

# 澳门地区产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌基因型分析

林艳芳<sup>1,2</sup>, 江振友<sup>1\*</sup>, 陈琛<sup>1</sup>, 施珊珊<sup>1</sup>, 孙毅凡<sup>1</sup>, 吴莎<sup>1</sup>

(1.暨南大学医学院微生物学与免疫学系, 广东 广州 510632; 2.澳门理工学院高等卫生学校, 澳门)

**摘要:**【目的】了解澳门地区医院感染产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBL)大肠埃希菌的临床分布特点和基因型特征。【方法】收集 2007 年 12 月至 2008 年 2 月期间从澳门地区两家医院的临床患者中分离到的大肠埃希菌 158 株, 用表型确定试验确定产 ESBL 大肠埃希菌。应用 PCR 方法分别扩增产酶菌株的 CTX-M-3、CTX-M-9、TEM 和 SHV 等常见的  $\beta$ -内酰胺酶基因, 并结合临床分离菌株的分布特点对 PCR 扩增结果作进一步的分析。【结果】澳门地区临床分离的 158 株大肠埃希菌中, 有 54 株产 ESBL, 产酶率为 34.2%。PCR 扩增结果显示, 所有产酶菌株均携带 TEM 基因; 其中有 47 株(87%)同时携带 CTX-M-9、TEM 两个基因; 没有菌株携带 CTX-M-3 和 SHV 基因。产 ESBL 大肠埃希菌广泛分布于临床各科室, 其中普外科占 40.7%, 内科占 27.8%, 心脏科占 16.7%。标本分布较为集中, 尿液占 55.6%, 分泌物或脓液标本占 22.2%, 血液和呼吸道标本各占 11.1%。【结论】澳门地区医院感染中, 产 ESBL 大肠埃希菌在临床各科室分布广泛, 主要分离自尿液、分泌物或脓液标本; 所有菌株均携带 TEM 基因, 并有 87% 的菌株同时携带 CTX-M-9 基因。

**关键词:** 大肠埃希菌; 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶; 基因型

中图分类号: R516

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)02-0274-05

## Analysis on Molecular Epidemiological Investigation of Nosocomial ESBLs Producing *Escherichia coli* in Macau

LIN Yan-fang<sup>1,2</sup>, JIANG Zhen-you<sup>1\*</sup>, CHEN Chen<sup>1</sup>, SHI Shan-shan<sup>1</sup>, SUN Yi-fan<sup>1</sup>, WU Sha<sup>1</sup>

(1. Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632; 2. School of Health Sciences, Macao Polytechnic Institute, Macau)

**Abstract:** 【Objective】To understand the distribution and genotype of nosocomial extended spectrum beta lactamases (ESBL) producing *Escherichia coli* in Macau. To establish the epidemiological data of nosocomial ESBL producing *E.coli* in Macau. 【Methods】A total of 158 ESBL producing *Escherichia coli* were determined by phenotypic confirmatory test according to NCCLS standards. 3 common beta lactamase genes of CTX-M, TEM, and SHV in ESBL producing non-repeated isolates were amplified by PCR. To analyze the data of PCR product and the distribution in hospital. 【Results】Of all isolates, 100% was respectively found carrying TEM gene. In addition, 87% of all strains carrying more than one beta-lactamase gene. ESBL producing isolates were widely distributed over all of the clinical departments. Urine, discharge or pus, blood and sputum were common samples. 【Conclusion】The predominant genotype of nosocomial ESBL producing *Escherichia coli* in Macau was TEM (100%), 87% of all strains carrying CTX-M-9 gene. May be mutation, they carry another CTX-M-9 gene to have burden. It may be the relation of the exposition, ESBLs producing isolates mostly came from urine and discharge or pus, where they were widely prevalent in that hospital.

