

• 临床检验研究论著 •

ICU 分离的大肠埃希菌基因分型及耐药分析*

黄 琳, 黄建宏, 何锦文
(珠海市人民医院检验科, 广东珠海 519000)

摘 要:目的 探讨珠海市人民医院 ICU 患者分离的 30 例多重耐药的大肠埃希菌的耐药及基因分型情况, 为 ICU 患者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) 对药敏实验筛选出多重耐药的大肠埃希菌进行基因分型。结果 ICU 共分离 30 株菌种, 分为 A 型和 B2 型两个基因型, 分别在痰液分离 16 株 (B2 型 5 株), 血液 9 株 (B2 型 7 株), 肺灌洗液 3 株, 尿液 2 株 (B2 型 1 株)。药敏结果显示 B2 型 13 株, 对阿莫西林、头孢唑林、哌拉西林、替卡西林的耐药率均达 90% 以上。A 型 17 株, 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, B2 型的多重耐药率高于 A 型。结论 B2 型菌株表现为多重耐药性且致病性强, 主要分布在血液标本中, 应该根据 ICU 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; 抗菌性; 微生物
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 15. 020 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2014)15-2013-03

Genotyping of *Escherichia coli* isolated from ICU and drug resistance situation analysis*

Huang Lin, Huang Jianhong, He Jinwen

(Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Municipal People's Hospital, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: **Objective** To explore the drug resistance and genotypes in 30 strains of multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from ICU patients to provide the basis for rational use of antibacterial drugs in ICU patients. **Methods** The MIC method was adopted to analyze the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and the Enterobacteriaceae intergenic repetitive sequence (ERIC)-polymerase chain reaction (PCR) method was adopted to perform the genotyping of multi-drug resistant *Escherichia coli* screened out by the antimicrobial susceptibility. **Results** 30 strains of *Escherichia coli* were isolated from ICU and divided into two genotypes of type A and B2, among which 16 strains were isolated in sputum (5 strains of type B2), 9 strains in blood (7 strains of type B2), 3 strains in lung lavage fluid and 2 strains in urine (1 strain of type B2). The drug susceptibility test results showed 13 strains of type B2 and their resistance rates to amoxicillin, cefuroxime, piperacillin, ticarcillin were over 90%. 17 strains were type A and their resistance rates to amoxicillin, cephalothin, gentamicin, ticarcillin and piperacillin reached more than 70%. The multi-drug resistance in type B2 was higher than that in the type A. **Conclusion** Type B2 strain of *Escherichia coli* shows multi-drug resistance and strong pathogenicity and mainly distributes in the blood samples. The use of antibacterial drugs in ICU patients should be reasonably adjusted according to different genotypes of *Escherichia coli* infection.

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

大肠埃希菌是临床分离的最常见的革兰阴性菌之一, 也是 ICU 分离的常见主要的致病菌。由于疾病本身或长期使用抗菌药物和免疫功能低下, ICU 患者容易导致并发感染的发生。超广谱 β -内酰胺酶是由质粒介导的耐药酶, 能够水解广谱青霉素、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抑制剂敏感。产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 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^[1], 将珠海市人民医院 ICU 科分离的 30 株大肠埃希菌进行基因分析及药敏测试, 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 材料与与方法

1.1 菌株来源及鉴定 30 株多重耐药的大肠埃希菌分离于 2013 年 1~12 月珠海市人民医院 ICU 住院患者, 其中男性 21 例, 年龄 30~81 岁, 平均 52.1 岁, 女性 9 例, 年龄 32~79 岁, 平均 50.1 岁, 患者均疾病病程较重。标本来源于痰液、血液、肺灌洗液、尿液, 保存于无菌容器内送检。菌种的鉴定采用西

门子 Walk 96 全自动微生物分析系统及配套试剂。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 西门子 Walk 96 全自动微生物分析系统; 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 种大肠埃希菌的抗菌药物组合进行耐药谱的分析, 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 (CLSI) 2013 年标准。

1.3.2 大肠埃希菌株的 DNA 提取 (1) 取细菌样品 0.5 mL 于无菌离心管中, 8 000 r/min 离心 1 min。(2) 弃上清液。沉淀物中加入 1 mL PBS 缓冲液, 涡流震荡使沉淀重新悬浮。(3) 重新悬浮的细菌悬液 8 000 r/min 离心 1 min。(4) 弃上清

* 基金项目: 广东省科技厅资助科研基金资助项目 (2012B031800024)。 作者简介: 黄琳, 女, 主管检验技师, 主要从事肝炎病毒基因扩增及临床微生物检验方向研究。

