

尿培养产 CTX-M 大肠埃希菌的 种系分型及耐药和毒力特点分析*

陈 菲, 曹小利, 程 莉, 张之烽, 徐学静, 宁明哲, 沈 瀚

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

摘要:目的 分析尿培养产 CTX-M 大肠埃希菌的种系分型, 耐药及毒力特点, 指导尿路感染的临床用药与控制医院感染。方法 收集鼓楼医院 2012 年尿培养大肠埃希菌, 纸片扩散法测定细菌的药物敏感性, 双纸片法确定细菌产 ESBLs 的情况; PCR 扩增 CTX-M 编码基因和毒力基因 *iutA*, *ompT*, *fyuA*, *fdeC*, *fimH*, *traT*, *cvaC*, *kpsMT*, *pap*, *pAI*, *usp* 和 *chuA*; 多重 PCR 分析产 CTX-M 大肠埃希菌的种系分型; 采用肠杆菌属重复基因间隔共有序列-PCR (ERIC-PCR) 对细菌进行遗传相关性分析; 对比分析产 CTX-M 组和非产 CTX-M 组菌株在抗菌药物耐药性和毒力基因之间的差异。结果 162 株尿培养大肠埃希菌没有遗传相关性; 126 株 ESBLs 阳性菌株中, 91 株细菌产 CTX-M, 其中, 57 株产 CTX-M 大肠埃希菌属于 D 型, 16 株属于 B2 型。统计学分析发现, ESBLs 阳性菌株中, 产 CTX-M 组细菌的耐药率显著高于不产 CTX-M 组细菌 (除亚胺培南外), 毒力基因 *iutA*, *chuA* 和 *traT* 在产 CTX-M 细菌组中的流行显著高于非产 CTX-M 组, *P* 值依次为: 0.001, 0.006 和 0.000。结论 产 CTX-M 大肠埃希菌是鼓楼医院尿路感染的主要致病菌, 大多属于 D 型, 其耐药率显著增高, 且与毒力基因 *iutA*, *chuA* 和 *traT* 密切相关, 是尿路感染患者临床治疗的一个潜在威胁。

关键词: CTX-M; 毒力基因; 耐药; 大肠埃希菌

中图分类号: R378.21; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)02-012-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.004

Analysis on the Resistance and Virulence Characteristics and Phylogenetic Groups of CTX-M-Producing *Escherichia Coli* Isolated from Urine

CHEN Fei, CAO Xiao-li, CHENG Li, ZHANG Zhi-feng, XU Xue-jing, NING Ming-zhe, SHEN Han

(Department of Medical Laboratory, the Affiliated Drum

Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Objective** To analyze the distribution of phylogenetic groups, resistance and virulence characteristics of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolated from urine. **Methods** 162 urinary *Escherichia coli* were collected from Gulou hospital during 2012, disk diffusion test was implemented to determine the susceptibility, PCR was carried out to detect the CTX-M encoding genes and multiple virulence genes, and Multiplex PCR was used to determine the phylogenetic groups of CTX-M-producing *Escherichia coli*. Using Enterobacter repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR) genetic correlation analysis of the bacteria. These strains were classified as the CTX-M-producing group and non-CTX-M-producing group according to the results of CTX-M detection, the difference on the distribution of virulence genes were analyzed by Chi-square test. **Results** There was no genetic correlation between 162 strains of *Escherichia coli*. Ninety-one isolates out of 162 urinary *E. coli* were confirmed to produce CTX-M, 57 out of 91 CTX-M-producing *E. coli* were confirmed to be phylogenetic D group and 16 were B2 group. CTX-M-producing isolates displayed an obviously higher resistance rates to the antimicrobial agents tested except imipenem than the non-CTX-M-producing isolates ($P < 0.05$), the prevalence of virulence genes including *iutA*, *chuA* and *traT* was higher than that among non-CTX-M-producing isolates, the *P* values were 0.001, 0.006 and 0.000, respectively. **Conclusion** Most of the CTX-M-producing *E. coli* isolates belonging to phylogenetic D group was the main etiological agents for urinary tract infections, leading to a higher resistance rates toward antimicrobial agents frequently used in clinical treatment, in addition, the prevalence of CTX-M were closely related with the virulence genes *iutA*, *chuA* and *traT*, posing a potential threat to the clinical treatment of urinary tract infections.

