

· 临床检验研究论著 ·

产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌耐药性及基因型分析*李云慧, 翟如波, 张 昊, 吴秋梅, 邱广斌
(解放军 202 医院检验科, 沈阳 110003)

摘要:目的 了解本院超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)基因在大肠埃希菌中的分布类型及对常用抗菌药物耐药情况,为临床合理用药提供依据。方法 用确证法对 54 株产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌进行确证,用 PCR 的方法扩增 ESBLs 基因片段,用 K-B 纸片扩散法检测对抗菌药物的敏感性。结果 125 株大肠埃希菌中,ESBLs 阳性率为 43.2%。对青霉素类和第一、二代头孢菌素的耐药率为 100%,对头孢噻肟、头孢哌酮和头孢曲松的耐药率在 95% 以上,对头孢他啶的耐药率为 31.5%;对环丙沙星和复方新诺明的耐药率分别为 79.6% 和 83.3%;对 β -内酰胺类/酶抑制剂复合制剂仍保持较高的敏感性;未发现耐亚胺培南菌株。含耐药基因型 CTX-M 型 49 株、TEM 型 33 株、SHV 型 1 株,同时含有两种基因型达 29 株。结论 产 ESBLs 大肠埃希菌对 18 种抗菌药物的耐药情况明显高于非产 ESBLs 大肠埃希菌。基因型主要为 CTX-M,其次为 TEM,同时含有两种基因型达 29 株。明确产 ESBLs 病原菌的基因型及耐药性对临床抗感染治疗及感染控制有较大意义。

关键词:大肠埃希菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 基因型; 耐药性,细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1822-02

Drug resistance and genotype analysis of *Escherichia coli* producing ESBLs

Li Yunhui, Zhai Rubo, Zhang Hao, Wu Qiumei, Qiu Guangbin

(Department of Laboratory Medicine, No. 202 Hospital of PLA, Shenyang, Niaoning 110003, China)

Abstract: Objective To investigate the genotype and antimicrobial resistance of ESBL-producing *Escherichia coli* (E. coli) in this hospital to provide basis of reasonable drug usage. **Methods** Strains with a zone diameter for cefpodoxime less or equal with 23 mm were detected by phenotypic confirmatory test for ESBLs production and all screening test-positive strains were examined with PCR to detect the following ESBL genes: CTX-M, SHV and TEM. ESBLs-positive strains were detected for antimicrobial resistance by using disc diffusion test. **Results** The positive rate of ESBLs-producing was 43.2% in 125 strains of E. coli. Of these 54 strains, antimicrobial resistance rates to penicillin and cephalosporin I, II were 100%, to cephalosporins, cefoperazone and ceftriaxone were all above 95%, to ceftazidime was 31.5%, to ciprofloxacin and cotrimoxazole were 79.6% and 83.3%, respectively. ESBLs-producing E. coli was sensitive to most β -Lactamase inhibitors, and resistant to imipenem. The distribution of isolates with the ESBLs positive were as follows: CTX-M($n=21$), TEM($n=4$), SHV and TEM($n=1$), TEM and CTX-M($n=28$). **Conclusion** Antimicrobial resistances of ESBLs-producing E. coli might be more sensitive in 18 types of antibiotics than non ESBL-producing E. coli. The majority of the ESBLs positive clinical isolates of E. coli could carry CTX-M gene followed by both TEM and CTX-M. ESBL production in E. coli should be promptly detected and reported as it could help in treating individual cases and also in controlling the spread of these resistant phenotypes to other individuals.

Key words: *Escherichia coli*; extended-spectrum β -lactamase; genotype; drug resistance, bacterial

超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是由质粒介导的耐药酶,可在菌株间转移或传播^[1-2]。近年来,随着第三代头孢菌素在医院感染患者中广泛应用及不合理使用,产 ESBLs 的肠杆菌科细菌耐药性日益严重,使革兰阴性杆菌对广谱 β -内酰胺类抗生素的耐药率大幅上升,由其耐药所引发的临床治疗失败,以及医院感染的暴发流行已成为日益严重的全球性的医疗事件和公共卫生问题^[3]。而产 ESBLs 大肠埃希菌是目前医院感染的主要病原菌之一,由于各医院患者病种、病程及使用的抗菌药物不同,流行的 ESBLs 基因型各不相同,其耐药性和流行特征也存在明显差异,给临床治疗带来困难^[4]。本研究采用流行病学、分子生物学等技术,对本院临床分离产 ESBLs 大肠埃希菌的检出率、危险因素、基因型以及产菌株感染的临床特征进行分析,为临床合理用药、治疗产菌感染、控制产菌株的流行、制定有效的防治措施提供依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集本院 2010 年 3~9 月临床送检各类标