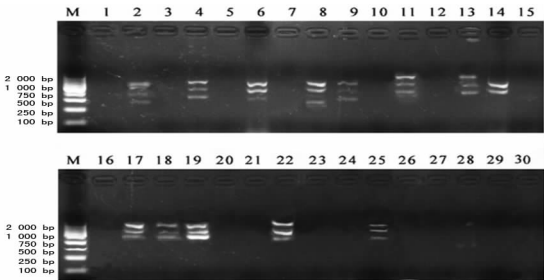
液。沉淀物中加入 500 μ L TE 缓冲液,漩涡震荡使之重新悬浮。(5)加入 30 μ L 10% SDS,混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h(期间每 10 min 轻轻混匀 1 次)。(6)加入 100 μ L 5 mol/L NaCl,充分混匀,再加入 70 μ L CTAB/NaCl 溶液,混匀后 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min(期间每 3 min 轻轻混匀 1 次)。(7)加入等体积酚/氯仿/异戊醇轻轻颠倒混匀,13 500 r/min 离心 10 min。(8)将上清转移至一只新的离心管中,加入等体积氯仿/异戊醇,轻轻颠倒混匀,13 500 r/min 离心 10 min。(9)将上清转移至一只新的离心管中,加入 0.6 倍体积异丙醇,轻轻颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置

0.5 h 沉淀 DNA,13 500 r/min 离心 10 min。(10)弃上清,加入 1 mL 75%乙醇洗涤 DNA 沉淀,13 500 r/min 离心 10 min。(11)弃上清,在超净工作台中稍加干燥,加入 20 μ L TE 缓冲液,溶解 DNA 沉淀。(12)DNA 溶液置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。
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)-PCR 对目标菌株的 3 个不同 DNA 片段进行扩增分析,PCR 反应体系和 PCR 反应条件见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。引物序列具体信息见表 2。

表 2 PCR 引物信息

检测基因	引物名称	引物序列(3'~5')
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
an anonymous DNA fragment designated TSPE4. C2	TspE4C2. 1	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA
	TspE4C2. 2	CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG

1.3.4 电泳结果 见图 1。



M:DNA 标记物;1~30:菌株编号。

图 1 PCR 产物凝胶电泳图

1.3.5 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^[2],大肠埃希菌分为 A,

B1,B2 和 D 型。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)

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,利用 SPSS18.0 对收集到的计数资料进行 χ^2 检验以及多因素分析等。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DNA 同源性分析及分离菌株分布 30 株大肠埃希菌共分为 2 种类型,其中 17 株为 A 型,13 株为 B2 型,未见其他基因型。根据基因分型对分离菌株在标本来源中的分布进行统计,结果显示分别在痰液分离 16 株(B2 型 5 株),血液 9 株(B2 型 7 株),肺灌洗液 3 株,尿液 2 株(B2 型 1 株)。

2.2 药敏结果 见表 3。

表 3 30 株大肠埃希菌株耐药率比较(%)

抗菌药物	A 型($n=17$)			B2 型($n=13$)		
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药
阿莫西林	11.8	8.8	79.4	8.8	1.2	90.0
头孢西丁	64.7	8.8	26.5	8.8	11.2	80.0*
头孢他啶	59.0	2.6	38.4	7.7	2.6	89.7*
头孢噻吩	17.6	73.5	74.9	8.8	8.8	82.4
庆大霉素	35.9	2.6	61.5	10.3	0.0	89.7
环丙氟哌酸	6.5	13.8	79.7	10.3	10.3	79.4
替卡西林	17.9	10.3	71.8	2.6	4.7	92.7
替卡西林+克拉维酸	30.8	10.2	59.0	5.1	5.1	89.8
妥布霉素	43.6	10.2	46.2	10.3	0.0	89.7*
头孢呋辛	41.2	8.8	50.0	5.9	2.9	91.2
哌拉西林	17.9	10.3	71.8	2.6	5.7	91.7
奈替米星	58.8	8.8	32.4	8.8	9.7	81.5*
哌拉西林/他唑巴坦	79.5	10.2	10.3	10.3	10.6	79.1*
头孢吡肟 3 代	51.3	7.7	41.0	7.7	12.6	79.7*

续表 3 30 株大肠埃希菌株耐药率比较(%)

抗菌药物	A 型(<i>n</i> =17)			B2 型(<i>n</i> =13)		
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药
美罗培南	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
阿莫西林+克拉维酸	50.0	35.1	14.9	8.8	10.0	81.2*
头孢噻肟/3 代	50.0	5.9	44.1	5.9	2.9	91.2*
阿米卡星	74.4	10.2	15.4	10.3	10.6	79.1*
复方磺胺甲噁唑	35.9	10.3	53.8	7.7	2.6	89.7
亚胺培南	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0

