

• 临床检验研究论著 •

2010~2012 年安徽池州地区 TEM、SHV、CTX-M 型产超广谱 β -内酰胺酶分布特征*

罗 飞¹, 王细宏¹, 罗庆礼²

(1. 安徽省池州市人民医院检验, 安徽池州 247100; 2. 安徽医科大学病原生物学重点实验室, 安徽合肥 230000)

摘 要:目的 研究池州地区分离的大肠埃希菌(*E. coli*)、肺炎克雷伯菌(*K. pn*)质粒编码的超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)分子流行病学特征。方法 收集 2010 年 9 月至 2012 年 4 月期间从临床标本中分离的菌株, 采用法国生物梅里埃(Bio-Merieux)全自动细菌分析系统鉴定, 大肠埃希菌 294 株, 肺炎克雷伯菌 178 株, 采用美国临床实验室标准化协会(CLSI)规定的 ESBLs 表型筛选和确证试验, 确定该地区 ESBLs 的发生率, 并用质粒提取试剂盒提取 ESBLs 阳性菌株的质粒 DNA, 通过特异性引物, 聚合酶链反应(PCR)及核酸电泳分析上述菌株所携带的耐药基因并进行基因分型。结果 该地区 17.3% 的大肠埃希菌和 19.7% 肺炎克雷伯菌产 ESBLs, 其中大肠埃希菌耐质粒编码 TEM 型、SHV 型和 CTX-M 型基因的百分率分别为 49.0%、37.2%、39.2%, 肺炎克雷伯菌分别为 48.6%、25.7%、42.8%。结论 该地区产 ESBLs 菌株已经达到一定的比例, 并且出现有些菌株同时携带两种或两种以上应的耐药基因, 临床上严格控制, 合理使用抗菌药物已经刻不容缓。

关键词: β 内酰胺酶类; 基因型; 抗菌药; 安徽

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0395-03

The investigation molecular epidemiology of ESBLs in Chizhou 2010-2012*

Luo Fei¹, Wang Xihong¹, Luo Qingli²

(1. the First Hospital of Chizhou, Chizhou, Anhui 247100, China; 2. Anhui Key Laboratory of Pathogenic Biology, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230000, China)

Abstract: **Objective** To study the molecular epidemiology of ESBLs about *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Chizhou. **Methods** 294 *Escherichia coli* strains and 178 *Klebsiella pneumoniae* strains were detected by ATB Expression bacterium analytical system from 2010 to 2012. Method of National Committee for Clinical Laboratory Standards was performed for screening and ascertainment of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with ESBLs. Plasmid of the bacterium with ESBLs was extracted and amplified by polymerase chain reaction. Nucleate electrophoretic analysis was performed for genotyping of ESBLs. **Results** The percent of ESBLs positive *Escherichia coli* was 17.3%, of *Klebsiella pneumoniae* was 19.7%. Among the *Escherichia coli* strains, TEM type was 49.0%, SHV type was 37.2%, CTX-M type was 39.2%. Among the *Klebsiella pneumoniae* strains, TEM type was 48.6%, SHV type was 25.7%, CTX-M type was 42.8%. **Conclusion** The local ESBLs producing strains could have reached a certain proportion. Some strains might carry two or more kinds of resistance genes. Application of antibiotics should be controlled and rationally used at clinical.

Key words: beta-lactamases; genotype; anti-bacterial agents; Anhui

中国是世界上滥用抗菌药物最为严重的国家之一, 耐药菌引起的医院感染人数, 已占到住院感染患者总人数的 30% 左右^[1]。大肠埃希菌(*E. coli*)和肺炎克雷伯菌(*K. pn*)是临床上常见的分离菌, 随着新一代 β -内酰胺类抗菌药物的广泛应用, 超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)逐渐进入人们的视野, 并日益扩散, 有报道称武昌产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的比例从 2005 年的 38.6% 和 35.1% 上升为 2009 年的 59.2% 和 58.6%^[2]。本研究通过耐药表型筛选确定产 ESBLs 大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌的检出率, 并提取阳性菌株的质粒 DNA, 合成特异性引物, 通过 PCR 方法对阳性菌株进行基因分型, 从分子层面掌握池州地区产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的流行情况。

