

肠杆菌科细菌耐药基因 NDM 和 ESBLs 的检测及 白头翁汤增强其敏感性研究

许二平^{1a}, 刘保光^{1a}, 董颖^{1a}, 白明^{1a}, 谢苗^{1b}, 汪保英^{1a}, 吴华², 李永伟^{1c}

(1.河南中医药大学 a.中医药科学院;b.中医学院;c.第二附属医院,郑州 450046;

2.河南农业大学 动物医学院,郑州 450002)

摘要:采用美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的方法,检测了临床分离的 44 株肠杆菌科细菌产超广谱 β -内酰胺酶(Extended-Spectrum Beta-Lactamases, ESBLs)的情况.利用 PCR 对临床分离菌进行新德里金属 β -内酰胺酶(New Delhi metallo- β -lactamase, NDM)以及 ESBLs 耐药基因的检测.用微量肉汤稀释法测定了分离菌对阿莫西林等 14 种抗菌药的敏感性,并统计其耐药率.结果表明,临床分离的 44 株肠杆菌科细菌中,有 31 株产超广谱 β -内酰胺酶,检出率为 70.5%.耐药基因检测结果显示,耐药基因 NDM-1 携带率为 13.6%.ESBLs 耐药基因 *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, *OXA* 的携带率分别为 100%, 43.2%, 45.5%, 6.8%.同时发现,有 6 株菌株同时检出了含 NDM-1 和 ESBLs 的基因,有 9 株菌株同时检出含有 2 种 ESBLs 基因,3 株同时检出含有 3 种 ESBLs 基因.敏感性测定结果显示,分离菌大多呈现多重耐药,分离菌除对替加环素(18.2%)和阿米卡星(36.4%)的耐药率较低外,对其他药物呈现出较高的耐药率,其中对阿莫西林的耐药率高达 97.7%,对头孢曲松、环丙沙星、土霉素、四环素、红霉素的耐药率均在 75.0%以上.此外发现,同时携带多个耐药基因的菌株耐药率较高.中药复方白头翁汤对分离菌表现出了一定的抑菌活性,其 MIC 值为 204.8 g/L.14 种抗菌药分别与白头翁汤联用后,耐药率均有不同程度下降,其中头孢类药物、氟喹诺酮类药物与白头翁汤联用后,耐药率下降较为明显,如头孢曲松由 84.1%下降至 56.8%,环丙沙星由 75.0%下降至 45.5%.综上,NDM 和 ESBLs 耐药基因在肠杆菌科细菌中已有一定的流行,同时携带 NDM 和 ESBLs 多个耐药基因的菌株耐药较为严重.白头翁汤与抗菌药联用能在一定程度增强耐药菌株的敏感性,为临床相关感染的防治提供理论依据.

关键词:肠杆菌科;超广谱 β -内酰胺酶;白头翁汤;药物敏感性

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

肠杆菌科细菌是人体正常菌群的重要组成部分,多数为条件致病菌,广泛存在于人体的体表和肠道中,它在维持肠道菌群平衡方面起着重要作用^[1-2].此外,这类菌也广泛存在于医院的环境中,它是引起医源性感染的重要病原菌,研究发现导致医院病原菌感染的病例中,有近一半是肠杆菌科细菌导致的感染,可谓危害性极大^[3].2008 年,首次在肠杆菌科细菌导致尿路感染的患者中发现了 NDM,后被命名为 NDM-1 型,它属于一种新型碳青霉烯酶,对包括碳青霉烯类在内的所有 β -内酰胺类抗菌药物耐药^[4].随后,该酶在世界范围内快速播散,给临床医疗及感染防控带来了严重威胁.ESBLs 主要由肠杆菌科细菌产生,大肠杆菌和肺炎克雷伯菌是典型代表,产 ESBLs 是肠杆菌科细菌对 β -内酰胺类药物耐药的重要机制^[5].

当前,产 NDM 和 ESBLs 的肠杆菌科细菌检出率居高不下,菌株的耐药问题变得日趋严峻^[6].寻找不易产生耐药且能恢复耐药菌株敏感性的药物迫在眉睫.中药为中国传统特有药物,具有毒副作用小、不易产生耐药性等特点.同时,很多中药还可以使已经产生耐药性的菌株耐药性降低,从而能够恢复耐药菌株对治疗

收稿日期:2022-01-07;修回日期:2022-04-21.

基金项目:国家自然科学基金(81973739);河南省中医药科学研究专项课题(2019ZY1019;20-21ZY2144);河南省自然科学基金(222300420481).

作者简介:许二平(1962-),男,河南鄱陵人,河南中医药大学教授,博士,博士生导师,主要从事仲景方药配伍及作用机制研究,E-mail:xuerping0371@163.com.

