

· 基础论著 ·

不同人群中分离的大肠埃希菌的耐药性及多重耐药机制

叶英 李家斌

【摘要】 目的 分析健康成人、儿童和患者3组人群中分离的大肠埃希菌对常用抗菌药物的耐药性和耐药机制。方法 采用 MicroScan-Walkway-40 系统鉴定细菌,琼脂平皿倍比稀释法测定各种抗菌药物 MIC (minimal inhibitory concentration),对筛选出的 215 株 MDR 进行 PCR 扩增及序列分析检测这些菌株产 AmpC 和 ESBLs 的基因型。结果 大肠埃希菌对亚胺培南、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦显示较好的敏感性。健康成人和临床患者携带的 MDR 比例分别为 58.3% 和 74.6%。PCR 及序列分析表明本地区已出现 CMY-2、DHA-1 型 AmpC 酶和以 CTX-M 为主的 ESBLs,并检测到 1 株新 CMY 型基因和 1 株 ESACs 菌株。结论 健康人与患者肠道中病原大肠埃希菌对常用抗菌药物的耐药率相当高,在 MDR 中检测出多种 AmpC 和 ESBLs 基因。应严格控制抗菌药物使用并养成良好卫生习惯以减少耐药株出现。

【关键词】 大肠埃希菌;耐药性;人群

Investigation on the antibiotic resistance and mechanism of *Escherichia coli* isolated from different human of Hefei area YE Ying, LI Jia-bin. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: Li Jia-bin, Email: gao3ye2@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the difference of antibiotic susceptibility and multiresistant mechanism in *Escherichia coli* isolated from stool and clinical samples collected from the healthy human and patients. **Methods** The bacteria were identified by MicroScan-Walkway-40 system. Agar dilution method was used to determine MIC (minimal inhibitory concentration) of 14 antibiotics. AmpC and ESBLs genotypes were analyzed by PCR amplification and product sequencing. **Results** Imipenem/cilastatin, amikacin and piperacillin/tazobactam had good activity against *Escherichia coli*. The multiresistance rates of the healthy human and patients were 58.3% and 74.6%, respectively. PCR amplification and sequencing showed that blaCMY-2,

基金项目:安徽省卫生厅基金资助项目(05A037);安徽省自然科学基金项目(30571654)

作者单位:230022 合肥市,安徽医科大学第一附属医院感染病科

通讯作者:李家斌 Email: gao3ye2@yahoo.com.cn

blaDHA-1 and CTX-M ESBLs were detected. A new CMY genotype and one ESACs were detected. **Conclusions** Higher resistance rate were detected in healthy human and patients. AmpC and ESBLs gene were produced by multiresistant *Escherichia coli*. More judicious use of antibiotic and better health habit may decrease the incidence of resistant *Escherichia coli*.

【Key words】 *Escherichia coli*; Resistance; Human

大肠埃希菌是人和动物肠道中正常菌群的组成部分,几乎占粪便干重的 1/3,在一定条件下可引起肠道和肠道外组织或器官的感染。近年来,由大肠埃希菌尤其是多重耐药大肠埃希菌引起的感染明显增加,给临床治疗带来极大的困难。本研究测定了从不同人群分离的大肠埃希菌的耐药性,并检测了多重耐药大肠埃希菌携带 AmpC 基因和超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)基因的状况。

材料和方法

一、材料

1. 菌株来源:2005 年 10 ~ 11 月,收集在本院健康体检中心体检的成人粪便标本 120 份和合肥市区多所小学的学生(6 ~ 12 岁)粪便标本 209 份,均为 2 周内未使用过抗菌药物者。另收集同时期本院中正应用或在 2 周内使用过抗菌药物的住院患者各感染部位的大肠埃希菌 185 株。

2. 标准菌株:大肠埃希菌 ATCC25922 购自卫生部临床检验中心,高产 ACT-1 型质粒 AmpC 酶 *E. coli* DH5a 由浙江大学附属医院传染病科实验室惠赠。

3. 抗菌药物:氨苄西林、哌拉西林-他唑巴坦、头孢呋辛、头孢他啶、头孢曲松、头孢噻肟、头孢西丁、头孢吡肟、氨曲南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、左旋氧氟沙星、亚胺培南-西司他丁均购于中国生物制品检定所。

