

鸡源大肠杆菌 *ESBLs* 基因型检测及耐药性分析研究*

栾鹏, 冷丽, 徐国锋, 李辉**

(东北农业大学动物科技学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 为调查哈尔滨市周边地区鸡源大肠杆菌中超光谱β-内酰胺酶(*ESBLs*)基因型的流行情况, 探索携带*ESBLs*对鸡源大肠杆菌耐药性的影响, 从哈尔滨市周边地区多个养殖场分离了137株鸡源大肠杆菌, 用微量肉汤稀释法测定137株菌对18种抗菌药物的最小抑菌浓度, 采用CLSI推荐的表型筛选和确证试验检测大肠杆菌携带*ESBLs*情况, 用PCR方法检测*ESBLs*基因(*bla_{TEM}*、*bla_{SHV}*、*bla_{CTX-M}*、*bla_{OXA}*)的流行分布情况。结果显示: 109株大肠杆菌为产*ESBLs*菌株, 占79.6%; 137株鸡源大肠杆菌对临床常用18种抗菌药物产生不同程度耐药, 且产*ESBLs*大肠杆菌的耐药性比非产*ESBLs*大肠杆菌的耐药性严重, *bla_{TEM}*、*bla_{CTX-M}*基因阳性率分别为40.9%、71.5%, 所有菌株均未扩增出*bla_{SHV}*和*bla_{OXA}*基因。提示 *bla_{TEM}*和*bla_{CTX-M}*基因为哈尔滨地区鸡源产*ESBLs*大肠杆菌的流行基因型, 且鸡源产*ESBLs*大肠杆菌菌株分布广泛, 应加强当地用药监管。

关键词: 大肠杆菌, *ESBLs*, 耐药性, 基因型

ESBLs Genotype Detection and Antibiotic Resistance Analysis of *Escherichia coli* Isolated from Chickens*

LUAN Peng, LENG Li, XU Guofeng, LI Hui**

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: In order to investigate the genotype of extend spectrum β-lactamase (*ESBLs*) in *Escherichia coli* isolated from chickens in Harbin region and the effect of *ESBLs* on *E.coli* resistance, 137 *E.coli* isolates were identified, antimicrobial susceptibility of which to 18 antimicrobials were detected by micro-dilution broth method. *ESBLs* in *E.coli* isolates was detected by phenotype screening and confirmatory test according to CLSI guidelines, and the prevalence of *ESBLs* genes (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*) were detected by PCR. The results showed that 109 isolates were positive for *ESBLs*; Resistance of *ESBLs*-positive strains were higher than that of *ESBLs*-negative strains. The detection rates of *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* were 40.9% and 71.5%, while *bla_{SHV}* and *bla_{OXA}* type *ESBLs* were not detected in the *E. coli* isolates. *bla_{TEM}*-type and *bla_{CTX-M}*-type were epidemic genotype of *ESBLs* in Harbin region, and the *ESBLs* producing *E.coli* strains from chickens were widespread, the use of antimicrobial should be reinforcingly monitored.

Key words: *E. coli*, *ESBLs*, resistance, gene type

收稿日期: 2014-05-13

*基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-42)

**通讯作者: E-mail: lihui@neau.edu.cn

包括青霉素类、头孢菌素类、单环β-内酰胺类和碳青霉烯类在内的β-内酰胺类药物是医学临床上应用最为广泛的抗菌药物之一,同样β-内酰胺类药物在兽药临床上也发挥着极其重要的作用,随着该类药物的大量使用,β-内酰胺类药物耐药问题也越来越突出,严重影响了该药物的临床效果^[1]。超广谱β-内酰胺酶(Extend spectrum β-lactamases,ESBLs)是一种近年来发现的能够水解第三代头孢菌素类的β-内酰胺酶,能够介导对青霉素类、头孢菌素类、单环β-内酰胺类耐药,并可被β-内酰胺酶抑制剂所抑制^[2]。根据ESBLs基因及其编码蛋白质的同源性将其分为TEM型、SHV型、CTX-M型、OXA型及其他型共5种类型,其中ESBLs中最常见的是TEM型和CTX-M型^[3,4]。近年来随着头孢类药物大量应用于人医和兽医临床,携带ESBLs的细菌呈现逐年增加的趋势,给临床选药带来压力。介导ESBLs的耐药基因常位于质粒上,能在同种或者不同种间进行传播,且携带ESBLs基因的质粒往往同时携带氨基糖苷类、氟喹诺酮类等的耐药基因,引起多重耐药。本研究对哈尔滨周边地区分离的137株鸡源大肠杆菌进行ESBLs的筛选并对ESBLs基因型进行鉴定,以期了解哈尔滨地区鸡源产ESBLs大肠杆菌流行情况以及ESBLs基因和药物敏感性的相关性,为指导临床合理用药和大肠杆菌质粒介导的耐药传播机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2013年6~8月从哈尔滨周边7个县市(呼兰、阿城、双城、五常、尚志、方正、宾县)规模化养鸡场采集鸡肛拭子分离鉴定出137株鸡源大肠杆菌。药敏试验质控菌株ATCC25922购自中国微生物菌种保藏中心。