**Key words:** *Escherichia coli*; extended spectrum beta lactamases; genotype

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(2):274-278]

大肠埃希菌是临床分离的最常见的革兰阴性菌之一, 为当今临床上主要的致病菌。由于抗生素

不合理的使用超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended spectrum beta-lactamases, ESBL)的大肠埃希菌耐药

收稿日期: 2010-10-21

基金项目: 广东省科技计划项目(83057); 国家自然科学基金(30973693)

作者简介: 林艳芳, 硕士, 讲师, E-mail: cristlamim@hotmail.com; \* 通信作者, 江振友, 教授, E-mail: tjzhy@jnu.edu.cn

菌株也越来越多。

超广谱 $\beta$ -内酰胺酶是由质粒介导的耐药酶,能够水解广谱青霉、第3代头孢菌素及单环菌素的 $\beta$ -内酰胺酶,但对于头霉素、碳青霉烯类抗生素及酶抑制剂(如克拉维酸等)敏感。产ESBL的肠杆菌科的耐药问题是当前全球最重要的医院内耐药问题之一<sup>[1]</sup>。ESBL的基因型主要分为TEM型、SHV型、CTX-M型、OXA型及其它。有报道称<sup>[2]</sup>,欧洲各国产ESBL耐药菌的类型从以TEM、SHV型变为以CTX-M型为主,其中西班牙主要为CTX-M-9和CTX-M-14,加拿大卡尔加里主要为CTX-M-14型<sup>[3]</sup>。CTX-M型是我国产ESBL菌株的主要基因型,这与近年来我国临床上大量使用头孢噻肟和头孢曲松有关。

近年,世界各地的ESBL的检出率较高,美国ESBL的检出率为2%~13%,西班牙为28.8%,法国为19.0%<sup>[4]</sup>。由于澳门经济不断的发展,外来人口也逐渐上升,人的生活水平不断的提升,用在医疗的花费也不断提高。澳门地区产ESBL大肠埃希菌基因型分析研究未见报道。本研究旨在研究澳门地区感染产ESBL大肠埃希菌可能分子流行病学的数据,为临床治疗提供有意义的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集2007年12月至2008年2月期间澳门镜湖医院和山顶医院各类临床标本中分离到的大肠埃希菌(*E.coli*)不重复株158株,其中来自中段尿86株、分泌物或脓液36株、血液20株、痰10株、体液或组织4株、其它2株。所有菌株采用法国生物梅里埃公司VITEK-60全自动细菌鉴定仪鉴定到种;质控菌株为大肠埃希菌ATCC 25922。

### 1.2 主要试剂

引物、6x Sucrose DNA Loading Buffer I、DNA Marker C为上海生工生物工程公司产品;GN I+生化鉴定卡为法国生物梅里埃公司产品;PCR试剂盒为加拿大Bio Basic Inc产品;药敏纸片为英国Oxoid产品;EtBr溶液为美国Promega产品;10×TBE buffer为美国应用生物系统公司产品。

### 1.3 主要仪器

PCR仪(GeneAmp 9700,美国应用生物系统公司),分光光度仪(ND-1000 美国NanoDrop),去离

子水系统(NANOpure Diamond 1193, Barnstead/Thermolyne),全自动细菌鉴定仪(Vitek-60,法国生物梅里埃公司)。

### 1.4 试验方法

1.4.1 药敏试验 所有操作均参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的纸片扩散法(K-B法)进行,将待测菌液用涂布方式接种M-H平板,贴上抗生素纸片,经37℃培养18~24h,测定抑菌圈的直径,判断标准依据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)2008年版的药敏参考指引,利用查表方式,对照大肠杆菌对每种药敏纸片的抑菌圈的大小记录敏感率(S)、中介率(I)和耐药率(R)的结果。

1.4.2 ESBL确定试验 采用美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)2003年推荐的酶抑制剂增强双纸片扩散法。先将待测菌落用4.5 g/L消毒的盐水,配成0.5 McFarland(比浊计为红色的区域)菌液,用涂布的方式,涂满90 mm,4 mm厚的MH平板,取头孢他啶(CAZ30  $\mu$ g)、头孢噻肟(CTX 30  $\mu$ g)、头孢他啶/克拉维酸(CD02, 30/10  $\mu$ g)、头孢噻肟/克拉维酸(CD03, 30/10  $\mu$ g),35℃孵育18~24h,测抑菌环直径;单药纸片(CAZ、CTX)和与其相应的纸片(CD02、CD03)中任何一对的抑菌环直径之差 $\geq 5$  mm,即可确认该菌株为ESBL产生株。以大肠埃希菌ATCC 25922和CTX-M阳性大肠埃希菌为质控菌株(图1)。

