

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.19.006

ASB 及 UTI 患者尿液中分离的大肠埃希菌系统分群、毒力基因及耐药性分析*

邓 聪, 区静怡, 朱雪莲, 彭 亮[△]

(广州医科大学附属第二医院检验科, 广州 510260)

摘要:目的 对无症状菌尿(ASB)及症状性尿路感染(UTI)患者尿液中分离的大肠埃希菌进行系统分群、毒力基因及耐药性检测。**方法** 收集该院 2014 年 5 月至 2016 年 3 月从尿路感染患者尿液中分离的大肠埃希菌共 145 株,其中 ASB 组 65 株,UTI 组 80 株。利用多重聚合酶链反应(PCR)对其进行系统分群及 10 种毒力基因表达检测;采用纸片扩散(K-B)法对其进行耐药性检测。**结果** ASB 组中,A、B1、B2、D 群分别占 10.77%、38.47%、43.07%、7.69%。UTI 组中,A、B1、B2、D 群分别占 12.50%、10.00%、62.50%、15.00%,两组系统分群结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。ASB 组黏附相关基因 *afa* 和 *sfa* 的表达率高于 UTI 组($P < 0.05$)。UTI 组细胞毒性相关基因细胞毒性坏死因子 1(*cnf1*)和溶血素(*hlyA*),铁摄取相关基因 *fyuA* 和 *iutA* 的表达率高于 ASB 组($P < 0.05$)。ASB 组和 UTI 组对 18 种抗菌药物的耐药率及产超广谱 β -内酰胺酶菌株阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** ASB 和 UTI 不同的系统分群特征,可能与其表现出不同的致病能力有关。ASB 菌株毒力较 UTI 低,降低了其急性致病能力,但具有更高表达率的黏附相关基因,这可能有助于细菌实现持续定植。尿路感染大肠埃希菌的高耐药率必须引起临床重视。

关键词: 无症状菌尿; 症状性尿路感染; 大肠埃希菌; 系统分群; 毒力基因

中图法分类号:R378.2+1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)19-2862-04

Phylogenetic grouping, virulence genes and drug resistance of *E. coli* strains isolated from patients with asymptomatic bacteriuria and urinary tract infection*

DENG Cong, OU Jingyi, ZHU Xuelian, PENG Liang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

Abstract: Objective To conduct the phylogenetic grouping, virulence genes and antimicrobial resistance detection of *Escherichia coli* (*E. coli*) strains isolated from the patients with asymptomatic bacteriuria (ASB) and symptomatic urinary tract infection (UTI). **Methods** A total of 145 strains of *E. Coli* isolated from the urine of the patients with UTI were collected in this hospital from May 2014 to March 2016, including 65 strains in the ABS group and 80 strains in the UTI group. The phylogenetic grouping and 10 virulence gene expression detection were performed by using the multiplex polymerase chain reaction (PCR). The drug resistance was detected by adopting the K-B method. **Results** The A, B1, B2 and D groups in the ASB group accounted for 10.77%, 38.47%, 43.07% and 7.69% respectively. In the UTI group, the group A, B1, B2 and D accounted for 12.50%, 10.00%, 62.50% and 15.00% respectively. The difference in phylogenetic grouping results had statistical difference between the two groups ($P < 0.05$). The expression rates of adhesion related genes *afa* and *sfa* in the ASB group were higher than those in the UTI group ($P < 0.05$). The expression rates of cytotoxic related genes *cnf1* and *hlyA*, and iron uptake related genes *fyuA* and *iutA* in the UTI group were higher than those in the ASB group ($P < 0.05$). The resistance rates to 18 antibacterial drugs and positive rate of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases had no statistical difference between the ASB group and UTI group ($P > 0.05$). **Conclusion** The different phylogenetic grouping characteristics between the ASB and UTI may be related to their different pathogenic abilities. The virulence of *E. Coli* strains in the ASB is lower than that in the UTI, which may lower their acute pathogenic ability. But *E. Coli* strains in the ASB have adhesion related genes with higher expression rates, which can help the bacteria to realize the continuous colonization. The high drug resistance rates of UPEC must be paid attention to in clinic.

