

# 高校学生宿舍室内空气中产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌分离株 ERIC-PCR 指纹图谱分析

李晓霞<sup>1Δ</sup> 付丽娅<sup>2Δ</sup> 邱玉玉<sup>1\*</sup> 于爱莲<sup>1</sup> 张忠<sup>1</sup> 杨春贵<sup>1</sup>  
潘少波<sup>1</sup> 于广福<sup>1</sup> 赵英会<sup>1</sup>

(1. 泰山医学院 基础医学院 山东 泰安 271000)

(2. 新泰市人民医院呼吸内科 山东 新泰 271200)

**摘要:** 【目的】了解大学生宿舍空气中产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌的检出率和分离株之间的遗传相似性, 为预防和控制传染病的传播提供依据。【方法】用 FA-1 型六级筛孔撞击式空气微生物采样器采集大学生宿舍内室内空气并分离鉴定其中的产 ESBLs 大肠埃希菌, 采用 ERIC-PCR 扩增基因组 DNA, 形成聚类图谱, 分析分离株的相似性。【结果】从收集到的 300 份空气样品中分离鉴定出 194 株大肠埃希菌, 30 株鉴定为超广谱  $\beta$ -内酰胺酶分离株, 检出率达 15.46%; 产 ESBLs 大肠埃希菌 ERIC-PCR 指纹图谱条带相似性在 50%–100% 之间。【结论】大学生宿舍空气中存在着产 ESBLs 大肠埃希菌污染, 应加强对空气中大肠埃希菌耐药性监测。

**关键词:** 空气, 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs), 大肠埃希菌, 细菌基因间重复共有序列 PCR (ERIC-PCR)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81101307); 泰山医学院校级面上基金项目(No. 2010ZR035, 2010ZR070); 泰山医学院高等科研计划项目(No. 2012GCC15)

\*通讯作者: Tel: 86-10-6222493; 信箱: yyqiu@tsmc.edu.cn

Δ共同第一作者

收稿日期: 2012-12-16; 接受日期: 2013-04-02

# Analysis of ERIC-PCR fingerprints of extended-spectrum $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in the air of college student's dormitories

LI Xiao-Xia<sup>1Δ</sup> FU Li-Ya<sup>2Δ</sup> QIU Yu-Yu<sup>1\*</sup> YU Ai-Lian<sup>1</sup> ZHANG Zhong<sup>1</sup>  
YANG Chun-Gui<sup>1</sup> PAN Shao-Bo<sup>1</sup> YU Guang-Fu<sup>1</sup> ZHAO Ying-Hui<sup>1</sup>

(1. School of Basic Medicine Sciences, Taishan Medical University, Tai'an, Shandong 271000, China)

(2. Department of Respiratory of Xintai People Hospital, Xintai, Shandong 271200, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate airborne extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs) producing *Escherichia coli* (*E. coli*) infection situation in the student dormitory in Chinese university and to analysis genetic similarities between different strains, and then provide a practical basis for preventing and controlling infectious diseases. [Methods] The air samples were collected by FA-1 six-stage microbial samplers in the different traditional student dormitory, *E. coli* strains were isolated and identified from the air samples, and then the enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) fingerprints of ESBLs-producing *E. coli* were analyzed. [Results] 194 strains of *E. coli* were isolated from 300 air samples, 30 strains of ESBLs-producing *E. coli* were founded and the resistant rate was 15.46%. The genetic similarity index of ESBLs-producing *E. coli* was 50%–100%. [Conclusion] The air in the student dormitory in university was contaminated by ESBLs-producing *E. coli*. The results stress the need for surveillance of the antibiotics resistance of *E. coli* in the air.

