

- 2017, 37(10):2078-2084.
- [5] 《抗菌药物临床应用指导原则》修订工作组. 抗菌药物临床应用指导原则: 2015版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [6] 张凌, 黄欣, 何祖光. 呼吸内科患者下呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(1): 90-92.
- [7] BERNARD H, DESSEYN JL, GOTTRAND F, et al. Pectin-derived acidic oligosaccharides improve the outcome of pseudomonas aeruginosa lung infection in C57BL/6 mice[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0139686. DOI: 10.1371/journal.pone.0139686.
- [8] 褚月娇, 周楚铭, 韩莹莹, 等. 呼吸科病房老年病人肺部感染常见病原菌及其耐药性分析[J]. 安徽医药, 2019, 23(1): 63-66.
- [9] 梅海霞, 唐玉珍, 杨辉, 等. 老年重症肺炎患者的临床特征、病原菌分布以及影响患者死亡的危险因素分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(3): 352-354.
- [10] 李炳玲. 铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展[J]. 抗感染药学, 2014, 11(3): 182-186.
- [11] 董燕, 陈俊文, 阳俊, 等. 莫西沙星与头孢哌酮舒巴坦治疗老年心力衰竭患者铜绿假单胞菌院内感染的疗效对比观察[J]. 安徽医药, 2018, 22(2): 312-315.
- [12] 陈德生, 符信萍. 头孢他啶与左氧氟沙星联用对心力衰竭患者伴肺部感染的临床疗效评价[J]. 抗感染药学, 2018, 15(12): 2122-2124.
- [13] 刘传铃, 王佳贺. 中药抗耐药铜绿假单胞菌机制的研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(3): 40-43.
- [14] 成向进, 林朝亮, 朱红林, 等. 泻肺通腑方干预ICU多重耐药铜绿假单胞菌肺炎患者的临床研究[J]. 中国中医急症, 2019, 28(1): 47-50.
- [15] 梁洪文, 谭福柱, 刘凯, 等. 清瘟解毒汤对广泛耐药铜绿假单胞菌相关性重症肺炎的临床研究[J]. 中国中医急症, 2019, 28(1): 44-46.
- [16] 庞载元, 吴贤丽, 华毅. 4种中药对30株广泛耐药铜绿假单胞菌的抑菌作用[J]. 中国执业药师, 2015, 12(2): 25-27.
- [17] 李亚楠, 岑艳灵, 孔晋亮, 等. 黄芩素联合头孢他啶对小鼠腹腔铜绿假单胞菌早期生物被膜感染的体内影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(2): 247-250.
- [18] 姜蔚. 野黄芩苷药理作用及机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(12): 1634-1637.
- [19] 曹琳, 宋晓文, 任金来, 等. 血清淀粉样蛋白A的研究进展[J]. 安徽医药, 2019, 23(2): 221-224.

(收稿日期: 2019-07-25, 修回日期: 2019-08-12)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.07.049

◇ 医院药学 ◇

碳青霉烯类耐药大肠埃希菌耐药基因型检测及同源性分析

胡志军^a, 吴希静^b, 潘晓龙^a, 崇慧峰^a, 朱娟娟^a, 赵哲^a, 唐吉斌^a作者单位: 铜陵市人民医院,^a检验科,^b妇产科, 安徽 铜陵 244000

基金项目: 铜陵市卫生局科研课题项目(卫科研[2014]31号)

