

· 基础论著 ·

# 产 ESBLs 大肠埃希菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药性探讨

游春芳 黄永茂 张馨琢 邓敏 陈枫 钟利 陈庄

**【摘要】 目的** 了解本地产 ESBLs 大肠埃希菌对氨基糖苷类抗菌药物 (AGs) 的耐药情况,分析 ESBLs、AGs 耐药表型和氨基糖苷类修饰酶 (AMEs) 基因之间的相互关系。**方法** 对临床分离的 75 株大肠埃希菌用表型确证试验检测 ESBLs,用 K-B 纸片扩散法对 6 种 AGs 做药敏试验以及采用 PCR 技术检测 AMEs 基因。**结果** 临床分离的 75 株大肠埃希菌中共检出产 ESBLs 菌 37 株 (49.33%)。产 ESBLs 菌耐药情况:庆大霉素 (78.38%)、链霉素 (70.27%)、卡那霉素 (62.16%)、妥布霉素 (50.05%)、奈替米星 (18.92%)、阿米卡星 (10.81%)。与非产 ESBLs 菌株相比较,除奈替米星和阿米卡星外耐药性均有差异,且产 ESBLs 菌中耐多药模式明显 ( $P < 0.05$ )。产 ESBLs 菌携带 AMEs 基因结果:共检出 5 种基因,其中以  $aac(3)-II$  (64.86%) 和  $aac(6')-I$  (45.95%) 为主,未检出  $aac(6')-II$ 。除  $ant(2'')-I$  和  $aac(3)-I$  外,其余 3 种基因检出率高于非产 ESBLs 菌株,且 2 种基因携带率也明显高于非产 ESBLs 菌株 ( $P < 0.05$ )。产 ESBLs 菌株 AGs 耐药表型和修饰酶基因之间存在对应关系。**结论** ESBLs 的产生可使大肠埃希菌对 AGs 的耐药情况加重,提示 ESBLs 和 AGs 引起的耐药可能存在着一定的相关性。

**【关键词】** 大肠埃希菌;超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (ESBLs);氨基糖苷类修饰酶 (AMEs)

**Study on aminoglycosides resistance of extended spectrum  $\beta$ -lactamases-producing strains of *Escherichia coli*** YOU Chun-fang, HUANG Yong-mao, ZHANG Xin-zhuo, DENG Min, CHEN Feng, ZHONG Li, CHEN Zhuang. Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China  
Corresponding author: HUANG Yong-mao, Email: huang5616@sina.com

**【Abstract】 Objective** To study the resistance to aminoglycosides (AGs) in *Escherichia coli* which produce extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), and analyze the relationships among ESBLs, phenotypes of aminoglycosides resistance and aminoglycosides modifying enzymes (AMEs) genes. **Methods** The ESBLs-producing

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.03.004

基金项目:四川省重点学科重点建设项目资助(SZD0241)

作者单位:646000 泸州市,泸州医学院附属医院感染科、自贡市仁济医学中心

通讯作者:黄永茂,Email:huang5616@sina.com

strains were detected by confirmatory test from 75 strains *E. coli*; six kinds of AGs were detected by disk diffusion and the genotypes of AMEs were determined by PCR.

**Results** In 75 strains of *E. coli*, 37 (49.33%) ESBLs-producing strains were confirmed. The resistance to AGs in ESBLs-producing strains: gentamicin (78.38%), streptomycin (70.27%), kanamycin (62.16%), tobramycin (50.05%), netilmicin (18.92%), amikacin (10.81%). compared with non-ESBLs-producing strains, there were obvious differences in these aminoglycosides except netilmicin and amikacin and also in the modes of resistance to three and more kinds of AGs ( $P < 0.05$ ). Five kinds of AMEs genes were detected in ESBLs-producing strains and more were aac (3) - II (64.86%) and aac (6') - I (45.95%); aac (6') - II wasn't detected. Compared with non-ESBLs-producing strains, the positive rates were obviously different in aac (3) - II, aac (6') - I, ant (3'') - I and double genes' modes ( $P < 0.05$ ). There were correlations between aminoglycosides-resistant phenotypes and genes. **Conclusions** *E. coli* resistance to AGs became more serious because of ESBLs producing. There maybe some relationships between ESBLs and AGs in resistance of *E. coli*.