* :*P*<0.05,与 A 型耐药比较。

3 讨 论

ICU 患者由于疾病本身或长期使用抗菌药物,导致机体免疫系统功能低下,容易受到病原微生物的侵袭,临床治疗难度大,特别侵入性的医疗行为更是增加引起血液方面感染的风险,是引起死亡的重要原因,在 ICU 患者常见感染的革兰阴性杆菌中,大肠埃希菌是最常见致病菌之一,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^[3]。在众多的耐药机制中,以 β-内酰胺类抗菌药物耐药为主,其主要机制是通过产 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^[4]。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情况对临床抗菌药物的使用有指导意义,因此对本院 ICU 分离的 30 株阿莫西林耐药大肠埃希菌进行耐药分析及基因分型。

分析结果显示,检出的 17 株 A 型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+克拉维酸、阿米卡星等药物的敏感性高。13 株 B2 型大肠埃希菌对阿莫西林、头孢呋辛、哌拉西林、替卡西林的耐药率均达 90% 以上,对其他抗菌药物的耐药率普遍高,与文献相符^[6]。检出的大肠埃希菌均未发现对亚胺培南及美罗培南耐药。在检出的 13 株致病性较强的 B2 型大肠埃希菌主要分布于血液,其引起的血液感染常常病情较重,治疗也较为困难,应该引起临床的足够重视。目前引起这种情况的是患者血液中复杂的抗菌药物种类及浓度使大肠埃希菌基因更容易发生突变,还是 ICU 病区 B2 型的大肠埃希菌通过侵入性医疗行为引起患者菌血症,需要进一步的调查研究。

大肠埃希菌出现多重耐药的表现不止是多种耐药机制共同作用的结果,更与细菌染色体基因发生突变,耐药基因水平

传播有着重要的联系^[7-10],不同基因型的大肠埃希菌的泛耐药和多重耐药的情况不一致,给临床控制感染造成困难,因此为医生提供 ICU 患者感染多重耐药的大肠埃希菌的基因分型信息,能提供更加有价值的参考意见,避免抗菌药物的滥用,降低治疗经济成本,同时更加有效地控制感染。

参考文献

[1] 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.

[2] Mine Y, Kovacs NJ. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infections disease[J]. J Med Food, 2002, 5(3): 159-169.

[3] 赵庆东. 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): 191-192.

[4] 钮博, 王卫国, 王敏, 等. 320 株大肠埃希菌对常用抗生素耐药性分析[J]. 中国医药, 2008, 3(2): 96-97.

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

[6] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10): 4555-4558.

[7] 冯美菊, 张燕, 罗予. 多药耐药肠杆菌科细菌产超广谱 β-内酰胺酶基因型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(12): 1651-1653.

[8] 李林, 赖小美, 郭有能, 等. 大肠埃希菌的耐药特点与产超广谱 β-内酰胺酶基因型分布[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(15): 3206-3208.

[9] 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.

[10] 何晓峰, 刘金禄, 邵端芳, 等. 产超广谱 β-内酰胺酶大肠埃希菌感染及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(6): 1239-1241.

(收稿日期: 2014-02-12)

(上接第 2012 页)

strains among heterogeneous populations in shellfish[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(8): 2098-2101.

[6] Yano Y, Yokoyama M, Satomi M, et al. Occurrence of Vibrio vulnificus in fish and shellfish available from markets in China[J]. J Food Prot, 2004, 67(8): 1617-1623.

[7] 陈艳, 梅玲玲, 李秀桂, 等. 东南沿海地区零售海产品中创伤弧菌的监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(4): 344-347.

[8] 潘军航, 梅玲玲, 朱敏, 等. 舟山市售牡蛎中创伤弧菌污染的定量分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(12): 2760-2761, 2819.

[9] Nakafusa J, Misago N, Miura Y, et al. The importance of serum

creatinine phosphokinase level in the early diagnosis, and as a prognostic factor, of Vibrio vulnificus infection[J]. Br J Dermatol, 2001, 145(2): 280-284.

[10] 卢中秋, 邹长林, 李秉煦, 等. 12 例创伤弧菌败血症的流行病学特点[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 900.

[11] 赵典惠, 孙际佳, 王海芳, 等. 创伤弧菌的药物敏感性[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(12): 1207-1211.

[12] 王志刚, 邵平扬, 吴晓燕. 创伤弧菌的培养鉴定及其对抗菌药物的敏感性[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(5): 293-296.

(收稿日期: 2014-03-06)