Keywords: CTX-M; virulence gene; drug resistance; *Escherichia coli*

尿路感染是临床主要感染类型之一, 而大肠埃希菌是尿路感染的主要致病菌。产超广谱内酰胺

酶 (extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs) 是肠杆菌科对 β 内酰胺类抗生素耐药的重要机制, 而

* 基金项目: 江苏省青年基金资助 (BK2014099); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (021414340283)。

作者简介: 陈 菲 (1991—), 女, 本科, 技师, 主要从事临床医学检验, E-mail: 1070299160@qq.com。

通讯作者: 沈 瀚, 硕士, 主任技师, E-mail: shenhan10366@sina.com。

CTX-M 基因型是 ESBLs 常见的一种^[1]。近年来, CTX-M 超广谱 β 内酰胺酶广泛流行, 主要分布于大肠埃希菌等肠杆菌科细菌中, 其与抗菌药物耐药及毒力基因之间的相关性等仍未明确。本研究收集 2012 年我院非重复连续分离尿培养大肠埃希菌 162 株, 旨在分析 CTX-M 编码基因的流行性, 并对比分析 ESBLs 阳性菌株中, 产 CTX-M 细菌组与不产 CTX-M 细菌组之间在耐药率与毒力基因流行的差异, 为临床用药和感染控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2012 年 1 月~12 月我院非重复连续分离的尿培养大肠埃希菌 162 株。所有样本均为尿路感染患者的中段尿。

1.2 主要仪器及试剂 所有菌株均采用法国生物梅里埃公司生产的 VITEK2 鉴定系统或 ATB 鉴定系统鉴定。主要试剂及仪器药敏纸片为 Oxoid 公司产品, 包括阿米卡星、氨苄西林/舒巴坦、氨曲南、头孢吡肟、左旋氧氟沙星、头孢他啶、头孢西丁、哌拉西林/他唑巴坦、头孢噻肟、头孢呋辛、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林、亚胺培南; PCR 引物由 Invitrogen 公司合成, 2 \times PCRMaster Mix、PCR 产物纯化试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自北京天根公司; Vitek2 全自动细菌鉴定仪购自法国生物梅里埃公司。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感性试验: 药物敏感性试验采用 K-B 纸片扩散法测定各种抗菌药物的抑菌圈直径。结果根据 2013 年美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 标准判断^[2]。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。使用 WHONET5.6 对目的菌株进行药物敏感性分析。

1.3.2 ESBLs 表型检测: 按照临床实验室标准化协会 (CLSI) 推荐的标准纸片扩散确证法进行 ESBLs 确证^[2]。头孢噻肟 (30 μ g) 与头孢噻肟/克拉维酸 (30 μ g/10 μ g)、头孢他啶 (30 μ g) 与头孢他啶/克拉维酸 (30 μ g/10 μ g) 两对纸片中任一对或两对加克拉维酸者比不加克拉维酸者抑菌圈直径 ≥ 5 mm 判定为 ESBLs 阳性。质控菌株: 阴性质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922, 阳性质控菌株为肺炎克雷伯杆菌 ATCC700603。

1.3.3 CTX-M 编码基因检测: CTX-M 编码基因的扩增和测序采用水煮法提取细菌总 DNA, 取 2 μ l 提取物作为 PCR 模板。参考文献^[3], PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。对于耐药基因阳性的菌株, 使用单纯 PCR 再对耐药基因进行扩增纯化, 送上海美吉生

物医药科技有限公司测序。测序结果经 blast 比对、确定。

1.3.4 种系分型: 细菌的种系分型使用多重 PCR^[4]检测 chuA, yjaA 和 TspE4. C2。使用引物序列见表 1。PCR 反应体系为 25 μ l, PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。阳性对照为大肠埃希菌 ECOR20 (yjaA 阳性), ECOR48 (chuA 阳性), ECOR58 (TspE4. C2 阳性) 和 ECOR62 (chuA, yjaA 和 TspE4. C2 阳性), 阴性对照为大肠埃希菌 ECOR4。分型的标准为: A (chuA⁻, TspE4. C2⁻, yjaA⁺), B1 (chuA⁻, TspE4. C2⁺, yjaA⁻), B2 (chuA⁺, TspE4. C2^{-/+}, yjaA⁺), D (chuA⁺, TspE4. C2^{-/+}, yjaA⁻)。