**【Key words】** *Escherichia coli*; Extended spectrum  $\beta$ -lactamases; Aminoglycosides modifying enzymes

大肠埃希菌是临床分离的革兰阴性杆菌中最常见的菌种,作为重要的条件致病菌广泛存在于自然界。超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)是能水解青霉素类、头孢菌素类以及单环类抗菌药物的一类酶<sup>[1]</sup>,可由质粒介导,通过接合转移引起耐药基因在细菌间的传播。因此,产 ESBLs 细菌易引起医院感染的暴发流行。氨基糖苷类抗菌药物是一种治疗革兰阴性菌(如大肠埃希菌)感染(尤其是医院感染)的重要抗菌药物,细菌对该类药物耐药主要是通过产氨基糖苷类修饰酶(AMEs), AMEs 按功能可分成氨基糖苷乙酰转移酶(AAC)、氨基糖苷磷酸转移酶(APH)、氨基糖苷核苷转移酶(ANT)三类。本研究收集了2007年7月至2008年7月本院临床分离的75株大肠埃希菌,通过ESBLs检测以及对氨基糖苷类抗菌药物耐药情况分析,了解本地区大肠埃希菌产ESBLs感染发生率,探讨产ESBLs细菌、AGs的耐药表型和修饰酶基因之间是否存在相关性,进而为临床合理选用抗菌药物提供理论依据。

## 材料和方法

### 一、实验材料

1. 实验菌株:75株大肠埃希菌临床分离株(不含同一病例相同部位的重复分离株)来自泸州医学院附属医院2007年7月至2008年7月期间大肠埃希菌感染的患者,全部菌株均重新经VITEK系统(BioMerieux,法国)鉴定确认。标准菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922(购自国家临床检验中心)。

2. 试剂:抗菌药物药敏纸片:链霉素(streptomycin, S)、卡那霉素(kanamy-

cin, K)、庆大霉素(gentamicin, G)、妥布霉素(tobramycin, T)、阿米卡星(amikacin, A)、奈替米星(netilmicin, N)、头孢他啶/克拉维酸(CDO<sub>2</sub>)、头孢噻肟/克拉维酸(CDO<sub>3</sub>)(均购自杭州天和微生物试剂有限公司)。

培养基:M-H 琼脂培养基、LB 培养基(均购自杭州天和微生物试剂有限公司);PCR 反应所需试剂:细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 引物序列(见表1)、PCR 扩增试剂盒、电泳琼脂糖及 Marker(均购自上海生工生物工程技术有限公司)。

表1 6种氨基糖苷类修饰酶基因引物序列

靶基因	引物序列	产物长度
aac(3)-I	P1:5'-ACCTACTCCCAACATCAGCC-3'	169 bp
aac(3)-II	P1:5'-ACTGTGATGGGATACGCGTC-3'	237 bp
aac(6')-I	P1:5'-TATGATGGCTAAATCGA-3'	394 bp
aac(6')-II	P1:5'-TTCATGTCCGCGAGCACCCC-3'	178 bp
ant(2'')-I	P1:5'-GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG-3'	320 bp
ant(3'')-I	P1:5'-TGATTGCTGGTTACGGTGAC-3'	284 bp

## 二、方法

1. ESBLs 表型确证试验:参照美国临床实验室标准委员会(NCCLS)推荐的纸片确证扩散法标准进行,采用头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸纸片检测,对两组中任何一个药物加与不加克拉维酸的抑菌圈直径差值 $\geq 5$  mm 时,可确证该菌株产 ESBLs<sup>[2]</sup>。

2. 药物敏感试验:采用 K-B 纸片扩散法测定 75 株大肠埃希菌对 6 种 AGs 的敏感性,药敏结果均按照 NCCLS 2008 年标准判定。

3. PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳:根据 aac(3)-I、aac(3)-II、aac(6')-I、aac(6')-II、ant(2'')-I、ant(3'')-I 的序列设计六对引物,采用细菌基因组 DNA 试剂盒提取大肠埃希菌 DNA 用于 PCR 反应模板。PCR 反应体系(25  $\mu$ l):2  $\times$  Taq PCR MasterMix 12.5  $\mu$ l [包括:0.1 U/ $\mu$ l Taq Polymerase,500 mmol/L dNTP,20 mmol/L Tris-Cl(pH 8.3),100 mmol/L KCl,3 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 等],上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l,DNA 模板 5  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 5.5  $\mu$ l。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环,然后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外线检测仪观察结果,基因测序。