4. PCR 引物和仪器:多重 PCR 引物、CIT 型和 DHA 型质粒介导 AmpC 酶结构基因全编码引物序列见表 1,ESBLs 基因的多对通用引物序列见表 2,应用 Primer 5.0 检测引物的匹配性,由上海生物工程有限公司合成。PCR 仪和 32R 台式冰冻高速离心机为德国 Biometra 公司产品;凝胶成像系统为上海天能公司产品;多点接种仪为英国 AQS Manufacturing 公司产品;Micro-Walkway-40 微生物鉴定系统为 Dade MicroScan 公司产品。

二、方法

1. 细菌鉴定:应用 Micro-Walkway-40 微生物菌种鉴定系统鉴定。

2. 药物敏感试验:应用多点接种仪采用琼脂稀释法测定常用抗菌药物对大肠埃希菌的最低抑菌浓度(MIC),试验方法和判断标准均按 CLSI 2006 年标准。

3. AmpC β -内酰胺酶基因检测:(1)多重 PCR 试实:采用 6 对引物进行多重 PCR 扩增,模板的制备、反应体系及反应条件均参照文献进行^[1]。高产 ACT-1 型 *E. coli* DH5a 为阳性对照,蒸馏水代替模板作为空白对照。阳性菌株再经单一引

表1 AmpC 基因多重 PCR 引物和 CIT、DHA 型全编码基因的引物序列

引物名称	序列(5'-3')	扩增长度(bp)	核苷酸位置	参考菌株
MMOX-F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	358 ~ 378	D13304
MMOX-R	CACATTGACATAGGTGTGGTGCC		877 ~ 856	
MCIT-F	TGGCCAGAACTGACAGGCCAAA	462	478 ~ 498	X78117
MCIT-R	TTTCTCCTGAACCTGGCTGGC		939 ~ 919	
MDHA-F	AACCTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	1244 ~ 1256	Y16410
MDHA-R	CCGTACGCATACTGGCTTTTGC		1648 ~ 1628	
MACC-F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	861 ~ 881	AJ133121
MACC-R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		1206 ~ 1186	
MEBC-F	TCCGTAAGCCGATGTTGCCG	302	1115 ~ 1135	M37839
MEBC-R	CITCCACTGCGGCTGCCAGTT		1416 ~ 1396	
MFOX-F	AACATGGGCTATCAGGGAGATG	190	1475 ~ 1496	X77455
MFOX-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		1664 ~ 1644	
DHA-F	CACGGAAGGTTAATTCTGATG	1140	1631 ~ 1651	Y16410
DHA-R	TTATTCCAGTGCACCTCA		2772 ~ 2788	
CIT-F	AACACACTGATTGCGTCTGAC	1226	1861 ~ 1881	X78117
CIT-R	CTGGGCCTCATCGTCAGTTA		3086 ~ 3067	

表2 ESBLs 基因各型通用引物 PCR

引物名称	引物序列(5'-3')	长度(bp)	退火温度(℃)	产物类型
CTX-M-1	R ACAGCGATAACGTGGCGATG F TCACCCAATGCTTTACCCAG	197	52	CTX-M-1
CTX-M-2	R GAAATCAAGAAGAGCGACCTG F CAACGAGCGAGCAAACG	180	54	CTX-M-2
CTX-M-8	R TTTGCCCGTCCGATTGG F CGACTTTCTGCCTTCTGCTCT	368	51	CTX-M-8
CTX-M-9	R CTGCTTAATCAGCCTGTGCA F TCAGTCCGATCCAGACGAAA	211	52	CTX-M-9
TEM	R GCTATGTGCTGCGGTATT F CGCTCGTCGTTTGCTAT	309	54	TEM-type
SHV	R AAGCGAAAGCCAGCTGTCC F TTGGCTCCAGCTGTTGCTC	176	55	SHV-type
OXA-1	R TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT F TTCTTTGGCTTTTATGCTTG	409	52	OXA-1
OXA-2	R CGCTGTTGCTGATGAGTTCC F ATCGGCGTTGCCATAGTC	210	48	OXA-2
OXA-10	R ATGCTGTCTTCGTGCTTT F TCTTACTTCGCCAACTTCT	299	52	OXA-10

