

尿液分离大肠埃希菌耐复方磺胺甲噁唑相关基因研究

凌步致, 马均宝, 吴智刚, 何艳嫦, 崔东岚(广东省佛山市第一人民医院检验科 528000)

【摘要】目的 了解尿液分离大肠埃希菌对复方磺胺甲噁唑耐药的相关基因的分布特征。**方法** 从临床尿液标本中分离得到 145 株大肠埃希菌, 采用 K-B 法对甲氧苄啶和复方磺胺甲噁唑的药物敏感性测定。对甲氧苄啶耐药菌株中的 I、II 类整合子进行扩增, 并酶切分析相应的可变区, 从具有相同酶切图谱的菌株中各选取一株进行测序。测序结果在 GenBank 中进行核酸序列同源性搜索。对复方磺胺甲噁唑耐药株扩增 sul1、sul2、sul3 三种基因。对 I 类整合子阳性菌株进行 ERIC-PCR 基因分型。**结果** 对甲氧苄啶和复方磺胺甲噁唑耐药率分别为 73.1%、79.9%。在 109 株耐甲氧苄啶菌株中, I 类整合子含有 7 种基因盒类型, II 类仅含有 1 种类型基因盒, 发现 4 种类型 dfrA 基因。在 119 株耐复方磺胺甲噁唑菌株中, sul1 阳性 72 株, sul2 阳性 81 株, sul3 阳性 2 株。在甲氧苄啶和(或)复方磺胺甲噁唑耐药菌株中, 80 株 I 类整合酶阳性株 ERIC-PCR 分为 59 个基因型。**结论** 在复方磺胺甲噁唑的耐药基因分布中, dfrA17、sul2、sul1 携带率较高。在耐药性播散方面, 耐药基因的水平转移比菌株克隆传播作用更大。

【关键词】 尿路感染; 大肠埃希菌; 复方磺胺甲噁唑; 耐药基因; 整合子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.13.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)13-1652-03

Study on the resistance related genes of trimethoprim-sulfamethoxazole in urinary isolates of Escherichia coli LING Bu-zhi, MA Jun-bao, WU Zhi-gang, HE Yang-chang, CUI Dong-lan (Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Foshan City, Foshan, Guangdong 52800, China)

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of resistance related genes of trimethoprim-sulfamethoxazole in urine isolates of Escherichia coli. **Methods** 145 isolates of Escherichia coli were isolated from urine sample, the Trimethoprim and sulfamethoxazole susceptibility test of which were performed by K-B method. PCR for class I and II integrons were performed in trimethoprim-resistant isolates. Integron PCR products were digested with Hinf I, and amplicons with the same RFLP pattern were deemed to contain the same gene cassettes. The PCR products which is representative for each pattern were selected for DNA sequencing. The DNA sequences were analysed with BLAST algorithm in GenBank. sul1, sul2 and sul3 were detected by PCR in sulfamethoxazole-resistant isolates. ERIC-PCR were performed for genotype of int1-positive isolates. **Results** The resistant rate to trimethoprim and sulfamethoxazole were 73.1% and 79.1%, respectively. In 109 trimethoprim-resistant isolates, 8 different gene cassettes of integrons and 4 different dfrA genotypes were found. In 119 sulfamethoxazole-resistant isolates, sul1 (72 isolates), sul2 (82 isolates) and sul3 (2 isolates) were detected. In 80 int1-positive isolates, 59 genotypes were detected by ERIC-PCR. **Conclusion** DfrA17, sul2 and sul1 are widespread in urine isolates of Escherichia coli with resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Horizontal gene transfer plays a more important role than clonal expansion in the dissemination of the drug-resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole.