**Keywords:** Air, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs), *Escherichia coli* (*E. coli*), Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR)

目前, 室内微生物污染已成为重要的环境卫生问题, 成为人们关注的热点之一<sup>[1]</sup>。高校学生宿舍是学生集中的场所, 高校的大学生每天至少有 8 小时是在宿舍里度过的, 宿舍内的空气质量直接影响着学生的身心健康<sup>[2-3]</sup>。加强对高校校园内各个场所, 尤其对宿舍的卫生监督和监测, 对预防和控制传染病的传播有积极作用。

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)是人和动物肠道中的一种共栖菌, 随着粪便排出而污染环境, 是环境、水、食品等污染的重要指示细菌, 其中致病性大肠埃希菌能够通过消化道、接触感染,

也能够通过呼吸道感染<sup>[4-5]</sup>, 也可作为评估空气质量的指示细菌<sup>[6]</sup>。目前在临床上广泛应用广谱抗菌药物来治疗大肠埃希菌病, 耐药性问题越来越突出, 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)大肠埃希菌的相关医学研究较多, 但大都集中研究痰液、尿标本、咽拭子等医院临床标本及食品动物源大肠埃希菌<sup>[7-9]</sup>, 而对于环境空气中的产 ESBLs 大肠埃希菌的研究却很少。为了解大学生宿舍空气中产 ESBLs 大肠埃希菌的检出率和分离株之间的相似性, 本研究在某高等院校学生宿舍中收集气体标本并分离

其中产 ESBLs 大肠埃希菌,应用细菌基因间重复共有序列 PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR, ERIC-PCR)对产 ESBLs 大肠埃希菌菌株之间的遗传相似性进行了初步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

麦康凯 3 号和 LB 培养基均购自英国 Oxoid 公司; ESBLs 检测试剂盒购自杭州天和微生物试剂有限公司; API 20 E 购自法国梅里埃公司; DL2000 Marker、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、MgCl<sub>2</sub> 等 PCR 试剂均购自大连宝生物公司。

FA-1 型六级筛孔撞击式空气微生物采样器购自辽宁省辽阳市康洁仪器研究所; AG22331 Hamburg 型 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司; PowerPac Basic 型电泳仪购自法国 Bio-Rad 公司; 自动凝胶图像分析仪购自法国 Vilber 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 空气样品收集:** 于 2012 年春季 4 月 1 日-20 日,在山东省泰安市某高校的男生和女生宿舍的一楼及六楼分别随机选取 5 个宿舍,共在 20 个学生宿舍采集气体样本。按照《室内空气质量标准》(GB/T 18883-2002)的要求选取采样点;采样方法采用撞击法<sup>[10]</sup>,用 FA-1 型六级筛孔撞击式空气微生物采样器收集空气样品,选择麦康凯 3 号琼脂为大肠埃希菌采样介质,气流速度 28.3 L/min,采样高度距离地面约为 1 m,采样时间为 10 min。采样于清扫 2 h 后、关闭门窗条件下进行。在房间中央同时采用 2 台收集器朝同一方向采集,收集完毕立刻将平皿放置培养箱,37 °C 需氧培养 24-48 h。采样器使用前用 70%酒精棉球擦拭消毒。在收集空气样本的同时记录下当时的温度和相对湿度。

**1.2.2 大肠埃希菌的分离鉴定:** 参照文献[11],将采集气体样本的麦康凯琼脂平板置 37 °C 条件

下培养 24 h,所有红色菌落经过 KOH 反应试验鉴定其是革兰氏阴性菌还是革兰氏阳性菌。所有革兰氏阴性菌进行革兰氏染色镜检后,将革兰氏阴性短杆菌的菌株接种麦康凯培养基上进行一次纯培养,然后用 API 20 E 鉴定。鉴定的菌株 -20 °C 条件下保存备用。

**1.2.3 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的检测:** 按照 ESBLs 检测试剂盒说明进行。待测菌株制成菌悬液,浊度为 0.5 麦氏单位,菌液接种 MH 平板,将试条头孢噻肟和头孢噻肟/克拉维酸组合,头孢他啶和头孢他啶/克拉维酸组合贴在平板表面,滤纸片一面接触培养基,胶片面朝上。两个药物的组合可以贴在同一平板上,35 °C 培养过夜。测量各纸片的抑菌环直径。含有棒酸纸片的(有颜色端)抑菌环大于另一纸片(无颜色端)的 5 mm 以上,可证实为产 ESBLs 阳性。同时以肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)作为阳性对照,大肠埃希菌(ATCC 25922)作为阴性对照。

