

[文章编号] 1000-2200(2008)05-0605-04

· 检验医学 ·

产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌耐药表型和基因型分析吴祥林<sup>1,2</sup>, 沈继龙<sup>3</sup>, 徐元宏<sup>1</sup>

**[摘要]**目的:分析临床分离大肠埃希菌耐药性、产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)阳性率及耐药基因之间的关系。方法:用 K-B 法检测 117 株大肠埃希菌耐药性,用酶抑制剂增强实验纸片法检测产 ESBLs 菌株,用 PCR 法检测相关耐药基因,用 DNA 序列分析确认基因亚型。结果:117 株大肠埃希菌产 ESBLs 49 株,阳性率 41.9%。产 ESBLs 菌株对青霉素类和第一、第二代头孢菌素耐药率 100%,对第三代头孢菌素中头孢哌酮、头孢噻肟和头孢曲松耐药率 >95%,对酶抑制剂哌拉西林/三唑巴坦和头孢哌酮/舒巴坦耐药率 <20%,未检测到亚胺培南耐药株。非产 ESBLs 菌株耐药率明显低于产 ESBLs 菌株。49 株产 ESBLs 菌株 PCR 均扩增到 CTX-M 型耐药基因,44 株扩增到 TEM 型基因,未扩增到其他基因型。DNA 序列分析证实为 CTX-M-14 亚型、CTX-M-3 亚型和广谱酶 TEM-1 亚型基因。结论:大肠埃希菌产 ESBLs 较高,耐药显著;耐药基因以 CTX-M-14 亚型为主,其次为 CTX-M-3 亚型,尚未检出其他 ESBLs 基因。TEM-1 亚型广谱内酰胺酶基因在大肠埃希菌中普遍存在。

[关键词] 大肠埃希菌;超广谱  $\beta$ -内酰胺酶;耐药性;基因型

[中国图书资料分类法分类号] R 378.21 [文献标识码] A

Study on the antimicrobial resistance and genotypes of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolatesWU Xiang-lin<sup>1,2</sup>, SHEN Ji-long<sup>3</sup>, XU Yuan-hong<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory Diagnostics; 2. Department of Laboratory Medicine, Anhui Medical University, Hefei Anhui 230032  
3. Department of Medical Laboratory, Tongling People's Hospital, Tongling Anhui 244000, China)

**[Abstract]** Objective: To study the relationship between antibiotic resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases(ESBLs) genes in clinical isolates of *E. coli*. Methods: Antibiotic susceptibility was tested by Kirby-Bauer disk diffusion method and ESBLs production was detected by CLSI phenotypic confirmatory test in *E. coli* isolates. The  $\beta$ -lactamases genes were identified by PCR and sequencing. Results: Forty-nine of 117 strains collected were ESBLs-producing *E. coli* and all of them were resistant to ampicillin, piperacillin, cefazolin, cefuroxime. The resistance rates to cefotaxime, ceftriaxone, cefepodoxime, and cefoperazone were more than 95%, but only 41.8% to ceftazidime. The resistance rates to piperacillin-tazobactam and cefoperazone-sulbactam were 8.1% and 18.4%, respectively, to imipenem was 0.0%. ESBLs gene was found in all ESBLs-producing isolates, and CTX-M-14 genotype was dominated (87.8%). Conclusions: ESBLs-producing *E. coli* are prevalent in our hospital and most of them are multidrug resistant strains. CTX-M-14 is the main genotype of ESBLs, and the second is CTX-M-3 genotype. No other genotype of ESBLs was detected.

[Key words] *Escherichia coli*; extended-spectrum  $\beta$ -lactamases; drug resistance; genotype

大肠埃希菌是临床分离率最高的病原菌,而产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)导致多重耐药又给临床选择抗菌药物带来压力。由质粒介导的 ESBLs 基因可以使不同的国家和地区具有不同的流行特点,甚至各医院之间的流行基因模式不同。为了解大肠埃希菌产 ESBLs 基因型,我们对此进行了检测,并与耐药表型进行了分析,现予报道。