本,培养分离按《全国临床检验操作规程(第 2 版)》要求进行,所有菌株经全自动微生物鉴定系统 VITEK-2 Compact 鉴定到种,共检出大肠埃希菌 125 株,同一患者,同一部位无重复菌株。

1.2 试剂与药敏试验 药敏试验采用 K-B 纸片扩散法, M-H 培养基及药敏纸片均购自 OXOID 公司;试验方法和判定标准按照美国 CLSI2008 的规定判定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

1.3 ESBLs 表型确证试验 采用 CLSI 推荐的表型确证方法(纸片扩散法):头孢噻肟(30 μ g)与头孢噻肟/克拉维酸(30 μ g/10 μ g)、头孢他啶(30 μ g)与头孢他啶/克拉维酸(30 μ g/10 μ g)两对纸片中任一对或两对加克拉维酸后抑菌圈直径比原来增大 5 mm 判定产 ESBLs,质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

1.4 引物序列及扩增片段 细菌质粒 DNA 提取、PCR 扩增与 DNA 测序质粒 DNA 的提取参考相关文献。Taq DNA 聚

* 基金项目:辽宁省科学技术计划(编号:2011225021)。

合酶、dNTPs 购自 TaKaRa 公司,引物由上海博文生物工程公司合成。扩增引物见表 1。

表 1 扩增序列及扩增片段长度

靶基因	引物	扩增片段长度(bp)
TEM	5'-TGC GGT ATT ATC CCG TGT TG-3'	297
	5'-TCG TCG TTT GGT ATG GCT TC-3'	
SHV	5'-TCT CCC TGT TAG CCA CCC TG-3'	574
	5'-CCA CTG CAG CAG CTG CCG TT-3'	
CTX-M	5'-GAG AGT GCA ACG GAT GAT GT-3'	849
	5'-GAT GAT TCT CGC CGC TGA AG-3'	

2 结 果

2.1 产 ESBLs 大肠埃希菌检出结果 本院 2010 年 3~9 月住院患者临床标本中,共检出大肠埃希菌 125 株,其中产 ESBLs 54 株,阳性率为 43.2%。

2.2 产 ESBLs 大肠埃希菌的科室分布和标本分布 54 株产 ESBLs 的大肠埃希菌主要分布于:普通外科占 40.7%,内科占 27.8%,血液科占 16.7%,重症监护病房占 5.6%,肿瘤科占 5.6%,儿科占 3.7%,见表 2。

表 2 54 株产 ESBLs 的大肠埃希菌在科室和标本中的分布

科室	痰	血液	尿液	分泌物	合计	构成比(%)
外科	4	2	8	8	22	40.70
内科	2	0	12	1	15	27.80
血液科	0	4	5	0	9	16.70
ICU	0	0	3	0	3	5.60
肿瘤科	0	0	0	3	3	5.60
儿科	0	0	2	0	2	3.70
总计	6	6	30	12	54	100

2.3 ESBLs 的基因型分布 54 株表型阳性的大肠埃希菌利用相关的引物扩增后,纯化测序后经序列比对证实,含耐药基因型 CTX-M 型 49 株、TEM 型 33 株、SHV 型 1 株,同时含有两种基因型达 29 株。各基因型分布见表 3。

表 3 54 株产 ESBLs 的大肠埃希菌基因型分布

基因型	菌株数(n)	构成比(%)
TEM+CTX-M	28	51.85
TEM+SHV	1	1.85
TEM	4	7.41
CTX-M	21	38.89
合计	54	100.00

2.4 产 ESBLs 大肠埃希菌耐药情况 药敏结果显示本院产 ESBLs 大肠埃希菌对 18 种抗菌药物的耐药情况明显高于非产 ESBLs 大肠埃希菌。产 ESBLs 大肠埃希菌对青霉素类和第 1、2 代头孢菌素的耐药率为 100%,第 3 代中头孢噻肟、头孢哌酮和头孢曲松的耐药率在 95% 以上,仅头孢他啶的耐药率为 31.5%;对环丙沙星和复方新诺明的耐药率分别为 79.6% 和 83.3%;对 β-内酰胺类/酶抑制剂复合制剂仍保持较高的敏感性,耐药率为 13%~16%。而非产 ESBLs 大肠埃希菌除对氨苄西林的耐药率为 83.1% 外,对头孢菌素类耐药率

均低于 10%,未见耐亚胺培南菌株,见表 4。

表 4 125 株大肠埃希菌对 18 种抗菌药物的耐药率(%)