**1.2.4 ESBLs 大肠埃希菌分离株模板的制备:** 将大肠埃希菌接种到 5 mL LB 培养基,振荡培养 18 h 后取出培养液 1.5 mL,10 000×g 离心 2 min,弃掉上层液体,用 100  $\mu$ L TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)悬浮沉淀,在 100 °C 条件下煮沸 10 min,再迅速冰浴 5 min,最后 12 000×g 离心 2 min,取出上清液作为模板在 -20 °C 条件下保存备用。

**1.2.5 ERIC-PCR:** 引物 ERIC 1 (3'-CACTTAGG GGTCTCGAATGTA-5')和 ERIC 2 (5'-AAGTAA GTGACTGGGGTGAGCG-3')均由大连宝生物公司合成。ERIC-PCR 反应体系: 6  $\mu$ L 10×Buffer, 200  $\mu$ mol/L dNTPs, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (TaKaRa), 引物 ERIC1 和 ERIC2 各 50 pmol, 3  $\mu$ L 模板 DNA, 最后用灭菌双蒸水补充至 50  $\mu$ L。反应参数: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 51 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 32 个循环;

72 °C 16 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定反应产物，电泳结果在自动凝胶图像分析仪上照相。

**1.2.6 ERIC-PCR 结果分析：**采用非加权对数算术平均法(Unweighted pair group method using averages algorithm, UPGMA)，利用 NTSYS-pc 2.10 软件构建聚类树状图。为了减少误差，把所有分离到的大肠埃希菌在同一个反应条件下一次完成，而且电泳也是在同一块凝胶中一次完成。

2 结果与分析

2.1 空气中 ESBLs 大肠埃希菌的分离鉴定

在 20 个宿舍中共收集到 300 份空气样品；共分离鉴定得到大肠埃希菌 194 株，具体分布情况见表 1，分离到产 ESBLs 大肠埃希菌 30 株，阳性率为 15.46% (30/194)。卡方检验结果表明，产 ESBLs 大肠埃希菌的阳性率在男生女生宿舍及楼层之间无显著性差异( $P>0.05$ )。

气体样品采集时温度维持在 21 °C–23 °C 之间，相对湿度在 30%–40%。

2.2 产 ESBLs 大肠埃希菌 ERIC-PCR 指纹图谱分析

用 ERIC-PCR 方法对空气中分离的 30 株 ESBLs 大肠埃希菌进行扩增，根据电泳谱带绘制

的 UPGMA 遗传进化树见图 1。30 株 ESBLs 大肠埃希菌 ERIC 指纹图谱相似性在 50%–100%之间。其中 6P3 株与 6P4 株，6N7 株与 4N5 株，6N4 株与 4P2 株，6N9 株与 4N7 株，6P6 株与 4N6 株以及 6N8 株与 4N6 株两两之间相似性均为 100%，即由同一株细菌分裂繁殖而来<sup>[14]</sup>。

3 讨论

大学生是社会的一个特殊群体，是国家宝贵的人才资源，对大学生的培养不仅仅在于科学文化知识的灌输和传授，还要关心他们的生活生存质量。由于大学生在宿舍活动较多，时间较长，加上宿舍居住人口密度大，人员流动频繁，因此易于导致某些传染病的发生<sup>[12–13]</sup>。司东霞等<sup>[14]</sup>研究指出学校室内空气细菌平均含量为  $2.39\times10^3$  CFU/m<sup>3</sup>，宿舍环境空气微生物污染比较严重。黄宁<sup>[12]</sup>研究结果表明，冬季教室及学生宿舍在未开窗且存在人活动时微生物含量均超过卫生标准(即室内空气细菌总数不超过 4 000 个/m<sup>3</sup>)。本研究选取大肠埃希菌为指示菌，研究宿舍空气中产 ESBLs 的大肠埃希菌分离率，结果分离率已达到 19.51% (表 1)，其中男生女生宿舍以及楼层之间产 ESBLs 的大肠埃希菌分离率无显著

