

三株黏液型大肠埃希菌的耐药性测定及耐药基因分析

张妍琴¹, 姚 迪², 王邵琚¹

(1. 邵阳市中医院 检验科, 湖南 邵阳 422000; 2. 邵东县人民医院 检验科)

摘要: **目的** 分析研究三株临床分离得到的黏液型大肠埃希菌的耐药性。 **方法** 对实验菌株进行临床常用 22 种抗生素药物敏感试验。用 PCR 对其耐药基因 TEM-1、IMP、OXA-23、OXA-24、AmpC、aac(3)-I、aac(6')-I、ant(3'')-I、aph(3')、armA、rmtA、rmtB、Int-I、Int-II 进行扩增以及序列分析。 **结果** 药敏试验为产 ESBL 对 β -内酰胺类药物耐药, 对其它类药物无明显共同耐药性; 耐药基因分析结果显示实验菌株均呈 TEM-1 阳性, 其他阴性。

结论 三株实验菌株与一般常见的产 ESBL 的大肠埃希菌无明显差别。

关键词: 黏液型大肠埃希菌; 耐药性; 耐药基因

中图分类号: R446

文献标识码: A

文章编号: 2095-1116(2011)06-0681-04

Resistance Gene Analysis and Antibiotic Resistance Test of Three Mucoid Escherichia Coli Strains

ZHAN Yan-qin, YAO Di, WANG Shao-jun

(Department of Laboratory, Shaoyang Traditional Chinese Medicine Hospital,
Shaoyang, Hunan 422000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the antibiotic resistance of three mucoid Escherichia coli (E. coli) from clinic.

Methods Test the drug sensitive of the three mucoid E. coli with 22 normal drugs in clinical. Use PCR technology to analyze the resistance genes such as TEM-1, IMP, OXA-23, OXA-24, AmpC, aac(3)-I, aac(6')-I, ant(3'')-I, aph(3'), armA, rmtA, rmtB, Int-I, Int-II. **Results** Drug sensitivity test shows they all have produced beta-lactamase (ESBLs) which is resistant to β -lactamase drug, but have no significant resistance in common to other drugs. Resistance gene analysis shows all the experimental strains are positive in TEM-1, and negative in other resistance gene. **Conclusion** Three experimental strains and the common products ESBLs resistant to β -lactamase of E. coli. have no obvious difference.

Key words: mucoid Escherichia coli; antibiotic resistance; resistance gene

大肠埃希菌, 通称大肠杆菌, 是构成肠道正常菌群的组成部分。随着检测手段的不断发展, 人们逐渐认识到某些型大肠杆菌也能够引起腹泻^[1]和食物中毒^[2]以及感染等。大肠埃希菌是肠道中革兰阴性杆菌的主要成员, 常引起各种肠道内外的感染, 是腹泻和泌尿道感染的主要病原菌。由于细菌变异性的存在, 在临床细菌学检查工作中, 经常会遇到一些不典型的细菌。有文献报道黏液型铜绿假单胞菌与非黏液型铜绿假单胞菌耐药性存在差异^[3]。本文旨在对大肠埃希菌中三株少见的黏液型菌株的耐

药性及其耐药基因进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

本次实验的三株细菌: 编号 N1、N2、N3。2009 年 12 月~2010 年 12 月分离自邵阳市中医院肿瘤内科一 80 岁男性病人的血液标本, 中医内科一 61 岁男性病人的血液标本, 泌尿外科一 42 岁女性病人的尿液标本。另取大肠埃希菌标准株 ATCC25922

作对照。耐药基因 TEM-1(genbank 号 EU977570) , 含核酸染料的 1.5% 琼脂糖凝胶。

1.2 实验试剂

北京天根生化科技有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司 PCR 试剂 Taq PCR MarsterMix, Pfu PCR MarsterMix, DNA Marker I。北京鼎国生物技术有限公司的 EB 替代品染料。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 实验仪器

美国都灵公司生产的 Microscan W/A 96 全自动微生物鉴定及药敏系统,德国 Biometra 公司生产的 PCR 扩增仪,ABI PRISM 3730 全自动测序仪,美国伯乐公司生产的凝胶成像仪。