表 1 种系进化关系分型引物序列及产物大小

| 引物 | 序列(5'-3') | 大小(bp) |
|-----------|-------------------------|--------|
| chuA | F GACGAACCAACGGTCAGGAT | 279 |
| | R TGCCGCCAGTACCAAGACA | |
| yjaA | F TGAAGTGTGAGAGACGCTG | 211 |
| | R ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC | |
| tspE4. c2 | F GAGTAATGTCTGGGGCATTCA | 152 |
| | R CGCGCCAACAAAGTATTACG | |

1.3.5 毒力基因检测: 毒力基因扩增参照文献^[5, 6], 通过 PCR 对下列毒力基因 iutA, ompT, fyuA, fdeC, fimH, traT, cvaC, kpsMT, pap, pAI, usp 和 chuA 进行检测。其中, chuA 是通过细菌种系分型时检测。

1.3.6 同源性分析: 采用肠杆菌属重复基因间隔共有序列-PCR 技术 (ERIC-PCR) 对 162 株细菌进行同源性分析^[7], 采用 ERIC1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') 与 ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') 引物。ERIC-PCR 的扩增条件如下: 变性 94 $^{\circ}$ C 1 s, 退火 52 $^{\circ}$ C 10 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 35 s, 共 30 循环。1.5 g/dl 的琼脂糖凝胶电泳 3 h 后成像。若有 2 个或以上条带的差异, 则认为是不同的菌株。结果使用 Bio-numerics 软件分析。

1.4 统计学分析 应用 SPSS17.0 软件进行统计分析。皮尔森卡方检验对产 CTX-M 菌株和非产 CTX-M 菌株的耐药和毒力基因分布差异进行分析。P 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌敏感性分析 细菌对于氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛、头孢噻肟、左旋氧氟沙星的耐药率较高, 高于 63%, 对于亚胺培南、头孢西丁较敏感, 耐

药率分别为 3.7% 和 10.5%。

2.2 CTX-M 编码基因的流行 162 株尿培养大肠埃希菌中,有 126 株细菌为 ESBLs 阳性,产酶率为 77.8%,其中,91 株细菌经 PCR 扩增和 DNA 测序鉴定为产 CTX-M 菌株。CTX-M 编码基因的分型包括 CTX-M-14,CTX-M-15,CTX-M-27,CTX-M-3。ESBLs 阳性菌株中,除亚胺培南无统计学意义($P>0.05$)外,产 CTX-M 组的细菌对所测的抗菌药物的耐药率均显著高于不产 CTX-M 组的细菌, P 值见表 2。

表 2 产 CTX-M 大肠埃希菌与不产 CTX-M 大肠埃希菌的耐药率及差异性分析

| 抗菌药物 | 分 组[耐药菌株数(%)] | | χ^2 | P 值 |
|-----------|-------------------|--------------------|----------|-------|
| | 产 CTX-M($n=91$) | 非产 CTX-M($n=71$) | | |
| 氨苄西林/舒巴坦 | 91(100) | 59(83.1) | 16.611 | 0.000 |
| 阿米卡星 | 40(44.0) | 11(15.5) | 14.979 | 0.000 |
| 头孢他啶 | 35(38.5) | 8(11.3) | 15.127 | 0.000 |
| 哌拉西林 | 91(100) | 10(14.1) | 125.403 | 0.000 |
| 头孢唑辛 | 91(100) | 21(29.6) | 92.694 | 0.000 |
| 头孢西丁 | 15(16.5) | 2(2.8) | 6.411 | 0.011 |
| 头孢唑酮/舒巴坦 | 19(20.9) | 5(7.0) | 6.051 | 0.014 |
| 亚胺培南 | 5(5.5) | 1(1.4) | 0.897 | 0.344 |
| 哌拉西林/舒巴坦 | 52(57.1) | 16(22.5) | 19.612 | 0.000 |
| 头孢噻肟 | 69(75.8) | 23(32.4) | 30.655 | 0.000 |
| 头孢吡肟 | 66(72.5) | 17(23.9) | 37.678 | 0.000 |
| 替卡西林/他唑巴坦 | 57(62.6) | 24(33.8) | 13.264 | 0.000 |
| 左旋氧氟沙星 | 70(76.9) | 33(46.5) | 15.964 | 0.000 |
| 氨基糖 | 65(71.4) | 12(16.9) | 47.548 | 0.000 |

