

• 论 著 •

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*

李 阳¹, 沈 瀚², 张之烽², 程 莉², 徐学静², 宁明哲², 周万青², 曹小利^{2△}
(南京大学附属鼓楼医院: 1. 医院感染管理科; 2. 检验科, 江苏南京 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。方法 收集该院 2014 年尿培养大肠埃希菌, 环扩散法测定细菌的敏感性, ESBLs 确定分析细菌产 ESBLs 的情况; 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; PCR 扩增 CTX-M 编码基因和毒力基因 iutA, ompT, fyuA, fdeC, fimH, traT, cvaC, pap, kpsMT, pAI, usp, aer, hlyA, cnf, 和 chuA; 多重 PCR 分析产 CTX-M 大肠埃希菌的种系分型; 依据 PCR 对菌株的 CTX-M 编码基因的检验结果, 将细菌分为产 CTX-M 组和非产 CTX-M 组, 对比分析两组之间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中没有遗传相关性, 126 株 ESBLs 阳性菌株中, 有 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, 产 CTX-M 组细菌的耐药率显著高于不产 CTX-M 组细菌(除外亚胺培南), 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 值分别依次为: 0.001、0.006 和 0.000。结论 产 CTX-M 大肠埃希菌是本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; 整合子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.16.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)16-2207-03

Analysis on species classification and characteristics of drug resistance and virulence in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolated from urine culture*

LI Yang¹, SHEN Han², ZHANG Zhifeng², CHENG Li², XU Xuejing², NING Mingzhe², ZHOU Wanqing², CAO Xiaoli^{2△}

(1. Department of Infection management; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Drum Tower
Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: **Objective** To analyze the species classification and characteristics of drug resistance and virulence in CTX-M producing *Escherichia coli* isolated from urine culture. **Methods** *Escherichia coli* cultured by urine were collected from our hospital during 2014, the ring disk diffusion test was implemented to determine the bacterial susceptibility, the EBLs determination test was used to analyze the bacterial EBLs producing situation; the enterobacter duplicated gene spacer consensus sequence PCR(ERIC-PCR) was adopted to perform the genetic relation analysis; PCR was used to amplify the CTX-M encoding genes and multiple virulence genes iutA, ompT, fyuA, fdeC, fimH, traT, cvaC, pap, kpsMT, pAI, usp, aer, hlyA, cnf and chuA; the multiple PCR was used to analyze the species classification of CTX-M-producing *Escherichia coli*; these strains of bacteria were classified as the CTX-M-producing group and non-CTX-M-producing group according to the results of CTX-M coding gene detection, the differences in the antibacterial drug resistance and virulence genes between the two groups were performed the contrastive analysis. **Results** One hundred and sixty-two strains of *E. coli* by urine culture had no genetic correlation, among 126 EBLs positive strains, 91 strains produced CT-M, in which 57 strains of CT-M producing *Escherichia coli* belonged to type D, and 116 strains belong to Type B2. The statistical analysis found that the drug resistance rate in the CTX-M-producing group was significantly higher than that in the non- CT-M producing group (except for imipenem), the prevalence of virulence genes including iutA, chuA and traT in the CT-M producing bacteria group was significantly higher than that in the non-CTX-M-producing group ($P=0.001, 0.006, 0.000$). **Conclusion** CTX-M-producing *E. coli* is main pathogenic bacterium of urinary infection in our hospital, its majority belong to type D with increased drug resistance, moreover has close correlation with virulence genes iutA, chuA and traA and is a potential threat in clinical treatment of urinary infection.

Key words: CTX-M; virulence genes; drug resistance; *Escherichia coli*; integron

尿路感染是临床主要感染之一, 大肠埃希菌是尿路感染的主要致病菌。近年来, CTX-M 超广谱 β -内酰胺酶在全球范围内广泛流行^[1], 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 2014 年本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, 并对比分析产 CTX-M 细菌组与不产 CTX-M 细菌之间在耐药率、毒力基因流行及整合子分布之间的差异, 为临床用药和感染控制提供参考。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集 2014 年 1—12 月本院非重复连续分离的尿培养大肠埃希菌 162 株。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。

1.2 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、氨基曲南、头孢吡肟、左氧氟沙星、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、哌拉西林/舒巴坦、亚胺培南; PCR 引物由 Invitro-