## 三、统计学处理

数据采用 Excel 表格进行统计分析,率的比较采用 SPSS 14.0 软件进行  $\chi^2$  检验。

## 结 果

### 一、产 ESBLs 大肠埃希菌的检测结果

75 株大肠埃希菌经表型确证试验共检出产 ESBLs 细菌 37 株,检出率为

49.33% (37/75)。

## 二、产 ESBLs 细菌对氨基糖苷类抗菌药物的药敏情况

37 株产 ESBLs 细菌对 AGs 的耐药情况: G (78.38%)、S (70.27%)、K (62.16%)、T (50.05%)、N (18.92%)、A (10.81%); 与非产 ESBLs 菌株相比较, 在 6 种 AGs 中除 N 和 A 外耐药性均有差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。联合耐药模式中 GTK 较常见 (16.22%), 其次是 GS (13.51%), 最低的是 GK 和 GSTKA (2.70%); 与非产 ESBLs 细菌相比较, 仅在三种及以上耐药模式中差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 2 产 ESBLs 与非产 ESBLs 细菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药比较 [n (%)]

	链霉素	卡那霉素	妥布霉素	庆大霉素	奈替米星	阿米卡星
ESBLs (+)	26 (70.27)	23 (62.16)	20 (50.05)	29 (78.38)	7 (18.92)	4 (10.81)
ESBLs (-)	17 (44.74)	14 (36.84)	11 (28.95)	20 (52.63)	3 (7.89)	3 (7.89)
$\chi^2$	4.996	4.808	4.873	5.487	1.133	0.001
$P$	0.025 <sup>a</sup>	0.028 <sup>a</sup>	0.027 <sup>a</sup>	0.019 <sup>a</sup>	0.287	0.970

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  为差异具有统计学意义

表 3 产 ESBLs 与非产 ESBLs 细菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药模式比较 [n (%)]

	全敏感	单耐药	双耐药	三种耐药及以上
ESBLs (+)	3 (8.11)	4 (10.81)	8 (21.62)	22 (59.46)
ESBLs (-)	8 (21.05)	10 (26.32)	9 (23.68)	11 (28.95)
$\chi^2$	2.510	2.968	0.045	7.083
$P$	0.113	0.085	0.831	0.008 <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  为差异具有统计学意义

## 三、产 ESBLs 细菌携带氨基糖苷类抗菌药物修饰酶基因结果

37 株产 ESBLs 大肠埃希菌中各 AMEs 阳性检出率见表 4; 与非产 ESBLs 细菌株相比较, 除 aac (3)-I 和 ant (2'')-I 外, 其余基因的检出率比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在 37 株产 ESBLs 细菌中有 35 株 (94.59%) 携带有修饰酶基因, 其中有 19 株 (51.35%) 同时携带 2 个基因 [以 aac (3)-II + aac (6')-I 为主]; 且在产 ESBLs 细菌两基因携带率明显高于非产 ESBLs 细菌 ( $\chi^2 = 8.976$ ,  $P < 0.05$ )。

表 4 产 ESBLs 菌株与非产 ESBLs 菌株修饰酶基因阳性率比较 [n (%)]

	aac (3)-I	aac (3)-II	aac (6')-I	aac (6')-II	ant (2'')-I	ant (3'')-I
ESBLs (+)	2 (5.41)	24 (64.86)	17 (45.95)	0 (0.00)	4 (10.81)	11 (29.73)
ESBLs (-)	1 (2.63)	16 (42.11)	8 (21.05)	0 (0.00)	1 (2.63)	4 (10.53)
$\chi^2$	0.001	3.902	5.228		0.915	4.321
$P$	0.981	0.048 <sup>a</sup>	0.022 <sup>a</sup>		0.339	0.038 <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  为差异具有统计学意义



#### 四、产 ESBLs 细菌 AGs 耐药表型和修饰酶基因相互对应关系

耐药表型对应的修饰酶基因:S 型:ant(3'')-I (3/3);G 型:aac(3)-I + aac(3)-II (1/1);GTK 型:aac(6')-I (6/6) > aac(3)-II (2/6)。34 株(91.89%) AGs 耐药菌中有 1 株未检出修饰酶基因,3 株全敏感菌中 aac(3)-II 和 aac(6')-I 阳性菌株各有 1 株。修饰酶基因对应的耐药表型:aac(3)-II :G = S > T; aac(6')-I :G = K = T > S > N; ant(3'')-I :S > K; aac(3)-II + aac(6')-I :G = K = T > S > N > A。aac(3)-I 仅在耐 G 和 GS 的菌株中发现。在 2 株修饰酶基因阴性菌株中,分别是 SK 型和全敏感型。