摘要: 目的 检测临床分离碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的耐药基因型, 并对其同源性进行分析, 研究其流行情况。方法 收集铜陵市人民医院 2012 年 9 月至 2016 年 10 月临床分离碳青霉烯类耐药大肠埃希菌, 采用 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定仪进行鉴定, 改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶表型, EDTA 双纸片协同试验进行金属酶初筛, 聚合酶链反应(PCR)检测碳青霉烯酶基因(*bla_{KPC}*、*bla_{IMP}*、*bla_{VIM}*、*bla_{NDM}* 和 *bla_{OXA-48}*), 并对阳性扩增产物进行基因测序; 同源性分析采用肠杆菌科基因间重复一致序列聚合酶链反应技术(ERIC-PCR)。结果 共收集碳青霉烯类耐药大肠埃希菌 25 株, 8 株改良 Hodge 试验阳性, 13 株金属酶初筛试验阳性, 其中 4 株携带 *bla_{NDM-1}* 基因, 1 株携带 *bla_{IMP-4}* 基因, 1 株携带 *bla_{KPC-2}* 基因; ERIC-PCR 检测分为 10 种型别。结论 碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的耐药机制主要是产金属酶, 携带 NDM-1 型碳青霉烯酶大肠埃希菌需重点监测; 碳青霉烯类耐药大肠埃希菌未在院内引起克隆流行。

关键词: 埃希氏菌属; 序列同源性; 基因, MDR; 大肠埃希菌; 碳青霉烯酶; 基因间重复一致序列聚合酶链反应技术(ERIC-PCR)

Detection and homology analysis of carbapenem-resistant genotypes of escherichia coli

HU Zhijun^a, WU Xijing^b, PAN Xiaolong^a, CHONG Huifeng^a, ZHU Juanjuan^a, ZHAO Zhe^a, TANG Jibin^aAuthor Affiliation: ^aDepartment of Clinical laboratory, ^bDepartment of Obstetrics and Gynecology,

Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui, 244000, China

Abstract: Objectives To detect the drug-resistant genotypes of clinically isolated carbapenem-resistant Escherichia coli, and analyze their homology to study their epidemic situation. **Methods** From September 2012 to October 2016, clinically isolated carbapen-

em-resistant *Escherichia coli* were collected in Tongling people's Hospital and identified by VITEK-2 Compact automatic microbiological identification instrument. Modified Hodge test was performed to screen the phenotype of carbapenemase, and metalloenzymes were screened by EDTA double-disc synergistic test. Carbapenemase gene (bla_{KPC} , bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{NDM} and bla_{OXA-48}) was detected by polymerase chain reaction (PCR). The positive amplified products were sequenced and the homology analysis and typing of ERIC-PCR were carried out. **Results** A total of 25 strains of carbapenem-resistant *Escherichia coli* were collected, 8 strains were positive for the modified Hodge test, and 13 strains were positive for the metalloenzyme screening test. Four of them carried bla_{NDM-1} gene, one strain carried bla_{IMP-4} gene and one strain carried bla_{KPC-2} gene. ERIC-PCR detection was divided into 10 types. **Conclusions** The main mechanism of carbapenem-resistant *Escherichia coli* is the production of metalloenzymes. The NDM-1 type carbapenem-resistant *Escherichia coli* needs to be monitored. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* did not cause clonal epidemics in hospitals.

Key words: *Escherichia*; Sequence homology; Genes, MDR; *Escherichia coli*; Carbapenemase; Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR)

碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)在我国临床上越来越常见,美国疾病控制和预防中心(CDC)已经将CRE定义为对全球公众健康构成严重威胁三种微生物之一^[1],但碳青霉烯类耐药大肠埃希菌分离率相对稳定,一直维持在2%左右^[2-3]。大肠埃希菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制在各地均见到不同报道。因此,笔者检测临床分离的碳青霉烯类耐药大肠埃希菌所携带的碳青霉烯酶耐药基因型,并对其进行同源性分析,为医院感染和临床提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 25株碳青霉烯类耐药大肠埃希菌分离自2012年9月至2016年10月铜陵市人民医院临床标本,剔除同一病人重复菌株。抗菌药物纸片和培养基分别为英国OXOID公司和合肥天达公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养鉴定和药敏试验 严格按照操作规程进行,梅里埃公司Vitek-2 Compact型细菌鉴定仪进行细菌鉴定。采用纸片扩散法进行药敏试验,依据CLSI 2015年^[4]标准判断结果。质控菌株为大肠埃希菌ATCC 25922。