通信作者:许二平;刘保光,E-mail:liubaoguang83@sina.com.

药物的敏感性.中药复方白头翁汤(Pulsatillae Decoction,PD),具有抗菌、消炎、镇痛等药理作用,可用于防治肠杆菌科细菌导致的感染性疾病.据体外抑菌试验研究发现,白头翁汤具有明显的抑菌作用^[7-9].目前,中药复方在对产 NDM 和 ESBLs 肠杆菌科细菌作用机制方面鲜见报道^[10].此外,白头翁汤在对产 NDM 和 ESBLs 肠杆菌科细菌恢复敏感性方面缺乏系统研究.鉴于此,本试验开展肠杆菌科细菌 NDM 和 ESBLs 基因检测、白头翁汤对产 NDM 和 ESBLs 肠杆菌科细菌增强敏感性方面的研究,旨在阐释白头翁汤对产 NDM 和 ESBLs 肠杆菌科细菌恢复敏感性的初步作用,为临床抗感染治疗、医院源产 NDM 和 ESBLs 肠杆菌科细菌感染性疾病防控提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

44 株已鉴定的肠杆菌科细菌于 2020 年 6 至 9 月由河南中医药大学第二附属医院检验科惠赠,分离自 ICU、神经外科和急诊科肺部感染患者的痰液标本.菌株组成包括大肠杆菌 13 株(E1~E13),肺炎克雷伯菌 15 株(K1~K15),绿脓杆菌 10 株(P1~P10),不动杆菌 6 株(A1~A6).菌株鉴定采用德国布鲁克 microflex LT 台式 MALDI-TOF 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪及原装进口配套试剂,鉴定结果分值均大于 2.00.

1.1.2 培养基和试剂

TSA(批号:200620),MH(批号:200426),LB(批号:210215)等培养基购自北京陆桥技术股份有限公司;各种显色培养基(货号:PS820,EC166,AC092,TA870)购自法国科玛嘉公司.2×Taq Master Mix(货号: CW0682C)等购自北京康为世纪有限公司.

1.1.3 药敏纸片及药物

氨曲南(AZT,30 μg/片,批号:20200609)、头孢他啶(CAZ,30 μg/片,批号:20200712)、头孢曲松(CRO,30 μg/片,批号:20200910)、头孢噻肟(CTX,30 μg/片,批号:20210115)、头孢他啶/棒酸(CAZ/CA,30 μg/片,批号:20200918)和头孢噻肟/棒酸(CTX/CA,30 μg/片,批号:20210204)购自北京天坛药物生物技术开发公司.白头翁、黄檗、黄连、秦皮均购自河南中医药大学第三附属医院,经河南中医药大学代丽萍教授鉴定为毛茛科植物白头翁 *Pulsatillae Radix* 的干燥根、芸香科植物黄檗 *Phellodendri Chinensis Cortex* 的干燥根、毛茛科植物黄连 *Coptidis Rhizoma* 的干燥的根、木樨科植物苦枥白蜡树 *Fraxini Cortex* 的干燥的根.常用抗菌药物阿莫西林(Amoxicillin,货号:S26864)、头孢曲松(Ceftriaxone,货号:B24430)、头孢他啶(Ceftazidime,货号:B70108)、头孢吡肟(Cefepime,货号:T48283)、美罗培南(Meropenem,货号:S31659)、环丙沙星(Ciprofloxacin,货号:S17012)、左氧氟沙星(Levofloxacin,货号:S17134)、阿米卡星(Amikacin,货号:S37556)、土霉素(Terramycine,货号:B34615)、多西环素(Doxycycline,货号:S27317)、四环素(Tetracycline,货号:S17051)、替加环素(Tigecycline,货号:S24031)、红霉素(erythromycin,货号:S17002)和林可霉素(Lincomycin,货号:B33847)为标准品或对照品,购自上海源叶生物科技有限公司,均在有效期内.

1.2 方法

1.2.1 肠杆菌科细菌菌株复苏以及 ESBLs 表型检测

菌株复苏:无菌划线接种于血平板上,37 °C 培养 12~16 h,后挑取单菌落接种 LB 肉汤培养基,再培养 12~16 h,而后再次划线接种于显色培养基上纯培养,作为受试菌株.

ESBLs 检测:按照 CLSI^[11]推荐的 ESBLs 初筛和表型确证试验,重复 3 次,取平均值.