1 材料与方 法

1.1 材料 大肠埃希菌 294 株, 肺炎克雷伯菌 178 株, 收集 2010 年 9 月至 2012 年 4 月期间池州地区从临床标本中分离的菌株。抗菌药物纸片购自北京天坛生物制品所。Maker 2000 购自大连宝生物, 质粒抽提试剂盒购自杭州爱思进生物工程公司, TBE、SDNA-Nucleic Acids Stain Dye 购自 Boi BASIC Inc 公司, 琼脂糖购自 Promega 公司, 引物由上海生工合成;

Taq 酶、dNTP、Mg²⁺ PCR 缓冲液均购自 Fermentas 公司。PCR 仪由美国伯乐公司生产, 核酸电泳系统由南京大学普阳科学仪器长生产, JD-801 凝胶成像系统为南京捷达公司产品。

1.2 方法 ESBLs 表型筛选试验: 采用美国临床实验室标准化协会(CLSI 2006)标准进行判定, 凡头孢他啶(CAZ)抑菌环直径小于或等于 22 mm 或头孢曲松抑菌环直径小于或等于 25 mm, 安曲南或 CTX 抑菌环直径小于或等于 27 mm, 均应高度怀疑产 ESBLs, 须进一步做确证试验。

ESBL 确证实验: 将头孢他啶或头孢噻肟纸片和头孢他啶加棒酸或头孢噻肟加棒酸纸片固定在塑料胶片两端。两张纸片的间隔距离是固定的。加有棒酸的纸片端有颜色, 通常红色是头孢他啶组合, 头孢噻肟组合为蓝色, 在第三代头孢菌素和棒酸的混合纸片周围, 耐药菌株可以出现抑菌环, 单独头孢菌素纸片和混有棒酸的头孢菌素纸片抑菌环相差 5 mm 以上可确认为是产 ESBLs 菌株。

1.3 基因分型 TEM 型引物 P1: 5'-TCG GGG AAA TGT GCG-3' (97~111); P2: 5'-TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC-3' (1049~1068); SHV 型引物 P1: 5'-GGA TGT ATT GTG GTT ATG CGT T-3' (59~80); P2: 5'-TTA GCG TTG

* 基金项目: 池州市科技局社会发展科技计划项目(20104605)。

作者简介: 罗飞, 男, 检验师, 主要从事微生物学及分子生物学检验研究。

CCA GTG CTC-3′(511~528);通用 CTX-M 型引物 P1:5′-CGG TCG TAT TGC CTT TGA GCC-3′;P2:5′-ATC AAG CCT GCC GAT CTG-3′。按下列了条件进行 PCR 反应:94 ℃,预变性,5 min;3 步 PCR,94 ℃,变性,40 s 53 ℃,退火 40 s 72 ℃延伸 40 s,共 35 个循环;72 ℃延伸 10 min;4 ℃ HOLD 3.1%琼脂糖凝胶电泳(5 V/cm×30 min)分析 PCR 产物。

2 结 果

2.1 产 ESBLs 大肠埃希菌(*E. coli*)及肺炎克雷伯菌(*K. pn*)的检出率见表 1。

表 1 产 ESBLs 大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)及肺炎克雷伯菌(<i>K. pn</i>)的检出率				
菌种名称	菌株数目 (<i>n</i>)	表型阴性 (<i>n</i>)	表型阳性 (<i>n</i>)	阳性率 (%)
大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)	294	243	51	17.3
肺炎克雷伯菌(<i>K. pn</i>)	178	143	35	19.7