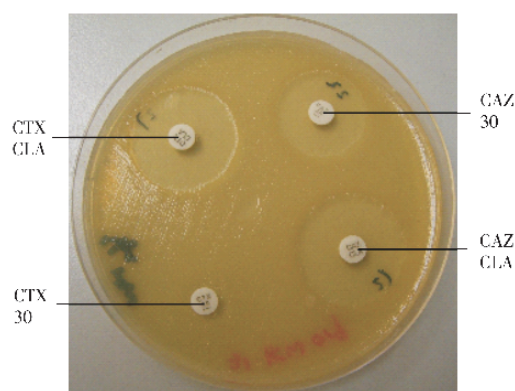


图1 ESBL确诊试验,酶抑制剂增强纸片扩散法结果:大肠埃希菌

Fig.1 ESBL confirmatory test, the result of enzyme inhibitors enhanced disk diffusion method; *Escherichia coli*

1.4.3 细菌质粒DNA的提取 采用传统碱裂解法的原理提取细菌质粒。用美国NanoDrop ND-

1000 分光光度仪及其所配的软件 ND-1000 V3.5.2 直接测定 1 μL 的 plamid DNA 的浓度;所有萃取出来的 plasmid DNA 的浓度均在 10 ~ 40 ng/μL 之间,可确认萃取成功;每批均设阳性及阴性对照,大肠埃希菌 ATCC 25922 和 CTX-M 阳性大肠埃希菌为质控菌株。

1.4.4 PCR 扩增 引物序列见表 1。根据参考文献[5],PCR 反应体系:25 μL 的 PCR 反应体系中含有 10 ~ 50 ng/μL 的 DNA 模板 1 μL,符合试剂的

浓度;2 × PCR Master mix 12.5 μL (内含 MgCl<sub>2</sub> 3.0 mmol/L、dNTP 0.2 mmol、Taq DNA 聚合酶 0.1 U/μL);1 μL 相应引物各 25 pmol/L;9.5 μL 的 sterilized ddH<sub>2</sub>O;PCR 反应的退火温度:CTX-M 基因 2 组反应均为 55 ℃,TEM 基因为 49 ℃,SHV 基因为 59 ℃;延伸时间为 60 s,循环 35 次。扩增后的 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖,加入 0.01 g/L 溴化乙锭染色,与 DNA marker C 同时作凝胶电泳(100 V,60 min);再用凝胶成像仪观察结果并照相。

表 1 超广谱 β-内酰胺酶基因引物序列  
Table 1 Primers of extended spectrum β-lactamase gene

| Gene    | Primers                                 | Amplification length(bp) | Annealing temperature(℃) |
|---------|-----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| CTX-M-9 | 5'-GAG AGT GCA ACG GAT GAT GT-3'        | 849                      | 55                       |
|         | 5'-GAT GAT TCT CGC CGC TGA AG-3'        |                          |                          |
| CTX-M-3 | 5'-CCG TTT CCG CTA TTA CAA ACC GTT G-3' | 1 046                    | 55                       |
|         | 5'-GGC CCA TGG TTA AAA AAT CAC TGC C-3' |                          |                          |
| TEM     | 5'-TGC GGT ATT ATC CCG TGT TG-3'        | 297                      | 49                       |
|         | 5'-TCG TCG TTT GGT ATG GCT TC-3'        |                          |                          |
| SHV     | 5'-TCT CCC TGT TAG CCA CCC TG-3'        | 574                      | 59                       |
|         | 5'-CCA CTG CAG CAG CTG CCG TT-3'        |                          |                          |

2 实验结果

2.1 科室分布

54 株产 ESBL 大肠埃希菌主要分布于:普通外科占 40.7%,内科占 27.8%,心脏科占 16.7%,重症监护病房(ICU)占 5.6%,癌症科占 5.6%及儿科占 3.7%。

2.2 标本分布

检出产 ESBL 大肠埃希菌最多的标本为尿液 55.6%,22.2% 来自分泌物或脓液标本,血液及呼吸道标本均为 11.1%。

2.3 PCR 结果

凝胶成像仪观察结果如图 2 ~ 图 5 所示。结果显示:54 株产 ESBL 菌株中共有 47 株(87 %)携带 CTX-M-9 基因,54 株(100%) 携带 TEM 基因,而 54 株中没有携带 CTX-M-3 也没有携带 SHV 基因,见表 2。同一菌株携带多基因情况:由于本次所测出来的所有菌株均带有 TEM 基因,导致一菌株多基因的情况很多,即有的株同时带有 CTX-M-9 及 TEM 基因。其实很多地区均有相类似的情形发生。

