

# 137株多耐药大肠埃希菌表型及耐药机制研究

王会中 沙杭 陈倩 郭燕菊 祝丙华 王韶辉 高德禄

**【摘要】** 目的 探讨临床分离的多耐药大肠埃希菌对常用抗生素的敏感性及其耐药机制。方法 采用琼脂稀释法对北京市城区3家三甲医院近3年从各种临床标本分离的大肠埃希菌进行药敏试验,收集对头孢噻肟、环丙沙星和阿米卡星同时耐药的多耐药菌株;采用PCR和测序方法检测上述多耐药菌株对 $\beta$ -内酰胺类、喹诺酮类和氨基糖苷类的耐药基因,并对菌株进行系统发生分型;使用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析菌株同源性;通过接合试验观察耐药质粒的传递性。结果 共检出137株多耐药大肠埃希菌。其中分离自尿液的比例最高(41.61%);除对亚胺培南和美罗培南耐药率(均为1%)较低外,对哌拉西林/他唑巴坦的耐药率也较低(4%);85%的多耐药大肠埃希菌产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBL),且多为CTX-M型;介导菌株对喹诺酮类药物耐药的主要原因是药物靶位突变;导致菌株对阿米卡星耐药的机制主要是产生16S rRNA甲基化酶(Arma或RmtB)。结论 临床分离多耐药大肠埃希菌主要来自尿液标本;除碳青霉烯类,酶抑制剂抗生素可能也是治疗该类菌株引起感染的有效药物。

**【关键词】** 大肠埃希菌;多耐药;耐药机制

**Study on phenotypic and genotypic characterization of clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates** WANG Hui-zhong<sup>1</sup>, SHA Hang<sup>2</sup>, CHEN Qian<sup>1</sup>, GUO Yan-ju<sup>1</sup>, ZHU Bing-hua<sup>3</sup>, WANG Shao-hui<sup>3</sup>, GAO De-lu<sup>1</sup>. 1 Department of Laboratory Medicine, 2 Department of Respiratory, 3 Department of Hospital Infection Control, The 305th Hospital of PLA, Beijing 100017, China  
Corresponding author: SHA Hang, Email: shahang5835@hotmail.com

**【Abstract】** **Objective** To study the mechanisms on drug susceptibility and resistance of clinically multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates, to provide information on related treatment. **Methods** The susceptibility of *E. coli* strains that isolated from different kinds of samples in the last 3 years on drugs was analyzed by agar dilution test, with strains that exhibiting resistances to cefotaxime, ciprofloxacin and amikacin simultaneously collected for further analysis. Resistant genes which mediate resistance to  $\beta$ -lactamases, fluoroquinolone and aminoglycoside as well as phylogenetic type were detected by PCR amplification while genetic relation was analyzed by PFGE. Transferability of resistant plasmids was identified by conjugation test. **Results** In total, 137 multidrug-resistant *E. coli* isolates were collected. Only 1% of the isolates exhibited resistance to both imipenem and meropenem while 4% of the strains were resistant to piperacillin/tazobactam. Most (85%) of the isolates were positive to ESBL and majority of them produced CTX-M. Target substitution and production of methylases were the main mechanisms causing resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides respectively. **Conclusion** The main source of clinical multidrug-resistance was collected from urine samples. Carbapenem and enzyme inhibitor-containing antibiotics seemed to be the available antibiotics that were sensitive to the clinically multidrug-resistant *E. coli* isolates.

**【Key words】** *Escherichia coli*; Multidrug-resistance; Resistance mechanism

目前我国临床多耐药(MDR)菌株的检出率逐渐增加<sup>[1]</sup>。国际上通行的MDR定义则是指细菌具有同时对三类以上抗生素耐药的表型<sup>[2,3]</sup>。表明一旦MDR菌株出现,细菌将多种耐药机制整合在一起并同时发挥耐药作用。例如对头孢菌素、氟喹诺酮

