

·短篇论著·

儿童福氏志贺菌超广谱 β 内酰胺酶 CTX-M 基因型的研究高春燕¹, 刘树平¹, 高庆双¹, 王瑶²

摘要 :目的 了解唐山地区产 CTX-M 型超广谱 β 内酰胺酶(ESBLs)福氏志贺菌的流行基因型,为有效预防和控制该类感染提供理论依据。方法 临床分离的无重复产 ESBLs 的福氏志贺菌 43 株,采用 CLSI 推荐的表型筛选和确证试验检测 ESBLs,采用聚合酶链反应(PCR)检测 CTX-M 基因型。结果 43 株产 ESBLs 的福氏志贺菌中,产 CTX-M 基因型的有 19 株(44.2%),经 PCR 扩增及测序,19 株具有 ESBLs 表型的福氏志贺菌中有 17 株表达 CTX-M-14,1 株表达 CTX-M-57,1 株表达 CTX-M-3。结论 唐山地区存在着 CTX-M 基因的流行,应加强唐山地区产 CTX-M 型 ESBLs 菌株的检测。

关键词 福氏志贺菌; ESBLs; CTX-M

中图分类号 R378.2+5 文献标识码 A 文章编号 1009-9727(2012)1-78-02

Characterization of CTX-M-type extended spectrum Beta-lactamase producing *Shigella flexneri* in children. GAO Chun-yan, LIU Shu-ping, GAO Qing-shuang et al. (1. Tangshan Municipal Maternal and Child Care Hospital, Tangshan 063000, Hebei P. R. China)

Abstract Objective To explore the molecular transmission mechanisms of CTX-M type β -lactamases in clinical isolates of *Shigella flexneri* for rational use of antibiotics in clinic. Methods A total of nonrepetitive 43 *Shigella flexneri* isolates with ESBLs were detected by phenotypic confirmatory test based on CLSI criteria for ESBLs. CTX-M gene was detected by PCR. Results The incidences of CTX-M producing were 44.2% in ESBLs producing isolates and the genotypes of these strains included CTX-M-14 (17/19), CTX-M-3 (1/19) and CTX-M-57 (1/19). Conclusion The transmission of CTX-M producing strains force us to investigate intensively and control effectively the CTX-M type ESBLs producing isolates in Tangshan City.

Key word: *Shigella flexneri*; ESBLs; CTX-M

近年来,在超广谱 β 内酰胺酶家族中,CTX-M 型 ESBLs (即头孢噻肟酶)是一类快速增长并有着广泛的地域分布的酶,该酶已成为细菌耐药机制研究的新热点。研究报道,我国 ESBLs 种类与国外不同,主要是 CTX-M 型,其次是 SHV 型,而国外常见的 TEM 型在我国则很少见^[1]。为了解唐山地区临床福氏志贺菌中 CTX-M 型 ESBLs 的发生率、流行情况,本研究对唐山地区的福氏志贺菌临床分离株进行了研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集唐山市妇幼保健院 2007 年 4~11 月收集自儿童腹泻患者大便标本 518 份,分离出福氏志贺菌共 43 株。药敏试验质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25 922。

1.2 ESBLs 检测 参照 CLSI 推荐的纸片确证法检测菌株是否产 ESBLs,如果菌株对头孢他啶(30 μ g)或头孢噻肟(30 μ g)的抑菌圈直径比其加入克拉维酸(10 μ g)后的抑菌圈直径 \geq 5mm,则认为菌株产 ESBLs。对产 ESBLs 的菌株进一步用微量肉汤稀释法测定其 MICs,菌株对头孢他啶或头孢噻肟的 MICs 比其加入克拉维酸后 MICs \geq 8 倍,即菌株表达 ESBLs。所有结果按 CLSI M100-S18(2008)判定。