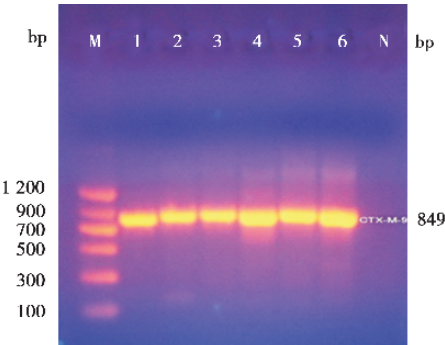


图 2 CTX-M-9 扩增产物电泳结果

Fig.2 CTX-M-9 primer PCR amplification product in agarose gel electrophoresis result

lane M:DNA marker C;lane 1:sample 49;lane 2:sample 50; lane 3:sample 51;lane 4:sample 52;lane 5:sample 53;lane 6:sample 54;lane N:Negative control

3 讨 论

近几年来有关于我国 ESBL 的检出率报道则显示了更高的比例,甚至可达 50%或更高比例<sup>[6]</sup>。澳门地区分离出院内感染产 ESBL 大肠埃希菌检出率徘徊在 30% ~ 40% 之间,且呈逐年上升的趋

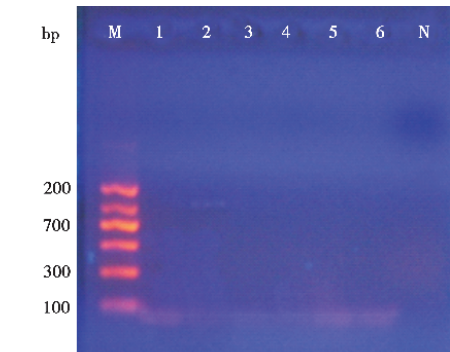


图 3 CTX-M-3 扩增产物电泳结果

Fig.3 CTX-M-3 primer PCR amplification product in agarose gel electrophoresis result

lane M: DNA marker C; lane 1: Sample 9; lane 2: Sample 31; lane 3: Sample 49; lane 4: Sample 51; lane 5: Sample 53; lane 6: Sample 54; lane N: Negative control

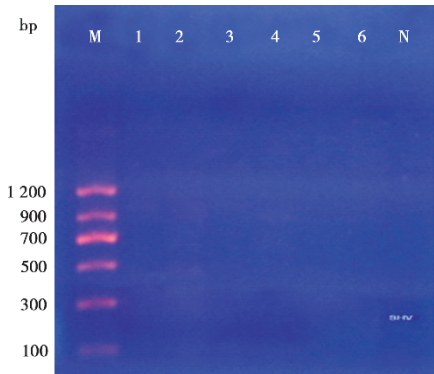


图 5 SHV 扩增产物电泳结果

Fig.5 SHV primer PCR amplification product in agarose gel electrophoresis result

lane M: DNA marker C; lane 1: Sample 9; lane 2: Sample 31; lane 3: Sample 49; lane 4: Sample 51; lane 5: Sample 53; lane 6: Sample 54; lane N: Negative control

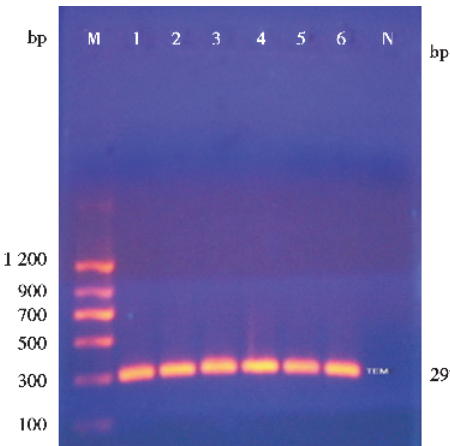


图 4 TEM 扩增产物电泳结果

Fig.4 TEM primer PCR amplification product in agarose gel electrophoresis result

lane M: DNA marker C; lane 1: Sample 49; lane 2: Sample 50; lane 3: Sample 51; lane 4: Sample 52; lane 5: Sample 53; lane 6: Sample 54; lane N: Negative control

表 2 54 株产 ESBLs 菌株 CTX-M、TEM、SHV 基因检测结果  
Table 2 The results of 54 strains producing ESBLs CTX-M, TEM, and SHV gene

| Gene          | Number of strains | Positive rate (%) |
|---------------|-------------------|-------------------|
| CTX-M-9       | 47                | 87                |
| CTX-M3        | 0                 | 0                 |
| TEM           | 54                | 100               |
| SHV           | 0                 | 0                 |
| CTX-M-9 + TEM | 47                | 87                |

