

I 类整合子与铜绿假单胞菌多重耐药相关性研究

黄震^{1,2}, 陈文胜¹, 余治健², 阳晋², 邓启文²

(1 深圳市宝安区慢性病防治院, 广东 深圳 518133; 2 广东医学院附属深圳南山医院, 广东 深圳 518052)

[摘要] **目的** 了解 I 类整合子在临床分离的铜绿假单胞菌多重耐药株及敏感株中分布的差异, 初步阐明 I 类整合子是否与铜绿假单胞菌多重耐药性形成相关。**方法** 应用聚合酶链反应(PCR)法分别检测临床分离的 67 株多重耐药铜绿假单胞菌和 62 株敏感株中 I 类整合子的阳性率, 并进一步用 PCR 证实 I 类整合子阳性菌中整合子相关基因盒的存在。**结果** 铜绿假单胞菌多重耐药株中, 32 株(47.76%)为 I 类整合子阳性; 敏感株中仅 1 株(1.61%)为 I 类整合子阳性, 多重耐药株的 I 类整合子分布显著高于敏感株($\chi^2 = 36.02, P < 0.05$)。PCR 进一步证实多重耐药铜绿假单胞菌携带 I 类整合子基因盒, 而敏感株携带空整合子。**结论** 多重耐药铜绿假单胞菌具有较高的 I 类整合子阳性率, I 类整合子可能与铜绿假单胞菌的多重耐药性相关。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 多重耐药; I 类整合子; 基因盒; 抗药性; 微生物; 医院感染

[中图分类号] R378.99⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)03-0165-04

Relationship between class 1 integron and multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*

HUANG Zhen^{1,2}, CHEN Wen-sheng¹, YU Zhi-jian², YANG Jin², DENG Qi-wen² (1 Shenzhen Baoan Chronic Diseases Prevention and Control Hospital, Shenzhen 518133, China; 2 The Affiliated Shenzhen Nanshan Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the differences in distribution and characteristics of the class 1 integron (Int I) between multidrug resistant (MDR) and susceptible *Pseudomonas aeruginosa* (PA), and to evaluate whether Int I was associated with the formation of MDR of PA. **Methods** Positive rate of Int I in 67 MDR and 62 susceptible isolates from clinical samples were detected by polymerase chain reaction(PCR), and integrated gene cassettes in Int I positive strains were also identified by PCR. **Results** 32(47.76%) isolates with MDR phenotype were Int I positive but only 1(1.61%) isolate with susceptible phenotype was Int I positive, the distribution of Int I in MDR isolates was significantly higher than susceptible ones($\chi^2 = 36.02, P < 0.05$). The gene cassettes in MDR group carried large fragments, but the susceptible isolates carried an empty one. **Conclusion** Positive rate of Int I in MDR-PA is high and may be related with MDR of PA.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; multidrug resistance; class 1 integron; gene cassette; drug resistance, microbial; healthcare-associated infection

[Chin Infect Control, 2012, 11(3): 165-168]

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是引起医院感染最常见的条件致病菌, 占世界医院感染的 10%~15%^[1], 引起的菌血症病死率可达到 34.0%^[2]。整合子是自然基因捕获系统, 通过整合酶的作用, 整合子可整合不同的游离耐药基因并重组于 5' 和 3' 保守端之间的可变区中, 从而导致 PA

的多重耐药(multidrug resistance, MDR)^[3]。在抗菌药物选择压力下, 整合子是帮助 PA 多重耐药形成的重要原因之一。本研究拟调查深圳市多重耐药 PA 及敏感 PA 中 I 类整合子的分布, 并分析 I 类整合子与深圳地区 PA 多重耐药形成的关系。

[收稿日期] 2011-12-02

[作者简介] 黄震(1985-), 男(汉族), 江西省抚州市人, 医师, 主要从事细菌耐药机制研究。

[通讯作者] 邓启文 E-mail: Qiwendeng@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验用 PA 分离自深圳市南山医院及深圳市第一人民医院 2009 年 1 月—2010 年 9 月间非重复、具有临床意义的各类临床标本。药敏试验质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。I 类整合子阳性对照菌和阴性对照菌分别为经广东医学院微生物教研室鉴定的阴沟肠杆菌和肺炎克雷伯菌 GY2000, 由杨维青教授惠赠。细菌基因组 DNA 提取盒、聚合酶链反应(PCR)试剂和 DNA marker、琼脂糖凝胶回收试剂盒均为大连 TaKaRa 生物工程公司产品;引物合成及测序均由上海 Invitrogen 生物工程公司完成;抗菌药物敏感纸片为英国 OXOID 公司产品。