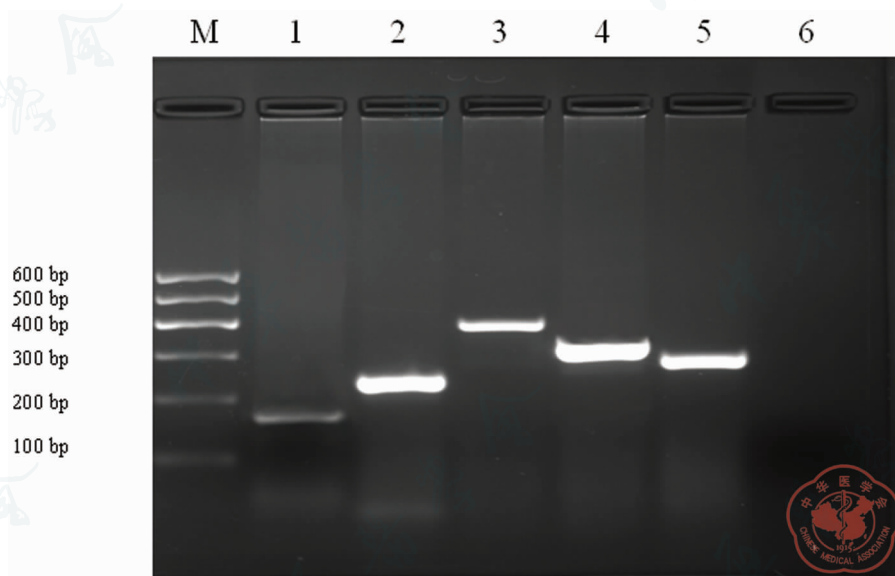


图1 PCR 电泳图谱

注:图中1、2、3、4、5 分别为 aac(3)-I、aac(3)-II、aac(6')-I、ant(2'')-I、ant(3'')-I 基因的扩增条带,分别长 169 bp、237 bp、394 bp、320 bp、284 bp;6 为蒸馏水阴性对照;M 为 DNA Maker,范围是 100 ~ 600 bp。

## 讨 论

大肠埃希菌是临床各种细菌感染的常见病原菌。目前大肠埃希菌产 ESBLs 引起的耐药问题已变得十分突出,ESBLs 通常由质粒所介导。本研究中大肠埃希菌 ESBLs 检出率为 49.33%,与文献报道基本一致<sup>[3-6]</sup>。大肠埃希菌对 AGs 的耐药机制主要包括:(1)药物作用靶位的改变;(2)细胞壁通透性改变或细胞内转运异常;(3)AMEs 的产生;(4)16 S rRNA 甲基化酶的产生。其中 AMEs 的产生是其主要的主要的耐药机制。

本地区产 ESBLs 大肠埃希菌对 AGs 的耐药结果是:G > S > K > T > N > A,这可能与 AGs 的使用频率和种类不同有关,以及大肠埃希菌耐药特性有关。产 ESBLs 与非产 ESBLs 菌株相比较,在 6 种 AGs 耐药结果中除 N、A 外均有差异性( $P < 0.05$ )。这可能与产 ESBLs 细菌的质粒在携带 ESBLs 基因的同时携带氨基糖苷类耐药基因有关<sup>[7]</sup>。而 A、N 耐药无差异可能是由于其对修饰酶更稳定,不

足以引起明显的差异。本实验有90%以上的产ESBLs细菌对AGs耐药,联合耐药模式中三种及以上的耐药模式明显多于非产ESBLs细菌( $P < 0.05$ ),提示ESBLs的产生可能会伴随多重耐药的出现,因此本地区临床医生在经验性选用AGs治疗产ESBLs大肠埃希菌引起的感染时要慎重。