势,分别为 28%,26%和 43%<sup>[7]</sup>。抗生素的滥用导致耐药菌株的不断出现,由于澳门医院的规模不大,故科室的分类也没有很细致,检出产 ESBL 大肠埃希菌最多的标本为尿液(55.6%),而最多的科室为普外科(40.7%),这可能跟导尿与手术前预防性用抗生素等因素有关,而且感染是外科常见的并发症。

本研究的分型结果显示,澳门产 ESBL 菌株 100%携带 TEM 基因,87%携带 CTX-M-9 基因。这表明被调查医院流行的主要基因型为 TEM。这与管希周等报道<sup>[8]</sup>的 96.3%产 ESBL 大肠埃希菌单

独携带 TEM 基因不用。而与张阮章等<sup>[9]</sup>报道的深圳市人民医院的 92.1%的产 ESBL 大肠埃希菌携带 CTX-M 基因不同。TEM 基因一般在英国和美国多见,而我国大陆则以 CTX-M 型为主<sup>[10-12]</sup>。ESBL 菌株的分离率有差异,可能与不同地区、不同医院使用第 3 代头孢菌素的种类、数量及时间不同从而造成对 ESBL 的筛选及诱导不同有关。已知大部分 ESBL 基因定位于宿主菌的质粒的 DNA 序列中,使得质粒对于介导 ESBL 基因在不同种属或同种属 G-的转移中发挥着主导作用,因此不同地区基因型的差异也可能与不同质粒参与介导 ESBLs 基因的转移有关。

产 ESBL 大肠埃希菌一般只携带一种 ESBL,近来有文献报道同时携带两种或两种以上的 ESBL。在我们的研究中,54 株细菌中有 47 株携带两种 ESBL。这非常值得我们探讨,因为单 TEM 基因就可以以点突变形成产 ESBL,为什么还要导入 CTX-M-9 基因,令细菌的代谢有更大的负担呢?可

能由于它们所暴露的环境,即澳门地区临床上的用药习惯,多与多重用药有关。而多个 ESBL 基因是否位于同一个质粒上还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Oxacelay C, Ergani A, Naas T, et al. Rapid detection of CTX-M-producing Enterobacteriaceae in urine samples [J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(5): 986-989.
- [2] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(2): 165-174.
- [3] Pitout JD, Church DL, Gregson DB, et al. Molecular epidemiology of CTX-M-producing Escherichia coli in the Calgary Health Region: emergence of CTX-M-15-producing isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1281-1286.
- [4] Spellberg B, Guidos R, Gildert D, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(2): 155-161.
- [5] 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): 3724-3732.
- [6] 李万华, 秦惠宏, 张泓, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌儿童分离株的耐药性和基因型检测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5): 355-359.
- [7] Ehlers MM, Veldsman C, Makgohlho EP, et al. Detection of blaSHV, blaTEM and laCTX-M antibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens from the Steve Biko Academic Hospital [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009, 56(3): 191-196.
- [8] 管希周, 刘又宁, 王睿, 等. 临床 ESBLs 细菌耐药性及其基因分型的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(6): 468-472.
- [9] 张阮章, 王沙燕, 陈升汶, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌基因型分析 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(2): 175-176.
- [10] 孙景勇, 倪语星. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的基因分型 [J]. 中国抗感染化疗杂志, 2002, 2: 211-214.
- [11] 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.
- [12] 季淑娟, 陈亚岗. 浙江省产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的基因分型 [J]. 中华传染病杂志, 2005, 23: 75-78.

(编辑 徐杰)

(上接第 268 页 from page 268)

- Rare Dis, 2008, 3: 3.
- [15] Wuyts W, Van Hul W. Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the EXT1 and EXT2 genes [J]. Hum Mutat, 2000, 15(3): 220-227.
- [16] Xu L, Xia J, Jiang H, et al. Mutation analysis of hereditary multiple exostoses in the Chinese [J]. Hum Genet, 1999, 105(1/2): 45-50.
- [17] McCormick C, Leduc Y, Diane Martindale, et al. The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate [J]. Nat Genet, 1998, 19(2): 158-161.
- [18] Ng SB, Buckingham KJ, Choli Lee, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder [J]. Nat Genet, 2010, 42(1): 30-35.

(编辑 刘清海)