抗菌药物	产 ESBLs 大肠埃希菌(n=54)		非产 ESBLs 大肠埃希菌(n=71)	
	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)
氨卞西林	54	100.0	59	83.1
头孢唑啉	54	100.0	5	7.0
头孢呋辛	54	100.0	3	4.2
头孢噻吩	54	100.0	7	9.9
头孢哌酮	52	96.3	2	2.8
头孢噻肟	53	98.1	0	0.0
头孢他啶	17	31.5	0	0.0
头孢曲松	52	96.3	0	0.0
头孢吡肟	19	35.2	0	0.0
氨基曲南	39	72.2	0	0.0
阿米卡星	18	33.3	2	2.8
庆大霉素	35	64.8	35	49.3
环丙沙星	39	79.6	33	46.5
亚胺培南	0	0.0	0	0.0
哌拉西林/他唑巴坦	7	13.0	0	0.0
阿莫西林/克拉维酸	42	77.8	0	0.0
头孢哌酮/舒巴坦	9	16.7	0	0.0
复方新诺明	45	83.3	44	62.0

3 讨 论

革兰阴性杆菌产 ESBLs 是其对 β-内酰胺类药物耐药最为普遍和重要的耐药类型,以质粒介导的 ESBLs 最为重要^[5-6]。ESBLs 现已成为介导革兰阴性杆菌对新型广谱 β-内酰胺类抗菌药物耐药的重要机制^[7],且造成了临床治疗上的很大困难。ESBLs 广泛分布于大肠埃希菌中,以其水解底物谱广、耐药性强、易传播等特点受到当今各国的普遍关注。产 ESBLs 的细菌呈世界性流行,不同地区流行的基因型不同^[8]。本研究显示本院 54 株产 ESBLs 大肠埃希菌基因型主要为 CTX-M(占 90.7%),其次为 TEM(占 61.1%),与国内多数报道相似^[9]。CTX-M 类 ESBLs 能水解头孢噻肟和单酰胺类抗生素,对头孢他啶水解能力弱^[10]。药敏结果显示 54 株产 ESBLs 的大肠埃希菌对头孢噻肟的耐药率为 98.1%,对氨基曲南的耐药率为 72.2%,对头孢他啶的耐药率为 31.5%,与基因型阳性率相符合。其耐药基因与我院长期大量使用头孢噻肟、头孢曲松、头孢哌酮等第 3 代头孢菌素,诱导细菌质粒耐药基因突变或选择性细菌耐药株产生和传播有关。

近几年来本医院分离出院内感染产 ESBLs 的大肠埃希菌的检出率呈逐年上升的趋势,本次研究检出率达到 43.2%。抗生素的滥用导致耐药菌株的不断出现,本院检出产 ESBLs 的大肠埃希菌的标本主要为尿液,最多的科室为普外科,这可能与导尿与手术前抗生素的预防性应用有关,而且感染是外科常见的并发症。产 ESBLs 的大肠埃希菌科室分布广泛,表明存在 ESBLs 的流行。产 ESBLs 的大肠埃希菌标本分布比较集中,主要来自尿液、分泌物或者脓液。

本实验采用 PCR 方法将编码 ESBLs 质(下转第 1825 页)

3 讨 论

热射病是由于人体在热环境下,散热途径受阻,体温调节紊乱所致。根据发病时患者所处的状态和发病机制,临床上分为两种类型:劳力性和非劳力性热射病。劳力性主要是在高温环境下内源性产生过多;非劳力性主要是在高温环境下体温调节功能障碍引起散热减少。劳力性热射病居多,多在高温、湿度大和无风的天气进行重体力劳动或剧烈体育运动时发病。患者多为平素健康的年轻人,在从事重体力劳动或剧烈运动后数小时发病,约 50% 大量出汗,心率可达 180 次/分,脉压增大,此种患者病死率较高^[4]。导致死亡的病理生理基础主要是由于高热不断攻击机体,对细胞膜及细胞内结构造成损伤,脑缺血缺氧,机体心血管系统、肝脏、肾脏、内分泌系统、中枢神经系统以及免疫系统发生了一系列病理生理变化^[5]。有文献指出其发病机制包括内毒素发病机制和直接热损害机制^[6]。临床特点是在高温环境中突然发病,体温可高达 40℃ 以上,先出汗,后无汗,并伴有干热和意识障碍、嗜睡、昏迷等中枢系统症状,是中暑最严重的一种类型。