1.2.2 耐药基因 NDM,ESBLs 检测

对 NDM 和 ESBLs 耐药基因进行 PCR 扩增(见表 1).反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,72 °C 延伸 45 s,循环 30 次,最后 72 °C 延伸 10 min.PCR 扩增后分别取 7 μL 产物进行电泳,利用凝胶成像系统观察结果.PCR 扩增阳性的基因,经测序验证.

表 1 肠杆菌科细菌分离株耐药基因的引物序列

Tab. 1 Target genes and primers used to amplify resistance genes of Enterobacteriaceae bacteria isolates

基因	引物名称	序列(5'→3')	扩增长度/bp	退火温度/℃	参考文献
NDM-1	NDM-1-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621	56	[12]
	NDM-1-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
TEM	TEM-F	GGGGATGAGTATTCAACATTTCC	861	58	This study
	TEM-R	GGGCAGTTACCAATGCTTAATCA			
SHV	SHV-F	GGTTATGCGTTATATTGCGCTGTG	861	56	This study
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCGATCA			
CTX-M	CTX-M-F	GGGCTGAGATGGTGACAAAGAG	876	56	This study
	CTX-M-R	CGTGCGAGTTTCGATTTATTCAAC			
OXA	OXA-F	TGAAGGGTTGGGCGATTT	831	58	This study
	OXA-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCGATCA			

注:F,上游引物;R,下游引物.

1.2.3 敏感性试验检测

1.2.3.1 药液配制

精确称取各抗菌药物溶解于无菌水中,配成质量浓度为 1 280 mg/L 的储备液, -20 ℃ 保存,备用.白头翁汤储备液的配制:按照白头翁汤组方比例取 4 味药材 90 g,加入 6 倍体积水浸润,然后添加 10 倍体积的水加热煮沸,煮沸后改文火煎煮 1 h;过滤,滤渣再加 8 倍体积水煎煮 1 h;过滤,取上清液,合并 2 次药液,减压浓缩为 43.95 mL,即质量浓度为 2 048 g/L 的储备液,5 000 r/min 离心 15 min;取上清液,再次离心取上清液,流通空气灭菌 20 min, -20 ℃ 保存,备用.

1.2.3.2 菌液准备

挑取纯培养菌液接种 MH 肉汤,于 37 ℃ 过夜培养,挑取 3~5 个纯菌落于 5 mL 去离子水中,经比浊使其达到 0.5 麦氏单位(约为 1×10^8 cfu/mL),使用前将菌液稀释 1 000 倍.

1.2.3.3 药物敏感性测定

采用微量稀释法,测定阿莫西林等 14 种抗菌药物和白头翁汤的最小抑菌浓度(MIC),再分别测定以上 14 种药物与白头翁汤(1/2MIC)联用的 MIC.替加环素耐药临界值按照欧洲药物敏感性检测委员会(EUCAST)标准^[13]来判读,其余抗菌药物耐药临界值 CLSI 标准^[11]来判读.此后,进行耐药率统计.

2 结果与分析

2.1 ESBLs 检测结果

根据初筛试验结果,13 株大肠杆菌菌株均为疑似产 ESBLs 菌株;15 株肺炎克雷伯菌菌株除 K9 外,其余 14 株为疑似产 ESBLs 菌株;10 株绿脓杆菌菌株除 P3 外,其余 9 株为疑似产 ESBLs 菌株;6 株绿脓杆菌菌株除 A4, A5 外,其余 4 株为疑似产 ESBLs 菌株.可见,44 株受试菌株中除 K9, P3, A4, A5 菌株外,其余 40 株为疑似产 ESBLs 菌株.

40 株疑似产 ESBLs 菌株的表型确证结果(表 2).40 株疑似产 ESBLs 菌株中有 31 株被确认为产 ESBLs 菌株,检出率为 70.5%.

2.2 耐药基因 NDM 和 ESBLs 检测结果

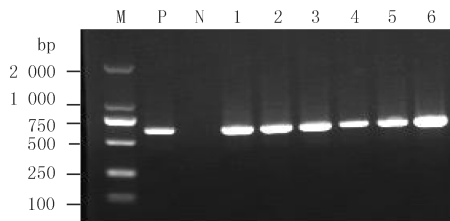
耐药基因在 44 株肠杆菌菌株中有不同程度的检出,金属 β -内酰胺酶耐药基因 NDM-1 携带率为 13.6%,其中,在大肠杆菌、绿脓杆菌、不动杆菌菌株中均有检出.ESBLs 耐药基因 TEM, SHV, CTX-M, OXA 的携带率分别为 100%, 43.2%, 45.5%, 6.8%,其中耐药基因 TEM 在 44 株肠杆菌菌株中被全部检出,耐药基因 OXA 的检出率较低(6.8%).同时还发现有 6 株菌株同时检出了含 NDM-1, ESBLs 的基因,有 9 株菌株同时检出含有 2 种 ESBLs 基因,3 株同时检出含有 3 种 ESBLs 基因.部分菌株耐药基因检测结果见图 1 至图 4.