2.3 菌株的种系分型 依据种系分型的标准,91 株产 CTX-M 大肠埃希菌中,有 11 株(12.1%)为 A 型,4 株(4.4%)为 B1 型,16 株(17.6%)为 B2 型,57 株(62.6%)为 D 型,3 株细菌不能进行分型(NTs)。

2.4 毒力基因的分布 产 CTX-M 组中,毒力基因以粘附基因 fimH 和 traT 的分布最高,流行率为 87.9% 和 86.8%,其次为 iutA 和 fyuA,流行率为 69.2% 和 68.1%。非产 CTX-M 组中,fimH 的流行率最高,为 80.3%(57),其次为 fyuA,流行率为 60.6%(43)。iutA,chuA,traT 在产 CTX-M 细菌组中的流行明显高于非产 CTX-M 细菌组,差异有统计学意义(χ^2 分别为 10.705,7.579,21.885; P 值分别为 0.001,0.006,0.000)。见表 3。

2.5 遗传相关性 ERIC-PCR 分析显示,162 株大肠埃希菌之间没有遗传相关性。

3 讨论 近年来,CTX-M 在肠杆菌科细菌,特别是大肠埃希菌中的广泛流行导致病人的住院时间延长,治疗成本增加,迫切需要对这类细菌的种系

分型与毒力特点等方面进一步研究,以助于临床感染控制措施的实施。

本研究中,产 CTX-M 大肠埃希菌对青霉素类、大多数头孢菌素类、 β 内酰胺酶抑制剂、氨基糖苷类和氟喹诺酮类的耐药率高于不产 CTX-M 组的细菌。这与我们前期对多药耐药大肠埃希菌的耐药基因分析结果一致^[7],也与 D'Andrea 等^[9] 学者的研究结果相似。表明产 CTX-M 大肠埃希菌很可能同时携带其他多种耐药基因而成为多药耐药菌。

表 3 产 CTX-M 大肠埃希菌与不产 CTX-M 大肠埃希菌的毒力基因分布及差异性分析

| 抗菌药物 | 分 组[毒力基因的流行数(%)] | | χ^2 | P 值 |
|-------|-------------------|--------------------|----------|-------|
| | 产 CTX-M($n=91$) | 非产 CTX-M($n=71$) | | |
| iutA | 63(69.2) | 31(43.7) | 10.705 | 0.001 |
| ompT | 35(38.5) | 37(52.1) | 3.010 | 0.083 |
| fyuA | 62(68.1) | 43(60.6) | 1.002 | 0.317 |
| fdeC | 54(59.3) | 52(73.2) | 3.406 | 0.065 |
| fimH | 80(87.9) | 57(80.3) | 1.779 | 0.182 |
| traT | 79(86.8) | 32(45.1) | 21.885 | 0.000 |
| cvaC | 2(2.2) | 3(4.2) | 0.080 | 0.777 |
| kpsMT | 50(54.9) | 33(46.5) | 1.144 | 0.285 |
| pap | 25(25.3) | 17(23.9) | 0.259 | 0.611 |
| pAI | 13(14.3) | 11(15.5) | 0.046 | 0.830 |
| usp | 16(17.6) | 15(21.1) | 0.324 | 0.569 |
| chuA | 73(80.2) | 43(60.6) | 7.579 | 0.006 |

大肠埃希菌的种系分型对于判断细菌引起的肠外感染具有一定的临床重要性。在欧美等国家,产 CTX-M 大肠埃希菌多为 B2 型,D 型次之^[9],因为和 A 及 B1 型大肠埃希菌相比,B2 和 D 型大肠埃希菌主要属于肠外致病菌。本研究中,产 CTX-M 的大肠埃希菌主要属于 D 型,B2 型次之,这和日本及韩国等的研究结果一致^[8],其差异可能与地理位置等有关。

毒力是指同种病原微生物不同菌株或菌株的不同程度的致病能力,编码毒力物质的基因称为毒力基因。引起肠外感染的大肠埃希菌其致病性主要与其所产生的特定的毒力因子如毒素、黏附素、脂多糖、侵袭素等密切相关。本研究中,iutA,chuA 和 traT 大多分布于产 CTX-M 大肠埃希菌中,这与巴西的一项研究结果有相似之处^[10]。

ERIC-PCR 技术是利用 ERIC 序列中的高度保守区来设计的一对反向引物进行 PCR 扩增。由于该方法快速有效,灵敏度高,可重复性强,目前已广泛应用于微生物分类鉴定等方面的研究。本研究通过 ERIC-PCR 分析尿路 (下转 19 页)

