

血培养大肠埃希菌的药物敏感性分析及 ESBLs 编码基因的流行性分析*

徐学静, 曹小利, 张之烽, 宁明哲, 周万青, 张 葵, 沈 瀚

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

摘要:目的 对2012年血培养分离121株大肠埃希菌的药物敏感性、产ESBLs情况及ESBLs编码基因blaCTX-M, blaTEM和blaSHV的分布进行分析。方法 收集2012年血培养非重复分离大肠埃希菌121株, 使用WHONET 5.6分析耐药性; 采用双纸片协同法确认试验筛选产ESBLs菌; 聚合酶链反应(PCR)法和DNA测序法分析产ESBLs菌中blaCTX-M, blaTEMt blaSHV基因的流行性。结果 121株大肠埃希菌对广谱青霉素和二, 三代头孢菌素、左旋氧氟沙星及复方新诺明都有较高的耐药性, 耐药率大于40%; 对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星有较高的敏感性, 耐药率小于12%; 121株大肠埃希菌中, 86(88.7%)株产ESBLs, blaCTX-M, blaTEM和blaSHV基因的检出率分别为59.5%(72), 38.8%(47)及4.1%(5)株; 其中, 2(1.7%)株细菌同时携带blaCTX, blaTEM和blaSHV基因, 30(24.8%)株细菌同时携带blaCTX和blaTEM基因, 1(0.8%)株细菌同时携带blaSHV和blaTEM基因。结论 南京鼓楼医院血培养大肠埃希菌大多产ESBLs, 以bla(CTX-M-14)的流行为主, 对大多数的青霉素类、头孢菌素和单环类等常用抗菌药物耐药治疗时应根据药敏结果选择抗菌药物。

关键词: 大肠埃希菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 血培养; 耐药性; 敏感性

中图分类号: R378.21; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)01-055-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.015

Analysis on the Antimicrobial Susceptibilities and the Prevalence of ESBLs Encoding Genes of *Escherichia Coli* Isolates Collected from Blood

XU Xue-jing, CAO Xiao-li, ZHANG Zhi-feng, NING Ming-zhe, ZHOU Wan-qing,

ZHANG Kui, SHEN Han (Department of Medical Laboratory, the Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Objective** To analyze the susceptibilities of *Escherichia coli* isolates collected from blood and the prevalence of ESBLs encoding genes. **Methods** A total of 121 *Escherichia coli* isolates collected from blood during 2012 were analyzed for antimicrobial susceptibilities by software of WHONET 5.6, the production of ESBLs was confirmed by confirmatory phenotypic testing, PCR and DNA sequence were further implemented to analyze the ESBLs-encoding genes. **Results** 121 *E. coli* isolates displayed high resistance towards broad spectrum penicillin and 2nd or 3rd generation cephalosporins, levofloxacin and cotrimoxazole, with the resistance rates being more than 40%, susceptibilities to imipenem, piperacillin/tazobactam, amikacin were observed, with the resistance rates to be less than 12%, 86(88.7%) out of 121 isolates were found to produce ESBLs. Among them, 59.5%(72), 38.8%(47) and 4.1%(5) were confirmed to carry blaCTX-M, blaTEM and blaSHV genes. Additionally, 2(1.7%) isolates carried all the genes detected, 30(24.8%) isolates carried both of blaCTX and blaTEM, 1(0.8%) isolate carried both of blaSHV and blaTEM. **Conclusion** Most of the *E. coli* isolates from the blood culture in Nanjing Gulou Hospital produce ESBLs, and displayed resistance towards most of the penicillins, cephalosporins and single amide antimicrobial agents should be chosen according to susceptibility results.