Key words: asymptomatic bacteriuria; urinary tract infection; *Escherichia coli*; phylogenetic group;

* 基金项目:广东省广州市卫生计生科技一般引导项目(20171A011308)。

作者简介:邓聪,女,讲师,主要从事感染性疾病的分子致病机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: pl_206@126.com。

virulence gene

尿路感染是临床上最普遍的细菌感染之一。由于女性特殊的泌尿道解剖结构,女性尿路感染的发生率远高于男性。40%~50%的女性一生至少经历过一次尿路感染。同时,尿路感染也是老年人和儿童常见的感染性疾病^[1],其致病机制至今仍不明确。根据有无临床表现,尿路感染可被分为无症状菌尿(ASB)及症状性尿路感染(UTI)。ASB 表现在泌尿系统中存在着持续性细菌增殖,但在临床上无常见的“尿频、尿急、尿痛”等尿路感染的症状。ASB 在临床很常见,尤其多见于妊娠女性、老年女性及糖尿病患者。健康女性 ASB 的发生率随着年龄的增长而增加,新生儿发病率为 1%左右而 80 岁的老年女性可达 10%~20%^[2]。大肠埃希菌是尿路感染最常见的病原菌。绝大多数 ASB 和 UTI 均由尿路致病性大肠埃希菌(UPEC)引起。虽然由同一种菌株引起,但 ASB 和 UTI 临床表现却截然不同,其具体机制至今仍不明确。本文通过对 ASB 和 UTI 患者尿液中分离的 UPEC 进行系统分群、毒力基因和耐药性检测,以期发现决定尿路感染发生和发展的关键因素,进一步明确 UPEC 致病机制。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 5 月至 2016 年 3 月本院检验科微生物室清洁中段尿细菌培养结果为大肠埃希菌,且同时满足 1.2 中诊断标准的菌株共 145 株。根据有无尿路感染的临床表现分为 ASB 组和 UTI 组,其中 ASB 组 65 株,UTI 组 80 株。65 例 ASB 患者中男 15 例,女 50 例,年龄 26~75 岁,中位年龄 62 岁。80 例 UTI 患者中男 21 例,女 59 例,年龄 28~72 岁,中位年龄 51 岁。

1.2 诊断标准 UTI:(1)清洁中段尿细菌培养,菌落计数 $\geq 10^5$ CFU/mL;(2)清洁中段尿沉渣镜检每高倍镜视野白细胞数 ≥ 5 个。具备以上两项且同时具有典型尿路感染症状可确诊,如不符合(2),则再次行清洁中段尿细菌培养,如菌落计数仍 $\geq 10^5$ CFU/mL,且两次为同一细菌,可以确诊。ASB:连续两次或以上清洁中段尿细菌培养,菌落计数 $\geq 10^5$ CFU/mL,无全身及任何泌尿道感染症状,且在 3 个月内未接受针对尿路感染的抗菌药物治疗。

1.3 仪器与试剂 Taq DNA 聚合酶、DNA 标记物均购自宝生物工程(大连)有限公司,聚合酶链反应(PCR)引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,PCR 扩增仪和电泳仪购于美国 Bio-Rad 公司,凝胶图像分析系统购于英国 Syngene 公司,药敏纸片购自英国 OXOID 公司。

1.4 方法

1.4.1 系统分群 采取煮沸裂解法提取菌株 DNA。利用多重 PCR 检测大肠埃希菌分群基因 ChuA、

YjaA 和特征性 DNA 片段 TspE4C2.1,将大肠埃希菌分为 A、B1、B2、D 群。PCR 引物序列见表 1,反应体系及反应条件参见 CLERMONT 等^[3]的报道。

表 1 PCR 检测分群基因引物序列

基因	引物(5'~3')
ChuA	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA
YjaA	TGAAGTGTCAAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC
TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAGTATTACG

1.4.2 毒力基因检测 采用多重 PCR 方法检测大肠埃希菌 10 种毒力基因表达,包括黏附相关基因 afa、papA、sfa 和 fimH,细胞毒性相关基因 sat、细胞毒性坏死因子 1(cnf1)和溶血素(hlyA),铁摄取相关基因 fyuA、irp2 和 iutA。PCR 引物序列见表 2,反应体系及反应条件参见 JOHNSON 等^[4]的报道。

表 2 PCR 检测毒力基因引物序列

基因	引物(5'~3')
afa	GGCAGAGGGCCGCAACAGGC CCCCTAACGCGCCAGCATCTC
papA	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG AGCACATTATCACCATCTTTTCAG
sfa	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA
fimH	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA
sat	GTTGTCTCTGGCTGTTGC AATGATGTTTCTCCAGAGC
cnf1	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG CATTACAGAGTCTGCCCTCATTATT
hlyA	AACAAGGATAAGCACTGTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA
fyuA	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGGACGATGTTGTA
irp2	AAGGATTTCGCTGTTACCGGAC TCGTCGGGCAGCGTTTCT
iutA	GGCTGGACATCATGGGAAGCTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG

1.4.3 药敏试验 采用纸片扩散(K-B)法检测 ASB 组和 UTI 组大肠埃希菌对 18 种抗菌药物的敏感性,根据 2014 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)M100-S22 文件标准判断药物敏感或耐药。产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)检测按 CLSI 推荐的双纸片扩散法进行确证。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 系统分群 系统分群结果显示, ASB 组中, B2 群(43.07%)菌株最多,其次是 B1 群(38.47%)、A 群(10.77%)和 D 群(7.69%)。而在 UTI 组中, B2 群(62.50%)菌株占绝大多数,其余分别为 D 群(15.00%)、A 群(12.50%)、B1 群(10.00%)。两组系统分群结果差异有统计学意义($\chi^2 = 17.005, P < 0.05$)。见表 3。

表 3 ASB 组和 UTI 组大肠埃希菌系统分群[n(%)]

组别	n	A 群	B1 群	B2 群	D 群
ASB 组	65	7(10.77)	25(38.47)	28(43.07)	5(7.69)
UTI 组	80	10(12.50)	8(10.00)	50(62.50)	12(15.00)

2.2 毒力基因表达检测 黏附相关基因中, fimH 在两组中表达率最高, 4 种黏附相关基因在 ASB 组中的表达率均高于 UTI 组, 其中 afa、sfa 基因表达率差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞毒性相关基因的表达率, UTI 组高于 ASB 组, 其中 cnf1 和 hlyA 基因的表达率差异有统计学意义($P < 0.05$)。铁摄取相关基因的表达, UTI 组同样高于 ASB 组, 其中 fyuA 和 iutA 基因的表达率差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 ASB 组和 UTI 组大肠埃希菌毒力基因表达检测[n(%)]

类型	基因名称	ASB 组 (n=65)	UTI 组 (n=80)	χ^2	P
黏附相关基因	afa	40(61.25)	25(31.25)	13.302	0.000
	papA	44(67.69)	48(60.00)	0.915	0.339
	sfa	48(73.00)	42(52.50)	6.941	0.008
	fimH	59(90.76)	65(81.25)	2.624	0.105
细胞毒性相关基因	sat	30(46.15)	42(52.50)	0.578	0.447
	cnf1	26(40.00)	47(58.75)	5.043	0.025
	hlyA	23(35.38)	50(62.50)	9.010	0.003
铁摄取相关基因	fyuA	38(63.33)	67(83.75)	11.481	0.001
	irp2	29(44.61)	45(56.25)	1.943	0.163
	iutA	20(30.76)	40(50.00)	5.468	0.019

2.3 药敏试验结果 ASB 组和 UTI 组大肠埃希菌对除亚胺培南以外的 17 种抗菌药物均表现出不同程度耐药, 其中对呋喃妥因耐药率较低, 耐药率最高为氨苄西林。两组大肠埃希菌对抗菌药物的耐药率及产 ESBLs 株阳性率(50.76% vs. 56.25%), 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 ASB 组和 UTI 组大肠埃希菌对 18 种抗菌药物的耐药率[n(%)]

抗菌药物	ASB 组 (n=65)	UTI 组 (n=80)	χ^2	P
呋喃妥因	1(1.54)	0(0.00)	1.239	0.266
厄他培南	1(1.54)	2(2.50)	0.164	0.686
头孢唑林	46(69.76)	45(56.25)	3.235	0.072
头孢曲松	30(46.15)	44(55.00)	0.003	0.958

续表 5 ASB 组和 UTI 组大肠埃希菌对 18 种抗菌药物的耐药率[n(%)]

抗菌药物	ASB 组 (n=65)	UTI 组 (n=80)	χ^2	P
头孢替坦	1(1.54)	2(2.50)	0.164	0.686
阿米卡星	2(3.07)	3(3.75)	0.049	0.825
庆大霉素	25(38.46)	36(45.00)	0.629	0.428
妥布霉素	14(21.53)	12(15.00)	1.042	0.307
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	34(52.31)	33(41.25)	1.764	0.184
环丙沙星	32(49.23)	44(55.00)	0.734	0.392
左氧氟沙星	30(46.15)	42(52.50)	0.578	0.447
亚胺培南	0(0.00)	0(0.00)	—	—
氨基南	25(38.46)	36(45.00)	0.629	0.428
氨苄西林	60(92.30)	67(83.75)	2.416	0.120
氨苄西林/舒巴坦	38(46.15)	47(58.75)	0.001	0.972
哌拉西林/他唑巴坦	1(1.54)	2(2.50)	0.164	0.686
头孢他啶	14(21.54)	23(28.75)	0.981	0.322
头孢吡肟	12(18.46)	11(13.75)	0.596	0.440