1.2.2 EDTA双纸片协同试验 将培养过夜的细菌制成0.5麦氏浓度菌液,接种MH平板,晾干后中间贴IPM,相距1~2 cm处贴EDTA纸片(含4 μL 0.5 M EDTA)。培养18~24 h后,以IPM抑菌圈在EDTA纸片侧明显扩大者为金属酶阳性。

1.2.3 改良Hodge试验 参照CLSI 2015推荐方法进行。

1.2.4 碳青霉烯酶基因检测 (1)PCR试剂与仪器:PCR试剂盒、琼脂糖(进口分装)、DNA Marker、电泳缓冲液等试剂为上海生工产品。扩增用瑞士罗氏cobas z 480型PCR仪进行。(2)PCR方法:煮沸法提取细菌DNA模板,实验严格按照试剂盒说明书操作。各引物序列(表1)由上海生工合成。扩增产

物经(137V)凝胶电泳30 min后,置凝胶成像系统上成像。(3)基因测序:阳性扩增产物由上海生工公司进行纯化和测序,测序结果经BLASTn比对来确定碳青霉烯酶基因型。

表1 PCR引物序列

耐药基因	引物序列 (5'→3')	预期产物大小/ 参考文献
KPC	正向引物:5'-GCTACACCTAGCTCCACCTTC-3' 反向引物:5'-ACAGTGGTTGGTAATCCATGC-3'	920 [5]
IMP	正向引物:5'-GTTGAAGAAGTTAACGGGTGG-3' 反向引物:5'-ATAATTTGGCGGACTTTGGC-3'	459 [6]
VIM	正向引物:5'-TGGTGTGGTTCGCATATCG-3' 反向引物:5'-GAGCAAGTCTAGACCGCCCG-3'	595 [6]
NDM	正向引物:5'-GCCTGGTTAAGGATGAACAC-3' 反向引物:5'-CATCAAGTTCGAACCCAACCG-3'	621 [7]
OXA-48	正向引物:5'-GGTTGGCGATCTGGTTTTTC-3' 反向引物:5'-CGGAATGGCTCATCAGATC-3'	438 [7]

1.2.5 肠杆菌科基因间重复一致序列PCR (ERIC-PCR)

(1)ERIC-PCR方法:煮沸法提取细菌DNA模板,严格按照生工PCR反应试剂盒(B532073)说明书操作。反应体系共50 μL,ERIC-PCR引物:E1 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', E2 5'-AAGTAAGTACTGGG GTGAGCG-3'。反应条件为:预变性94℃ 7 min,变性94℃ 1 min,退火52℃ 1 min,延伸65℃ 8 min,共30个循环,最后65℃延伸16 min。扩增产物经(46 V)凝胶电泳2 h后,置凝胶成像系统上成像。(2)DNA同源性分析:电泳后,分型条带位置完全相同和相差1~2条者为同一基因型,相差3条及以上者为不同型别。

2 结果

2.1 碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的科室和标本来源 25株碳青霉烯类耐药大肠埃希菌分离自临床13个科室,其中肝胆外科和胃肠外科各4(16.0%)株,泌尿外科和神经外科各3(12.0%)株,耳鼻喉头颈外科和骨科各2(8.0%)株,急诊科、妇科、呼吸内科、神经内

科、肾内科、重症医学科和中医风湿科各1(4.0%)株。标本分布中,分离自中段尿最多,11(44.0%)株,其次是痰液6(24.0%)株,脓标本3(12.0%)株,胆汁和引流液各2(8.0%)株,血液标本1(4.0%)株。