2.2 产 ESBLs 大肠埃希菌(*E. coli*)及肺炎克雷伯菌(*K. pn*)基因分型见表 2。

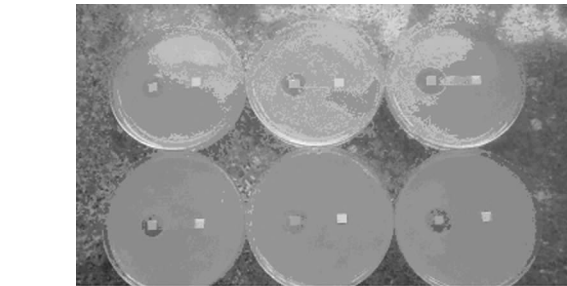
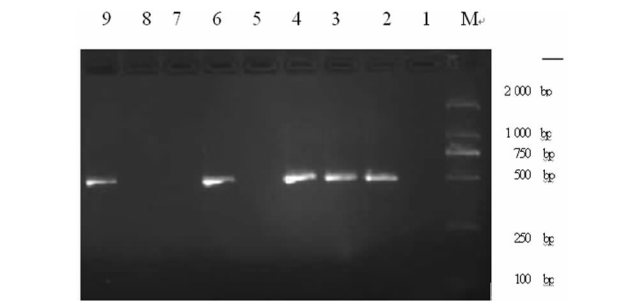
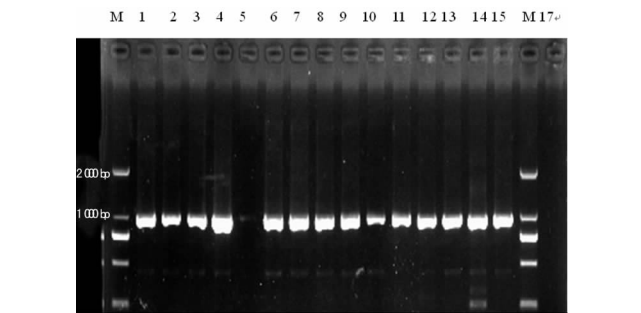


图 1 药敏试验 MH 琼脂培养图



M:Maker2000;泳道 1:大肠埃希菌标准菌株 *Eco* ATCC25922;泳道 2~9:为部分菌株 SHV 引物扩增结果,其中泳道 5、7、8 为阴性,而 2、3、4、6、9 在 480 bp 左右出现条带的为 SHV 型阳性。

图 2 SHV 型阳性 PCR 产物电泳图



M:Maker2000;泳道 17:肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC700603;泳道 1~15 为部分菌株 TEM 引物扩增结果,其中泳道 5 为阴性,其余在 1 000 bp 左右出现条带的均为 TEM 型阳性。

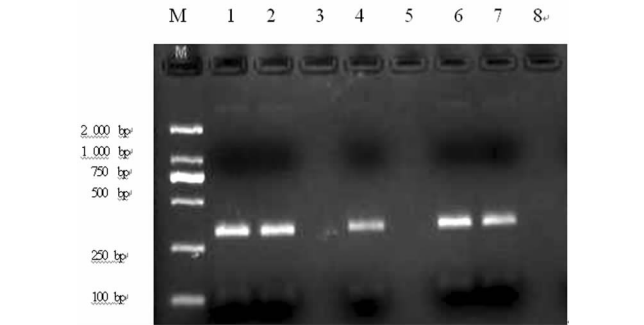
图 3 TEM 型阳性 PCR 产物电泳图

2.3 MH 琼脂上可见单独头孢菌素纸片和混有棒酸的头孢菌素纸片抑菌环大于 5 mm,可确认为产 ESBLs 表型菌株,见图 1。

2.4 1%琼脂糖凝胶电泳(5V/cm×30min)分析 PCR 产物见图 2~4。

表 2 产 ESBLs 大肠埃希菌(*E. coli*)及肺炎克雷伯菌(*K. pn*)基因分型[n(%)]

菌种名称	ESBLs 阳性 (<i>n</i>)	TEM 型	SHV 型	CTX 型
大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)	51	25(49.01)	19(37.2)	20(39.2)
肺炎克雷伯菌(<i>K. pn</i>)	35	17(48.60)	9(25.7)	15(42.8)



M:Maker2000;泳道 8:肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC700603;泳道 1~7 为部分菌株 CTX-M 引物扩增结果,其中泳道 3、5 为阴性,其余在 360 bp 左右出现条带的均为 CTX-M 型阳性。