1.2 抗菌药物与药敏纸片

抗菌药物:阿莫西林(AMX)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、头孢噻吩(CEF)、头孢曲松(CRO)、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢西丁(FOX)、氨曲南(AZM)、亚胺培南(IPM)庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、四环素(TET)、多西环素(DOX)、氯霉素(CHL)、氟苯尼考(FLO)、恩诺沙星(ENR)、环丙沙星(CIP)和复方新诺明(SXT)药物原粉均购自中国兽医药品监察所。

药敏纸片:头孢噻肟(CTX,30 g/片)、头孢他

啶(CAZ,30 g/片)、头孢噻吩/克拉维酸(CTX/Clav,30/10 g/片)、头孢他啶/克拉维酸(CAZ/Clav,30/10 g/片)购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.3 主要试剂

LB肉汤、MH肉汤、MH琼脂,购自北京陆桥技术有限责任公司;质粒提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;Taq PCR Mix、DNA Marker、pMD18-T载体、DH-5α感受态细胞等均购自大连宝生物公司。

1.4 ESBLs表型检测

ESBLs表型检测按照CLSI标准^[5]进行操作和结果判读。ESBLs表型初筛试验:将受试菌株均匀涂布于MH琼脂平板,在每个平板贴上CTX和CAZ两种纸片。当抑菌圈直径满足以下任一条件:CTX≤27 mm,CAZ≤22 mm时,提示为产ESBLs疑似菌株,需要进一步进行ESBLs表型确证试验。ESBLs表型确证试验:将受试菌株均匀涂布于MH琼脂平板,分别贴CTX、CTX/Clav以及CAZ、CAZ/Clav两组纸片。当两组中任何一组加克拉维酸后与不加克拉维酸抑菌圈直径差值≥5 mm时可确认为产ESBLs菌株。

1.5 药物敏感性试验

以大肠杆菌ATCC25922为质控菌株,用微量肉汤稀释法^[6]分别测定18种抗菌药物对137株鸡源大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)值。药敏试验结果解释标准参照CLSI(2012版)^[5]判读。

1.6 ESBLs基因型检测

1.6.1 引物的设计及合成

ESBLs基因 bla_{TEM} 、 bla_{SHV} 、 bla_{CTX-M} 、 bla_{OXA} 引物参照GenBank中收录的序列及相关文献^[7,8]设计(见表1)。所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

表1 PCR引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)
bla_{TEM}	F :ATGAGTATTCAACATTTCCG	861
	R :TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
bla_{SHV}	F :AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713
	R :ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
bla_{CTX-M}	F :TGCATGTGCAGTACCAGTAA	540
	R :ATATCGTTGGTGGTCCATA	
bla_{OXA}	F :GGCACCAGATTCAACTTCAAG	564
	R :GACCCCAAGTTTCTGTAAGTG	

注:F上游引物,R下游引物。

1.6.2 PCR扩增

用质粒提取试剂盒提取大肠杆菌质粒作为PCR反应模板。PCR反应体系(20 μL):Taq PCR Mix 10 μL,上下游引物各 1 μL,质粒DNA模板 1 μL,超纯水 7 μL。循环参数:94 °C预变性 5 min,94 °C变性 30 s,58 °C退火 30 s,72 °C延伸 45 s,进行 30 个循环;72 °C终延伸 7 min。PCR扩增产物在 1.0%琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭(EB)染色在凝胶成像系统上观察电泳结果。

1.6.3 PCR产物回收测序

把阳性的PCR产物进行胶回收,连接到pMD18-T载体上,转化DH-5α感受态细胞,筛选阳性克隆,经PCR鉴定为阳性的菌落送上海英骏生物技术有限公司测序,将测序结果登陆GenBank进行BLAST分析。

1.7 统计学分析

用SPSS 17.0软件进行数据统计。根据检测结果,将大肠杆菌分为ESBLs阳性组和ESBLs阴性组,采用SPSS统计软件中的T检验对ESBLs阳性组和ESBLs阴性组菌株的药敏试验结果进行统计学分析。