【Key words】 urinary tract infection; Escherichia coli; trimethoprim-sulfamethoxazole; resistance gene; integron

大肠埃希菌是泌尿系感染最常见的病原菌, 复方磺胺甲噁唑(SXT)曾作为治疗该类感染的一线药物, 是甲氧苄啶和磺胺甲噁唑的复方制剂, 其耐药性不断上升。复方磺胺甲噁唑相关耐药基因主要有整合子、磺胺类耐药基因(sul)^[1]。I、II类整合子可变区基因盒含有耐甲氧苄啶耐基因(dfrA)^[2], 而且 I 类整合子 3' 保守末端携带 sul 基因。sul 基因编码低亲和力的二氢叶酸合成酶, 与磺胺类耐药的主要有 3 个基因型(sul1、sul2、sul3)^[3]。本文主要对尿液分离大肠埃希菌的耐 SXT 相关基因进行研究, 并对 I 类整合子阳性菌株同源性进行分析。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 本院检验科微生物室 2010 年 1~11 月分离的非重复大肠埃希菌 145 株, 标本来源于尿液, 其中男 41 例, 女 104 例; 门诊患者 58 例, 住院患者 87 例。

1.2 细菌鉴定和药敏试验 利用法国梅里埃公司的 VITEK-

2 全自动微生物鉴定仪进行菌种鉴定和药敏试验, 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。头孢哌酮/舒巴坦、米诺环素、甲氧苄啶和磺胺甲噁唑的药敏试验采用 K-B 法, 根据临床实验室标准化委员会(CLSI)2010 年的标准判断结果, 其中甲氧苄啶的耐药标准为 $R \leq 10$ mm, 磺胺甲噁唑的耐药标准为 $R \leq 12$ mm。

1.3 仪器与试剂 德国 Eppendorf 公司的 PCR 扩增仪器; Bio-Rad 公司的凝胶成像仪; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 相关试剂盒、DNA Marker 均为 TaKaRa 公司产品。

1.4 PCR 反应体系 细菌基因组 DNA 提取按照试剂盒操作说明书, 于 -20 °C 保存。相关基因的 PCR 反应体系均为 50 μ L 体积, 其中含 Mg^{2+} 的 10 \times buffer 5 μ L, dNTP 200 μ mol/L, 上下游引物 0.2 μ mol/L, DNA 模板 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 1.25 U, 加入灭菌去离子水至 50 μ L。相关耐药基因的引物序

列和退火温度见表 1, int I、int II、sul1 的阳性对照为本实验室 PCR 扩增阳性并测序验证, sul2 和 sul3 阳性对照菌株为南方医科大学流行病学实验室惠赠。ERIC-PCR 的引物序列

ERIC-2^[4]: AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G, 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 52 °C 退火 40 s; 72 °C 延伸 4 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

表 1 PCR 反应引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	基因名称	片段大小	参考文献
int I -F	GCATCTCGGTTTTCTGG	I 类整合酶(int I)	457 bp	[5]
int I -R	GGTGTGGCGGGCTTCGTG			
5-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	I 类整合子基因盒	可变	[6]
3-CS	AAGCAGACTTGACCTGA			
int II -F	GCAAACGCAAGCATTCATTA	II 类整合酶(int II)	393 bp	[7]
int II -R	ACGGATATGCGACAAAAAGG			
hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG	II 类整合子基因盒	可变	[8]
hep74	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA			
sul1-F	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	sul1	433 bp	[9]
sul1-R	GCCGATCGCGTGAAGTTCCG			
sul2-F	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	sul2	293 bp	[9]
sul2-R	GCGTTTGA TACCGGCACCCGT			
sul3-F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	sul3	790 bp	[10]
sul3-R	CTAACCTAGGGCTTTGGATA			

1.5 整合子基因盒酶切分析 对 I、II 类整合子基因盒进行 Hinf I 酶切^[8], 初步判断是否携带相同的基因盒, 反应体系为: HinfI(10 U/μL)0.5 μL, 10 × H Buffer 2 μL, PCR 产物 5 μL, 加入灭菌去离子水至 20 μL。反应温度为 37 °C, 反应时间为 3 h。9 μL 酶切产物加入 1 μL 10 × Loading Buffer 琼脂糖电泳进行鉴定。

1.6 PCR 扩增产物鉴定 PCR 扩增产物与 DNA marker 用 1.0 % 琼脂糖 5 v/cm 电压电泳 50 min 左右, 用凝胶成像仪观察结果。对于整合子相同酶切图谱的基因盒 PCR 产物, 随机挑取 1 例阳性产物, 经纯化后送华大基因科技公司进行双相测序, 测序结果在 GenBank 进行序列比对分析。

