

鸡猪源大肠杆菌 CTX - M 型 ESBLs 的分子检测

杜向党¹,焦显芹²,莫娟¹,张素梅¹,侯春彬³,李新生¹

(1. 河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002;2. 郑州市现代农业技术中心,河南 郑州 450002;

3. 郑州牧业工程高等专科学校,河南 郑州 450011)

摘要:为了解河南地区鸡猪源 CTX - M 型超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的流行情况,并进行基因型分析,通过表型确证试验检测产 ESBLs 大肠杆菌,分别用 5 组 CTX - M 型引物对其进行聚合酶链式反应扩增。表型确证试验检测结果显示,鸡、猪源大肠杆菌中产 ESBLs 菌株检出率分别为 62.8 % (59/94) 和 78.3 % (36/46)。PCR 扩增结果进一步显示,鸡源大肠杆菌中 CTX - M 型 ESBLs 阳性率为 89.8 % (53/59),其中 CTX - M - 2 组型 14 株,CTX - M - 9 组型 26 株,CTX - M - 2 和 CTX - M - 9 组型 13 株;猪源大肠杆菌 CTX - M 型 ESBLs 的阳性检出率为 69.4 % (25/36),其中,CTX - M - 2 组型 7 株,CTX - M - 9 组型 17 株,CTX - M - 2 和 CTX - M - 9 组型 1 株。河南地区鸡、猪源大肠杆菌 CTX - M 型 ESBLs 的产生率较高,而以 CTX - M - 2 组型和 CTX - M - 9 组型为主。

关键词:大肠杆菌;耐药;CTX - M

中图分类号:S432 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 - 7091(2009)02 - 0090 - 04

Molecular Detection of CTX - M Type ESBLs Genes among *Escherichia coli* Strains Isolated from Diseased Chickens and Pigs

DU Xiang - dang¹, JIAO Xian - qin², MO Juan¹, ZHANG Su - mei¹, HOU Chun - bin³, LI Xin - sheng¹

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhengzhou Modern Agricultural Technology service Centre, Zhengzhou 450002, China;

3. Zheng zhou college of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China)

Abstract: In order to investigate the epidemiology of extended - spectrum β -lactamases - producing *E. coli* and to detect CTX - M type ESBLs in Henan province, the *E. coli* strains isolated from chickens and pigs were screened for the presence of ESBLs by phenotype confirmatory test, and the CTX - M type ESBLs were detected by PCR. The results indicated the positive rates of ESBLs among *E. coli* stains isolated from chickens and pigs were 62.8 % (59/94) and 78.3 % (36/46), respectively. Further PCR amplification results revealed that the positive rate of the CTX - M type ESBLs in chickens was 89.8 % (53/59). Of them, there were 14 isolates positive for CTX - M - 2 group, 26 isolates for CTX - M - 9 group, 13 isolates for both CTX - M - 2 and CTX - M - 9 group. While, the positive rate of the CTX - M type ESBLs in pigs was 69.44 % (25/36). Of them, there were seven isolates positive for CTX - M - 2 group, 17 isolates for CTX - M - 9 group, one isolate for both CTX - M - 2 and CTX - M - 9 group. The positive rate of CTX - M type ESBLs - producing *Escherichia coli* strains is relatively high in Henan province, with the CTX - M - 2 group and CTX - M - 9 group dominant.

Key words: *Escherichia coli*; Resistance; CTX - M

目前,细菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药问题十分突出。产生超广谱 β -内酰胺酶(Extended spectrum β -lactamases, ESBLs)是细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药最重要的机制^[1]。最初报道的 ESBLs

主要为 TEM 型和 SHV 型,随着新一代 β -内酰胺类抗生素如第三代头孢菌素类药物头孢噻肟在兽医临床上的大量使用,以及头孢曲松、头孢噻肟在兽医临床上的非法使用,细菌产生的能够水解这类抗菌药

收稿日期:2008 - 12 - 01

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAK02A03 - 3);河南省高等学校青年骨干教师资助计划

作者简介:杜向党(1977 -),男,河南南阳人,副教授,博士,主要从事兽医药理学及食品安全研究。

通讯作者:李新生(1969 -),男,河南荥阳人,副教授,博士,主要从事微生物与免疫学教学及研究工作。

物的 ESBLs 逐步被发现,迄今已有 200 多种,其中以 CTX - M 型 ESBLs 传播更为广泛^[2]。根据基因同源性该酶可分为 CTX - M - 1、CTX - M - 2、CTX - M - 8、CTX - M - 9 和 CTX - M - 25 等 5 组^[3]。为了解 CTX - M 型 ESBLs 在临床分离鸡、猪大肠杆菌中的流行情况及其基因型特征,我们对河南地区 2007 年 8 - 10 月临床分离的 94 株鸡源大肠杆菌和 46 株猪源大肠杆菌进行了产 CTX - M 型 ESBLs 监测与分析。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