Keywords: *Escherichia coli*; ESBLs; blood culture; resistance; susceptibilities

大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是引起血流感染最常见的革兰阴性杆菌, 是产生超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum beta lactamases, ESBLs)的主要菌株^[1]。近年来, 临床上ESBLs的检出率逐渐增加, 导致耐药情况日益严重, 给抗感染治疗造成很大困难。分析本院血培养大肠埃希菌的耐药特征和产ESBLs情况, 为临床治疗及控

制院内感染提供依据。本研究对2012年本院血培养非重复分离的121株大肠埃希菌进行耐药特点分析和ESBLs检测, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集南京鼓楼医院2012年1月~12月血培养分离的非重复大肠埃希菌121株。

1.2 试剂和仪器 药敏纸片氨苄西林(AMP)、氨

* 基金项目: 南京市卫生局医学科技发展资金资助(QRX11191)。

作者简介: 徐学静(1983—), 女, 主管技师, 主要从事临床检验工作, Tel: 13951829953, E-mail: xxuejing@hotmail.com。

通讯作者: 沈 瀚, 男, 主任技师, E-mail: shenhan10366@sina.com。

苄西林/舒巴坦(SAM)、头孢呋辛(CXM)、头孢西丁(FOX)、头孢噻肟(CTX)、头孢他定(CAZ)、阿米卡星(AMK)、亚胺培南(IMP)、氨曲南(ATM)、替卡西林/克拉维酸(TIM)、头孢噻肟/克拉维酸(30 μg/10 μg)、头孢他啶 30 μg 与头孢他啶/克拉维酸(30 μg/10 μg)、哌拉西林(PRL)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、头孢吡肟(FEP)、头孢哌酮/舒巴坦(SCF)、复方新诺明(SXT)、左旋氧氟沙星(LEV)为 Oxoid 公司产品, MH 平板为法国生物梅里埃公司产品。2×PCR Master Mix 及 100 bp marker 均为北京天根生化科技有限公司产品。PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。DNA 序列测定由上海美吉生物医药科技有限公司完成。所有菌株均采用 VITEK2 Compact(法国生物梅里埃公司生产)鉴定系统鉴定。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感性分析:2012 年分离的大肠埃希菌菌株,所有的药敏测定采用 K-B 法。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。根据 2014 年 CLSI 标准^[2],对 18 种常用抗生素的抑菌圈直径作出“敏感”、“耐药”和“中介”的判断。使用 WHONET5.6 对目的菌株进行药物敏感性分析。

1.3.2 ESBLs 的表型检测:按临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的标准纸片扩散确证法进行 ES-
BLs 确证^[2]。头孢噻肟(30 μg)与头孢噻肟/克拉维酸(30 μg/10 μg)、头孢他啶 30 μg 与头孢他啶/克拉维酸(30 μg/10 μg)两对纸片中任一对或两对加克拉维酸者比不加克拉维酸者抑菌圈直径≥5 mm 判定为 ESBLs 阳性。质控菌株:阴性质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922;阳性质控菌株为肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.3.3 耐药基因检测:采用水煮法提取细菌总 DNA,取 2 μl 上清液作为 PCR 模板。参照文献^[3],采用 PCR 对 blaCTX-M, blaSHV 和 blaTEM 基因分别进行扩增,通用引物见表 1。PCR 反应体系为 50 μl,其中,2×PCR Master Mix 为 25 μl,模板 DNA 2 μl,上下游引物各 2 μl, H₂O 19 μl。blaCTX-M PCR 反应参数为:94℃预变性 3 min, 94℃变性 1 min,60℃退火 1 min,72℃延伸 1 min, 30 个循环,72℃延伸 7 min;blaTEM PCR 反应参数为:94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 30 s,30 个循环,72℃延伸 10 min;blaSHV 的 PCR 反应参数为:94℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,60℃退火 40 s,72℃延伸 1 min,30 个循环,72℃延伸 7 min。对于耐药基因阳性的菌株,进一步纯化,送上海美吉生物医药科技

有限公司测序。测序结果在 NCBI 上进行比对、确定。

表 1 PCR 引物序列及扩增片段长度		
基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
blaCTX-M	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	593
	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYSAGCGG	
blaTEM	ACCAATGCTTAATCAGTGAG	963
	GCGGAACCCCTATTTG	
blaSHV	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713
	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	

