dis J, 2002, 21(10):957.

(收稿日期:2009-10-27 修回日期:2010-01-12)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。