表 2 40 株肠杆菌科细菌疑似产 ESBLs 菌株的表型确证试验结果

Tab. 2 Phenotype confirmatory test results of 40 doubt ESBLs-producing enterobacteriaceae strains

mm

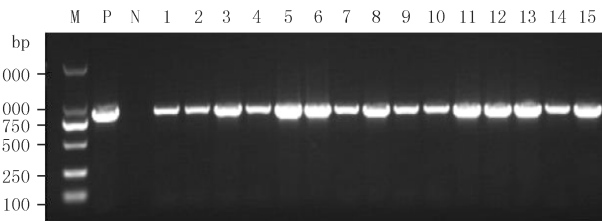
菌株	头孢噻肟	头孢噻肟/棒酸	头孢他啶	头孢他啶/棒酸	菌株	头孢噻肟	头孢噻肟/棒酸	头孢他啶	头孢他啶/棒酸
E1	7	32	22	29	K8	18	19	22	22
E2	28	35	25	34	K10	19	19	20	20
E3	8	29	12	30	K11	11	26	16	24
E4	12	30	15	30	K12	22	25	22	22
E5	7	17	7	12	K13	6	14	7	12
E6	6	17	6	12	K14	7	14	7	12
E7	10	31	19	28	K15	7	13	7	12
E8	8	24	16	33	P1	6	25	15	30
E9	28	33	25	33	P2	6	32	18	30
E10	12	34	23	31	P4	11	25	20	26
E11	6	22	13	22	P5	12	20	20	22
E12	25	30	22	26	P6	11	20	19	22
E13	28	31	22	30	P7	10	21	20	21
K1	19	20	18	20	P8	7	17	18	20
K2	6	12	6	12	P9	10	20	19	20
K3	6	11	6	8	P10	10	17	22	23
K4	11	16	6	8	A1	20	21	22	22
K5	26	28	22	25	A2	19	28	16	27
K6	28	28	26	26	A3	6	6	15	16
K7	7	21	20	22	A6	6	9	15	16



M. DM2000; P. 阳性对照; N. 阴性对照; 1至6 依次为E5, E6, P9, P10, A2, A4菌株.

图1 基因NDM-1扩增结果(621 bp)

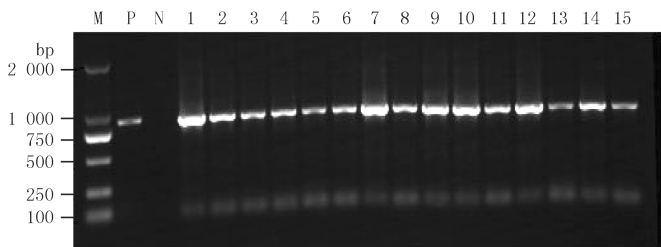
Fig. 1 Amplification of the *NDM-1* gene(621 bp)



M. DM2000; P. 阳性对照; N. 阴性对照; 1至15为 携带基因TEM的阳性菌株.

图2 基因TEM扩增结果(861 bp)

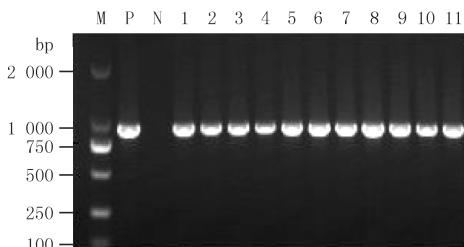
Fig. 2 Amplification of the *TEM* gene(861 bp)



M. DM2000; P. 阳性对照; N. 阴性对照; 1至15为携带 基因SHV的阳性菌株.

图3 基因SHV扩增结果(861 bp)

Fig. 3 Amplification of the *SHV* gene(861 bp)



M. DM2000; P. 阳性对照; N. 阴性对照; 1至15为 携带基因CTX-M的阳性菌株.

图4 基因CTX-M扩增结果(861 bp)

Fig. 4 Amplification of the *CTX-M* gene(861 bp)

2.3 敏感性试验测定结果

MIC 结果显示,分离株大多呈现多重耐药,尤其大肠杆菌、肺炎克雷伯菌和绿脓杆菌耐药较为严重.中药复方白头翁汤对肠杆菌科细菌具有一定的抑菌活性,其 MIC 值为 204.8 g/L.由表 3 可知,分离株除对替加环素(18.2%)和阿米卡星(36.4%)的耐药率较低外,对其他药物呈现出较高的耐药率,其中对阿莫西林的耐药率高达 97.7%,对头孢曲松、环丙沙星、土霉素、四环素、红霉素的耐药率均在 75%以上,对林可霉素、多西环素、左氧氟沙星、美罗培南、头孢他啶的耐药率也在 50%以上.此外发现,同时携带多个耐药基因的菌株耐药率较高.