1.3 PCR 扩增 ESBLs 基因并测序 对于所有经表型检测产 ESBLs 的菌株,PCR 扩增 CTX-M 型酶的基因并测序,引物见

表 1。

表 1 PCR 引物及反应条件

Table 1 PCR primer and reaction condition

扩增基因 Gene	引物 Primer	序列(5' → 3') Sequence	参考文献 Reference
CTX-M-1 组	CTX-M-1 F	GGTAAATAATCACTGCGTC	[2]
	CTX-M-1 R	TTGGTGACGATTTAGCCGC	
CTX-M-2 组	CTX-M-2 F	ATGATGACTCAGAGCATTG	[3]
	CTX-M-2 R	TTATTGCATCAGAAACCGTG	
CTX-M-8 组	CTX-M-8 F	ATGATGACATCGCGTTAAG	[3]
	CTX-M-8 R	CGGTGACGATTTTCGGGCAG	
CTX-M-9 组	CTX-M-9 F	GTGACAAAGAGATGCAACGG	[3]
	CTX-M-9 R	ATGATTCGCGCGCTGAAGCC	
CTX-M-25 组	CTX-M-25 F	CACACGAATTGAATGTTGAG	[3]
	CTX-M-25 R	TCACTCCACATGGTGAGT	

2 结果

2.1 ESBLs 检测 43 株福氏志贺菌中,纸片扩散法检出具有 ESBLs 表型的菌株 19 株(44.2%),这 19 株菌经琼脂稀释法检测,同样具有 ESBLs 表型。

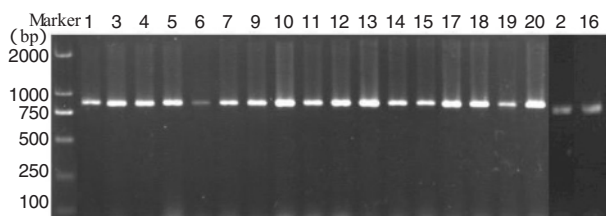
2.2 CTX-M 基因检测 经 PCR 扩增,测序反应由上海生工公司完成,19 株具有 ESBLs 表型的福氏志贺菌中有 17 株表达

基金项目 2010 年唐山市卫生临床科学技术研究与发展指导计划(第一批)(No.10130206a)

作者单位 1.唐山市妇幼保健院检验科,河北 唐山 063000; 2.北京协和医院微生物实验室,北京 100730

作者简介 高春燕(1967~)女,汉族,主管检验技师,主要从事微生物检验研究。

CTX-M-14, 1 株表达 CTX-M-57, 1 株表达 CTX-M-3。见图 1。



注：菌株 2 号、16 号 CTX-M-1 组基因扩增阳性，经测序分别为 CTX-M-3 和 CTX-M-57；其它菌株 CTX-M-9 组基因扩增阳性，经测序均为 CTX-M-14

No.2, No.16 CTX-m-1 gene is identified as CTX-m-3, CTX-m-57 after amplification; other CTX-m-9 gene is identified as CTX-m-14 after amplification

图 1 19 株福氏志贺菌 ESBLs 基因 PCR 扩增电泳图谱

Fig 1 PCR amplification electrophoresis pattern of ESBLs genotypes in 19 *Shigella flexneri* isolates

3 讨论

福氏志贺菌是唐山市妇幼保健院分离自儿童腹泻患者大便标本的主要致病菌，本研究收集的 19 株产 ESBLs 的福氏志贺菌，均产以水解头孢噻肟为主的 CTX-M 型酶，所携带基因型主要为 CTX-M-14。与大多数的 CTX-M 型 ESBLs 相同，CTX-M-14 由于缺少与水解头孢他啶相关的氨基酸位点，仅存在与水解头孢噻肟、头孢曲松密切相关的 237 位点的氨基酸^[4]，因此产酶菌株对于第三代头孢菌素中的头孢他啶与头孢噻肟、头孢曲松的耐药性存在显著差异。我国肠杆菌科菌所产 ESBLs 以 CTX-M 型酶为主，其中又以 CTX-M-3、CTX-M-9、CTX-M-14 为主^[5]。已有报道在我国的福氏志贺菌中检出了 CTX-M-14 型 ESBL，该研究中菌株也对头孢噻肟耐药而对头孢他啶敏感，且经接合实验证明，其耐药性可经质粒水平传播^[6]。本研究收集的 19 株产 ESBLs 的菌株，所分离患者均为儿科病房 1~8 岁患者，分离时间为患者住院后 4~13d，因此菌株所携带 CTX-M-14 型 ESBLs 很有可能来自其它产 CTX-M-14 的肠杆菌科菌。