1.2 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法,测定 429 株 PA 对阿米卡星 (AMK)、氨苄西林(AMP)、氨曲南(ATM)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、环丙沙星(CIP)、亚胺培南 (IPM)、左氧氟沙星(LVX)、美罗培南(MEM)、哌拉西林(PFP)、四环素(TET)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、多粘菌素 E(PLE) 13 种抗菌药物的敏感性试验。对照菌为 PA ATCC 27853。结果参照美国临床实验室标准化研究所 (CLSI) 2009 年标准判断。纳入标准,敏感组:对 PFP 或替卡西林(TIC)、CAZ 等第三代头孢及所有四代头孢、LVX 及碳青霉烯类抗菌药物敏感的 PA^[1];多重耐药组定义:对 PFP 或 TIC、CAZ 或 FEP 或头孢哌酮(CFP)、IPM 或 MEM、LVX 中 3 类或以上抗菌药物耐药的 PA^[4-5]。

1.3 引物设计 参照文献^[5-7]设计 I 类整合子的整合酶基因(Int I 1)引物,Int I 1F:5'-ACGAGCG CAAGGTTTCGGT-3',Int I 1R:5'-GAAAGGTC TGGTCATACATG-3',目的片段 565 bp; I 类整合子可变区引物,5' CS: 5'-GGCATCCAAGCAG CAAG-3', 3' CS: 5'-AAGCAGACTTGACCT-GAT-3';对 I 类整合子阳性菌的整合子可变区基因进行扩增。

1.4 Int I 测定及整合子可变区扩增 以多重耐药及敏感组 PA 和对照菌 DNA 为模板扩增 Int I 1,反应体系为标准的 50 μL PCR 反应体系,反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 延伸 40 s,30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖

凝胶电泳鉴定。为排除假阳性,重复试验一次,并随机切取阳性条带回收后测序鉴定。之后,对所有 I 类整合子阳性菌的整合子可变区进行扩增,反应体系为标准的 50 μL PCR 反应体系,反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 1 min,72℃ 延伸 2 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经凝胶电泳鉴定。

2 结果

2.1 PA 耐药情况 在 429 株 PA 中,纳入多重耐药菌株 67 株(15.62%),敏感菌株 62 株(14.45%),其对各种抗菌药物的耐药率见表 1。

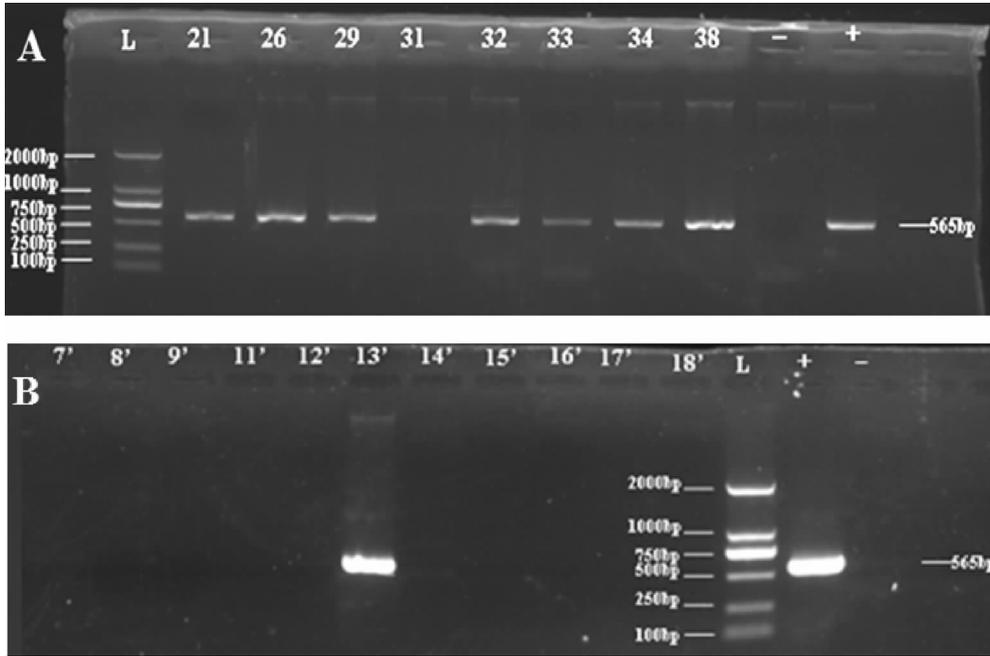
表 1 多重耐药组与敏感组 PA 对各抗菌药物的耐药率(%)
Table 1 Antimicrobial resistant rates of PA in MDR and susceptible groups(%)