由表 3 显示,14 种抗菌药分别与白头翁汤联用后,耐药率均有不同程度下降,其中头孢类药物、氟喹诺酮类药物与白头翁汤联用后,耐药率下降较为明显,如头孢曲松由 84.1%下降至 56.8%,环丙沙星由 75.0%下降至 45.5%.

表 3 14 种抗菌药与白头翁汤联用对肠杆菌科细菌的体外抑菌活性($n=240$)

Tab. 3 In vitro activities of 14 antimicrobial agents combined with Pulsatilla decoction against Enterobacteriaceae strains($n=240$)

药物	耐药菌株	MIC 折点/ $(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	耐药率/%	抗菌药与白头翁汤联用耐药率/%
阿莫西林(Amoxicillin)	43	≥ 32	97.7	93.2
头孢曲松(Ceftriaxone)	37	≥ 64	84.1	56.8
头孢他啶(Ceftazidime)	29	≥ 32	65.9	52.3
头孢吡肟(Cefepime)	31	≥ 32	70.5	59.1
美罗培南(Meropenem)	22	≥ 8	50.0	31.8
环丙沙星(Ciprofloxacin)	33	≥ 4	75.0	45.5
左氧氟沙星(Levofloxacin)	25	≥ 8	56.8	43.2
阿米卡星(Amikacin)	16	≥ 64	36.4	29.5
土霉素(Terramycin)	39	≥ 16	88.6	68.2
多西环素(Doxycycline)	29	≥ 16	65.9	54.5
四环素(Tetracycline)	36	≥ 16	81.2	68.2
替加环素(Tigecycline)	8	> 0.5	18.2	11.4
红霉素(Erythromycin)	39	≥ 8	88.6	79.5
林可霉素(Lincomycin)	28	≥ 4	63.6	56.8

注:复配药物质量浓度按第一个药物计算,白头翁汤质量浓度为 102.4 mg/mL(1/2MIC).

3 讨论

肠杆菌科细菌是广泛存在于自然界的条件致病菌,同时又是医源性感染的重要病原菌.当机体免疫功能受损或寄居条件发生改变时,肠杆菌科细菌便大量增殖,继而能引起感染.据相关报道,肠杆菌科细菌中检出率最高的是大肠杆菌和肺炎克雷伯菌,也是产 ESBLs 的常见菌株^[14-15].随着抗菌药物广泛应用于临床,耐药菌株日趋呈上升态势,特别是肠杆菌科细菌中产 NDM 和 ESBLs 菌株日益增多,这给临床感染的防治带来了巨大挑战.因此,及时掌控产酶菌株的流行和耐药特征,有效防止耐药菌株在医院的感染及流行具有重要意义.

本试验 ESBLs 检测采用 CLSI 推荐方法,具有方便、快速、特异性较高等优点,适合实验室和临床推广检测使用.ESBLs 是能水解青霉素类、头孢菌素类药物,但能被 β -内酰胺酶抑制剂如舒巴坦、克拉维酸所抑制的一类酶^[16-17].本研究发现产 ESBLs 的检出率 70.5%,这高于文献^[18]报道的产 ESBLs 大肠杆菌检出率 42.19%.另据研究得知,从 798 株肠杆菌中检出产 ESBLs 菌株 160 株,检出率为 20.05%.其中,大肠杆菌的检出率为 61.25%(98/160)^[19].

本研究显示,耐药基因 NDM-1 在大肠杆菌、绿脓杆菌、不动杆菌菌株中均有检出,携带率为 13.6%,这与以往报道检出结果相一致^[20-21].据崔小璠等^[22]研究发现,从 178 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌菌株中检出产 NDM 菌株 22 株,检出率为 12.4%.另有研究发现,从 153 株肠杆菌科细菌菌株中检出产 NDM 菌株

2 株,检出率为 1.3%^[23].ESBLs 的基因型种类较多,按照同源性可分为 *TEM*,*SHV*,*CTX-M*,*OXA* 等多种型别^[24].本试验发现,ESBLs 耐药基因中检出率最高的是 *TEM* 型(100%),这与曾利娟^[2] 研究报道检出率最高的是 *CTX-M* 型(81%)有一定差异,推测可能是不同地区、不同医院的菌株流行的 ESBLs 基因型存在一定差异,或可能与本试验受试菌株的数量以及与不同地区、不同医院抗生素的使用情况不同有一定关系,后续应加大样本量进一步研究.本研究还发现,有部分菌株同时携带了 *NDM-1* 和 ESBLs 的基因,在同一菌株发现了含 2 种以上 ESBLs 基因,这从中揭示了产 NDM 和 ESBLs 肠杆菌科细菌所含耐药基因存在一定的复杂性,这警示我们在临床中应合理用药,并及时加强耐药性检测.

