

产 ESBLs 大肠埃希菌氨基糖苷类修饰酶基因的检测

黄永茂¹, 游春芳², 张馨琢¹, 邓 敏¹, 陈 枫¹, 钟 利¹, 陈 庄¹

(1 泸州医学院附属医院, 四川 泸州 646000; 2 自贡市第一人民医院, 四川 自贡 643000)

[摘要] **目的** 了解某地区产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌氨基糖苷类修饰酶(AMEs)基因存在状况及耐药情况。**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, K-B 纸片扩散法对 6 种氨基糖苷类抗生素做药敏试验, 并采用聚合酶链反应(PCR)检测 AMEs 基因。**结果** 75 株大肠埃希菌中共检出产 ESBLs 菌 37 株(49.33%)。产 ESBLs 菌对氨基糖苷类抗生素耐药率(包括中介株): 庆大霉素 78.38%, 链霉素 75.68%, 卡那霉素 67.57%, 妥布霉素 64.86%, 奈替米星 24.32%, 阿米卡星 13.51%; 共检出 5 种基因, 其中以 *aac* (3)-II (64.86%) 和 *aac* (6')-I (45.95%) 为主, 其次为 *ant* (3'')-I (29.73%)、*ant* (2'')-I (10.81%)、*aac* (3)-I (5.41%), 未检出 *aac* (6')-II; 除 *ant* (2'')-I 和 *aac* (3)-I 外, 其余 3 种基因检出率均高于非产 ESBLs 菌株, 且 2 个基因携带率也明显高于非产 ESBLs 菌株($P < 0.05$)。**结论** 该地区产 ESBLs 大肠埃希菌携带 AMEs 基因的比率较高, 对氨基糖苷类抗生素的耐药率亦高, 应加强监测与防控。

[关键词] 大肠埃希菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 氨基糖苷类修饰酶; 基因; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R378.2⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)04-0231-04

Detection of aminoglycoside-modifying enzyme genes in extended-spectrum β -lactamases-producing strains of *Escherichia coli*

HUANG Yong-mao¹, YOU Chun-fang², ZHANG Xin-zhuo¹, DENG Min¹, CHEN Feng¹, ZHONG Li¹, CHEN Zhuang¹ (1 The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2 The First People's Hospital of Zigong, Zigong 643000, China)

[Abstract] **Objective** To detect aminoglycoside-modifying enzyme (AMEs) genes and drug-resistance among extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) in an area. **Methods** ESBLs-producing strains were detected by confirmatory test in 75 strains of *E. coli*; the susceptibility of 75 strains to 6 kinds of aminoglycosides (AGs) were detected by disk agar diffusion method; and the genotypes of AMEs genes were detected by PCR. **Results** In 75 strains of *E. coli*, 37 (49.33%) ESBLs-producing strains were confirmed. The resistant rates to AGs in ESBLs-producing strains were as follows: gentamycin 78.38%, streptomycin 75.68%, kanamycin 67.57%, tobramycin 64.86%, netilmicin 24.32%, and amikacin 13.51%; Five kinds of AMEs genes were detected in ESBLs-producing strains and the main genes were *aac* (3)-II (64.86%) and *aac* (6')-I (45.95%); the next were *ant* (3'')-I (29.73%), *ant* (2'')-I (10.81%) and *aac* (3)-I (5.41%), *aac* (6')-II wasn't found. Except *ant* (2'')-I and *aac* (3)-I, the detection rates of the other 3 genes in ESBLs strains were higher than that of non-ESBLs strains, and the carrying rates of 2 kinds of gene were also higher than non-ESBLs strains ($P < 0.05$). **Conclusion** The carrying rates of AMEs in ESBLs-producing *E. coli* are high in this area, and resistant rates to AGs are also high, the monitor should be intensified.

[Key words] *Escherichia coli*; extended-spectrum β -lactamases; aminoglycoside-modifying enzymes; genes; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2010, 9(4): 231-234]

[收稿日期] 2009-12-15

[基金项目] 四川省重点学科建设项目资助(SZD0241)