2 结果

2.1 血培养大肠埃希菌临床分离株的耐药特点
121 株大肠埃希菌所测抗菌药物的耐药率如下:氨苄西林为 90.4%,氨苄西林/舒巴坦 78.9%,哌拉西林 81.9%,哌拉西林/他唑巴坦 8.4%,头孢呋辛 75.9%,头孢噻肟 74.7%,头孢他啶 41.0%,替卡西林/克拉维酸 41.6%,复方新诺明 67.5%,氨曲南 56.5%,左旋氧氟沙星 64.5%,头孢西丁 15.1%,头孢吡肟 46.4%,阿米卡星 12.0%,亚胺培南 1.8%。对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星有较高的敏感性,耐药率依次为 1.8%, 8.4%,12.0%。

2.2 超广谱头孢菌素酶的表型筛选结果及 ES-
BLs 的基因型 表型确证试验显示,121 株菌株中,86(88.7%)株产 ESBLs。基因检测显示:72(59.5%)株携带 blaCTX,其中,50 株检出为 bla(CTX-M-14),20 株为 bla(CTX-M-15),2 株为 bla(CTX-M-9);47(38.8%)株携带 blaTEM,均为 blaTEM;5(4.1%)株携带 blaSHV,其中,4 株检出为 bla(SHV-11),1 株为 bla(SHV-36)。其中,2(1.7%)株细菌同时携带 blaCTX, blaTEM 和 blaSHV,30(24.8%)株细菌同时携带 blaCTX 和 blaTEM,1(0.8%)株细菌同时携带 blaSHV 和 blaTEM。部分菌株 blaCTX-M, blaTEM 和 blaSHV 基因 PCR 检测结果见图(图 1~3)。

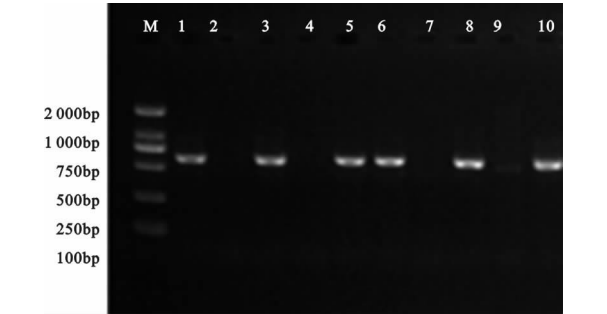


图 1 部分菌株 blaCTX-M 扩增产物电泳结果

3 讨论 大肠埃希菌是医院感染的常见病原菌。产 ESBLs 菌株耐药情况日益严重,给临床治疗造成很大困扰。本院血培养大肠埃希菌对广谱青霉素和二,三代头孢菌素、左旋氧氟沙星及复方新诺