近年来,关于肠杆菌科细菌的耐药性报道较多,本研究发现,分离菌株大多呈现多重耐药,这与有关报道结果一致^[25-26].本研究显示肠杆菌科细菌对常用抗菌药物呈现出较高的耐药率,这与文献^[18,27]结果一致.研究发现产 ESBLs 的肠杆菌菌株对阿莫西林、头孢曲松的耐药率达 79%,产 ESBLs 的肠杆菌菌株出现多重耐药的比例达 47%^[28].另有研究发现产 ESBLs 菌株耐药现象严重,其中大肠杆菌对四环素的耐药率超过 70%,肺炎克雷伯菌对氨苄西林耐药率几乎达 100%^[2].同时,也警示我们在治疗肠杆菌科细菌引起相关感染时应慎用或停止使用这些药物.研究发现用替加环素对多重耐药的肠杆菌菌株进行体外抗菌活性测定时,替加环素对肺炎克雷伯菌的耐药率为 6.7%^[29].产 ESBLs 菌株(大肠杆菌和肺炎克雷伯菌)对美罗培南和阿米卡星的耐药率都在 8% 以下^[2].目前,虽然替加环素对多重耐药的肠杆菌菌株具有良好的抗菌活性,也应注意在使用时必须谨慎,同时做好耐药性的监测.此外,不同地区、不同医院来源的病原菌分布存在一定差异,这可能与该地区、该医院所使用的抗菌药物种类有一定关联.同时,产 NDM 和 ESBLs 肠杆菌科细菌的分离率、耐药率和携带基因因不同地区、不同医院也存在一定差异^[30].本研究还发现,同时携带多个耐药基因的菌株耐药率较高.细菌携带多个耐药基因,具有不同的耐药表型,表现出一定的多种耐药^[31].总之,产 NDM 和 ESBLs 菌株的出现给临床治疗带来一定难度.

本研究发现,中药复方白头翁汤对肠杆菌科细菌表现出了一定的抑菌活性,与抗菌药联用能在一定程度增强耐药菌株的敏感性.所以在临床使用抗菌药物防治相关感染性疾病效果不好或无效时,不妨考虑使用中药与西药联合的方案,以求增效或恢复敏感性.此外,还可将 β -内酰胺类药物与酶抑制剂,如克拉维酸、舒巴坦等联合用药.此外,在临床用药时要注意,尽量不要长期使用某一药物,应选用敏感或高敏的药物,有条件时最好做药敏试验,还应考虑交叉用药或定期轮换用药等方法.

参 考 文 献

- [1] ROZWANDOWICZ M, BROUWER M, FISCHER J, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(5): 1121-1137.
- [2] 曾利娟. 某院产超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌目细菌的耐药性及基因型分析[J]. 中国药物与临床, 2021, 21(22): 3775-3777.
ZENG L J. Resistance and genotype analysis of Enterobacteria producing Extended-spectrum β -Lactamases in a hospital[J]. Chin Rem Clin, 2021, 21(22): 3775-3777.
- [3] TAMMA P D, KAZMI A, BERGMAN Y, et al. The Likelihood of Developing a Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infection during a Hospital Stay[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(8): e00757.
- [4] YONG D, TOLEMAN M A, GISKE C G, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [5] BRADFORD P A. Extended-spectrum β -Lactamases in the 21st Century: characterization, Epidemiology, and Detection of this important resistance threat[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 933-951.
- [6] 梁唤唤, 金海萍, 边保华. 157 株剖宫产术后感染肺炎克雷伯菌产 ESBLs 和 AmpC 酶及耐药性分析[J]. 药物流行病学杂志, 2019, 28(6): 385-388.
LIANG H H, JIN H P, BIAN B H. Analysis of ESBLs and AmpC Enzyme Production and Drug Resistance of 157 Strains of Klebsiella pneumoniae Infected after Cesarean Section[J]. Chin J Pharmacoepidemiol, 2019, 28(6): 385-388.
- [7] 杨明凡, 高航, 万博, 等. 猪源大肠杆菌分离鉴定及白头翁汤对其抑菌试验[J]. 中国兽医杂志, 2019(5): 55-57.
YANG M F, GAO H, WAN B, et al. Isolation and identification of Escherichia coli from Swine and inhibition effect of Pulsatilla Decoction[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019(5): 55-57.
- [8] 杨雪贞, 姚红艳, 马卫红, 等. 白头翁汤对鸡实验性禽巴氏杆菌的抗感染作用[J]. 动物医学进展, 2019(5): 62-66.