* 基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金资助项目(BK20140099); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(021414340283)。

作者简介: 李阳, 女, 主治医师, 主要从事感染预防与控制方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: cao-xiao-li@163.com。

gen 公司合成,2×PCR Master 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 菌种鉴定 用法国生物梅里埃的 API20E 或 Vitek2 全自动细菌鉴定仪鉴定。

1.4 药敏试验 用 K-B 法测定 16 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。根据 2014 年 CLSI 标准,对 18 种常用抗菌素的抑菌圈直径作出“敏感”、“耐药”和“中介”的判断。使用 WHONET5.6 对目的菌株进行药物敏感性分析。

1.5 ESBLs 的表型检测 用双纸片法进行 ESBLs 初筛,按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 μg)与头孢噻肟/克拉维酸 30/10 μg)、头孢他啶 30 μg 与头孢他啶/克拉维酸(30/10 μg)两对纸片中任一一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。

1.6 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 μL 提取物作为 PCR 模板。参照文献^[3],PCR 反应参数为:94 ℃预变性 3 min,然后 94 ℃变性 40 s,60 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,72 ℃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 chromas 软件检测后,使用 blast 比对、确定。

1.7 细菌的种系分型 种系分型参考文献^[4]中的方法,使用多重 PCR 扩增 chuA, yjaA 和 TSPE4. C2 将 107 株大肠埃希菌分为 A、B1、B2 或 D。PCR 反应体系为 25 μL。PCR 反应参数为:94 ℃预变性 4 min,然后 94 ℃变性 5 s,59 ℃退火 10 s,72 ℃延伸 5 min,30 个循环,72 ℃延伸 7 min,分型的标准为:A (chuA+, TSPE4. C2+, yjaA+), B1 (chuA+, TSPE4. C2+, yjaA+), B2 (chuA+, TSPE4. C2+/+, yjaA+) and D (chuA+, TSPE4. C2+/+, yjaA+)。

1.8 毒力基因扩增 参考文献^[5-6],通过 PCR 对下列毒力基因 iutA, ompT, fyuA, fdeC, fimH, traT, cvaC, pap, kpsMT, pAI, usp, aer, hlyA, cnf, 和 chuA 进行鉴定。其中, chuA 是通过细菌种系分型时检测。

1.9 肠杆菌属重复基因间隔共有序列-PCR (ERIC-PCR) 参考文献^[7],采用 ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') and ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') 引物,ERIC-PCR 的扩增条件如下:变性 94 ℃,1 s,退火 52 ℃,10 s,延伸 72 ℃,35 s,共 30 循环。在 60 V 电压下,1.5%的琼脂糖电泳 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。

1.10 统计学处理 应用 SPSS11.0 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及整合子分布差异进行分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细菌敏感性分析 总体上,细菌对于氨苄西林/舒巴坦,头孢呋辛,头孢噻肟、左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%。除亚胺培南,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,见表 1。

表 1 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[n(%)]

抗菌药物	产 CTX-M (n=91)	非产 CTX-M (n=71)	P
氨苄西林/舒巴坦	91(100.0)	59(83.1)	0.000
阿米卡星	40(44.0)	11(15.5)	0.000
头孢他啶	35(38.5)	8(11.3)	0.000
哌拉西林	91(100.0)	10(14.1)	0.000
头孢呋辛	91(100.0)	21(29.6)	0.000
头孢西丁	15(16.5)	2(2.8)	0.011
头孢哌酮/舒巴坦	19(2.0)	5(7.0)	0.025
亚胺培南	5(5.5)	1(1.4)	0.344
哌拉西林/舒巴坦	52(57.1)	16(22.5)	0.000
头孢噻肟	69(75.8)	23(32.4)	0.008
头孢吡肟	66(72.5)	17(23.9)	0.000
替卡西林/他唑巴坦	57(62.6)	24(33.8)	0.000
左氧氟沙星	70(76.9)	33(46.5)	0.000
氨基南	65(71.4)	12(16.9)	0.000

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,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。