Antimicrobial agent	MDR group (n = 67)	Susceptible group (n = 62)
AMP	100.00	100.00
AMK	56.71	0.00
TET	100.00	100.00
SXT	100.00	100.00
CAZ	88.06	0.00
FEP	100.00	0.00
CIP	71.64	0.00
IPM	92.54	0.00
LVX	80.60	0.00
MEM	89.55	0.00
PFP	83.58	0.00
ATM	89.55	0.00
PLE	0.00	0.00

Intermediate isolates were in MDR group

2.2 I 类整合子的检测 多重耐药组中有 32 株(47.76%)为 I 类整合子阳性,而敏感组中仅 1 株(1.61%)为 I 类整合子阳性(图 1)。多重耐药组的 I 类整合子分布明显高于敏感组($\chi^2 = 36.02, P < 0.05$)。

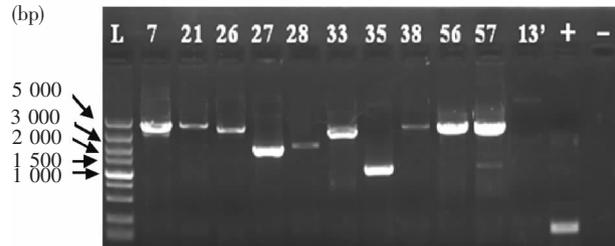
2.3 I 类整合子相关基因盒扩增 在多重耐药组 32 株 I 类整合子阳性菌中有 20 株菌携带基因盒(阳性率 62.50%),共 5 种可变区片段,大小均在 1 000 bp 以上,以 3 000~5 000 bp 为主;另 12 株菌无扩增产物,即携带空的 I 类整合子。敏感组 13' 号菌携带的亦为空整合子。见图 2。



Lane L: 2 000 bp DNA marker; - :negative control; + :positive control;Figure A:MDR group,Int I positive were 21,26,29,32,33,34 and 38; Figure B: susceptible group,only 13' was Int I positive.

图 1 Int I 的 PCR 产物电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of Int I PCR products of PA



Lane L:5 000 bp DNA ladder; - :negative control; + :positive control; Lane 7, 21, 26, 33, 38, 56 and 57: MDR-PA integrated a gene cassette between 3 000 - 5 000bp, others were 1 000 - 3 000 bp, lane 13': susceptible PA carrying an empty gene cassette.

图 2 I 类整合子阳性 PA 基因盒 PCR 产物电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of gene cassettes integrated by Int I positive PA

3 讨论

根据编码整合酶基因序列的异同(同源性 40%~58%),可将移动整合子分为 5 类^[3],而在 PA 中以 I 类整合子最常见。国内临床分离的 PA 整合子检出率报道不完全相同(42.9%~100%不等),在多重耐药 PA 中相对较高^[6,8-9],而深圳地区的 I 类整合子流行情况鲜见报道。本研究结果表明,多重耐药组 PA 的 I 类整合子阳性率显著高于敏感组 ($P<0.05$),提示深圳地区 PA 的多重耐药性与 I

类整合子有密切关系。本研究中多重耐药 PA 的 I 类整合子阳性率(47.76%)较国内其他地区低,这可能是由于不同地区、不同医院的抗菌药物选择环境不一样,也可能与菌株的来源不同有关。