- YANG X Z, YAO H Y, MA W H, et al. Antiinfection effect of Pulsatilla decoction on experimental *Pasteurella multocida* infection in chickens[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019(5): 62-66.
- [9] 王丽, 陶兴宝, 欧阳净, 等. 白头翁汤对痢疾杆菌的体外抑菌作用研究[J]. *中医药信息*, 2020, 37(5): 49-53.
- WANG L, TAO X B, OUYANG J, et al. Bacteriostasis in vitro effect of Baitouweng Decoction on *Shigella dysenteriae*[J]. *Information on Traditional Chinese Medicine*, 2020, 37(5): 49-53.
- [10] 郭海涛, 陈鹏举, 王哲. 中药组方榆杞散对产 ESBLs 大肠杆菌的抑菌机理研究[J]. *中国家禽*, 2018(21): 51-54.
- GUO H T, CHEN P J, WANG Z. Study on bacteriostatic action of Chinese herbal medicine Yuzhisan against ESBLs-producing *E. coli*[J]. *China Poultry*, 2018(21): 51-54.
- [11] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100[M]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [12] KHORSI K, MESSAI Y, HAMIDI M, et al. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like and blaNDM-1 in Algiers hospitals[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8(6): 438-446.
- [13] EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.[EB/OL].[2022-01-11]. <http://www.eucast.org>.
- [14] KARAM M A, HABIBI M, BOUZARI S. Urinary tract infection; Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Mol Immunol*, 2019, 108: 56-67.
- [15] DAY M J, HOPKINS K L, WAREHAM D W, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(12): 1325-1335.
- [16] 刘保光, 刘建华, 吴华, 等. 舒巴坦钠和 EDTA 使产 ESBLs 鸡大肠杆菌恢复对抗菌药物敏感性[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2010(3): 326-329.
- LIU B G, LIU J H, WU H, et al. Recovery of antibacterial sensitivity of ESBLs-producing fowl *E. coli* by sulbactam and EDTA[J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2010(3): 326-329.
- [17] 刘保光, 肖尚修, 吴华, 等. 鸭大肠杆菌超广谱 β -内酰胺酶的检测及药物敏感性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2010(9): 188-191.
- LIU B G, XIAO S X, WU H, et al. The ESBLs detection of duck *E. coli* and drug susceptibility analysis[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010(9): 188-191.
- [18] 李苑芳, 谢桂扬. 产 ESBLs 大肠埃希菌的医院感染分布及其耐药性研究[J]. *海南医学*, 2021, 32(10): 1279-1282.
- LI Y F, XIE G Y. Distribution and drug resistance of ESBLs-producing *Escherichia coli* in nosocomial infection[J]. *Journal of Hainan Medical University*, 2021, 32(10): 1279-1282.
- [19] 曲新明. 某院产超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌科细菌的临床分布与耐药性分析[J]. *中国现代药物应用*, 2021, 15(16): 247-249.
- QU X M. Clinical distribution and resistance analysis of extended-spectrum β -lactamase Enterobacteriaceae from a hospital[J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2021, 15(16): 247-249.
- [20] PEREZ-VAZQUEZ M, SOLA C P J, ADRIANA O, et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding blaNDM-like genes as determined by WGS[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(12): 3489-3496.
- [21] LI X, FU Y, SHEN M Y, et al. Dissemination of blaNDM-5 gene via an IncX3-type plasmid among non-clonal *Escherichia coli* in China[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018, 7: 59.
- [22] 崔小璠, 刘蕊, 刘慧敏, 等. 2017—2019年某院肠杆菌科细菌检出特征及耐药基因检测[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021(16): 2411-2415.
- CUI X F, LIU R, LIU H M, et al. Detection characteristics and drug resistance genes of Enterobacteriaceae bacteria in a hospital between 2017 to 2019[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2021(16): 2411-2415.
- [23] CAYCI Y T, BIYIK I, KORKMAZ F, et al. Investigation of NDM, VIM, KPC and OXA-48 genes, blue-carba and CIM in carbapenem resistant Enterobacteriales isolates[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2021, 15(5): 696-703.
- [24] SUTHERLAND C A, NICOLAU D P. Potency of parenteral antimicrobials including ceftolozane/tazobactam against nosocomial respiratory tract pathogens: considerations for empiric and directed therapy[J]. *J Thoracic Dis*, 2017, 9(1): 214-221.
- [25] VINODHKUMAR O R, KARIKALAN M, ILAYARAJA S, et al. Multi-drug resistant (MDR), extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing and carbapenem resistant *Escherichia coli* in rescued Sloth bears (*Melursus ursinus*), India[J]. *Vet Res Commun*, 2021, 45: 163-170.
- [26] HOMEIER-BACHMANN T, HEIDEN S E, LVBCKE P K, et al. Antibiotic-resistant enterobacteriaceae in wastewater of abattoirs[J]. *Antibiotics*, 2021, 10(5): 568.
- [27] 孔庆飞, 班立芳, 张明兰, 等. 河南省部分传染病医院临床标本分离肠杆菌分布特点及耐药性分析[J]. *中国消毒学杂志*, 2021(7): 534-537.
- KONG Q F, BAN L F, ZHANG M L, et al. Distribution characteristics and drug resistance analysis of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens in some infectious disease hospitals in Henan Province[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2021(7): 534-537.
- [28] ONDURU O G, ABOUD S, NYIRENDA T S, et al. Antimicrobial susceptibility testing profiles of ESBL-producing Enterobacteriales isola-