2 结 果

2.1 药敏结果 在 145 株大肠埃希菌中, 对甲氧苄啶和磺胺甲噁唑都耐药的为 104 株(71.7%), 仅对甲氧苄啶耐药的 5 株(1.4%), 仅对磺胺甲噁唑耐药的有 15 株(8.2%)。对氨苄西林、复方磺胺甲噁唑、哌拉西林、头孢唑林、环丙沙星、庆大霉素、氨基曲南的耐药率分别为 92.4%、76.5%、74.5%、70.3%、61.4%、53.1%、52.4%, 对左旋氧氟沙星、米诺环素、头孢他啶、呋喃妥因、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦分别为 44.8%、37.9%、25.5%、20.6%、17.9%、8.3%、2.1%, 对亚胺培南的耐药率为 0.0%。

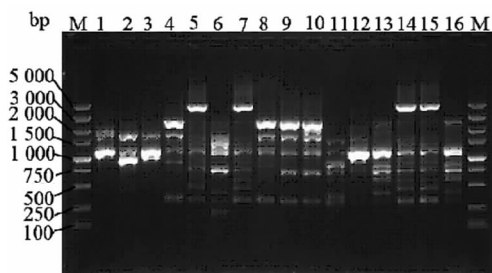
2.2 PCR 扩增结果 对 109 株甲氧苄啶耐药株进行整合子扩增, 有 76 株 I 类整合酶阳性, 8 株 II 类整合酶阳性。对整合子携带基因盒研究中发现, 有 8 株 I 类整合酶阳性基因盒扩增阴性, 有 64 株单独 I 类整合子基因盒阳性, 有 5 株细菌单独 II 类整合子阳性, 有 3 株细菌 I、II 类整合子基因盒同时阳性。对 119 株磺胺甲噁唑耐药株进行 sul 基因扩增发现, 112 株含有 sul 基因, 44 株 sul1+sul2 阳性, 26 株 sul1 阳性, 40 株 sul2 阳性, 1 株 sul1+sul2+sul3 阳性, 1 株 sul1+sul3 阳性。在 72 株 sul1 阳性株, 有 5 株 I 类整合子阴性。在 124 株甲氧苄啶和(或)复方磺胺甲噁唑耐药菌株中, I 类整合酶阳性有 80 例, 其中甲氧苄啶耐药株有 3 例, 磺胺甲噁唑耐药株有 4 例, 两者同

时耐药的含有 73 株。

2.3 PCR 产物序列分析 I、II 类整合子基因盒测序结果在 GenBank 中 blastn 比对分析, 同一性(identity)均大于或等于 99%, 具体排列方式及菌株分布见表 2。

表 2 I 和 II 类整合子在尿液分离大肠埃希菌的分布

整合子类型	基因盒类型	菌株数
I	dfrA17-aadA5	47
I	dfrA12+orfF+aadA2	11
I	dfrA5	1
I	dfrA1-aadA1	4
I	aadB-aadA1-cmlA6	1
I	aadA1, aacA4+cmlA	1
II	dfrA1-sat1-aadA1	5
I + II	aadA1, dfrA1-sat1-aadA1	3