蛋白胨、酵母粉,购自北京双旋微生物培养基制品厂;麦康凯培养基,购自北京路桥生物技术有限公司;大肠杆菌显色培养基,购自郑州博塞生物技术有限公司;DNA Marker DL2000,购自北京百泰克生物技术有限公司;Premix Taq、Loading Buffer,购自宝生物工程(大连)有限公司;头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶/克拉维酸(CAC/CD)、头孢噻肟/克拉维酸(CTX/CD),以上药敏纸片均为 30 μg/片,购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.2 细菌分离与鉴定

从发病或病死动物的肛门拭子或肝脏采集来自河南中北部 9 地区的病料,经麦康凯培养基初步分离培养,由显色培养基鉴定,共收集到 94 株鸡源大

肠杆菌和 46 株猪源大肠杆菌。

1.3 仪器

2720 Thermal Cycler PCR 扩增仪,购自北京基因有限公司;DYY - 5 型稳压稳流电泳仪、DYCP - 31DN 型琼脂糖水平电泳仪购自北京市六一仪器厂;手提式压力蒸汽消毒器购自上海医用核子仪器有限公司;Y - 875 - S 医用净化工作台购自苏州净化设备公司。

1.4 产 ESBLs 菌株的鉴定

按美国全国临床检验标准委员会(NCCLS)颁布的表型确证试验进行^[4]。将菌株用头孢噻肟和头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶和头孢他啶/克拉维酸做纸片药敏试验。2 对纸片中任意 1 对,含克拉维酸和不含克拉维酸纸片间抑菌圈之差 5 mm,即为确证产 ESBLs 株。

1.5 CTX - M 型基因的 PCR 扩增

1.5.1 模板制备 从 37 过夜培养的营养琼脂平板中,挑取单菌落 2 ~ 4 个,放入 500 μL 的生理盐水中,100 煮沸 10 min,12 000 r/min,离心 5 min,留取上清作为模板。

1.5.2 PCR 扩增引物及条件 根据 CTX - M 型基因编码区的同源性差异将其分为 5 组,并由 GenBank 公布的基因序列确定 5 对不同的特异性引物,由上海申能博彩生物科技有限公司合成。各组 PCR 所用引物及扩增长度见表 1。

表 1 PCR 扩增所用引物

Tab. 1 Primers used for the PCR amplification

引物名称 Primer name	参考基因序列 Genbank accession No.	引物序列 Oligonueotide sequences	扩增长度/bp Length
blaCTX - M - 1	AM003904	F: GCG GTG CTG AAG AAA AGT GAA R: TCC AAC TCC GAC CCA CCT CAT	570
blaCTX - M - 2	Y14156	F: GAT GAG CGT TTT GCG ATG TGC R: ATC TCC GCT GCC GGT TTT ATC	531
blaCTX - M - 8	AF189721	F: GCT GAT TGA CAC CGC CGA TAA R: TGC TCT GGC TGG GTG AAGTAA	660
blaCTX - M - 9	AJ416345	F: TCG CGG TGA TGA ACG CTT TCC R: AGT CGC CGC TGC CGG TCT TAT	539
blaCTX - M - 25	AF518567	F: TTG GCC AGT GTG CCG CTG TGT R: TGG GTA GCC CTG CCT GAA TGC	628

PCR 反应体系为 50 μL,包括 Ex Taq 酶 0.25 μL (1.25 U)、10 × PCR Buffer 5 μL、dNTP 4 μL (0.2 mmol)、上下游引物各 1 μL、模板 20 ~ 100 ng,加双蒸水至 50 μL。CTX - M - 1 组、CTX - M - 2 组、CTX - M - 8 组扩增条件:95 预变性 5 min;94 变性 45 s,59 退火 45 s,72 延伸 30 s,共 32 个循环;最后 72 延伸 10 min。CTX - M - 9 组、CTX - M - 25 组扩增条件:95 预变性 5 min;94 变性 45 s,63 退火 45 s,72 延伸 30 s,共 32 个循环;最后 72 延伸 10 min。每次均设 ATCC 25922 为阴性对照。

1.5.3 PCR 扩增产物电泳 PCR 产物在 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳,电泳电压为 100 V,电泳时间为 30 min。0.05 μg/L 的溴化乙锭染色,凝胶成像分析系统摄像,保存结果。