注: —表示无数据

3 讨 论

尿路感染是临床上最普遍的细菌感染之一, 并由于其易复发和易再感染, 以及较高的耐药率, 一直是临床治疗的重点和难点问题。其致病机制目前仍不明确。绝大多数 ASB 和 UTI 均由 UPEC 引起。根据系统分群的结果, 大肠埃希菌可以被分为 A、B1、B2、D 4 群。不同系统发育群根据其携带的毒力基因不同从而表现出不同的致病能力。既往研究显示, B2 群和 D 群大肠埃希菌具有较高毒力, 与尿路感染的持久性或复发性有关^[5-6], 而 B1 群菌株有黏附相关基因的高表达, 这些基因与菌株定植在尿路上皮细胞有关^[7]。本研究发现, ASB 组和 UTI 组系统分群结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。UTI 组中 B2 群菌株的比例明显高于 ASB 组, 提示具有较高毒力的 B2 群大肠埃希菌可能是造成典型尿路感染的主要原因。而 ASB 组中 B1 群菌株比例较高, 因此其可能具有更强的黏附定植能力, 但由于其 B2 群菌株比例较低, 毒力较低, 所以虽然能持续定植但未能造成典型尿路感染症状。

UPEC 相关毒力因素包括: 1 型菌毛、P 菌毛等黏附器官; α -溶血素、细胞毒坏死因子 1 等毒素; 含铁产气杆菌素; 荚膜; 脂多糖和铁摄取系统等。黏附是细菌致病的第一步。黏附因子各亚基在细菌表面聚集并装配成单体、寡聚体或超分子纤维结构菌毛, 介导 UPEC 的黏附和侵袭过程。UPEC 主要黏附因子包括 1 型、P 型、S 型、F1C 型菌毛及 Afa/Dr 黏附因子家族, 尤以 1 型菌毛最常见。fimH 基因编码 1 型菌毛顶端 FimH 蛋白, FimH 蛋白直接介导 UPEC 与宿主细胞的黏附, 是引发尿路感染的关键环节。本研究发现, 4 种黏附相关基因中, fimH 在 ASB 组和 UTI 组中均有较高的表达率。papA 基因编码的 P 菌毛亚单位 A 属于黏附素, P 菌毛可与人泌尿道黏膜上皮细胞

表面的特异性受体结合促使细胞黏附定植,是尿路感染的首要条件。sfa 基因编码的 S 型菌毛属于甘露糖抵抗的黏附素,可黏附于人的膀胱和肾脏上皮细胞。afa 基因编码产物则主要介导无菌毛黏附。本研究发现,ASB 组 4 种黏附基因表达率均高于 UTI 组,其中 afa、sfa 基因表达率差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 ASB 组 UPEC 可能具有更强的黏附定植能力。黏附因子被认为是 UPEC 最重要的毒力因子,它的存在一方面可以帮助细菌定植在宿主泌尿道上皮细胞表面,抵御尿液冲刷;另一方面,黏附因子可以直接参与 UPEC 信号转导,介导细菌产物对宿主细胞的作用。更重要的是,在黏附因子的介导下,UPEC 可以侵袭宿主细胞,并持续繁殖,形成细胞内菌落群,从而逃避宿主细胞释放的炎症因子及免疫效应细胞的攻击。UPEC 成为胞内寄生菌后,不仅对抗菌药物敏感性下降,同时免疫原性也大大降低^[8]。这可能是 ASB 组中 UPEC 逃避宿主免疫系统攻击,在宿主体内持续增殖,形成 ASB 的机制之一。