2.2 改良 Hodge 试验结果 25 株碳青霉烯类耐药大肠埃希菌改良 Hodge 试验 8 株阳性,阳性率 32.0%。

2.3 金属酶初筛试验结果 25 株碳青霉烯类耐药大肠埃希菌中,EDTA 协同试验 13 株阳性,阳性率 52.0%。

2.4 碳青霉烯酶基因型检测结果

2.4.1 PCR 扩增结果 25 株碳青霉烯类耐药大肠埃希菌中分别扩增出 4 株 NDM 基因、1 株 IMP 基因和 1 株 KPC 基因阳性产物;未见 VIM 和 OXA-48 型阳性产物。

2.4.2 PCR 产物测序结果 扩增阳性产物测序序列经 BLASTn 网上比对后与目标基因型同源性均为 100%,分别为 4 株 NDM-1 型(图 1)、1 株 IMP-4 型和 1 株 KPC-2 型碳青霉烯酶。

2.5 ERIC-PCR 同源性分析结果

2.5.1 ERIC-PCR 同源性分型结果 25 株碳青霉烯类耐药大肠埃希菌应用 ERIC-PCR 扩增后电泳,对电泳条带进行基因分型,每株细菌产生 3~7 条扩增条带,称为指纹图谱,部分结果见图 2。16 株碳青霉烯类耐药大肠埃希菌共分 10 型,无明显优势型别。

其中 9 株细菌未扩增出有效条带,未分型。

2.5.2 10 型碳青霉烯类耐药大肠埃希菌在科室流行情况 10 型碳青霉烯类耐药大肠埃希菌在临床科室中呈散在分布,未见同一型别的细菌在同一科室集中出现,并且同一科室的几株细菌还分离自不同年份。

3 讨论

大肠埃希菌是医院感染最多见的病原菌,但令人欣慰的是细菌耐药性监测显示碳青霉烯类耐药大肠埃希菌感染率并未出现明显增加,维持在 1%~3%。尽管近年大肠埃希菌耐药率未见明显上升,而且存在一定的好转趋势^[8],但仍需密切关注此类细菌的变化。

CRE 的耐药机制目前报道最多的是产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌,在大肠埃希菌中报道的较少,基本都是散在出现。而且国内外研究均提示碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的耐药机制有明显的地域性差异,在不同的地方检出的耐药基因型也不一样^[9-13]。本研究中,金属酶筛选试验双纸片协同试验阳性率为 52.0%;而改良 Hodge 试验阳性率较低,为 32.0%,说明本地区碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的耐药机制可能以产 B 类金属酶为主,随后的耐药基因也证实上面观点。本研究中,检出 5 例 B 类金属酶耐药基因(4 例 bla_{NDM-1} 和 1 例 bla_{IMP-4})和 1 例 A 类碳青霉烯酶耐药基因(bla_{KPC-2})。近年,国内外均有