## 1 材料与方

## 1.1 菌株 来自安徽省铜陵市人民医院 2005 年

[收稿日期] 2007-11-03

[作者单位] 安徽医科大学 1. 临床检验诊断学教研室, 3. 医学检验系, 安徽合肥 230032; 2. 安徽省铜陵市人民医院 检验科, 244000

[作者简介] 吴祥林(1967-),男,副主任检验师。

[通讯作者] 沈继龙,男,研究生导师,教授。

1~12月临床分离的 117 株大肠埃希菌,排除了同一患者同一部位重复菌株。菌种鉴定采用 Vitek-32 型全自动微生物鉴定仪。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922,肺炎克雷伯 ATCC700603。

1.2 药敏纸片 氨苄西林、氨苄西林-舒巴坦、阿莫西林-克拉维酸、哌拉西林、哌拉西林/三唑巴坦、替卡西林/克拉维酸、头孢噻肟、头孢曲松、头孢哌酮、头孢哌酮-舒巴坦、头孢他啶、头孢泊肟、头孢吡肟、氨基曲南、亚胺培南、头孢西丁、复方磺胺甲噁唑等药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品。头孢唑林、头孢呋辛、庆大霉素、阿米卡星、氧氟沙星、环丙沙星为北京天坛药物鉴定所生物技术开发公司产品。

1.3 培养基和试剂 M-H 琼脂为法国生物梅里埃公司产品;质粒基因抽提纯化及聚合酶链反应(PCR)试剂盒为上海申能博彩生物科技有限责任公司产品,按试剂盒说明书操作。

1.4 主要仪器设备 Vitek-32 型全自动微生物鉴定仪,法国生物梅里埃公司产品;PE-5700 型基因扩增仪,美国应用生物技术公司产品。

1.5 药敏试验 采用纸片扩散法(K-B法),按 CLSI 2005 年版标准判断药敏试验结果,采用 WHONET 5.3 版软件统计分析。

1.6 ESBLs 检测 采用 CLSI 2005 年版标准,初筛试验:抑菌圈直径头孢泊肟 $\leq 17$  mm,头孢噻肟 $\leq 27$  mm,头孢曲松 $\leq 25$  mm,头孢他啶 $\leq 22$  mm,氨曲南 $\leq 27$  mm,判为 ESBLs 初筛阳性。确证试验:酶抑制剂增强试验纸片法,即头孢他啶与头孢噻肟两个药物中有任何一个,在加克拉维酸后,抑菌圈直径与不加克拉维酸相比,增大值 $\geq 5$  mm 时,即判定为产 ESBLs 菌株。

1.7 PCR 扩增 ESBLs 根据编码基因的同源性,分为 TEM 型、SHV 型、CTX-M 型、OXA 型和其他型 5 种,根据 GenBank 的各型 ESBLs 基因序列,用 Primer 5.0 软件分别设计 TEM 型、SHV 型、CTX-M 型、OXA 型特异性引物,其中 CTX-M 型 ESBLs 根据同源性<sup>[1]</sup>分成 4 组:CTX-M-2 组,包括 CTX-M-2、4、5、6、7、20、31 及 TOHO-1;CTX-M-3 组,包括 CTX-M-1、3、10、11、12、15、22、23、28、29、30、33;CTX-M-8 组,包括 CTX-M-8、25、26;CTX-M-9 组,包括 CTX-M-9、13、14、16、17、18、19、21、24、27 及 TOHO-2。OXA 型分为 OXA-2 组和 OXA-10 组。各型序列 PCR 引物见表 1。引物合成及 PCR 产物测序均由上海申能博彩生物科技有限公司完成。由于各型扩增片段长度接近,摸索统一 PCR 扩增条件为预变性 94 °C 5 min,变性 94 °C 30 s,退火 56 °C 45 s,复性 72 °C 1 min,共 33 个循环,最后延伸 72 °C 5 min。扩增时以大肠埃希菌 ATCC25922 为阴性对照,以各型标准产酶株为阳性对照。PCR 产物在含 0.5  $\mu\text{g/ml}$  EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,在紫外灯下观察结果,在凝胶成像系统上成像。

1.8 扩增片断序列检测 随机抽取 10 份 TEM 型、10 份 CTX-M-9 组、5 份 CTX-M-3 组阳性扩增产物送上海申能博彩生物科技有限公司进行纯化测序,测序结果用 BLAST (Nucleotide query-proteindb, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 进行网上序列相似性分析,以明确 ESBLs 基因型。