目前，研究志贺菌产 ESBLs 的报道逐渐增多，已检出不少 CTX-M 基因型，如国内的有熊自忠等^[5]报道检出的 CTX-M-14 型，祝建军等^[7]报道检出 CTX-M-55 型。国外的一些研究中也发现 CTX-M-2 型^[8]、CTX-M-3 型^[9]、CTX-M-14 型^[10]。

本资料 19 株产 ESBL 福氏志贺菌中有 17 株表达 CTX-M-14, 1 株表达 CTX-M-57, 1 株表达 CTX-M-3。其中 CTX-M-57 型为国内首次查到的 ESBLs 基因型。

志贺菌呈多耐药值得关注，儿童用药又有其独自的特点和局限性，使其治疗受到很大限制。CTX-M 型是我国最常见的超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs)，并经常发生暴发流行。福氏志贺菌 CTX-M-9 组 ESBLs 在唐山地区的盛行和 CTX-M-14 型的常见与本地区抗生素的使用、抗生素的选择压力有何关系？有必要对本地区 ESBLs 菌株产生的临床危险因素进行调查，采用有效的临床控制措施，同时应采用分子生物学方法积极阐明细

菌的耐药机制、传播途径和流行发展趋势，有效监控该型产酶株在唐山地区的流行。

参考文献：

- [1] Wang Y, Xu YC, Yang QW et al. Detection of TEM-derived ESBLs in *E. coli* and *K. pneumoniae*: A hospital-based study in China [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science 2008 26 (2) 85-89. (In Chinese)
- (王瑶, 徐英春, 杨启文, 等. 19 家医院大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中 TEM 型 β -内酰胺酶的研究 [J]. 临床检验杂志 2008 26(2): 85-89.)
- [2] Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M et al. Dissemination of CTX-M-Type β -Lactamases among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France [J]. Antimicrob Agents Chemother 2004 48(4): 1249-1255.
- [3] Vasilev V, Japheth R, Yishai R et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Shigella* strains in Israel, 2000-2004 [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006 26: 189-194.
- [4] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat [J]. Clin Microbiol Rev 2001 14: 933-951.
- [5] Ning YZ, Wang H, Sun HL et al. The molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and plasmid-mediated AmpC β -lactamases (p-AmpC) produced by the clinical strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology 2006 26(10): 944-949. (In Chinese)
- (宁永忠, 王辉, 孙宏莉, 等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产生的超广谱 β -内酰胺酶和质粒 AmpC 型 β -内酰胺酶分子流行病学研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志 2006 26(10): 944-949.)
- [6] Xiong ZZ, Li T, Li H et al. Genotype of extended-spectrum β -lactamases in *Shigella flexneri* isolates [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases 2006 24(5): 296-300. (In Chinese)
- (熊自忠, 李涛, 李慧, 等. 福氏志贺菌中超广谱 β -内酰胺酶的基因型分析 [J]. 中华传染病杂志 2006 24(5): 296-300.)
- [7] Zhu JJ, Ye JY, Du YH et al. Identification of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-55 in *Shigella* [J]. Chin J Lab Med 2008 12: 1378-1379. (In Chinese)
- (祝建军, 叶金艳, 杜玉海, 等. 志贺菌属中鉴别出产 CTX-M-55 型菌株 [J]. 中华检验医学杂志 2008 12: 1378-1379.)
- [8] Andres P, Petroni A, Faccone D et al. Extended-spectrum in *Shigella flexneri* from Argentina: first report of TOHO-1 outside Japan. Intern [J]. Antimicrob Agents 2005 25: 501-507.
- [9] Acikgoz ZC, Gulay Z, Bicmen M et al. CTX-M-3 Extended-spectrum β -lactamase in *Shigella sonnei* Clinical Isolate: First Report from Turkey. Scandinavian [J]. Infect Dis 2003 35: 503-505.
- [10] Pai H, Choi E, Lee H et al. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea [J]. Clin Microbiol 2001 39: 3747-3749.

收稿日期 2011-09-20 编辑 吴中菲