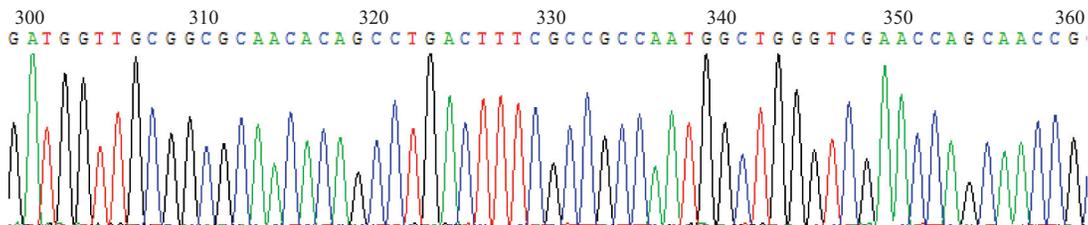
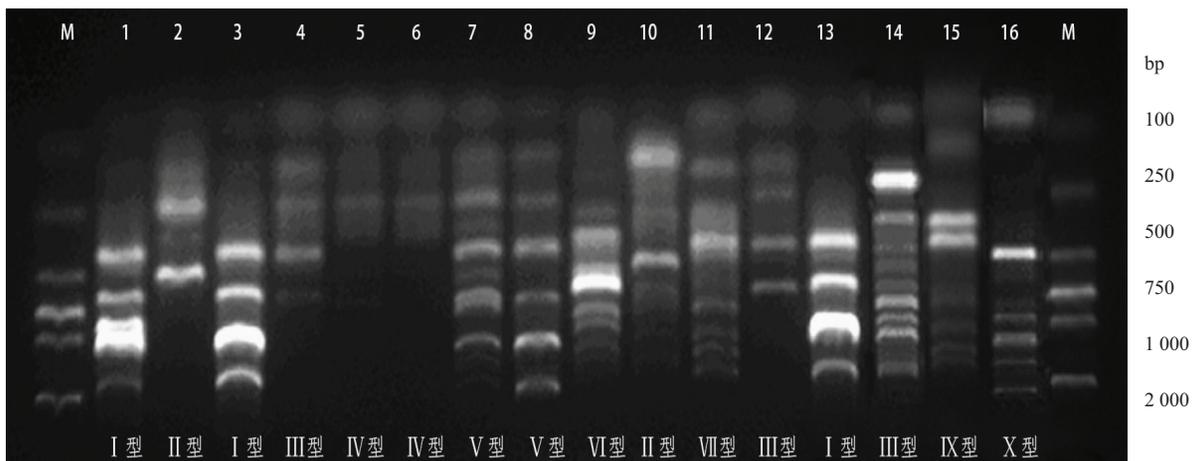


图1 碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的NDM-1型测序结果部分峰图



M:marker

图2 碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的基因间重复一致序列聚合酶链反应技术指纹图谱

报道携带 bla_{NDM-1} 型耐药基因的碳青霉烯类耐药大肠埃希菌^[9-10,14-15],而新德里金属 β -内酰胺酶(NDM)在2008年首次从肺炎克雷伯菌中发现,被称为“超级细菌”。随后在印度、巴基斯坦、科威特、美国等国家^[16-17]均有报道,尤其NDM-1在新加坡、印度等国家是最常见的碳青霉烯酶基因型。但在我国并不多见,只有一些散在报道。本研究中碳青霉烯类耐药大肠埃希菌却是携带 bla_{NDM-1} 型耐药基因为主,这类细菌耐药性强,需要我们高度重视,密切监测这类细菌,避免出现暴发流行。

此外,本研究还检测到1例携带 bla_{IMP-4} 型耐药基因的碳青霉烯类耐药大肠埃希菌,IMP是最常见的B类碳青霉烯酶,在我国主要为IMP-4和IMP-8型。同时,还检出1例携带 bla_{KPC-2} 型耐药基因的碳青霉烯类耐药大肠埃希菌,KPC-2基因主要见于肺炎克雷伯菌,也是本地区碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的主要耐药基因,在碳青霉烯类耐药大肠埃希菌中也是时有报道,但一般并不构成主要类型。遗憾的是,实验条件限制,本研究可能漏检了其他基因型,膜孔蛋白和外排泵机制也未作研究。

脉冲场凝胶电泳(PFGE技术)是目前国际公认的病原菌同源性分析的金标准,但其仪器昂贵,操作复杂,不适用于基层实验室开展。而ERIC-PCR技术操作简单、分型效率高,已成为肠杆菌科DNA基因分型常用方法^[18-19]。本研究的ERIC-PCR同源性分析结果显示,碳青霉烯类耐药大肠埃希菌分属于10个不同的流行克隆型,10型碳青霉烯类耐药大肠埃希菌在临床科室中均呈散在分布,25株细菌分离自13个不同的临床科室,未见同一型别的细菌在同一科室集中出现,并且同一科室的几株细菌还分离自不同年份,这些都提示该细菌在本院只是散在流行,未出现暴发流行的情况。