1.4 实验方法

于 Microscan W/A 96 全自动微生物鉴定及药敏系统上按操作规程操作。

1.5 PCR 检测部分耐药基因

参照试剂说明书提取细菌 DNA。引物设计:分别从 Genbank 获取 β 一内酰胺酶基因 TEM-1、IMP、OXA-23、OXA-24、AmpC,氨基糖苷类修饰酶基因 aac(3)-I、aac(6′)-I、ant(3′′)-I、aph(3′),整合子 Int- I、Int- II 以及 16S rRNA 甲基化基因 armA、rmtA、rmtB 序列,然后进行引物设计。序列均由上

海生工生物技术有限公司合成,引物的特性见表 1。

PCR 反应体系:Taq PCR MarsterMix,为北京天根生化科技有限公司产品。参考试剂说明书,扩增反应总体积为 20 μL,其中 2 × PCR MarsterMix 10 μL,模板 DNA(约 2 mmol/L) 1 μL,上游引物(10 μmol/L) 1 μL,下游引物(10 μmol/L) 1 μL, ddH₂O 7 μL。离心混匀后置 PCR 仪上进行自动化扩增反应,引物序列与循环参数见表 1。

PCR 反应条件:TEM-1、IMP:94℃ 预变性 5 min, 94℃60 s,55℃60 s,72℃50 s;OXA-23、OXA-24:94℃ 预变性 5 min,94℃30 s,48℃30 s,72℃35 s;AmpC: 94℃ 预变性 5 min,94℃30 s,50℃30 s,72℃ 50 s ; aac(3)-I、aac(6′)-I、ant(3′′)-I、rmtA:94℃ 预变性 5 min,94℃30 s,55℃30 s,72℃30 s;armA:94℃ 预变性 5 min,94℃30 s,47℃30 s,72℃35 s;rmtB:94℃ 预变性 5 min,94℃30 s,55℃30 s,72℃60 s;aph(3′): 93℃ 预变性 2 min,93℃20 s,55℃30 s,72℃30 s。Int- I、Int- II:94℃ 预变性 5 min,94℃30 s,55℃30 s,72℃60 s;94℃ 预变性 5 min,94℃30 s,53℃30 s,72℃60 s;以上反应经 30 次循环后,72℃延伸 7 min。以 DNA marker 1 为相对分子质量标准,取 5 μL 扩增产物点样于含核酸染料的 1.5% 琼脂糖凝胶,150V 电泳 20 min 后用凝胶成像仪观察结果。

表 1 引物序列和反应条件

扩增基因		引物序列(5′-3′)	产物长度(bp)	退火温度(℃)	参考文献
TEM-1	sense	TTCGTGTCGCCCTTATTC	512	55	本研究
	anti	ACGCTCGTCGTTTGGTAT			
IMP	sense	CTACCGCAGCAGAGCTTTTG	587	55	[4]
	anti	AACCAGTTTTGCCTTACCAT			
OXA-23	sense	TGTCATAGTATTCGTCGTT	453	48	本研究
	anti	TTCCCAAGCGGTAAG			
OXA-24	sense	TTTGCCGATGACCTT	175	48	本研究
	anti	TAGCTTGCTCCACCC			
AmpC	sense	CGACAGCAGGTGGAT	510	50	本研究
	anti	GGTTAAGGTTGGCATG			
aac(3)-I	sense	ACCTACTCCCAACATCAGCC	169	55	[5]
	anti	ATATAGATCTCACTACGCGC			
aac(6′)-I	sense	TATGAGTGGCTAAATCGA	394	55	[5]
	anti	CCCGCCTTCTCGTAGCA			
ant(3′′)-I	sense	TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	284	55	[5]
	anti	CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG			
armA	sense	GGGCTCTTACTATTCTG	503	47	[5]
	anti	TTCCCTTCTCCTTTTC			
rmtA	sense	CCTAGCGTCCATCCTTTCCTC	315	55	[6]
	anti	AGCGATATCCAACACACGATGG			
rmtB	sense	ATGAACATCAACGATGCCCTC	756	55	[6]
	anti	TTATCCATTCTTTTTATCAAGTATAT			
aph(3′)	sense	ATACAGAGACCACCATACAGT	234	55	[6]
	anti	GGACAATCAATAATAGCAAT			
Int- I	sense	GCACCGCCAACCTTTC	433	53	[6]
	anti	CCTTGATGTTACCCGAGA			
Int- II	sense	GCAAACGAGTGACGAAA	627	53	[6]
	anti	AGCCATAAACACGCAGA			