M:5000DL marker; 1~16: I 类整合酶阳性菌株。

图 1 部分 I 类整合酶阳性大肠埃希菌 ERIC-PCR 电泳结果

2.4 ERIC-PCR 扩增结果 ERIC-PCR 电泳条带集中分布在 250~3 000 bp, 根据条带的大小和多少, 经 SPSS 软件分析, 80 株 I 类整合酶阳性大肠埃希菌共分为 59 个基因型, 部分结果见图 1。

3 讨 论

随着头孢类和喹诺酮类等抗生素在治疗泌尿系感染的广泛应用,大肠埃希菌的耐药性不断上升,复方磺胺甲噁唑与头孢类、氨基糖苷类、喹诺酮类常呈交叉耐药。I 类整合子在临床最常见,在 I 类整合酶的催化作用下,对耐药基因进行特异位点重组,插入可变区内,在介导尿致病性大肠埃希菌的复方磺胺甲噁唑耐药性方面有重要作用。II 类整合子携带率较低,其整合酶基因 *int2* 被一个终止密码子中断,是缺陷的整合酶基因^[11],其基因盒有携带 *dfrA1*,但在介导甲氧苄啶耐药性有限。在整合子研究仅发现四种 *dfrA* 基因型,以 *dfrA17* 类型最为常见,这与文献报道一致^[2,12],而且 *dfrA* 基因与氨基糖苷类耐药基因密切相关。Yu 等^[12]发现 *dfrA* 基因的分布具有时间差异,1980~1985 年以 *dfrA12* 为主;1996~1997 年和 2001~2002 年内以 *dfrA17* 和 *dfrA12* 为主,但 *dfrA17* 稍占优势。在耐甲氧苄啶菌株中,2 株 I 类整合子不含有 *dfrA* 基因,28 株 I、II 类整合酶扩增阴性,可能存在其他的耐药机制,如外膜通透性的降低,或者其他 *dfrA* 亚型并不位于整合子上,如 *dfrA10*、*dfrA18*、*dfrA23* 位于 ISCR1 转座元件上^[13]。Solberg 等^[2]、Yu 等^[12]、Blahna 等^[1]分别在美国、韩国、加拿大和欧洲地区对该类大肠埃希菌 I 类整合子检出 *dfrA1*、*dfrA5*、*dfrA7*、*dfrA12*、*dfrA15*、*dfrA17* 六种基因型。

在对 *sul* 研究中发现,三种基因型两者以上共存的比例占到了 80%,尤其是 *sul1-sul2* 组合,可能在整合子和接合性质粒的作用下,进行了基因的水平转移。这些表明上述耐药基因从精简角度来说,对细菌基因组的组装没有明显负担,反而会增加宿主菌对外界环境的适应性,比如 Enne 等^[14]报道携带 *sul2* 质粒 p9123 提高了宿主菌的生长率。在 *sul* 基因分布中,*sul2* 携带率最高,大都位于多重耐药质粒上,常与 *strA-strB* 相连^[3]。*sul1* 与 I 类整合子高度相关,但有 5 株 *sul1* 阳性株而 I 类整合酶却阴性,表明 *sul1* 可能不是位于 I 类整合子上或者 I 类整合酶在引物结合区发生突变,导致 PCR 扩增失败。*sul3* 的携带率最低,最初在瑞士猪身上分离得到^[10],常位于非典型 I 类整合子 3' 末端,而且与 IS26 高度相关^[15]。虽然磺胺类药物在临床很少应用,但携带率仍较高,可能是 *sul* 基因位于多种类型的转座元件上,导致了在大肠埃希菌的广泛播散。

耐药性的播散方式主要有耐药菌株的克隆传播和耐药基因水平转移,80 株 I 类整合子阳性菌 ERIC-PCR 基因分型分布较广,未见优势基因型,可得出复方磺胺甲噁唑的耐药性主要由耐药基因在不同细菌之间水平转移导致,这与 Landgren 等^[16]得出的克隆传播在耐药性播散方面作用较小的结论相一致。

参考文献

- [1] Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, et al. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(4): 666-672.
- [2] Solberg OD, Ajiboye RM, Riley LW. Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1347-1351.
- [3] Vinué L, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, et al. Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hos-

- pital[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(5): 492-496.
- [4] Munoz MA, Welcome FL, Schukken YH, et al. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 3964-3971.
- [5] Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5407-5413.
- [6] Lévesque C, Piché L, Larose C, et al. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(1): 185-191.
- [7] Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, et al. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(3): 838-842.
- [8] White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(9): 2658-2661.
- [9] Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Møller N, et al. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections, bacteraemia. And distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50(4): 513-516.
- [10] Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(3): 1169-1172.
- [11] Hansson K, Sundström L, Pelletier A, et al. *Int12* integron integrase in Tn7[J]. J Bacteriol, 2002, 184(6): 1712-1721.
- [12] Yu HS, Lee JC, Kang HY, et al. Prevalence of *dfr* genes associated with integrons and dissemination of *dfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(3): 445-450.
- [13] Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(2): 296-316.
- [14] Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, et al. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(6): 958-963.
- [15] Dawes FE, Kuzevski A, Bettelheim KA, et al. Distribution of class 1 integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12754.
- [16] Landgren M, Odén H, Kühn I, et al. Diversity among 2481 *Escherichia coli* from women with community-acquired lower urinary tract infections in 17 countries[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(6): 928-937.