综上所述,本地区碳青霉烯类耐药大肠埃希菌的耐药机制以携带B类碳青霉烯酶(金属酶)为主,尤其是携带 bla_{NDM-1} 型耐药基因最常见,同时还存在 bla_{IMP-4} 和 bla_{KPC-2} 型耐药基因,未发现暴发流行,呈现散在流行,为院感控制工作提供了实验室依据。

参考文献

- [1] ZOWAWI HM, FORDE BM, ALFARESI M, et al. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15082.
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016年中国CHINET细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(5): 481-491.
- [3] 叶峥嵘, 吴琳. 2013—2015年临床感染的病原菌分布及耐药性分析[J]. *安徽医药*, 2017, 21(3): 511-513.
- [4] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M100-S25 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement [S]. Wayne: CLSI, 2015.
- [5] ZHANG XX, DU J, ZHOU C, et al. An uncommon ST1224 NDM-1-producing *klebsiella pneumoniae* isolated from the bloodstream of a leukemia patient in China [J]. *Chemotherapy*, 2017, 62(4): 262-268.
- [6] AGHAMIRI S, AMIRMOZAFARI N, FALLAH MJ, et al. Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo-beta lactamase genes including bla-imp and bla-vim types in *pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in tehran hospitals [J]. *Isrn Microbiol*, 2014, 2014: 941507. DOI: 10.1155/2014/941507.
- [7] POIREL L, WALSH TR, CUVILLIER V, et al. Multiplex pcr for detection of acquired carbapenemase genes [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1): 119-123.
- [8] 胡志军, 唐吉斌, 吴希静, 等. 碳青霉烯类耐药大肠埃希菌出现后的大肠埃希菌耐药性监测[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(16): 2412-2415.
- [9] CUZON G, BONNIN RA, NORDMANN P. First identification of novel ndm carbapenemase, ndm-7, in *escherichia coli* in france [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61322. DOI: 10.1371/journal.pone.0061322.
- [10] LIU Z, LI W, WANG J, et al. Identification and characterization of the first *escherichia coli* strain carrying ndm-1 gene in china [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66666. DOI: 10.1371/journal.pone.0066666.
- [11] 卢玲玲, 郑国军, 涂斐佩, 等. 大肠埃希菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(4): 296-300.
- [12] 闫文娟, 李轶, 王山梅, 等. 耐碳青霉烯类抗菌药物大肠埃希菌耐药机制的研究[J]. *检验医学*, 2016, 31(1): 56-60.
- [13] 张保荣, 毕茹茹, 孔子艳, 等. 宿迁地区碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌耐药性及碳青霉烯酶基因型分析[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(9): 667-671.
- [14] 王峰, 孙景勇, 张芳芳, 等. 碳青霉烯类耐药的大肠埃希菌中 bla_{NDM} 基因型检测及流行病学分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(1): 56-60.
- [15] 梅艳芳, 刘盼盼, 王莲慧, 等. 新德里金属 β -内酰胺酶亚型在碳青霉烯类耐药肠杆菌中分布及分子流行病学研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(2): 241-246.
- [16] LING ML, TEE YM, TAN SG, et al. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in an acute tertiary care hospital in Singapore [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2015, 4: 26.
- [17] BERRAZEG M, DIENE S, MEDJAHED L, et al. New delhi metallo-beta-lactamase around the world: an eviewing using google maps [J]. *Euro Surveill*, 2014, 19(20): 20809. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.20.20809.
- [18] ARDAKANI MA, RANJBAR R. Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method [J]. *Electronic Physician*, 2016, 8(4): 2291-2296.
- [19] 李睿, 辛力华, 张青, 等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌ERIC-PCR指纹图谱分型的研究[J]. *解放军医药杂志*, 2018, 30(11): 102-105.

(收稿日期: 2019-02-27, 修回日期: 2019-03-31)