2 结果

2.1 ESBLs表型检测结果

137株鸡源大肠杆菌经过ESBLs表型初筛试验和表型确证试验,证实有109株菌为ESBLs阳性,检出率为79.6%(109/137)。

2.2 药敏试验结果

137株鸡源大肠杆菌对18种抗菌药物产生不同程度耐药且均都为多重耐药菌株,除了头孢西丁、阿米卡星以外,对其他15种抗菌药物的耐药率菌超过了50%,对复方新诺明耐药率达到了100%。所有菌株对亚胺培南都敏感。ESBLs阳性组大肠杆菌的耐药性显著高于ESBLs阴性组大肠杆菌结果(见表2)。

2.3 ESBLs基因型的PCR扩增及测序结果

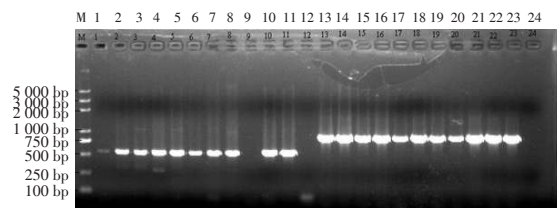
对109株ESBLs阳性大肠杆菌进行bla_{TEM}、bla_{SHV}、bla_{CTX-M}、bla_{OXA}4种主要基因型的PCR检测,结果显示:109株产ESBLs鸡源大肠杆菌基因型扩增106株为阳性,其中98株bla_{CTX-M}基因阳性,检出率为71.5%(98/137),占ESBLs阳性大肠杆菌比例为89.9%(98/109);56株bla_{TEM}基因阳性,检出率为40.9%(56/137),占ESBLs阳性大肠杆菌比例为

表2 137株鸡源大肠杆菌对18种抗菌药物的敏感性

抗菌药物	ESBLs 阳性(n=109)		ESBLs 阴性(n=28)		总耐药率 (%)
	菌株数	耐药率(%)	菌株数	耐药率(%)	
AMX	109	100.0	23	82.1*	96.4
AMC	100	91.7	18	64.3*	86.1
CEF	103	94.5	13	46.4*	84.7
CRO	95	87.2	9	32.1*	75.9
CAZ	75	68.8	0	0.0*	54.7
CTX	83	76.1	0	0.0*	60.6
FOX	50	45.9	2	7.1*	37.9
AZM	99	90.8	10	35.7*	79.6
IMP	0	0.0	0	0.0	0.0
GEN	101	92.7	15	53.6*	84.7
AMK	35	32.1	2	7.1*	27.0
TET	93	85.3	23	82.1	84.7
DOX	95	87.2	22	78.6	85.4
CHL	104	95.4	20	71.4*	90.5
FLO	103	94.5	26	92.9	94.2
ENR	102	93.6	21	75.0*	89.8
CIP	98	89.9	20	71.4*	86.1
SXT	109	100.0	28	100.0	100.0

注:*表示ESBLs阳性大肠杆菌和ESBLs阴性大肠杆菌耐药性存在显著性差异(P<0.05)。

51.4%(56/109);其中有26株大肠杆菌同时携带bla_{TEM}和bla_{CTX-M}两种基因,所有菌株均没有检出bla_{SHV}基因和bla_{OXA}基因。测序结果在GenBank上进行BLASTN比对,结果显示bla_{TEM}基因和bla_{CTX-M}基因与GenBank中已报道的bla_{TEM}基因和bla_{CTX-M}基因同源性超过99%。部分菌株PCR产物电泳结果见图1。



注:1.DNA相对分子质量标准;2.bla_{CTX-M}基因阴性对照;3-8、10、11.临床bla_{CTX-M}基因阳性菌株;9.临床bla_{CTX-M}基因阴性菌株;12.bla_{TEM}基因阴性对照;13-23.临床bla_{TEM}基因阳性菌株;24.临床bla_{TEM}基因阴性菌株。

图1 部分菌株PCR产物电泳结果

3 讨论

本研究对哈尔滨周边地区7个县市分离的137株鸡源大肠杆菌调查了耐药情况及携带ESBLs情况。研究发现,哈尔滨地区鸡源大肠杆菌中ESBLs的携带率较高(79.6%),这种高携带率与曲志娜等(81%)^[9]和Endimiani等(79%)^[10]的报道相吻合,表明鸡源大肠杆菌中已经普遍存在ESBLs,