药物和氨基糖苷类药物同时耐药的MDR菌株如获得对碳青霉烯类药物的耐药性后,将会成为对目前使用的抗生素均耐药的泛耐药细菌<sup>[4]</sup>,给临床抗感染治疗甚至医疗安全带来巨大威胁。因此,对临床分离MDR菌株进行流行病学和耐药机制方面的研究,可为预防此类菌引起的感染提供帮助。本研究选择北京市3家三级甲等医院近三年来从临床标本分离出的137株大肠埃希菌(均为同时对头孢噻肟、环丙

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.12.018

作者单位:100017 北京,解放军第三〇五医院检验科(王会中、陈倩、郭燕菊、高德禄),呼吸科(沙杭),感染控制科(祝丙华、王韶辉)  
通信作者:沙杭, Email: shahang5835@hotmail.com

沙星和阿米卡星耐药的MDR菌株)进行药物敏感性测定,并检测菌株携带常见耐药基因以及耐药质粒的传递情况,分析菌株间的遗传关系。

### 材料与方法

1. 实验菌株:均来自北京市城区3家三级甲等医院近3年从临床标本(血液、脓液、穿刺液、伤口分泌物、痰、尿以及其他体液标本)分离出的非重复大肠埃希菌。全部菌株经常规生化试验或VITEK II GN卡鉴定。大肠埃希菌ATCC25922和ATCC35218为药敏试验质控菌株。带叠氮钠抗性的大肠埃希菌J53作为接合实验的受体菌。

2. 药敏试验:临床分离菌株经纸片扩散法测定药物敏感性。超广谱β-内酰胺酶(ESBL)表型检测采用双纸片协同试验。具体方法参考美国临床实验室标准化委员会(CLSI)相关方法指南<sup>[5]</sup>。药敏纸片和M-H培养基均为OXID公司产品;量取细菌对不同药物的抑菌圈直径后,使用CLSI 2012纸片法折点标准进行判读。对头孢噻肟、环丙沙星和阿米卡星同时耐药的MDR菌株采用琼脂稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)。

3. 脉冲场凝胶电泳(PFGE):参考美国疾病预防控制中心推荐方法<sup>[6]</sup>。待测菌株DNA经Xba I (New England Biolabs)酶切后电泳。电泳结果经BioNumerics 3.1软件(Applied Maths NV)分析后绘制聚类分析图。相似度≥70%的菌株为同一群组(cluster),相似度≥85%或不同条带数<4条的菌株为同一克隆菌株。

4. 耐药基因检测:常见的β-内酰胺酶、喹诺酮类和16S RNA甲基化酶耐药基因经PCR和PCR产物测序进行检测,包括 $bla_{TEM}$ 、 $bla_{SHV}$ 、 $bla_{CTX-M}$ (groups 1, 2, 8, 9, and 25/26)、 $bla_{PER}$ 、 $bla_{VEB}$ 、 $bla_{GES}$ 、质粒介导的 $bla_{AmpC}$ 、 $qnrA$ 、 $qnrB$ 、 $qnrC$ 、 $qnrD$ 、 $qnrS$ 、 $qepA$ 、 $oqxAB$ 、 $aac(6')-Ib-cr$ 、 $armA$ 、 $rmtA$ 、 $rmtB$ 、 $rmtC$ 、 $rmtD$ 以及GyrA和ParC的位点突变。引物序列和扩增条件参考文献[7-12]。

5. 系统发生分型分析:通过多重PCR扩增 $chuA$ 、 $yjaA$ 和 $TspE4.C2$ 基因,根据不同基因的阳性组合确定待测菌株的系统发生型<sup>[13]</sup>。

6. 接合试验:将0.5 ml生长指数期的供体菌和受体菌(J53,叠氮钠抗性)分别加入新鲜的Luria-Bertani(LB)培养基中,37℃孵育过夜后取100 μl培养液涂布至带有抗性的中国蓝平板上。其中一种组合是阿米卡星(30 μg/ml)和叠氮钠(170 μg/ml),另一种组合是环丙沙星(0.25 μg/ml)和叠氮钠(170 μg/ml)。