[作者简介] 黄永茂(1965-), 男(汉族), 四川省梓潼县人, 副主任医师, 主要从事细菌性感染疾病研究。

[通讯作者] 黄永茂 E-mail: huang5616@sina.com

大肠埃希菌是临床分离的革兰阴性(G⁻)杆菌中最常见的菌种,它作为重要的条件致病菌广泛存在于自然界。超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)是能水解青霉素类、头孢菌素类以及单环类抗生素的一类酶^[1],它可由质粒介导,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。氨基糖苷类抗生素是一种治疗 G⁻ 菌(如大肠埃希菌)感染(尤其是医院感染)的重要抗生素,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)、氨基糖苷核糖转移酶(ANT)3 类。本研究收集了 2007 年 7 月—2008 年 7 月本院临床分离的 75 株大肠埃希菌,通过 ESBLs 的检测以及对 AMEs 基因的检测,了解本地区产 ESBLs 大肠埃希菌 AMEs 基因的存在状况,进而为临床合理选用抗菌药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验菌株:75 株大肠埃希菌临床株(不含同一患者相同部位重复分离株)分离自泸州医学院附属医院 2007 年 7 月—2008 年 7 月间非肠道大肠埃希菌感染患者,其中呼吸道感染 30 株,泌尿系统感染 19 株,外科切口感染 15 株,全身感染 8 株,其他感染 3 株。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。

1.2 试剂

1.2.1 药敏纸片 链霉素(STR)、庆大霉素(GEN)、卡那霉素(KAN)、妥布霉素(TOB)、阿米卡星(AMK)、奈替米星(NET)、头孢他啶/克拉维酸(CD₀₂)、头孢噻肟/克拉维酸(CD₀₃),购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2.2 培养基 M-H 琼脂培养基、LB 培养基,购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2.3 聚合酶链反应(PCR)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有限公司。

1.3 ESBLs 表型确证试验 参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的纸片确证扩散法进行 ESBLs 表型确证试验。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,

对两组中任何一种药物加与不加克拉维酸的抑菌圈直径差值≥5 mm 时,可确证该菌株产 ESBLs^[2]。

表 1 6 种氨基糖苷类修饰酶基因引物序列

Table 1 The primer sequences of 6 kinds of aminoglycoside-modifying enzyme genes

靶基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
<i>aac (3)- I</i>	P1: ACCTACTCCCAACATCAGCC	169
	P2: ATATAGATCTCACTACGCGC	
<i>aac (3)- II</i>	P1: ACTGTGATGGGATACGCGTC	237
	P2: CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	
<i>aac (6')- I</i>	P1: TATGATGGCTAAATCGA	394
	P2: CCCGCTTTCTCGTAGCA	
<i>aac (6')- II</i>	P1: TTCATGTCCGCGAGCACCCC	178
	P2: GACTCTCCGCCATCGCTCT	
<i>ant (2'')- I</i>	P1: GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG	320
	P2: CTGTTACAACGGACTGGCCGC	
<i>ant (3'')- I</i>	P1: TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	284
	P2: CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	

1.4 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法测定 75 株大肠埃希菌对 6 种抗生素的敏感性,结果均按照 CLSI 2008 年标准判定。

1.5 PCR 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 6 对引物,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取大肠埃希菌 DNA 用于 PCR 模板。PCR 体系(25 μL):2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL [包括:0.1 U/μL Taq Polymerase、500 mmol/L dNTPeach、20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl₂ 等],上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,DNA 模板 5 μL,ddH₂O 5.5 μL。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。扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外线检测仪观察结果,并送上海生工生物工程有限公司进行基因测序。

1.6 结果分析 文中的数据采用 Excel 表格进行统计分析,率的比较采用 SPSS12.0 软件进行 χ² 检验。

2 结果

2.1 产 ESBLs 大肠埃希菌的检出率 75 株大肠埃希菌经表型确证试验共检出产 ESBLs 株 37 株,检出率 49.33%。

2.2 产 ESBLs 菌对氨基糖苷类抗生素的药敏情况

见表 2。产 ESBLs 菌对庆大霉素耐药率(包括中介株)最高,为 78.38%,其次为链霉素 75.68%,卡那霉素 67.57%,妥布霉素 64.86%,奈替米星 24.32%,阿米卡星 13.51%。

表 2 37 株产 ESBLs 大肠埃希菌对氨基糖苷类抗生素的药敏情况(株,%)

Table 2 The resistant rates of 37 ESBLs-producing *E. coli* strains to aminoglycoside antibiotics (strain,%)

抗生素	R	I	S
STR	26(70.27)	2(5.41)	9(24.32)
KAN	23(62.16)	2(5.41)	12(32.43)
TOB	20(54.05)	4(10.81)	13(35.14)
GEN	29(78.38)	0(0.00)	8(21.62)
NET	7(18.92)	2(5.41)	28(75.67)
AMK	4(10.81)	1(2.70)	32(86.49)