兽医临床上头孢菌素类药物的广泛应用,再加上亚剂量、不规范使用抗菌药物,使得ESBLs基因传播速度增加,细菌产ESBLs的频率升高,导致ESBLs阳性菌株检出率提高^[11]。

耐药性检测结果表明,137株大肠杆菌除了对头孢西丁、亚胺培南和阿米卡星以外的其他15种抗菌药物的耐药率均达到了50%以上,对阿莫西林、氯霉素、氟苯尼考、复方新诺明的耐药率超过了90%,提示哈尔滨地区鸡源大肠杆菌的耐药状况比较严重,这可能与该地区养殖过程中大量应用抗菌药物有关。ESBLs阳性大肠杆菌对β-内酰胺类抗菌药物、氨基糖苷类药物、氟喹诺酮类药物的耐药率显著高于ESBLs阴性大肠杆菌,这与介导ESBLs基因的质粒往往携带氨基糖苷类和氟喹诺酮类耐药基因有关^[12]。亚胺培南和头孢西丁及阿米卡星等对ESBLs阳性和ESBLs阴性大肠杆菌具有较高的抗菌活性,因此可作为治疗因产ESBLs鸡源大肠杆菌引起疾病的首选药物,但由于这几种药物价格昂贵、治疗成本较高、兽医临床尚未批准,限制了其在兽药临床上的应用。

对109株ESBLs阳性大肠杆菌进行ESBLs基因型的检测结果发现,bla_{TEM}型和bla_{CTX-M}型ESBLs为哈尔滨地区主要的ESBLs流行基因型,这与许颖等^[13]和杜向党等^[14]的检出结果相似,显示在我国主要存在bla_{TEM}和bla_{CTX-M}型ESBLs基因型。而在欧洲各国则以bla_{SHV}和bla_{CTX-M}型为主^[15]。国内外ESBLs的流行基因型不同,进一步揭示了不同国家、不同地区流行的ESBLs基因型存在着差异性。本试验未扩增出bla_{TEM}、bla_{SHV}、bla_{CTX-M}、bla_{OXA}4种基因型的3株ESBLs阳性大肠杆菌是否存在其他ESBLs耐药基因有待进一步的研究。

参考文献:

- 1 苑丽,刘建华,胡功政,等.鸡大肠杆菌TEM和CTX-M型超广谱β-内酰胺酶基因分型研究[J].中国农业科学,2010,43(20):4310-4316.
- 2 汤电,张浩吉,刘继,等.广东地区患病食品动物源大肠杆菌ESBLs和AmpC酶流行分布调查[J].中国兽医学报,2012,32(2):42-47.
- 3 Seiffert S N, Hilty M, Perreten V, et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock:

An emerging problem for human health?[J]. Drug Resistance Updates, 2013, 16(1-2): 22-45.

- 4 Ewers C, Bethe A, Semmler T, et al. Extended-spectrum β-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective[J]. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2012, 18: 646-655.
- 5 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals[S]. Approved Standard-third Edition, 2012.
- 6 王彬婷,夏菁,黄运芳,等.合肥地区动物源致病性大肠杆菌ESBLs和PMQR基因流行分布[J].中国兽医学报,2012,33(4):581-585.
- 7 Zheng H Q, Zeng Z L, Chen S, et al. Prevalence and characterisation of CTX-M β-lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, 39: 305-310.
- 8 Dallenne C, Costa A D, Decre D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in *Enterobacteriaceae*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65: 490-495.
- 9 曲志娜,张颖,李玉清,等.鸡、猪大肠杆菌ESBLs基因型检测及耐药性分析[J].中国农学通报,2013,29(8):50-54.
- 10 Endimiani A, Rossano A, Kunz D, et al. First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2012, 73: 31-38.
- 11 钟钦卿.四川省动物源大肠杆菌质粒介导ESBLs和AmpC酶耐药基因的检测[D].成都:四川农业大学,2012.
- 12 Liu B T, Liao X P, Yue L, et al. Prevalence of β-Lactamase and 16S rRNA methylase genes among clinical *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from Animals[J]. Microbial Drug Resistance, 2013, 19(3): 237-245.
- 13 许颖,李晓庆,江俊,等.产ESBLs大肠埃希菌耐药基因分型研究[J].四川医学,2009,30(9):1363-1366.
- 14 杜向党,焦显芹,莫娟,等.猪源大肠杆菌CTX-M型的分子检测[J].华北农学报,2009,24(2):90-93.
- 15 Zhao W H, Hu Z Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2013, 39(1): 79-101.