2 结 果

2.1 药敏测定结果 (MIC)

三株实验菌株均产 ESBL,对 β -内酰胺类药物

表现出共同的耐药性,对其他种类抗生素耐药性各不相同(表2)。

2.2 耐药基因 PCR 测定结果(图1)

在对上述耐药基因的考察中三株实验菌株对 TEM-1 基因 PCR 均呈阳性,其他呈阴性。此结果与

表 2 实验菌株对 22 种临床常用药物的耐药性测定 MIC (mg/L)

	SAM	AK	AMP	AMC	ATM	CRO	CAZ	KF	CTX	KZ	CIP	FEP
N1	>16/8	≤16	>16	≤8/4	≤8	>32	4	>16	>32	>16	>2	>16
N2	>16/8	≤16	>16	≤8/4	≤8	>32	≤2	>16	>32	>16	≤1	≤8
N3	>16/8	≤16	>16	>16/8	16	>32	4	>16	>32	>16	>2	>16
	CXM	GAT	CN	IPM	LEV	TZP	PRL	TE	TIM	TOB		
N1	>16	>4	>8	≤4	>4	≤16	>64	≤4	≤16	>8		
N2	>16	≤32	≤1	≤4	≤2	≤16	≤16	≤16	≤16	≤1		
N3	>16	>4	2	≤4	>4	≤16	>64	≤4	≤16	2		

注:SAM:氨苄西林/舒巴坦;AK:阿米卡星;AMP:氨苄西林;AMC:阿莫西林/棒酸;ATM:氨曲南;CRO:头孢曲松;CAZ:头孢他定;KF:头孢噻吩;CTX:头孢噻肟;KZ:头孢唑肟;CIP:环丙沙星;FEP:头孢吡肟;CXM:头孢呋新;GAT:加替沙星;CN:庆大霉素;IPM:亚胺培南;LEV:左旋氧氟沙星;TZP:哌拉西林/他唑巴坦;PRL:哌拉西林;TE:四环素;TIM:替卡西林/棒酸;TOB:妥布霉素;MIC:最小的抑菌浓度。“MIC”数值越小则说明该药对该细菌越有效。“>”表示耐药;“≤”表示敏感;没有符号的表示中介。以 SAM 为例解释 16/8 的意思:SAM 是复合药氨苄西林/舒巴坦,16 表示氨苄西林的浓度,8 表示舒巴坦的浓度

三株实验菌株对 β -内酰胺酶类药物均表现耐药的
结果符合。为确定所得 PCR 产物是否为 TEM-1,以
细菌基因 DNA 为模板,参考试剂说明书,扩增反应
总体积为 50 μ L,其中 2 $\times$ Pfu PCR MasterMix25 μ L,
模板 DNA (约 2 mmol/L) 2.5 μ L,上游引物 (10
 μ mol/L) 2.5 μ L,下游引物 (10 μ mol/L) 2.5 μ L,
ddH₂O 10.5 μ L。离心混匀后置 PCR 仪上以上述条
件再次进行自动化扩增反应。

得到 PCR 产物后,取 3 μ L 得到的 PCR 产物直
接点样于核酸染料的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。150V
电泳 20 min 后用凝胶成像仪进行观察并分析。将
得到的 PCR 产物送上海生工生物技术有限公司测
序部,在 ABI PRISM 3730 全自动测序仪测序。本实
验得到的 TEM-1 序列与 TEM-1 (genbank 号
EU977570)两者的 BLAST 比对结果相符,以此确定
得到的是 TEM-1 基因。