物分别进行 PCR, 产物经 1.5% 琼脂糖电泳分析; (2) AmpC 全编码基因测定: 根据多重 PCR 结果, 设计 DHA 型和 CIT 型全编码基因引物扩增, 50 μ l 反应体系包含模板 DNA 2 μ l; 10 \times 扩增缓冲液 5 μ l; 2.5 mmol/L dNTP4 μ l (0.2 mmol/L); 全长引物 5 μ l; 1.25 U 的 ExTaq DNA 聚合酶 0.25 μ l 和无菌水 33.75 μ l。PCR 条件: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 进行 30 次循环, 最后延伸 7 min。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分析; (3) 序列分析: 全编码基因 PCR 产物, 由大连宝生物公司纯化后采用 ABI PRISM377 测序仪进行

测序并进行 BLAST 程序分析。

4. ESBLs 基因多对通用引物 PCR 和序列分析: PCR 反应体系为 50 μ l, 包括 ExTaq 酶 0.25 μ l (1.25 U)、10 \times PCR Buffer 5 μ l、dNTP 4 μ l (0.2 mmol/L)、引物各 1 μ l、模板 20 ng, 加双蒸水至 50 μ l。SHV 型的扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保护。其余各类型的扩增条件除退火温度见表 2 外, 其它相同于 SHV 型的条件。蒸馏水代替模板作为空白对照, PCR 产物进行电泳分析。随机选取 ES-
BLs 基因的各型扩增产物 3 例, 由大连宝生物公司纯化后测序进行 BLAST 程序分析。

5. 统计学方法: 采用 SPSS 11.5 软件分析药敏数据。

结 果

一、大肠埃希菌临床分离情况

来源于泌尿道 94 株, 占 50.8%; 痰液 76 株, 占 41.1%; 宫颈分泌物 8 株; 伤口分泌物 5 株; 血液 2 株。185 例患者主要集中在以下两组: 50 岁以上有 86 人, 所占比例最大 (46.5%), 感染部位主要为呼吸道; 20~40 岁组有 69 人, 占 37.8%, 感染部位主要为泌尿道和生殖道。

二、不同人群来源的大肠埃希菌药敏及 χ^2 检验

将被检测者分为健康成人、健康儿童和患者 3 组, 测定的大肠埃希菌对常用抗菌药物的耐药情况见表 3。其中 R% 表示耐药率, S% 表示敏感率。 χ^2 检验比较 3 组耐药率, 所有抗菌药物 P 值均 < 0.01。对健康成人与儿童进行比较, 除亚胺培南外其他抗菌药物的 P 值均 < 0.05。

表 3 3 组不同人群分离的大肠埃希菌对 14 种抗菌药物的耐药性

	氨苄西林		哌拉西林/他唑巴坦		头孢呋辛		头孢噻肟		头孢曲松		头孢他啶		庆大霉素	
	R%	S%	R%	S%	R%	S%	R%	S%	R%	S%	R%	S%	R%	S%
健康成人组	91.7	8.3	13.3	86.7	70.8	29.2	51.7	48.3	41.7	58.3	20.8	79.2	75.8	24.2
健康儿童组	65.1	34.9	2.4	97.6	26.3	73.7	13.4	86.6	18.2	81.8	6.2	93.8	10.0	90.0
临床患者组	97.3	2.7	50.8	49.2	90.3	9.7	86.5	13.5	84.9	15.1	56.8	43.2	91.4	8.6

	头孢吡肟		头孢西丁		氨曲南		亚胺培南/西司他丁		庆大霉素		左旋氧氟沙星		阿米卡星	
	R%	S%	R%	S%	R%	S%	R%	S%	R%	S%	R%	S%	R%	S%
健康成人组	28.3	71.7	37.5	62.5	35.0	65.0	0	100	69.2	30.8	73.3	26.7	5.8	94.2
健康儿童组	11.0	89.0	12.9	87.1	13.3	86.7	0	100	18.2	81.8	8.6	91.4	10	99.0
临床患者组	65.9	34.1	71.4	28.6	76.8	23.2	4.9	95.1	77.8	22.2	87.0	13.0	44.3	55.7