ted from hospital and community adult patients in Blantyre, Malawi[J]. *IJID Regions*, 2021, 45: 47-52.

- [29] MOHANTY S, MAHAPATRA A. In vitro activity of tigecycline against multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolates from skin and soft tissue infections[J]. *Ann Med Surg*, 2021, 62(2): 228-230.
- [30] III J P L, CLARK N M, ZHANEL G G. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases)[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2013, 14(2): 199-210.
- [31] GNIADKOWSKI M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7(11): 597-608.

Detection of resistance gene NDM and ESBLs of Enterobacteriaceae and study on its sensitivity enhanced by *Pulsatilla* decoction

Xu Erping^{1a}, Liu Baoguang^{1a}, Dong Ying^{1a}, Bai Ming^{1a}, Xie Miao^{1b}, Wang Baoying^{1a}, Wu Hua², Li Yongwei^{1c}

(1. a. Academy of Chinese Medical Sciences; b. College of Traditional Chinese Medicine; c. The Second Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)-producing from 44 strains of Enterobacteriaceae were detected by using the method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) and ESBLs resistance genes were detected in clinical isolates by PCR. The susceptibility of the isolates to 14 kinds of antibacterial drugs such as amoxicillin was determined by the micro-broth dilution method, and the resistance rate was calculated. The results showed that among the 44 strains of Enterobacteriaceae, 31 strains produced ESBLs, and the detection rate was 70.5%. The results of resistance gene detection showed that the carrier rate of resistance gene *NDM-1* was 13.6%. The carrier rates of ESBLs resistance genes *TEM*, *SHV*, *CTX-M* and *OXA* were 100%, 43.2%, 45.5% and 6.8%, respectively. At the same time, it was found that 6 strains were detected with *NDM-1* and ESBLs genes, 9 strains were detected with 2 ESBLs genes, and 3 strains were detected with 3 ESBLs genes. The results of susceptibility testing showed that most of the isolates showed multi-drug resistance, and the isolates showed high resistance rates to other drugs except for tigecycline (18.2%) and amikacin (36.4%). Among them, the resistance rate to amoxicillin was as high as 97.7%, and the resistance rate to ceftriaxone, ciprofloxacin, oxytetracycline, tetracycline and erythromycin were all above 75.0%. In addition, it was found that the strains carrying multiple resistance genes at the same time had a higher resistance rate. The traditional Chinese medicine compound *Pulsatilla* Decoction showed a certain antibacterial activity against the isolated bacteria, and its MIC value was 204.8 g/L. After 14 kinds of antibacterial drugs were used in combination with *Pulsatilla* Decoction, the drug resistance rates decreased to varying degrees. Among them, cephalosporins and fluoroquinolones were used in combination with *Pulsatilla* Decoction, and the drug resistance rates decreased significantly. For example, ceftriaxone dropped from 84.1% to 56.8%, and ciprofloxacin dropped from 75.0% to 45.5%. In conclusion, NDM and ESBLs resistance genes have been prevalent in Enterobacteriaceae, and strains carrying multiple NDM and ESBLs resistance genes are more resistant. The combination of *Pulsatilla* Decoction and antibacterial drugs can enhance the sensitivity of resistant strains to a certain extent, providing a theoretical basis for the prevention and treatment of clinically related infections.

Keywords: Enterobacteriaceae; ESBLs; *pulsatilla* decoction; antimicrobial susceptibility

[责任编辑 刘洋 杨浦]