R:耐药;I:中介;S:敏感

2.3 产 ESBLs 菌携带 AMEs 基因检测结果 见图 1 与图 2。

37 株产 ESBLs 大肠埃希菌中 AMEs 基因阳性检出率分别是:*aac* (3)- II 64.86%,*aac* (6')- I 45.95%,*ant* (3'')- I 29.73%,*ant* (2'')- I 10.81%,*aac* (3)- I 5.41%,*aac* (6')- II 0.00%, 详见表 3;与非产 ESBLs 菌株比较,除 *aac* (3)- I 和 *ant* (2'')- I 外,其余阳性基因的检出差异均有显著性($P < 0.05$)。在 37 株产 ESBLs 菌中,有 35 株(94.59%)携带有修饰酶基因,其中 19 株(51.35%)同时携带 2 个基因[以 *aac* (3)- II + *aac* (6')- I 为主];且产 ESBLs 菌 2 个基因携带率明显高于非产 ESBLs 菌($\chi^2 = 8.976, P < 0.05$)。

表 3 产 ESBLs 菌株与非产 ESBLs 菌株 AMEs 基因阳性率比较(株,%)

Table 3 Differences in positive rates of AMEs gene between ESBLs- and non-ESBLs-producing strains (strain,%)

AMEs 基因	ESBLs 阳性	ESBLs 阴性	χ^2	P
<i>aac</i> (3)- I	2(5.41)	1(2.63)	0.001	0.981
<i>aac</i> (3)- II	24(64.86)	16(42.11)	3.902	0.048
<i>aac</i> (6')- I	17(45.95)	8(21.05)	5.228	0.022
<i>aac</i> (6')- II	0(0.00)	0(0.00)	-	-
<i>ant</i> (2'')- I	4(10.81)	1(2.63)	0.915	0.339
<i>ant</i> (3'')- I	11(29.73)	4(10.53)	4.321	0.038

3 讨论

大肠埃希菌是临床各种感染性疾病的常见病原

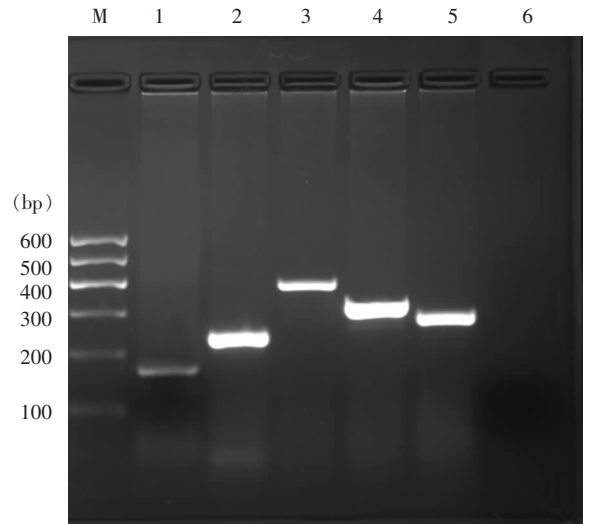


图 1 PCR 电泳图谱

Figure 1 Electrophoresis map of PCR

图中 1—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、237、394、320、284 bp;6 为蒸馏水阴性对照;M 为 DNA Marker,范围 100~600 bp

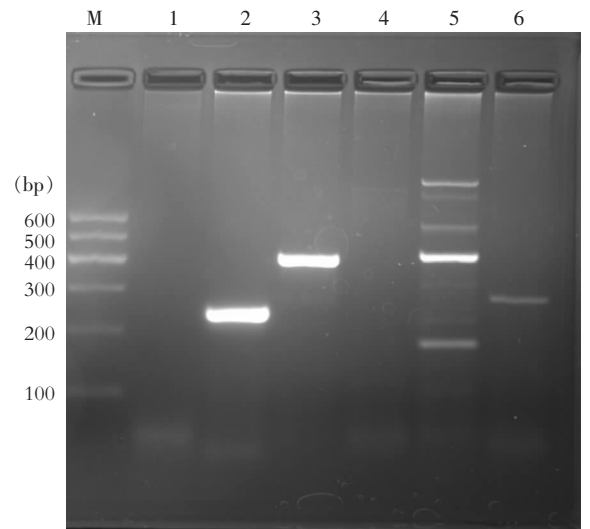


图 2 编号为 20060 菌株的 PCR 电泳图谱

Figure 2 Electrophoresis map of strain 20060

图中 1—6 分别为 *aac* (3)- I、*aac* (3)- II、*aac* (6')- I、*aac* (6')- II、*ant* (2'')- I、*ant* (3'')- I 基因的扩增结果,图示 *aac* (3)- II、*aac* (6')- I、*ant* (3'')- I 阳性;M 为 DNA Marker,范围 100~600 bp