三、不同人群分离的大肠埃希菌多重耐药率

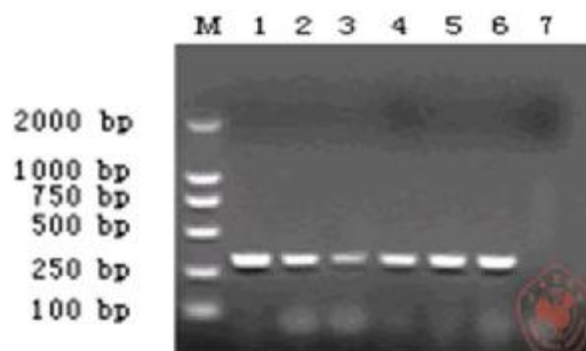
将同时对氨苄西林、庆大霉素和环丙沙星耐药的菌株定义为多重耐药菌 (MDR), 总检出率为 41.8% (215/514)。3 组人群携带的多重耐药菌检出率见表 4, 经比较, $\chi^2 = 222.24$, $P < 0.01$ 。

表4 不同人群携带的多重耐药大肠埃希菌检出率

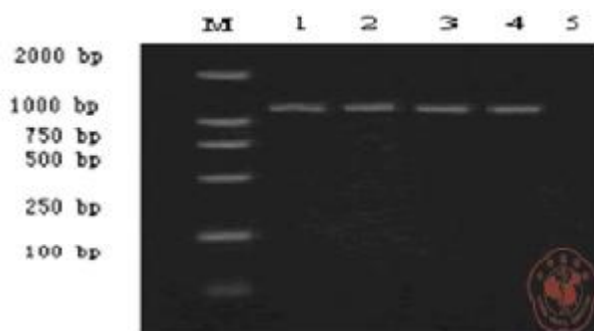
	多重耐药株数	检测总株数	多重耐药率
健康成人	70	120	58.3%
临床患者	138	185	74.6%
健康儿童	7	209	3.3%

四、AmpC 基因检测结果

提取215株MDR的质粒进行AmpC的多重PCR,共47株扩增出约400 bp的阳性条带,检出率为21.9%(47/215),多重PCR电泳见图1。经单一引物扩增,CIT型引物扩增出39株阳性,DHA型引物扩增出8株阳性,再经CIT和DHA型全编码基因扩增,CIT型引物扩增出11株阳性,DHA型引物扩增出3株阳性,部分全编码基因PCR电泳见图2。产物纯化测序结果为:3条DHA型序列长度为1150 bp、1090 bp、1089 bp;11条CIT型序列长度在1135 bp至1150 bp之间。经BLAST程序分析,证实3条DHA型序列与DHA-1型完全一致;10条CIT型序列与CMY-2型完全一致,1条1137 bp的核苷酸序列与CMY-2比对,出现27个碱基突变和10个氨基酸替换。此突变株来自临床患者,新基因已取得GenBank序列号EF054895。

**图1** 多重PCR产物电泳图

M: marker; 1~5 为阳性结果,6. 阳性对照; 7. 阴性对照

**图2** 部分携带CIT型AmpC基因株全编码PCR产物电泳图

M: DNA marker; 1~4 为阳性结果,5 为阴性对照

五、ESBLs 基因检测结果

提取的 MDR 质粒进行 ESBLs 基因各型的多对引物扩增,有 176 株扩增阳性,检出率为 81.9% (176/215)。CTX-M 型基因引物扩增出 91 株阳性,其中 64 株为 CTX-M-9 型阳性,27 株为 CTX-M-1 型阳性,CTX-M-2 型和 CTX-M-8 型未扩增出阳性条带。TEM 型基因的通用引物扩增出 134 株阳性。SHV 型基因的通用引物扩增出 63 株阳性。OXA-1 型基因的通用引物扩增出 7 株 400 bp 左右的阳性条带,OXA-2 和 OXA-10 型未出现阳性条带。部分 ESBLs 基因 PCR 产物电泳见图 3,随机选取各组阳性条带 3 例测序显示:CTX-M 型 3 例扩增片段与 GenBank 访问株(EF158298.1→CTX-M-1,EF416289.1→CTX-M-9)有 100% 的同源性,TEM 型片段均为 TEM-1,SHV 型片段均为 SHV-1,OXA-1 型片段与 GenBank 访问株亦完全一致。部分菌株同时产 CTX-M 和 TEM-1 和/或 SHV-1 广谱酶,并发现 1 株同时产 DHA-1 型 AmpC 和 CTX-M-9 型 ESBLs 的大肠埃希菌。