2.3 毒力基因的分布 产 CTX-M 组中,毒力基因以粘附基因 finH 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,finH 的流行率最高,为 57(80.3%),其次为 fyuA,流行率为 43(60.6)。iutA 和 traT 在产 CTX-M 细菌组中的流行显著高于非产 CTX-M 组,P 值分别为 0.001 和 0.000,见表 2。

表 2 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[n(%)]

毒力基因	产 CTX-M (n=91)	非产 CTX-M (n=71)	P
iutA	63(69.2)	31(43.7)	0.011
ompT	35(38.5)	37(52.1)	0.083
fyuA	62(68.1)	43(60.6)	0.317
fdeC	54(59.3)	52(73.2)	0.065
fimH	80(87.9)	57(80.3)	0.182
traT	79(86.8)	32(45.1)	0.000
cvaC	2(2.2)	3(4.2)	0.777
kpsMT	50(54.9)	33(46.5)	0.285
pap	25(25.3)	17(23.9)	0.611
PAIs	13(14.3)	11(15.5)	0.830
usp	16(17.6)	15(21.1)	0.569
chuA	73(80.2)	43(60.6)	0.006

2.4 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 株为 A 型,4 株为 B1 型,16 株为 B2 型,57 株为 D 型,3 株细菌不能进行分型(NTs)。

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患者的住院时间延长,治疗成本增加,迫切需要对该类细菌的种系分型、毒力特点等进一步分析,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,这与笔者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 Andrea 等^[8]学者的研究结果相相似,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。

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^[9]。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,构成毒力的物质称为毒力基因。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 显著分布于产 CTX-M 大肠埃希菌中,表明,铁色素的摄取对于产 CTX-M 大肠埃希菌的耐药播散有一定的作用。

总之,产 CTX-M 大肠埃希菌是本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。

参考文献

[1] Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and escherichia coli clones[J]. Microbial Drug Resistance, 2011, 17(1): 83-97.
[2] CLSI. M02-A Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test[S]. Wayne, PA: CLSI, 2014.
[3] Dallenne C, Da Costa A, Decré 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] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157: H7, Salmonella, and Shigella for Pulse Net[J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3(1): 59-67.
[7] 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.
[8] Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, et al. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance [J]. Med Microbiol, 2013, 303(3): 305-317.
[9] Chakraborty A, Adhikari P, Shenoy S, et al. Clinical significance and phylogenetic background of extended spectrum β -lactamase producing Escherichia coli isolates from extra-intestinal infections [J]. J Infect Public Health, 2015, 8(3): 248-253.

(收稿日期: 2017-02-17 修回日期: 2017-04-17)

(上接第 2206 页)

[2] Daniels G. Human blood groups[M]. 3rd ed. UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013: 388.
[3] Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy blood group system in Caucasians: evidence for a new allele[J]. Am J Hum Genet, 1965, 17(3): 384-389.
[4] 贺云蕾. 一种新的稀有血型基因检测方法的建立及应用[D]. 上海: 华东师范大学, 2013: 11-36.
[5] Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, et al. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals[J]. Nat Gene, 1995, 10(2): 224-228.
[6] Zimmerman PA, Wooley I, Masinde GL, et al. Emergence of FY * Anull in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(24): 13973-13977.
[7] Howes RE, Patil AP, Piel FB, et al. The global distribution of the Duffy blood group[J]. Nat Commun, 2011, 2(2): 266.
[8] Meny GM. The Duffy blood group system: a review[J]. Immunohematology, 2010, 26(1): 51-56.

[9] 苏宇清, 梁延连, 张印则, 等. 中国人群 Duffy 血型基因启动子 GATA-1 序列研究[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(6): 575-577.
[10] 王胜蓝, 吴明瞬, 刘红英, 等. 凉山地区彝族人群 Duffy 血型表型基因型分布[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(2): 158-159.
[11] Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fyx individuals[J]. Blood, 1998, 92(21): 2147-2156.
[12] Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, et al. The Fyx phenotype is associated with a missense mutation in the Fyb allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein[J]. Br J Haematol, 1998, 103(10): 1184-1191.
[13] Gassner C, Kraus RL, Dövc T, et al. Fyx is associated with two missense point mutations in its gene and can be detected by PCR-SSP [J]. Immunohematology, 2000, 16(1): 61-67.

(收稿日期: 2017-02-13 修回日期: 2017-04-13)