## 2 结果

2.1 产 ESBLs 菌株的检出率 117 株大肠埃希菌

中产 ESBLs 菌株 49 株,阳性率为 41.9%。

2.2 产 ESBLs 大肠埃希菌耐药情况 药敏结果显示,我院产 ESBLs 大肠埃希菌对青霉素类和第一、二代头孢菌素的耐药率为 100%;第三代头孢中,头孢噻肟、头孢曲松和头孢哌酮的耐药率也均在 95% 以上,仅头孢他啶耐药率为 41.8%;产 ESBLs 菌株对氟喹诺酮类和复方磺胺甲恶唑的耐药率也都在 75% 以上;对  $\beta$ -内酰胺类/酶抑制剂复方制剂如哌拉西林/三唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦的敏感性较好,耐药率在 20% 以下;头孢西丁的耐药率为 22.4%。而非产 ESBLs 菌株除对青霉素类药物的耐药率在 45.6% ~ 77.9% 外,对所有头孢菌素类药物的耐药率均在 16% 以下,对其它类抗菌药物的耐药率也均明显低于产 ESBLs 菌株。未发现有耐亚胺培南大肠埃希菌株(见表 2)。

表 1 ESBLs 各基因型 PCR 特异引物

引物	核苷酸序列	产物长度(bp)
SHV	F:5'-TGTTATCGCTTATATTCCGCC-3' R:5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT-3'	868
CTX-M-3	F:5'-TGTTGTTAGGAAGTGCCCGC-3' R:5'-TCGTTGCTGGTGCCATAGTC-3'	688
CTX-M-9	F:5'-ACCGTATTGGGAGTTTCAGATG-3' R:5'-GGTCGTAATTCCTTTGAGCC-3'	676
CTX-M-2	F:5'-CTCTACCGTGCCGATGAAC-3' R:5'-CCTTGCTGGTGCCATAATC-3'	559
CTX-M-8	F:5'-CCTGTATTTCGCTGTTGC-3' R:5'-GACTTTCGCTTCTGCTC-3'	783
TEM	F:5'-CAGAAACGCTGCTGAAAG-3' R:5'-AACTACGATACGGAGGG-3'	701
OXA-2	F:5'-ACGATGTTACGCAGCAGG-3' R:5'-CGAAGAATACGGAGCCAGT-3'	759
OXA-10	F:5'-CCGTCATGCTGCTTCG-3' R:5'-GCCACACCAGGATTTGAC-3'	533

2.3 PCR 检测结果 49 株产 ESBLs 大肠埃希菌中,酶基因型扩增结果见表 3。其中 TEM 型阳性 44 株(89.8%),CTX-M-9 组阳性 43 株(87.8%),CTX-M-3 组阳性 10 株(20.4%),CTX-M 型 49 株均为阳性(100%)。SHV-1 型、CTX-M-2 组、CTX-M-8 组、OXA-2 组和 OXA-10 组 PCR 扩增结果均为阴性。

2.4 基因测序结果 10 份 CTX-M-9 组阳性扩增产物测序结果经网上比对,确证均为 CTX-M-14 型;5 份 CTX-M-3 组确证为 CTX-M-3 型;而 10 份 TEM 型阳性扩增产物则均为 TEM-1 型,为广谱  $\beta$ -内酰胺酶。未检出其它型 ESBLs。

表 2 117 株大肠埃希菌药敏试验结果

抗菌药物	耐药率(%)	
	ESBLs + (n = 49)	ESBLs - (n = 68)
氨苄西林	100.0	77.9
氨苄西林/舒巴坦	81.6	29.4
阿莫西林/克拉维酸	55.1	13.2
哌拉西林	100.0	45.6
哌拉西林/三唑巴坦	8.1	1.5
替卡西林/克拉维酸	51.0	5.9
头孢唑林	100.0	16.1
头孢呋辛	100.0	4.4
头孢噻肟	98.0	0.0
头孢曲松	98.0	0.0
头孢哌酮	95.9	4.4
头孢哌酮/舒巴坦	18.4	1.5
头孢他啶	41.8	0.0
头孢泊肟	98.0	2.9
头孢吡肟	65.3	0.0
头孢西丁	22.4	8.2
氨基南	63.3	0.0
亚胺培南	0.0	0.0
庆大霉素	63.3	29.4
阿米卡星	10.2	6.1
氧氟沙星	75.5	25.0
环丙沙星	75.5	25.0
复方磺胺甲噁唑	83.7	42.6