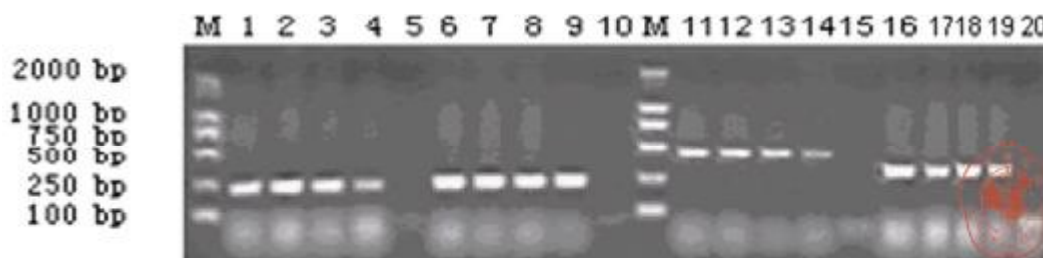


图 3 部分携带 CTX-M-1、CTX-M-9、OXA-1、TEM-1 型 ESBLs 基因 PCR 产物电泳图
M: DNA marker; 1 ~ 4 是 CTX-M-1 型阳性结果; 6 ~ 9 是 CTX-M-9 型阳性结果; 11 ~ 14 是 OXA-1 型阳性结果; 16 ~ 19 是 TEM-1 型阳性结果; 5、10、15、20 为空白对照

讨 论

大肠埃希菌是临床上最常见的一种病原菌,可引起人体多部位的感染。本次调查发现,大肠埃希菌的感染部位主要是泌尿生殖道和呼吸道。泌尿系统感染以大肠埃希菌为主已成共识,而目前在老年人呼吸系统感染中大肠埃希菌所占比重在逐渐增大^[2]。大肠埃希菌作为条件致病菌可使感染人群呈现某些特征。本研究显示,50 岁以上的老年人成为感染的高发人群,感染机率增大,主要是呼吸道感染。20 ~ 40 岁人群因婚育和劳累,机体抵抗力处于不稳定状态,易发生泌尿生殖道感染。大肠埃希菌也是人和动物肠道中正常菌群,在早期研究中就发现健康人群肠道大肠埃希菌对常用抗菌药物的耐药率高,近年来耐药率更呈上升趋势^[3]。

本文调查了 3 组人群即健康成人、健康儿童和患者携带的大肠埃希菌对临床上常用抗菌药物的耐药情况。从临床标本分离的 185 株大肠埃希菌的耐药情况显示,对大肠埃希菌敏感率较高的依次是亚胺培南(95.1%)、阿米卡星(55.7%)、哌拉西林/他唑巴坦(49.2%)、头孢他啶(43.2%)、头孢吡肟(34.1%),其它抗菌药物的敏感率均在 30% 以下。从健康儿童粪便中分离的大

肠埃希菌除对氨苄西林外的抗菌药物的敏感率均在70%以上,而从健康成人粪便中分离的大肠埃希菌对常用抗菌药物的耐药率相当高,尤其是对一些传统而目前仍在广泛使用的抗菌药物,如对氨苄西林的耐药率达91.7%,对喹诺酮类、庆大霉素和头孢呋辛的耐药率均在70%左右。经统计学分析,发现从健康成人、儿童粪便中分离的大肠埃希菌,与病原大肠埃希菌对抗菌药物的敏感性有明显区别,原因可能是住院患者正使用或反复使用广谱抗菌药物,与张小林等报道结果相同^[4],表明抗菌药物的选择压力是细菌耐药性上升的重要原因。健康成人肠道中分离的大肠埃希菌耐药性要比儿童肠道大肠埃希菌的耐药性高,这与国外报道不一致^[3],原因推测为:(1)我国成人使用抗菌药物的频率较高;(2)本研究中选择的孩子年龄较大,自身免疫力较强,使用抗菌药物的机会少。