### 结果

1. MDR菌株分布及其药物敏感性:137株MDR大肠埃希菌的标本来源中,尿液57株(41.61%),痰26株(18.98%)、穿刺液19株(13.87%)、血液15株(10.95%)、脓液10株(7.3%)、伤口分泌物6株(4.38%)和其他体液标本4株(2.92%)。经表型测定,有116株(84.67%)MDR大肠埃希菌产ESBL。对常用抗生素的耐药情况见表1。

表1 137株MDR大肠埃希菌对临床常用抗生素耐药情况

抗菌药物	耐药率(%)	抗菌药物	耐药率(%)
头孢他啶	68.61	亚胺培南	1.46
头孢吡肟	70.07	美罗培南	0.73
头孢西丁	62.77	米诺环素	43.07
头孢哌酮/舒巴坦*	54.01	哌拉西林/他唑巴坦	3.65

注:\* 参考头孢哌酮折点判读敏感性

2. MDR菌株分型:137株MDR大肠埃希菌中,系统发生分型以D型最多(51%),其次为A型(38.8%)及B1、B2型(各5.1%)。PFGE分析结果表明,所有分离的MDR大肠埃希菌表现出显著的基因差异性,按照相似性<70%为独立型别的原则,137株MDR大肠埃希菌有130个独立的PFGE型别。

3. 基因传递情况:通过接合试验,137株MDR大肠埃希菌有97株(70.8%)筛选出接合子。其中,78株(56.93%)在阿米卡星培养基上筛选出接合子,61株(44.52%)在环丙沙星培养基上筛选出接合子,42株(30.66%)在两种培养基上均能筛选出接合子。

4. 耐药基因分布:MDR大肠埃希菌及其接合子所携带的常见耐药基因分布情况见表2。

表2 137株MDR大肠埃希菌常见耐药基因分布

耐药基因	携带率(%)		耐药基因	携带率(%)	
	临床分离菌株	接合子*		临床分离菌株	接合子*
$bla_{CTX-M}$	84.67	50.00	GyrA 单位点突变	1.00	-
$bla_{TEM}$	93.43	-	GyrA 双位点突变	99.00	-
$bla_{SHV}$	1.46	-	ParC 单位点突变	91.80	-
$bla_{DHA}$	1.46	2.70	ParC 双位点突变	8.20	-
$bla_{CMV}$	10.22	-	$qepA$	54.01	43.24
$bla_{OXA-1}$	13.87	-	$oqxAB$	16.30	15.83
$qnr$	7.30	2.70	$armA$	12.41	6.76
$aac(6')-Ib-cr$	16.79	5.41	$rmtB$	78.10	86.49

注:\* 使用阿米卡星抗性培养基筛选出的接合子

### 讨论

本研究137株MDR大肠埃希菌多数(57株,41.61%)来自于尿液标本。引起泌尿系感染的病原菌多为大肠埃希菌,且患者大多接受各种抗生素治

疗<sup>[14]</sup>,因此泌尿系感染患者标本成为MDR大肠埃希菌的主要来源。值得注意的是有10.95%的MDR大肠埃希菌分离自血液。而作为严重的系统性感染,耐药大肠埃希菌所引起的血流感染近年来呈增加趋势<sup>[15]</sup>,这给临床抗感染治疗所带来危害值得关注。在4种系统发生分型中,A型和B1型一般携带毒力因子较少,致病性也较弱,而B2和D型往往携带各种毒力因子易导致各种感染<sup>[16]</sup>。本研究发现,临床分离MDR大肠埃希菌半数以上(51%)为D型,表明临床菌株在具备了各种毒力的情况下也逐渐获得了对常用抗生素的耐药性。此两种能力的结合必定使MDR大肠埃希菌成为引起各种感染的重要病原菌,并给抗感染治疗带来更多困难。

本研究137株MDR大肠埃希菌有130个独立的PFGE型别。接合实验结果表明,70.8%的MDR菌株携带可移动的耐药质粒,而这些质粒能够携带各种耐药基因在菌株间相互传递,造成耐药性的播散。