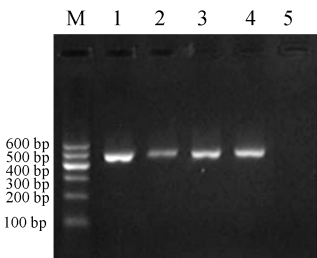


图 1 TEM-1 基因 PCR 产物电泳结果

M:Marker;1:N1;2:N2;3:N3;4:阳性对照;5:阴性对照

3 讨 论

由于细菌变异性的存在,在临床工作中,会碰到
一些形态、生化反应都不典型的细菌。随着抗生素
的广泛应用,耐药菌株越来越多,耐药性也越来越复
杂。为了更好地指导临床用药,体外药敏试验的准
确性尤其重要。从表 2 可知三株实验菌株对青霉素
类、头孢菌素类的三代、四代、单环 β -内酰胺类的
部分抗菌药物有一定的敏感率。根据 CLSI2009 年
规定,对于产 ESBL 大肠埃希菌,即使体外试验敏
感,也应报告耐药。三株实验菌株中只有 N2 对喹
诺酮类药物敏感,其余两株均耐药;三株实验菌株中
只有 N2 对常用的氨基糖苷类药敏感,其余两株对
该类药的敏感性各不相同。这些差异可能与收集标
本的对象所属群体、病人的抗生素使用情况等的不同有关;据相关报道,肠杆菌科的细菌对 β 内酰胺
酶抑制剂的复合制剂耐药率居高不下,但本实验结
果显示三株菌只对 SAM 耐药,对 AMC、TIM、TZP 敏
感,虽然它们具有相似的抗菌谱,且有交叉耐药和交
叉敏感,但还是可以根据药敏的精确结果选择用药;
三株实验菌株对四环素共同敏感,这可能与近年来
临床上很少用此药有关系;三株菌株对碳青霉烯类
抗菌药均敏感,因此目前碳青霉烯类抗菌药物是治
疗产 ESBL 菌感染的首选药。由于碳青霉烯类抗菌
药物的广泛应用,其耐药菌株已逐渐产生,崩守刚

等^[7]已检出耐碳青霉烯类抗菌药的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌,应引起足够重视。

近年来大肠埃希菌中产 ESBL 的检出率逐年升高,有些地区已接近 50%,某些病区甚至高于 50%^[8]。在如此高的 ESBL 检出率下,只有三株实验菌株全为产 ESBL 也不足为奇,不过耐药基因 PCR 分析结果显示在所测试的一系列耐药基因中仅有 TEM-1 基因呈阳性,这与三株菌株对 β -内酰胺类药物共同耐药相符。TEM-1 基因是否与三株实验菌株黏液型的表型有所关联还尚待研究。药物敏感实验除了三株实验菌株均产 ESBL 对 β -内酰胺类药物表现出共同耐药性对其他类药物并未显示出明显的共同耐药性。如不考虑三株实验菌株共同的 TEM-1 阳性则其药物敏感性也与一般常见的产 ESBL 的大肠埃希菌无明显差别。

参考文献:

- [1] Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007, 102(7): 839-844.
- [2] 张群, 赵巍. 一起致病性大肠杆菌所致食物中毒

的调查报告[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(7): 635.

- [3] 吴会玲, 田德英, 陈安群. *mucA* 基因突变的黏液型铜绿假单胞菌 PA17 与 PD0300 生物被膜形态观察和耐药性比较[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 15(5): 572-575.
- [4] K Senda, Y Arakawa, S Ichiyama, et al. Department of Bacteriology, Nagoya University School of Medicine, Japan. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(12): 2909-2913.
- [5] 陈琳, 蔡挺, 张顺, 等. 鲍曼不动杆菌氨基糖苷类修饰酶和 I 类整合酶基因研究[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(1): 34-36.
- [6] 史俊艳, 张小江, 徐英春. 2007 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(3): 196-200.
- [7] 蒯守刚, 邵海枫, 王卫萍, 等. 肺炎克雷伯菌介导碳青霉烯类耐药的基因型检测[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(5): 358-361.
- [8] 黄纯英, 肖建宁. 大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶感染情况调查[J]. 临床合理用药, 2010, 3(1): 97-98.

(此文编辑 蒋湘莲)