热射病是一种致命性疾病。热射病病死率高达 30%~80%^[7]。热射病患者出汗速率是健康人的 2 倍,容易导致水、钠丢失,引起脱水和电解质平衡失常^[8],其多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)发生率高达 50%,仅靠降温、抗休克处理并不能抑制炎症反应、弥散性血管内溶血(diffuse intravascular coagulopathy, DIC)和 MODS 的发生,因此早期保护各脏器功能和阻断恶性循环是抢救成功的关键^[9]。由上述的数据可见,热射病的并发症多种,包括电解质紊乱、肝功能受损、急性肾衰竭、横纹肌溶解、DIC 等并发症,对机体有广泛的损伤作用,引起炎症反应综合症并失控进入 MODS。影响治疗效果主要与神经系统、肝、肾和肌肉损伤程度有关,昏迷超过 6~8 h 预后不良,一旦启动外源性和内源性凝血途径,微血栓广泛形成,导致 DIC 和血液动力学障碍,受到影响的器官缺血、缺氧加重,出现组织坏死,引起 MDOS,更是增加死亡的机率。

当患者诊断为热射病时,需及时完善实验室相关检查,可

以作为早发现疾病、评估病情的参考指标。重视患者全身器官功能状态,加强系统或器官功能监测,改善全身情况,维持内环境稳定^[10],可降低患者的死亡率和致残率。一旦发生热射病,积极采取综合物理降温,联合应用多种手段防治 DIC 及 MODS,必要时还可采用集降温、超滤为一身的持续性血液净化治疗^[11]。因此,实验室检查对早期发现热射病并发症有重要意义,可降低患者的死亡率和致残率。

参考文献

- [1] Meehl GA et al. Science[M],2004,305(5686):994-997.
- [2] 宋青. 热射病,致命性的中暑[J]. 军医进修学院学报,2008,29(6):169.
- [3] Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome[J]. BMC Neurol, 2004, 14(1):2-9.
- [4] 殷平, 殷立青, 王帅. 劳力性热射病并神经系统损害 2 例报告[J]. 中国医学创新, 2011, 8(4):136.
- [5] 陈忠. 高温中暑的病理生理学研究进展[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1997, 17(4):373-375.
- [6] 夏士文, 陈阿楠, 卜甜甜, 等. 热射病发病机制的研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(3):26.
- [7] KW, Weir CJ, Alwan W, et al. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke[J]. Stroke, 1999, 30(7):981-985.
- [8] 陆在英, 钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2007.
- [9] 王烈明, 张娜, 吴江, 等. 热射病 12 例紧急救治分析[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(12):920-923.
- [10] 周高速, 陈冬梅, 王贵生, 等. 热射病并发多器官功能障碍综合征三例临床救治分析[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2009, 4(9):721-723.
- [11] 杨祖军, 张建峰, 庄华东. 高龄患者热射病 24 例抢救分析[J]. 中华危重症医学杂志:电子版, 2010, 3(4):256-258.

(收稿日期:2012-01-10)

(上接第 1823 页)

粒的 DNA 片段扩增,用琼脂糖凝胶电泳分离目的片段后进行质粒纯化具有实际意义,可以进一步分析该质粒的多态性及在不同菌株间的相关性和流行趋势,以便对它们进行流行病学分析。鉴于耐药菌耐药基因可通过接合、转化、转导等多种方式发生转移,最终导致耐药菌株的暴发流行,对疾病的预防和治疗带来极大困难,因此,明确产 ESBLs 病原菌的基因型及耐药性对临床抗感染治疗及感染控制有较大意义。

参考文献

- [1] 谭雪梅. 临床产超广谱 β-内酰胺酶菌株的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3):397-398.
- [2] 陈贤云, 夏春, 薛莲. 产超广谱 β-内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(20):2397-2398.
- [3] Hsieh CJ, Shen YH, Hwang KP, et al. Clinical implications, risk factors and mortality following community-onset bacteremia caused by extended-spectrum β-lactamase(ESBL) and non-ESBL producing Escherichia coli[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2010, 43(3):240-248.

- [4] 李万华, 秦惠宏, 张泓, 等. 产大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌儿童分离株的耐药性和基因型检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5):355-359.
- [5] Stoesser N, Crook DW, Moore CE, et al. Characteristics of CTX-M ESBL-producing Escherichia coli isolates from the Lao People's Democratic Republic, 2004-09[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(1):240-242.
- [6] 钟运华, 何林, 周克元, 等. 超广谱 β-内酰胺酶研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 28(3):252-254, 257.
- [7] 刘原, 徐灵彬, 耿燕, 等. 肠杆菌科细菌产超广谱 β-内酰胺酶的流行病学特征研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(8):910-913.
- [8] 胡同平, 张文兰, 张永梅. 大肠埃希菌产超广谱 β-内酰胺酶株的基因型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(17):2239-2241.
- [9] 陈慧红, 韩立中, 余素飞, 等. 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌超广谱 β-内酰胺酶基因型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(2):160-162.
- [10] 潘晓龙, 周东升, 吴祥朴, 等. 超广谱 β-内酰胺酶大肠埃希菌表型及基因型研究[J]. 检验医学杂志, 2005, 20(5):462-466.

(收稿日期:2012-01-06)