表 3 产 ESBLs 大肠埃希菌 PCR 扩增结果

基因型	数量(株)	构成比(%)
CTX-M-3	1	2.0
CTX-M-9	4	8.2
CTX-M-3 + CTX-M-9 + TEM-1	4	8.2
CTX-M-3 + TEM-1	5	10.2
CTX-M-9 + TEM-1	35	71.4

### 3 讨论

ESBLs 耐药基因主要由质粒介导通过多种方式进行传播,检出率逐步增高,据报道 2005 年国内产 ESBLs 大肠埃希菌平均占 38.9%<sup>[2]</sup>,本研究为 41.9%。胡大春等<sup>[3]</sup>实验显示垂直传播途径的存在。ESBLs 除可水解青霉素类和第一、第二代头孢菌素外,还能水解第三、第四代头孢菌素以及单酰胺类抗生素。产 ESBLs 菌株常同时伴有对氨基苷类、喹诺酮类等抗菌药物的多重耐药基因。最近来自法国的报道显示有产 CTX-M-15 类 ESBLs 大肠埃希菌

存在<sup>[4]</sup>,国内徐元宏首次报道了产 CTX-M-15 类 ESBLs 大肠埃希菌<sup>[5]</sup>。ESBLs 主要分为 TEM、SHV、CTX-M 和 OXA 四类,分别作用于不同的底物;ESBLs 的基因型分布带有明显区域特征,甚至同一地区不同医院各不相同,导致耐药性各不相同<sup>[5-12]</sup>。本研究中,CTX-M 型 ESBLs 以 CTX-M-14 亚型为主(87.8%),其次为 CTX-M-3 亚型(20.4%),与蔡琰等<sup>[13]</sup>报道相一致。这一特点提示各小区域内抗菌药物使用习惯不同,可能是导致不同选择性耐药菌株强势出现的原因。

CTX-M 类 ESBLs 水解头孢噻肟和单酰胺类抗菌药物导致耐药,对头孢他啶水解力弱和  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂敏感。本研究 49 株产 ESBLs 大肠埃希菌中对头孢噻肟的耐药率为 98.0%,对抗菌药物氨曲南的耐药率为 63.3%,对头孢他啶的耐药率为 41.8%,对  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂哌拉西林/三唑巴坦和头孢哌酮/舒巴坦的耐药率分别为 8.1% 和 18.4%。说明 CTX-M 类 ESBLs 普遍存在,与其基因型阳性率相符合。

TEM-1 是广谱酶,出现较早,于 1963 年发现,水解各种青霉素和部分第一代头孢菌素,对第三代头孢菌素和  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂敏感,但若高度表达也会对酶抑制剂耐药。本院 49 株产 ESBLs 大肠埃希菌检出 44 株 TEM-1 广谱酶基因,说明其存在的普遍性。非 ESBLs 大肠埃希菌 68 株对氨苄西林耐药率 77.9%,对哌拉西林耐药率 45.6%,推测 TEM-1 广谱酶在非 ESBLs 大肠埃希菌也普遍存在。

SHV、TEM 类 ESBLs 介导对青霉素和一、二、三代头孢菌素以及单酰胺类耐药,可被  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂抑制,不水解碳青霉烯类和头霉素类抗菌药物。虽然本次实验只检测到 TEM-1 一类广谱酶基因和 CTX-M 一类 ESBLs 基因,未检测到 SHV、TEM、OXA 类 ESBLs 基因,但药敏结果显示对  $\beta$ -内酰胺类抗生素均有一定程度耐药,耐药率最低为头孢他啶 41.8%,对头孢西丁耐药率为 22.4%,是否存在其他类型  $\beta$ -内酰胺酶基因,如 AmpC 酶耐药基因,有待进一步研究。本组产 ESBLs 大肠埃希菌对喹诺酮类抗菌药物氧氟沙星、环丙沙星耐药率为 75.5%,而非产 ESBLs 大肠埃希菌耐药率为 25.0%,产 ESBLs 大肠埃希菌可能伴有 qnrA 等耐喹诺酮类抗菌药物基因存在。