- [6] Conway K, Edmiston SN, Tse CK, et al. Racial variation in breast tumor promoter methylation in the Carolina Breast Cancer Study[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Pre, 2015, 24(6): 921-930.
- [7] Jiang S, Willox B, Zhou H, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C binds to BATF/IRF4 or SPI1/IRF4 composite sites and recruits Sin3A to repress CDKN2A[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2014, 111(1): 421-426.
- [8] Yi TZ, Guo J, Zhou L, et al. Prognostic value of E-cadherin expression and CDH1 promoter methylation in patients with endometrial carcinoma[J]. Cancer Invest, 2011, 29(1): 86-92.
- [9] Jalili S, Saeedi M. Study of curcumin behavior in two different lipid bilayer models of liposomal curcumin using molecular dynamics simulation[J]. J Biomol Struct Dyn, 2015, 42(2): 1-32.
- [10] Ali Hosseini S, Sobti RC, Malekzadeh K, et al. Frequency of P16INK4a and P14ARF genes methylation and its impact on bladder cancer cases in north Indian population[J]. Dis Markers, 2010, 28(6): 361-368.
- [11] Vivo M, Matarese M, Sepe M, et al. MDM2-mediated degradation of p14ARF: a novel mechanism to control ARF levels in cancer cells[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117252.
- [12] Kordi-Tamandani DM, Moazeni-Roodi A, Rigi Ladez MA, et al. Analysis of methylation patterns and expression profiles of p14ARF gene in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Biol Markers, 2010, 25(2): 99-103.
- [13] Geddert H, Zur Hausen A, Gabbert HE, et al. EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1[J]. Anal Cell, 2011, 34(3): 209-214.
- [14] Wu J, Zhang JR, Qin J. Clinical significance of methylation of E-cadherin and p14ARF gene promoters in skin squamous cell carcinoma tissue[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(7): 1808-1812.

收稿日期: 2015-02-07

修回日期: 2015-12-16

(上接 14 页)感染大肠埃希菌的同源性发现, 这些细菌之间有很大的遗传多样性, 这表明尿路感染的大肠埃希菌来源多样化, 这可能与患者来源广泛有关。

总之, 产 CTX-M 大肠埃希菌是我院尿路感染的主要致病菌, 大多属于 D 型, 具有很大的遗传多样性; 其 ESBLs 的产生率高, 且与毒力基因 iutA, chuA 和 traT 密切相关, 是尿路感染患者临床治疗的一个潜在威胁。迫切需要规范医院抗菌药物的使用, 强化感染控制措施的实施, 以减缓 ESBLs 的播散和耐药菌的发展。

参考文献:

- [1] 武学成, 张阮章, 卢月梅. 深圳地区产 ESBLs 大肠埃希菌 CTX-M 基因分型研究[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(3): 56-59.
- Wu XC, Zhang RZ, Lu YM. Study on CTX-M gene type of *Escherichia coli* producing ESBLs in Shenzhen[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2009, 24(3): 56-59.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, Approved standard In M2-A9[S]. Wayne, PA, CLSI M2-A9, 2013.
- [3] Dallenne C, Da Costa A, Decre D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3): 490-495.
- [4] Gordon DM, Clermont O, Tolley H, et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups; multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method[J]. Environ Microbiol, 2008, 10(10): 2484-2496.
- [5] Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise[J]. J Infect Dis, 2000, 181(1): 261-272.
- [6] Van der Bij AK, Peirano G, Pitondo-Silva A, et al. The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 72(4): 297-302.
- [7] Wang A, Yang Y, Lu Q, et al. Presence of qnr gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China[J]. BMC Infectious Dis, 2008, 8(9): 1097-1098.
- [8] Cao X, Zhang Z, Shen H, et al. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with urinary tract infections[J]. APMIS, 2014, 122(11): 1088-1095.
- [9] D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, et al. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance[J]. Int J Med Microbiol, 2013, 303(6/7): 305-317.
- [10] Chakraborty A, Adhikari P, Shenoy S, et al. Clinical significance and phylogenetic background of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates from extra-intestinal infections[J]. J Infect Public Health, 2015, 8(3): 248-253.

收稿日期: 2015-10-04

修回日期: 2015-11-30