图 4 CTX-M 型阳性 PCR 产物电泳图

3 讨 论

近年来,世界各地的 ESBLs 的检出率相对较高,有报道称^[3]:美国 ESBLs 的检出率为 2%~13%,西班牙为 28.8%,法国为 19.0%。不同国家和地区产 ESBLs 肺炎克雷伯菌分子流行情况也不同。Quale 等^[4]对纽约布鲁克林区 15 家医院研究表明,产 ESBLs 肺炎克雷伯菌主要为 SHV-5 型。欧洲国家中,荷兰主要为 SHV-5 型和 TEM 型^[5],意大利则主要为 TEM 型和 SHV 型^[6]。有报道称^[7],欧洲各国产 ESBLs 耐药菌的类型从以 TEM 型、SHV 型变为以 CTX-M 型为主,其中西班牙主要为 CTX-M-9 型和 CTX-M-14 型,加拿大卡尔加里主要为 CTX-M-14 型^[8]。在亚洲,不同国家和地区产 ESBLs 肺炎克雷伯菌基因型亦不同。Jeong 等^[9]在韩国做的一项研究发现,63.3%的肺炎克雷伯菌 ESBLs 为 TEM 型,61.5%为 SHV 型,同时发现 7.7%为 CTX-M 型。在中国不同地区产 ESBLs 肺炎克雷伯菌基因型也不同,Yang 等^[10]利用 TSAR IV 项目对全台北、中、南、东地区医院的 116 产 ESBLs 克隆主要为 SHV 型和 CTX-M 型。安徽熊自忠等^[11]调查 427 株大肠埃希菌和 559 株肺炎克雷伯菌中产 ESBLs 菌株的检出率分别为 23.6%和 51%,其中 TEM 型酶最为常见,在产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中分别为 84.5%(49/58)和 80.2%(65/81)。上海同济大学附属东方医院收集 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,TEM 型的总检出率最高,并且 63%以上携带两种以上耐药基因^[12]。河南地区郑州大学附属医院及河南省人民医院分离的 ESBLs 阳性大肠埃希菌中有 TEM-1 型(80.4%)、SHV 型(60.9%)和 CTX-M-14(58.7%)^[13]。崔雪萍等^[1]对山西医科大学第一医院、山西省人民医院临床微生物室分离的 178 株患者标本 ESBLs 阳性的 30 株肺炎克雷伯菌均携带有 TEM 型基因。本实验结果表明:本地区产 ESBLs 大肠埃希菌较 2007~2010 年基本相当,而产 ESBLs 肺炎克雷伯菌有较大幅度减少,这可能与本市积极开

展抗菌药物临床应用专项整治有关^[14]。TEM 型、SHV 型和 CTX-M 型 ESBLs 在本地区均有存在,并且出现有些菌株同时携带两种或两种以上耐药基因,进一步亚型分析尚需作进一步的序列分析和鉴定。

参考文献

[1] 崔雪萍,李连青,戎建荣,等.肺炎克雷伯菌产 ESBL 和 AmpC 酶菌株基因分型[J].中华检验医学杂志,2010,33(3)262-263.

[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] Spellberg B,Guidos R,Gilbert D,et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections;a call to action for the medical community from the infectious diseases society of america [J]. Clin Infect Dis, 2008,46(2):155-161.

[4] Quale JM, Landman D, Bradford PA, et al. Molecular epidemiology of a city wide outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection [J]. Clin Infect Dis, 2002,35(7):834-841.

[5] Patrick DJ, Sturm ET, Bochum M, et al. Prevalence, molecular characterization, and phenotypic confirmation of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* at the Radboud University Nijmegen Medical Centre in the Netherlands [J]. Microb Drug Resist, 2010,16(1):55-60.

[6] Pagani L, Perilli M, Migliavacca R, et al. Extended-spectrum TEM- and SHV- type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing outbreaks in intensive care units in Italy [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000,19(10):765-772.

[7] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M changing

the face of ESBLs in Europe [J]. Antimicrob Chemother, 2007,59 (2):165-174.

[8] Pitout JD, Church DL, Gregson DB, et al. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary Health Region; emergence of CTX-M-15-producing isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(4):1281-1286.

[9] Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, et al. Investigation of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea [J]. Letters in Applied Microbiol, 2004,39(1):41-47.