本实验检测到 CTX-M 基因以 CTX-M-14 型为主,各菌株之间是否有同源性,是否有产 ESBLs 大肠埃希菌株的流行,有待进一步做分子生物流行病学

学研究。

CLSI 指出,对产 ESBLs 的菌株,不管其体外药敏试验结果如何,都应视为对所有头孢类抗菌药物耐药。可用于治疗的药物有碳青霉烯类、头霉素类、阿米卡星、氟喹诺酮类及  $\beta$ -内酰胺酶类/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方剂。本组资料显示,49 株产 ESBLs 大肠埃希菌对碳青霉烯类抗生素亚胺培南全部敏感,对头霉素类抗生素头孢西丁敏感率近 80%,对阿米卡星敏感率近 90%,对  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方剂哌拉西林/三唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦敏感率  $\geq$  80%,支持上述观点。临床经验用药可选亚胺培南、阿米卡星或哌拉西林/三唑巴坦。

大肠埃希菌产 ESBLs 菌株比例逐年升高。由于产 ESBLs 基因型流行区域的多样化和伴有其他耐药基因的复杂性,加强区域内 ESBLs 菌株耐药性和耐药基因检测分析,指导临床合理选择抗菌药物成为必然趋势。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, et al. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47 (12): 3 724 - 3 732.
- [2] 汪 复. 2005 中国 CHINET 细菌耐药性监测结果[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6(5): 289 - 295.
- [3] 胡大春, 邵剑春, 杨绍敏, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌院内垂直传播分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2006,

16(3):331 - 334.

- [4] Lavigne JP, Marchandin H, Delmas J, et al. qnrA in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from France [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(12): 4 224 - 4 228.
- [5] 徐元宏, 沈继录, 杨佰侠, 等. 蚌埠地区产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶菌株 CTX-M 型耐药基因的分布[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(1): 4 - 7.
- [6] 季淑娟, 顾怡明, 谭文涛, 等. 中国部分地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因型研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9): 590 - 593.
- [7] 杨自华, 刘碧元, 何 林, 等. 大肠埃希菌耐药性及其基因同源分析[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(6): 435 - 437.
- [8] 陈晓香, 王士旗, 杨占军. 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌的耐药性分析[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(5): 94 - 95.
- [9] 张苏明, 许 平, 朱莉莉, 等. 医院感染患者分离的大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌耐药趋势分析[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(2): 120 - 124.
- [10] Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, et al. Dissemination of CTX-M-Type-Lactamases among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(4): 1 249 - 1 255.
- [11] 詹贞芳, 刘旭忠, 谢必会, 等. 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌耐药性分析[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(1): 38 - 39.
- [12] 穆 雪, 陈升汶, 王沙燕, 等. 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌产 ESBLs 株的耐药性与基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6(5): 301 - 305.
- [13] 蔡 琰, 范新建, 吕晓菊, 等. 产 CTX-M 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌的分析[J]. 中国微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(2): 87.

[文章编号] 1000-2200(2008)05-0608-02

· 检验医学 ·

## 类风湿性关节炎患者 IL-17 和 淋巴细胞 CD45RO 表达的临床意义

谭有为<sup>1</sup>, 胡守锋<sup>2</sup>, 史兵伟<sup>3</sup>

[摘要] 目的: 检测类风湿性关节炎(RA)患者血中白细胞介素(IL-17)和 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞表达 CD45RO 抗原的水平, 探讨其在 RA 发病过程中的作用。方法: 采用 ELISA 和双色流式细胞技术分析 92 例 RA 患者血中 IL-17 水平和 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞表达 CD45RO 抗原阳性率。结果: IL-17 在 RA 患者血清中出现明显的升高 ( $P < 0.05$ ), 血浆中 CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>T 淋巴细胞阳性率也均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。结论: CD45RO<sup>+</sup>T 细胞参与了 RA 发病, 这些细胞在 RA 炎症部位大量聚集, 促使 IL-17 的大量分泌, 导致疾病的发生。

[关键词] 关节炎, 类风湿性; IL-17; CD45RO

[中国图书资料分类法分类号] R 593.22

[文献标识码] A

[收稿日期] 2008-06-01

[作者单位] 1. 安徽省亳州市中心血站, 236800; 2. 蚌埠医学院 病原生物学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 3. 江苏省常州市中医院, 213001

[作者简介] 谭有为(1964 -), 男, 主管技师。

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节的慢性炎症和骨质破坏为主的疾病, 病因尚不明, 但一般认为是感染后引起的自体免疫反应, 与众多细胞因子有关。白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)是具有广泛生物学功能的细胞因子, 它参