本研究中有85%的MDR菌株为产ESBL菌株,表明这是介导头孢菌素耐药的主要机制。与此同时,带有酶抑制剂的哌拉西林/他唑巴坦的耐药率仅为3.65%,更证实了ESBL在介导菌株对 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药中的决定性作用。耐药基因检测显示,84.67%的MDR菌株产CTX-M型ESBL,表明该酶是临床分离MDR大肠埃希菌的主要型别。该酶能够被酶抑制剂所抑制,且水解头孢噻肟的能力要强于水解头孢他啶的能力<sup>[17]</sup>。本研究中有31.39%的菌株对头孢他啶仍敏感,也表明CTX-M型ESBL对头孢他啶的影响要弱于头孢噻肟。此外,有近五分之一的MDR菌株并未携带 $bla_{CTX-M}$ ,可能是TEM型ESBL以及质粒介导AmpC酶介导了这些菌株对超广谱头孢菌素的耐药。特别是 $bla_{TEM}$ 和 $bla_{CMY}$ ,分别有93.43%和10.22%的菌株携带有这两种酶, $bla_{TEM}$ 如此高的携带率表明其在介导菌株对头孢菌素耐药机制中发挥重要作用。本研究中的大多数菌株具有GyTA的双位点突变和ParC的单位点突变,表明药物靶位突变是介导MDR菌株对喹诺酮类药物耐药的主要机制。尽管如此,还有64.96%的菌株携带有质粒介导喹诺酮耐药(PMQR)基因,特别是有超过半数的菌株携带有 $qepA$ 。尽管PMQR基因通常只介导菌株对喹诺酮类药物的低水平耐药或敏感性降低,但其对药物作用靶位突变的影响会直接影响到携带菌株对喹诺酮类药物的高水平耐药,因而具有显著的生物学意义<sup>[16,18]</sup>。有90.51%的MDR大肠埃希菌携带有质粒介导16S RNA甲基化酶,且以 $rmtB$

(78.1%)为主。有13(9.49%)菌株未检测到已知的16S RNA甲基化酶,表明其他耐药机制仍能介导菌株对阿米卡星的高水平耐药。包括氨基糖苷修饰酶,如氨基糖苷类乙酰基转移酶(AAC)、氨基糖苷类磷酸转移酶(APH)和氨基糖苷类核苷转移酶(ANT)以及同时具有两种修饰功能的双功能酶,如AAC-APH等<sup>[19]</sup>。相关机制有待进一步研究证实。

#### 参 考 文 献

- [1] Xiao YH, Giske CG, Wei ZQ, et al. Epidemiology and characteristics of antimicrobial resistance in China. *Drug Resist Updat*, 2011, 14: 236-250.
- [2] Falagas ME, Koletsis PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 2006, 55: 1619-1629.
- [3] Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis*, 2008, 46: 1121-1122.
- [4] Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300: 371-379.
- [5] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Second Informational Supplement (M100-S22). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2012, 32(3): 41-60.
- [6] Ribot EM, Fair MA, Gautam R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*, 2006, 3: 59-67.
- [7] Dallenne C, Da Costa A, Decre D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65: 490-495.
- [8] Kim HB, Park CH, Kim CJ, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 639-645.
- [9] Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, et al. Prevalence in the United States of  $aac(6')-Ib-cr$  encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 3953-3955.
- [10] Kim HB, Wang M, Park CH, et al.  $oqxAB$  encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 3582-3584.
- [11] Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*, 2007, 45: 88-94.
- [12] Everett MJ, Jin YF, Ricci V, et al. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 2380-2386.
- [13] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 4555-4558.
- [14] Hsueh PR, Hoban DJ, Carmeli Y, et al. Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region. *J Infect*, 2011, 63: 114-123.
- [15] Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis*, 2007, 4: 134-163.
- [16] Yang J, Luo Y, Cui S, et al. Diverse phenotypic and genotypic characterization among clinical *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. *Microb Drug Resist*, 2011, 17: 363-367.
- [17] Rodriguez-Bano J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008, 6: 671-683.
- [18] Cesaro A, Bettoni RR, Lascols C, et al. Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne  $qnr$  genes. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61: 1007-1015.
- [19] Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70: 140-150.

(收稿日期:2012-08-15)

(本文编辑:张林东)