除黏附外,细胞毒性相关基因和铁摄取相关基因同样在 UPEC 致病过程中起着不可或缺的作用。cnf1 有助于细菌播散并持续存在于宿主上皮细胞中。hlyA 则作用于宿主红细胞、肾脏上皮细胞、内皮细胞和免疫细胞,诱导细胞凋亡,帮助细菌突破尿路上皮细胞屏障。sat 编码的自转运毒素对膀胱和肾脏来源的细胞具有毒性。铁是细菌生长发育不可或缺的必要元素,iutA、irp2 和 fyuA 的基因编码产物主要介导铁利用和铁摄取,可以帮助细菌定植在泌尿道这一铁缺乏的环境中,与 UPEC 的毒力密切相关^[9]。本研究发现,UTI 组细胞毒性相关基因及铁摄取相关基因的表达率均高于 ASB 组,其中 cnf1、hlyA、fyuA、iutA 基因的表达率差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明 UTI 组菌株毒力强于 ASB 组,ASB 组菌株较低的毒力基因表达率可能降低了其急性致病能力,使其较少引起典型上尿路感染症状和肾盂肾炎等。也有部分学者提出一种假设,认为这可能是 ASB 组菌株为了适应宿主体内环境,选择性失活和不表达一些毒力基因,这样可以降低激活宿主固有免疫系统的概率,从而达到在宿主体内长期定植而不被消灭的目的。甚至有研究认为,ASB 不一定需要治疗,因为这种毒性较低的 UPEC 菌株的持续定植状态有助于防御更容易耐药或更高毒力菌株的侵袭^[10]。

本研究中,虽然 ASB 组和 UTI 组 UPEC 具有不同的系统分群特征及不同的毒力基因表达率,但其对 18 种抗菌药物的耐药率相近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。近年来,随着广谱抗菌药物的广泛使用,产 ESBLs 大肠埃希菌的感染率不断上升,本研究中,产 ESBLs 大肠埃希菌在 ASB 组和 UTI 组中的比例均超过 50%。目前临床上对尿路感染的经验治疗常选用氟喹诺酮类药物,但本研究发现 UPEC 对环丙沙

星、左氧氟沙星耐药率均在 50%左右。这都提示我国 UPEC 耐药情况处于十分严峻的状态,在临床上必须引起重视。

综上所述,UTI 和 ASB 分离的大肠埃希菌,具有不同的系统分群特征,这可能与表现出的不同致病能力相关。ASB 菌株黏附相关基因的表达率更高,有助于细菌黏附在尿路上皮细胞,抵御尿液的冲刷,同时可能有助于菌株形成胞内寄生菌,逃避宿主免疫系统的攻击,从而实现持续定植状态。ASB 菌株毒力较 UTI 低,这可能是其定植在宿主体内但未能引起典型尿路感染临床症状的原因。此外,ASB 和 UTI 分离的大肠埃希菌存在严重耐药情况,在临床上必须注意谨慎选择抗菌药物,谨防滥用。

参考文献

- [1] FLOKAS M E, DETSIS M, ALEVIZAKOS M, et al. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in paediatric urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis[J]. J Infect, 2016, 73(6): 547-557.
- [2] NICOLLE L E. Asymptomatic bacteriuria and bacterial interference[J]. Microbiol Spectrum, 2015, 3(5): 1-25.
- [3] CLERMONT O, BONACORSI S, BINGEN E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10): 4555-4558.
- [4] JOHNSON J R, STELL A L. Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise [J]. J Infect Dis, 2000, 67(1): 261-272.
- [5] HARWALKAR A, GUPTA S, RAO A, et al. Prevalence of virulence factors and phylogenetic characterization of uropathogenic Escherichia coli causing urinary tract infection in patients with and without diabetes mellitus [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2015, 109(12): 769-774.
- [6] LÓPEZ-BANDA D A, CARRILLO-CASAS E M, LEYVA-LEYVA M, et al. Identification of virulence factors genes in Escherichia coli isolates from women with urinary tract infection in Mexico [J]. Biomed Res Int, 2014, 37(8): 959206.
- [7] EJRNAES K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by Escherichia coli [J]. Dan Med Bull, 2011, 58(4): B4187.
- [8] 秦晓华, 王明贵. 黏附因子在大肠埃希菌尿路感染中的作用 [J]. 微生物与感染, 2012, 7(4): 227-232.
- [9] 邓聪, 彭亮, 潘嘉韵, 等. fyuA 缺失对大肠埃希菌致病能力的影响 [J]. 广东医学, 2016, 37(7): 962-964.
- [10] SALVADOR E, WAGENLEHNER F, KÖHLER C D, et al. Comparison of asymptomatic bacteriuria Escherichia coli isolates from healthy individuals versus those from hospital patients shows that long-term bladder colonization selects for attenuated virulence phenotypes [J]. Infect Immun, 2012, 80(2): 668-678.