[10] Jia LY, Jann TW, Tsai LL, et al. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum β -lactamases production [J]. Microbiol Immunol Infect, 2009, 42(3):310-316.

[11] 熊自忠,朱德妹,张婴元,等.临床分离的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中超广谱 β -内酰胺酶的检测 [J]. 中华医学杂志, 2002,82 (21):1476-1479.

[12] 施锦杰,丁媛媛,李永明.大肠埃希菌 ESBLs 的携带情况及药敏分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(1):53-54.

[13] 张志坚,张傅山,张钦宪,等.大肠埃希菌产超广谱 β -内酰胺酶基因型与其耐药性 [J]. 郑州大学学报:医学版, 2010,45(5):738-740.

[14] 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.

(收稿日期:2012-09-23)

(上接第 394 页)

型(单一或混合感染)的患者占全部腺癌病例的 72.3%(34/47),占全部阳性病例的 77.2%(34/44);感染 HPV18 型(单一或混合感染)的患者占全部腺癌病例的 55.3%(26/47),占全部阳性病例的 59.1%(26/44)。同时感染 HPV16 型和 HPV18 型的患者占全部宫颈腺癌病例的 42.6%(20/47),占全部阳性病例的 45.5%(20/44)。以上结果提示,HPV16 型和 HPV18 型为宫颈腺癌患者感染优势型别,与宫颈癌的发生、发展密切相关。

近几十年来宫颈腺癌的发病率不断升高,有人认为这是因为宫颈脱落细胞学筛查的广泛开展,使得子宫颈鳞状细胞癌得以早期发现和早期治疗,从而造成了宫颈腺癌的发病率相对升高。但也有研究表明宫颈腺癌发病的绝对数量确实一直在不断增加。本研究描述了 HPV 在 47 例宫颈腺癌中的基因型别分布,HPV16 型和 HPV18 型为优势型别。因此,研究者可以通过基因芯片检测技术对宫颈疾病进行广泛筛查,对高危型阳性患者进一步实施阴道镜检查以及必要的病理活检,从而有效地预防和治疗宫颈癌患者。

参考文献

[1] 严粉琴,耿建祥,肖蔚,等.已婚女性宫颈上皮细胞中人乳头瘤病毒基因分型 2 000 例分析 [J]. 实用妇产科杂志, 2012,28(5):390-393.

[2] 孙信,薛敏,邓新粮.宫腔镜诊断宫颈腺癌 4 例临床分析 [J]. 中国医科大学学报, 2010,39(1):71-72.

[3] 耿建祥,王旭波.人乳头瘤病毒检测及其临床应用 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:381-427.

[4] 张金浩,耿建祥,吴崑岚,等.结直肠肿瘤中 HPV 感染的基因分析 [J]. 医学研究生学报, 2011,24(2):391-393.

[5] 兰建云,邵伟伟,袁苏娟,等.外耳道乳头状瘤中的人乳头瘤病毒检测及其临床意义 [J]. 医学研究生学报, 2010,23(4):391-393.

[6] 董云灿,耿建祥,张劲松,等.1 722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒基因的分型 [J]. 国际检验医学杂志, 2012,33(7):817-820.

[7] 唐永发,耿建祥,张金浩,等.196 例肛门及肛管尖锐湿疣病变中 HPV 感染的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2012,33(11):1303-1304,1307.

[8] 王建英,范明明,吴效科,等.人乳头状瘤病毒感染及端粒酶 hTERT 表达与宫颈癌关系的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2008,21(12):1321-1324.

[9] 何桂蓉,刘秋芹,龚文波,等.双色荧光定量快速分型、定量高危型人乳头状瘤病毒 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007,27(8):762-765.

[10] 王鲁平.人乳头状瘤病毒感染与子宫颈病变关系的研究进展及应对策略 [J]. 诊断病理学杂志, 2007,14(2):86-89.

[11] Li J, Zhang D, Zhang Y, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in women with cervical cancer or high-grade precancerous lesions in Chengdu, western China [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2011,112(1):131-134.

[12] Lan HY, Twu NF, Chen PC, et al. The relationship between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in relation to age of patients with cervical adenocarcinoma [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2009,48(3):370-374.

(收稿日期:2012-09-23)