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%,与文献所报道^[3-6]基本一致。大肠埃希菌对氨基糖苷类抗生素的耐药机制主要包括:(1)药物作用靶位的改变;

(2) 细胞膜通透性改变; (3) AMEs 的产生; (4) 16S rRNA 甲基化酶的产生; (5) 主动外排机制。其中 AMEs 的产生是其主要的耐药机制。

本地区产 ESBLs 大肠埃希菌对氨基糖苷类抗生素的耐药结果是: GEN > STR > KAN > TOB > NET > AMK, 这可能与氨基糖苷类抗生素的使用频率和种类不同, 以及大肠埃希菌的耐药特性有关。在产 ESBLs 菌中, 各 AMEs 基因阳性检出率, $aac(3)-II > aac(6')-I > ant(3'')-I > ant(2'')-I > aac(3)-I$, 未检出 $aac(6')-II$ 。产 ESBLs 与非产 ESBLs 菌株相比较, 除 $aac(3)-I$ 和 $ant(2'')-I$ 外, 其余阳性基因的检出率差异均有显著性 ($P < 0.05$), 且 2 个基因携带率也明显高于非产 ESBLs 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 相关联导致多重耐药^[7]。国外 Karisik 等^[8]在携带 CTX-M-15 的大肠埃希菌质粒上也同时发现有 $aac(6')-Ib-cr$ 、 $aac(3)-IIa$ 。葡萄牙学者也在产 CTX-M-15 和 OXA-1 的大肠埃希菌中发现带有 $aac(6')-Ib-cr-bla_{OXA-1}$ 的基因盒^[9]。在产 ESBLs 与非产 ESBLs 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。此外, 在部分产 ESBLs 菌株的 $ant(2'')-I$ 基因扩增时出现多个非目的条带(图 2), 该现象尚在进一步探讨中。

综上所述, 本地大肠埃希菌产 ESBLs 菌株流行严重, 说明 ESBLs 和氨基糖苷类抗生素的耐药可能存在着一定的相关性, 但就其具体原因, 值得进一步

探讨和研究。

[参考文献]

- [1] Page M G. Extended-spectrum beta-lactamases: structure and kinetic mechanism[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(Suppl 1): 63 - 74.
- [2] D'Azevedo P A, Goncalves A L, Musskopf M I, 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[J]. Braz J Infect Dis, 2004, 8(5): 372 - 377.
- [3] Galas M, Decousser J W, Breton N, et al. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in France[J]. Antimicrob Agents and Chemother, 2008, 52(2): 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[J]. Saudi Med J, 2006, 27(5): 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[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(12): 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[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(1): 55 - 57.
- [7] 张卓然, 夏梦岩, 倪语星. 微生物耐药的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 149 - 150.
- [8] Karisik E, Ellington M J, Pike R, et al. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 β -lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(3): 665 - 668.
- [9] Patterson J E. Extended spectrum beta-lactamases: a therapeutic dilemma[J]. Pediatr Infect Dis J, 2002, 21(10): 957 - 959.
- [10] Sellami A, Sellamia H, Makni F, et al. Candiduria in intensive care unit: significance and value of yeast numeration in urine[J]. Ann Fr Anesth Reanim, 2006, 25(6): 584 - 588.
- [11] 刘振宗, 周锦红. 老年患者 ESBLs 阳性肺炎克雷伯菌感染耐药性监测[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(3): 189 - 191.
- [12] 张芳, 李玉敏, 崔琴, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌的检出与耐药趋势分析[J]. 中国感染控制杂志, 2009, 8(3): 195 - 197.

(上接第 254 页)

- [7] Brown C V, Morales I R, Hadjizacharia P, et al. Evolving pathogens in the surgical intensive care unit: a 6-year experience [J]. J Crit Care, 2008, 23(4): 507 - 512.
- [8] Lizan-Garcia M, Peyro R, Cortina M, et al. Nosocomial infection surveillance in a surgical intensive care unit in Spain, 1996 - 2000: a time-trend analysis [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006, 27(1): 54 - 59.
- [9] Fridkin S K, Welbel S F, Weinstein R A. Magnitude and prevention of nosocomial infections in the intensive care unit [J].