表 1 大学生宿舍空气中大肠埃希菌及产 ESBLs 大肠埃希菌的分离情况 Table 1 Distribution of $\beta$ -lactamase resistance phenotypes among airborne <i>E. coli</i> isolates in the traditional dormitory in Chinese university							
宿舍 Dormitory	楼层 Floor	大肠埃希菌 <i>E. coli</i> (strains)	ESBLs 大肠埃希菌 ESBLs-producing <i>E. coli</i>			$\chi^2$	<i>P</i>
			株数 Strains	阳性率 Positive rate (%)	株号 Numbers		
女生 Schoolgirl	一楼	36	7	19.44	4P1-4P7	1.120 0*	0.29*
	六楼	41	8	19.51	4N1-4N8		
男生 Schoolboy	一楼	52	6	11.54	6P1-6P6	0.001 9**	0.97**
	六楼	65	9	13.85	6N1-6N9		
合计 Total		194	30	15.46	/		/

注：\*：男生与女生比较；\*\*：一楼与六楼比较。  
Note：\*：Scoolgirl groups and scoolboy groups were compared with Chi-square test；\*\*：The ground-floor groups and the sixth floor groups were compared with Chi-square test.

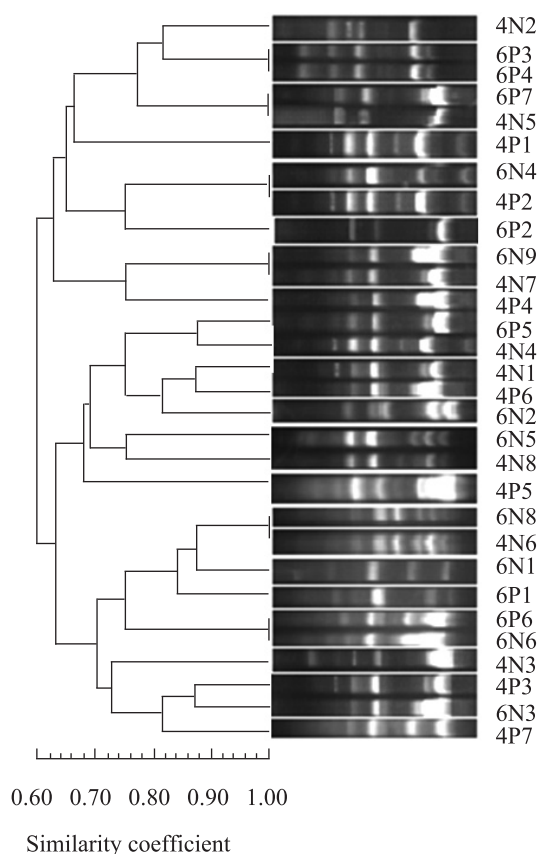


图1 ESBLs 大肠埃希菌的遗传关系聚类树状图  
Fig. 1 Dendrogram of airborne ESBLs *E. coli* strains isolated from traditional dormitory in Chinese university based on ERIC-PCR analysis

性差异( $P>0.05$ )。由于超广谱  $\beta$ -内酰胺酶可以由质粒介导在细菌间转移形成耐药的扩散,空气中播散更容易造成大范围交叉感染和耐药菌扩散,因此空气中大肠埃希菌耐药性已成为不容忽视的问题。然而目前关于室内空气中产 ESBLs 的大肠埃希菌的研究非常少,本研究为进一步研究空气中致病微生物与临床感染关系提供基础资料和思路参考。

基因分型不仅可以为大肠埃希菌的流行病学研究提供有价值的信息,也可用于污染源的追踪。ERIC-PCR 分型技术是以肠杆菌科基因间重复序列为引物进行 PCR,扩增出多态性的 DNA 图谱<sup>[15]</sup>。通过重复序列在细菌基因组内的数量和