2 结果与分析

2.1 产 ESBLs 菌株分离率

经表型确证试验鉴定,鸡源大肠杆菌分离株产 ESBLs 的检出率为 62.8 % (59/94)。猪源大肠杆菌分离株产 ESBLs 的检出率为 78.3 % (36/46)。

2.2 PCR扩增结果

鸡、猪源产 ESBLs 鸡源大肠杆菌分离株经设计的 5 组 CTX - M 型 ESBLs 通用引物进行 PCR 检测, 扩增结果见表 2。59 株产 ESBLs 鸡源大肠杆菌分离株中, 共有 53 株 CTX - M 型 ESBLs 阳性, 检出率为 89.8 %。其中, CTX - M - 2 组 14 株, CTX - M - 9 组株 26 株, CTX - M - 2 组和 CTX - M - 9 组 13 株。36 株产 ESBLs 猪源大肠杆菌分离株中, 共有 25 株 CTX - M 组 ESBLs 阳性, 检出率为 69.4 %。其中, CTX - M - 2 组 7 株, CTX - M - 9 组株 17 株, CTX - M - 2 组和 CTX - M - 9 组 1 株。而在鸡、猪源产 ESBLs 大肠杆菌分离株中, CTX - M - 1 组、CTX - M - 8 组和 CTX - M - 25 组均未被检出。CTX - M - 2 组和 CTX - M - 9 组型 ESBLs 的 PCR 扩增产物见图 1。

表 2 鸡猪源大肠杆菌 CTX - M 型 ESBLs 的 PCR 检测

CTX - M 基因亚型 Subgroups of CTX - M gene	阳性检出率/ % The positive rate	
	鸡 Chickens	猪 Pigs
CTX - M - 1 组	0	0
CTX - M - 2 组	23.7 (14/ 59)	19.4 (8/ 36)
CTX - M - 8 组	0	0
CTX - M - 9 组	44.1 (26/ 59)	47.2 (17/ 36)
CTX - M - 25 组	0	0
CTX - M - 2 组 和 CTX - M - 9 组	22.0 (13/ 59)	2.8 (1/ 36)
各组合计	89.8 (53/ 59)	69.4 (25/ 36)

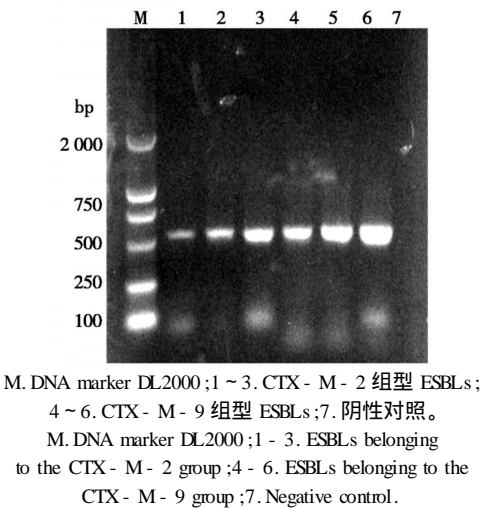


图 1 CTX - M - 2 组和 CTX - M - 9 组型 ESBLs 的 PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis map for PCR products of ESBLs belonging to the CTX - M - 2 group and CTX - M - 9 group

3 讨论

CTX - M 型 ESBLs 属于 Alamber A 类, 优先水解头孢噻肟和头孢曲松。根据氨基酸序列的同源性,

目前 CTX - M 酶分为五大组。CTX - M 酶在许多国家呈现不同的流行趋势, 不同国家和地区流行亚型有很大不同^[5, 6], 同一个国家的不同地区流行亚型也复杂多变。阿根廷主要流行 CTX - M - 2^[7], 英国以 CTX - M - 15 为主^[8]。国内 CTX - M 酶以 CTX - M - 3、CTX - M - 9、CTX - M - 14 为主, 但也有其他基因型存在, 季淑娟等^[9]研究发现在浙江有 8 种 CTX - M 亚型并存, 北京、上海、广州及武汉均有 CTX - M 基因存在的报道^[10 - 14], 说明国内 CTX - M 酶流行状况复杂, 并以高度耐头孢噻肟而对头孢他啶敏感的 CTX - M 型衍生酶占大多数, 现已成为该酶流行的“重灾区”。