MDR指细菌对3种以上不同类抗菌药物同时耐药^[5]。本文将同时对氨苄西林、庆大霉素和环丙沙星耐药的大肠埃希菌定义为MDR。调查显示健康成人与患者携带的MDR比例高达50%以上。大肠埃希菌出现多重耐药的主要机制是产生各种具有水解活性的 β -内酰胺酶,其中质粒介导的ESBLs和AmpC酶是大肠埃希菌产生的两种最重要的 β -内酰胺酶。同一个质粒上含有ESBLs和AmpC称为超广谱 β -内酰胺酶(ESACs),表现出对除碳青霉烯类以外的所有 β -内酰胺类耐药^[6]。本实验先用多重PCR方法进行AmpC筛选,再根据结果采用家族特异性引物进行全编码基因扩增,证实本地区已出现CMY-2型和DHA-1型质粒介导AmpC酶,CMY型检出率最高,这与国内外文献报道一致^[7,8]。进行ESBLs基因检测发现,阳性率高达81.9%,说明产ESBLs是大肠埃希菌产生多重耐药的重要机制。本地区ESBLs的主要类型为CTX-M,尤以CTX-M-9型为主。实验中发现一株同时产DHA-1型AmpC和CTX-M-9型ESBLs的大肠埃希菌,表型测定仅对亚胺培南敏感,表明已有产ESACs的MDR出现,向人类发起了新的挑战。另外,还有9株大肠埃希菌对亚胺培南耐药,说明细菌还可以通过其它机制如外膜孔蛋白缺失等出现对多种药物的耐药。本研究中发现的与CMY-2有97%同源性的新基因,表型也表现为对亚胺培南耐药,是基因突变导致酶活性改变,还是在产AmpC酶同时合并有外膜孔蛋白缺失,目前尚不清楚,其机制正在研究中。

本次调查发现健康人群肠道和病原大肠埃希菌耐药性强,MDR比例高,分析原因为:(1)抗菌药物的选择压力;(2)耐药质粒在肠道菌种之间传递;(3)摄入外源性耐药菌株。人通过不洁饮用水或食物摄入外源性耐药菌株,尤其是来自食用动物肠道的耐药性大肠埃希菌,可以通过食物链引起人体感染。出现MDR的大部分原因为产ESBLs和AmpC酶。实验中发现了产ESACs菌和AmpC新基因,说明不断有新的耐药机制产生。因此,减少抗菌药物的选择压力-即合理、慎用抗生素和养成良好卫生习惯是控制耐药菌包括MDR产生和传播的最根本措施。

参 考 文 献

- 1 Perez F, Nancy H. Detection of plasmid-mediate AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Mi-

- crobiol, 2002, 140: 2153-2162.
- 2 许吉生, 金法祥, 刘慧英, 等. 241例老年人肺部感染痰培养及药敏分析. 实用老年医学, 2007, 21: 64-65.
 - 3 张小林, 汪复. 健康人群肠道大肠埃希菌耐药状况. 国外医学流行病学与传染病学分册, 1996, 23: 79-81.
 - 4 张小林, 汪复. 抗菌药物对肠道大肠埃希菌耐药性的影响. 中华传染病杂志, 1998, 56: 52-53.
 - 5 戴自英. 多重耐药菌感染在临床上的重要意义. 中华传染病杂志, 1999, 17: 77-78.
 - 6 Hanson ND, Moland TS, Hossain A, et al. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-9, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamase. J Antimicrob Chemother, 2002, 49: 1011-1014.
 - 7 Philippon A, Arlt G, Jacoby GA, et al. Plasmid-determined AmpC type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 1-11.
 - 8 管希周, 刘又宁, 罗燕萍, 等. 新 CMY 型头孢菌素酶在大肠埃希菌中的流行. 中华医学杂志, 2004, 84: 1872-1875.

(收稿日期: 2007-02-29)

(本文编辑: 王丹静)

叶英, 李家斌. 不同人群中分离的大肠埃希菌的耐药性及多重耐药机制[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(2): 13-20.