分布之间的关系分析,比较其遗传相似性,获得其遗传距离,分析细菌的来源,是一种准确可靠的分子鉴定技术<sup>[16-17]</sup>。为了解大学生宿舍空气分离株中产 ESBLs 大肠埃希菌的来源及相似性,本研究应用 ERIC-PCR 方法分析分离株之间的遗传相似性,采用 Tenover 等<sup>[18]</sup>的判读标准:把大于或等于 90%相似性的菌株看作是一个分离株。结果从不同宿舍空气分离得到的 30 株产 ESBLs 大肠埃希菌遗传相似性分别在 50%–100%之间,有 12 株两两之间的相似达到 100% (图 1),这 12 株大肠埃希菌可看作是同一个分离株分裂增殖而来<sup>[14]</sup>。其中 6P3 和 6P4 均从男生宿舍一楼分离得到的,说明在同一层楼的宿舍中具有同源的产 ESBLs 大肠埃希菌;6N7 株与 4N5 株,6N4 株与 4P2 株,6N9 株与 4N7 株,6P6 株与 4N6 株以及 6N8 株与 4N6 株却分别来自不同的男生和女生宿舍楼,初步说明耐药性大肠埃希菌可在不同宿舍间传播,具体传播机制需要进一步研究。另外同层宿舍中分离到相似性仅为 50%的产 ESBLs 大肠埃希菌,如 4N2 和 4N6(这两个菌株分离于同一个宿舍),6P3 和 6P6 等,说明同一宿舍中有着不同来源产 ESBLs 大肠埃希菌流行,给防治工作带来了严峻的挑战。高等学校也应保持校园卫生,教育学生合理应用抗生素,增强健康意识和环保意识,保护校园环境,保持身体健康。及时、准确地进行空气中 ESBLs 的细菌的检测及其遗传相似性研究,控制耐药菌株的扩散和流行,合理应用抗生素预防细菌耐药和防止感染的产生,在公共卫生方面具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Breyse PN, Diette GB, Matsui EC, et al. Indoor air pollution and asthma in children[J]. Proceeding of American Thoracic Society, 2010, 7(2): 102–106.
- [2] 金宝, 张兴, 顾坚磊, 等. 高校校区空气微生物

- 污染情况监测分析[J]. 江苏预防医学, 2007, 18(3): 45-46.
- [3] 马荣华, 南国良, 程景林. 大学生公寓室内污染物分布的数值模拟研究[J]. 建筑节能, 2008, 6(4): 67-70.
- [4] Strachan NJC, Doyle MP, Kasuga F, et al. Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103: 35-47.
- [5] Beutin L, Steinrück H, Krause G, et al. Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(3): 630-639.
- [6] Hojovec J, Fiser A, Kubicek KZ. Die Rolle von Indikator keimen fuer die beurteilung der stallluft[J]. Monatshefte Veterinary Medicine, 1977, 32: 766-769.
- [7] 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  $\beta$ -内酰胺酶的研究[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(2): 85-89.
- [8] 郑红青, 邓玉婷, 何良英, 等. 食品动物源产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠杆菌的流行状况调查[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(12): 182-185.
- [9] 郭健莲, 江先海, 刘惠娜, 等. 产超广谱  $\beta$  内酰胺酶检测及药敏分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(18): 84-85.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局, 卫生部, 国家环境保护总局. GB/T 18883-2002室内空气质量标准. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [11] 段会勇, 柴同杰, 蔡玉梅, 等. ERIC-PCR 对鸡舍大肠杆菌气溶胶向舍外环境传播的鉴定[J]. 中国科学 C 辑, 2008, 38(1): 74-83.
- [12] 黄宁. 冬季通风对学生宿舍与教室微生物含量的影响[J]. 江苏卫生保健, 2005, (6): 34-35.
- [13] 张宏伟, 丁鹏. 室内空气污染的健康效应[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2002, 29(3): 162-165.
- [14] 司东霞, 徐丙荣, 张敏. 校园室内空气微生物污染的调查[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(6): 431-432.
- [15] 晏群, 陈丽华, 刘文恩, 等. 分子生物学分型技术 ERIC-PCR 的建立[J]. 实用医学杂志, 2003, 19(6): 688-689.
- [16] Ibenyassine K, AitMhand R, Karamoko Y, et al. Use of repetitive DNA sequences to determine the persistence of enteropathogenic *Escherichia coli* in vegetables and in soil grown in fields treated with contaminated irrigation water[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(5): 528-533.
- [17] Wilson LA, Sharp PM. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR[J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(6): 1156-1168.
- [18] Borges LGD, Dalla VV, Corcao G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 45(2): 173-180.