笔者本次对河南地区鸡、猪源大肠杆菌分离株进行 ESBLs 表型确证试验, 产 ESBLs 鸡、猪源大肠杆菌分离株检出率分别为 62.8 % 和 78.3 %, 说明本地区猪、鸡源大肠杆菌对三代头孢类药物的耐药性较为严重。PCR 扩增结果进一步显示, 猪、鸡源大肠杆菌 CTX - M 型 ESBLs 的检出率分别为 69.4 % (25/ 36) 和 89.8 % (53/ 59), 也远高于其他地区^[6 - 8]。本试验检测到鸡猪、源大肠杆菌分离株 CTX - M 型 ESBLs 以 CTX - M - 2 组和 CTX - M - 9 组型为主。而在以往文献报道中, 中国地区产 ESBLs 菌株主要以 CTX - M - 1 组和 CTX - M - 9 组居多^[15 - 17], 尚未见有关于 CTX - M - 2 组的报道。本试验检测出较大比例的产 CTX - M - 2 组型 ESBLs 的菌株, 提示鸡、猪源大肠杆菌与医学临床分离的大肠杆菌的 CTX - M 型 ESBLs 分布可能存在一定差异, 其是否存在交叉传播也有待于进一步证实。

- 内酰胺酶的种类和数量正以惊人的速度发展^[15, 17, 18], 各种新酶的不断出现和新 - 内酰胺类抗生素的发展密不可分。在过去的二十余年里, 由于具有广谱抗菌活性的头孢菌素类药物的大量使用, 造成了 ESBLs 在世界范围的流行。尽管目前对 - 内酰胺酶的研究取得了长足的进步, 但许多疑点和难点还有待进一步研究。为了有效地控制细菌产生 ESBLs 和治疗产酶菌株的感染, 一方面我们需要不断研制出更新的抗生素, 然而更重要的是, 应加强对耐药病原菌的监测, 合理使用抗生素, 并密切注意高耐药菌株的出现, 控制耐药菌株的传播。

参考文献:

[1] Bradford P A. Extended - spectrum - Lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 933 - 951.
[2] Jacoby G, Bush K. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended - spectrum and inhibitor resistant - lactamase [EB/OL]. <http://www.lahey.org/Studies>, 2007.

- [3] Pitout J D, Hossain A, Hanson N D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M - lactamases produced by *Escherichia coli* and *klebsiella* spp [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 12: 5715 - 5721.
- [4] NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth information standard M100 - S9 [M]. Pennsylvania: NCCLS, 1999: 101 - 103.
- [5] Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, *et al.* Cefotaxime - resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a Hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M - 3 cefotaxime - hydrolyzing - Lactamase that is closely related to the CTX-M - 1/MEN - 1 enzyme [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 827 - 832.
- [6] Radice M, Power P, Di Conza J, *et al.* Early dissemination of CTX-M - derived enzymes in South America [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46: 602 - 604.
- [7] Quinteros M, Radice M, Gardella N, *et al.* Extended - spectrum - lactamase in *Enterobacteriaceae* in Buenos Argentina, public hospitals [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(9): 2864 - 2867.
- [8] Mushtaq S, Woodford N, Potz N, *et al.* Detection of CTX-M - 15 extended - spectrum - lactamases in the United Kingdom [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52(3): 528 - 529.
- [9] 季淑娟, 陈亚岗, 俞云松, 等. 浙江省超广谱 - 内酰胺大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的基因分型[J]. *中华传染病杂志*, 2005, 23(2): 75 - 78.
- [10] Munday C J, Xiong J, Li C, *et al.* Dissemination of CTX-M type - lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates in the People's Republic of China [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 23: 175 - 180.
- [11] Wang H, Kelkar S, Wu W Y, *et al.* Clinical isolates of enterobacteriaceae producing extended - spectrum - lactamases prevalence of CTX-M - 3 at a Hospital in China [J]. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2003, 47(2): 790 - 793.
- [12] Shen D X, Winoku P, Jones R. Characterization of extended spectrum - lactamases Producing *Klebsiella pneumoniae* from Beijing, China [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 18: 185 - 188.
- [13] Li C R, Li Y, Zhang P A. Dissemination and spread of CTX-M extended spectrum - lactamases among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in central China [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 22: 521 - 525.
- [14] Xiong Z Z, Zhu D M, Wang F, *et al.* Investigation of extended spectrum - lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from China [J]. *Diagn Microbiol and Infect Dis*, 2002, 44: 195 - 200.
- [15] 张盛斌, 刘朝辉. CTX-M 型 ESBLs 的研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2006, 6(3): 212 - 215.
- [16] 高春明, 赵守松, 李家斌, 等. 产 CTX-M 型超广谱 - 内酰胺酶大肠埃希菌分布与耐药性分析[J]. *实用医学杂志*, 2007, 23(11): 1745 - 1747.
- [17] 朱戎冬, 吴伟元, 陈民钧. 超广谱 - 内酰胺酶 CTX-M 型新进展[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2001, 1: 109 - 110.
- [18] 李金钟, 刘利平. CTX-M 型 - 内酰胺酶的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(6): 543 - 546.