明都有较高的耐药性,这与孙国全等^[4]学者的分析结果一致,因此临床上不能盲目地经验性使用喹诺酮类和头孢菌素类抗菌药物治疗大肠埃希菌感染。

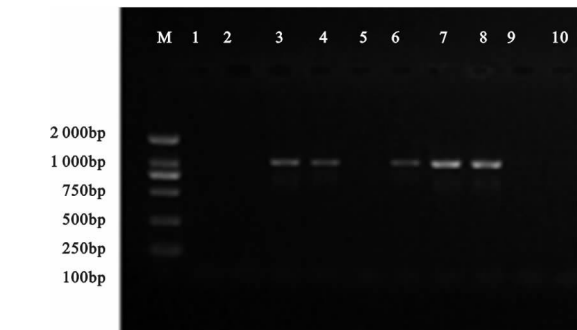


图2 部分菌株 blaTEM 扩增产物电泳结果

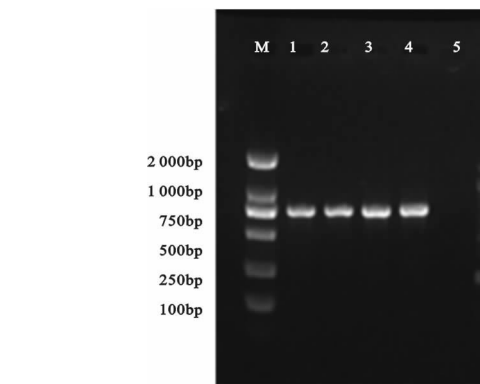


图3 部分菌株 blaSHV 扩增产物电泳结果

此外,本研究所测菌株对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星有较高的敏感性,这与 ESBLs 不能水解 β -内酰胺酶/ β -内酰胺酶抑制剂复合药物、头霉素及碳青霉烯抗菌药物有关^[5]。虽然产 ESBLs 菌株在体外对头霉素具有良好的抗菌作用,但头霉素类易诱导细菌产生诱导酶(AmpC 酶)^[6],应慎用;而对于既产 β -内酰胺酶同时伴有外膜蛋白丢失的细菌, β -内酰胺酶/ β -内酰胺酶抑制剂复合药物的抗菌活性会降低^[7],应警惕使用。亚胺培南是目前国际上认为治疗产 ESBLs 肠杆菌科细菌引起的重症感染的有效药物^[8],对于该类细菌引起的血液感染等,可考虑作为临床上经验性用药早期使用,但临床上最好根据药敏试验结果尽早选择敏感药物进行治疗。

ESBLs 在本院血培养大肠埃希菌中广泛流行,分型结果与杨小影等^[9]学者的报告一致,本研究分析的是住院病人的血培养结果,住院病人大多有基础疾病、免疫力低,长期使用广谱抗生素等现状这可能是导致大肠埃希菌普遍产 ESBLs 的原因。

本研究,ESBLs 的编码基因以 blaCTX-M-14 流行为主,大多伴有 blaTEM 的播散,这与张阮章等^[10]学者报道的致血液感染大肠埃希菌中 ESBLs 的流行特点一致。值得注意的是,到目前为

止,bla(SHV-36)只在英国、加拿大、摩洛哥、葡萄牙分离的肺炎克雷伯杆菌中被检测到^[5],这是我们首次在中国临床分离的大肠埃希菌中检测到 bla(SHV-36)基因。

综上所述,本院血培养大肠埃希菌对临床常用抗菌药物耐药率高,且大多产 ESBLs,以 CTX-M-14 为最主要基因型,伴有 blaTEM-1 的播散,应加强检测。

参考文献:

[1] Horner C, Fawley W, Morris K, et al. *Escherichia coli* bacteraemia: 2 years of prospective regional surveillance (2010 ~ 2012) [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(1): 91-100.

[2] Clinical and Laboratory. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22th informational supplement[S]. Wayne, PA, CLSIM100-S22, 2014.

[3] Dallenne C, Da Costa A, Decre D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3): 490-495.

[4] 孙国全, 王倩, 褚云卓, 等. 28 179 例血培养病原菌分布及耐药性分析[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(5): 102-105.

Sun GQ, Wang Q, Chu YZ, et al. Pathogen distribution & drug resistance analysis from 28 179 blood cultures[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(5): 102-105.

[5] Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, et al. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology [J]. Curr Issues Mol Biol, 2015(17): 11-22.

[6] Galán JC, González-Candelas F, Rolain JM, et al. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β -lactamases world[J]. Front Microbiol, 2013(4): 9.

[7] Buynak JD. β -Lactamase inhibitors: a review of the patent literature (2010-2013) [J]. Expert Opin Ther Pat, 2013, 23(11): 1469-1481.

[8] Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact [J]. Curr Opin Infect Dis, 2010, 23(4): 320-326.

[9] 杨小影, 吴洪秋, 李丽琴, 等. 珠海地区妇幼保健院大肠埃希菌产 ESBLs 的基因型研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(4): 40-42.

Yang XY, Wu HQ, Li LQ, et al. Genotypes research for *E. coli* producing ESBLs in Zhuhai MCH [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(4): 40-42.

[10] 张阮章, 卢月梅, 胡玉华, 等. 血流感染大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的 ESBLs 基因分型[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(7): 632-633, 636.

Zhang RZ, Lu YM, Hu YH, et al. Genotyping of ESBLs in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood culture specimens [J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(7): 632-633, 636.