在产ESBLs菌中各AMEs基因阳性检出率是: $aac(3)-II > aac(6')-I > ant(3'')-I > ant(2'')-I > aac(3)-I$ ,未检出 $aac(6')-II$ 。产与非产ESBLs菌株相比较,除 $aac(3)-I$ 和 $ant(2'')-I$ 外阳性基因的检出率差异有统计学意义,且两基因携带率也明显高于非产ESBLs细菌( $P < 0.05$ )。这可能与产ESBLs菌携带ESBLs基因的质粒同时含有一个或多个AMEs基因有关,带有酶基因的质粒可经接合转移方式在细菌间扩散和传递耐药基因。国内文献也有提示多数菌种特别是肠杆菌科细菌的酶基因位于质粒或转座子上,并常和ESBLs相关导致多重耐药<sup>[8]</sup>。Karisik等<sup>[9]</sup>在携带CTX-M-15的大肠埃希菌质粒上同时也发现有 $aac(6')-I$  b-cr、 $aac(3)-II$  a。Patterson<sup>[10]</sup>也在产CTX-M-15和OXA-1的大肠埃希菌中发现带有 $aac(6')-I$  b-cr-blaOXA-1的基因盒。在产与非产菌株中 $aac(3)-I$ 和 $ant(2'')-I$ 检出率无差异,可能与其本身检出率低有关。

耐药表型对应的AMEs基因:S型: $ant(3'')-I$ ;G型: $aac(3)-I + aac(3)-II$ 。这可能与不同的抗菌药物底物对应不同的修饰酶基因有关,其原因可能是一种抗菌药物分子结构中可能存在多个结合位点。AMEs基因对应的耐药表型提示一种基因型可对应多种耐药表型,其原因可能有以下三点:一是可能存在其他机制导致细菌对AGs耐药;二是细菌对AGs耐药的程度不仅与是否产生修饰酶有关,而且还与药物被修饰后是否还有抗菌活性有关;三是由于修饰酶基因常以沉默状态存在,细菌并不表现耐药,但在抗菌药物的选择压力下可使细菌迅速产生耐药。在全敏感菌株中发现 $aac(3)-II$ 和 $aac(6)-I$ 阳性,说明这两个基因可以沉默态存在而不表现出耐药。在AMEs基因阴性菌株中发现有SK型,提示S或K有其它耐药机制存在,有学者<sup>[11]</sup>发现菌株核糖体S12特定的突变(即87位赖氨酸→谷氨酸)可造成链霉素的耐药。

综上所述,本地细菌产ESBLs大肠埃希菌流行严重,ESBLs的产生可使大肠埃希菌对AGs的耐药情况加重,说明ESBLs和AGs引起的耐药可能存在着一定的相关性,但其具体原因很复杂,值得进一步探讨和研究。

## 参 考 文 献

- 1 Page MG. Extended-spectrum beta-lactamases: structure and kinetic mechanism. Clin Microbiol Infect, 2008, 14: 63-74.
- 2 d' Azevedo PA, Goncalves AL, Musskopf MI, et al. Laboratory tests in the detection of extended spectrum beta-lactamase production: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) screening test, the E-test, the double disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. Braz J Infect Dis, 2004, 8: 372-377.
- 3 Galas M, Decousser JW, Breton N, et al. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52: 786-789.

- 4 Ozgunes I, Erben N, Kiremitci A, et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in clinical isolates and risk factors. *Saudi Med J*, 2006, 27: 608-612.
- 5 王辉, 陈民钧, 倪语星, 等. 2003-2004 年中国十家教学医院革兰阴性杆菌的耐药分析. *中华检验医学杂志*, 2005, 28: 1295-1303.
- 6 赵晓丽, 胡大春, 周玲, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌的耐药表型及水平传播研究. *中国抗菌药物杂志*, 2008, 33: 55-57.
- 7 Manzur A, Tubau F, Pujol M, et al. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 2365-2369.
- 8 张卓然, 夏梦岩, 倪语星, 主编. 微生物耐药的基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 149-150.
- 9 Karisik E, Ellington MJ, Pike R, et al. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58: 665-668.
- 10 Patterson JE. Extended spectrum beta-lactamases: a therapeutic dilemma. *Pediatr Infect Dis J*, 2002, 21: 957-959.
- 11 Gill AE, Amyes SG. The contribution of a novel ribosomal S12 mutation to aminoglycoside resistance of *Escherichia coli* mutants. *J Chemother*, 2004, 16: 347-349.

(收稿日期: 2009-09-07)

(本文编辑: 孙荣华)

游春芳, 黄永茂, 张馨琢, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药性探讨[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2010, 4(3): 259-265.