尽管 I 类整合子阳性菌株可变区基因盒的扩增阳性率为 62.50%,但仍有部分 PA 的多重耐药性并非由整合子引起,而是通过其他机制,但并不排除少数菌 I 类整合子的 3'端保守序列不完整甚至缺失的可能而导致基因盒扩增的假阴性。通过可变区扩增后电泳可见其整合的片段在 3 000~5 000 bp 多见,相比国内其他文献中片段大^[6-7],说明基因盒中整合的耐药基因较多,但由于条件限制,并未进一步测序。在敏感 PA 中仅有 1 株为整合子阳性,且携带空整合子,故 13'号敏感 PA 与其他携带空整合子的多重耐药 PA 一样具有整合游离耐药基因的能力,从而进一步增加耐药性。

通过药敏试验结果发现敏感组与多重耐药组对 SXT、TET、AMP 的耐药率均为 100.00%,可见天然耐药在 PA 的耐药性中起很大作用,而 I 类整合子 3'端固有磺胺耐药基因(*sulI*)只是 PA 对 SXT 耐药原因之一。多重耐药 PA 对 AMK 和 MEM 耐药率相对较低,对 PLE 均敏感,故对于临床上难治性多重耐药 PA 感染,可考虑选用 PLE。PA 的多

重耐药机制复杂,并非携带整合子与否这一单方面可以解释,但是通过本研究可见, I 类整合子在 PA 多重耐药的形中仍发挥着重要作用。

[参考文献]

[1] Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(9):1133 - 1148.

[2] Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(2):229 - 233.

[3] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution [J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8):608 - 620.

[4] Ohmagari N, Hanna H, Graviss L, et al. Risk factors for infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cancer [J]. Cancer, 2005, 104(1):205 - 212.

[5] Falagas M E, Koletsis P K, Bliziotis I A, et al. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(12):1619 - 1629.

[6] Xu H, Su Z, Wang S, et al. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from Zhenjiang, China [J]. Curr Microbiol, 2009, 59(2): 113 - 117.

[7] 杨维青,殷长甫,石磊,等. 整合子及相关基因盒在临床分离铜绿假单胞菌中的分布[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(9):855 - 857.

[8] 姚慧琳,刘培明,陆士海,等. 铜绿假单胞菌中整合子的分布及其可转移耐药性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(8):S4 - S6.

[9] 赵书平. 多药耐药铜绿假单胞菌 β -内酰胺类耐药相关基因及 I 型整合酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(12): 1663 - 1666.

(上接第 203 页)

药物实施细则”(以下简称“细则”)。第 1 次 MTP 会议,将“细则”发给各目标处方者,并对每一条款进行学习 and 讨论。通过深入的学习和讨论,处方医生普遍认为在术前 0.5~2 h 用药、减少用药天数、避免联合用药及按“细则”选用第一代头孢菌素比较容易做到,但对手术一般不需预防使用抗菌药物还是疑虑重重。因此,在第 1 次 MTP 会议结束时,定下了先从容易改善的指标做起,并争取在避免联合用药、术前 0.5~2 h 用药、减少用药天数和按“细则”选用药物方面先达标。第 1 次 MTP 会议后的第 2 季度监测表明,除抗菌药物使用率仍为 100.00%,无改善外,其他监测指标都有明显改善。针对此种情况,MTP 小组在召开第 2 次 MTP 会议时,着重宣传了国外及国内某些知名医院对 I 类切口手术早已不预防使用抗菌药物且也未引起感染的事实,以消除处方医生的疑虑,并建议科主任带头在接受上述 3 种手术的患者中选择各方面条件较好的患者试行围术期不预防用药,结果取得了较好的效果,增强了各处方医生的信心,抗菌药物预防使用率明显下降。第 3 次 MTP 会议重点讨论如何改善手术室无菌管理及提高无菌手术操作水平,为 I 类切口手术全面实施一般情况下不预防使用抗菌药物奠定基础。通过 3 轮 MTP 活动,普外科的甲状腺次全切除、乳腺切除及腹外疝手术基本达到了“2011 全国抗菌药物临床应用专项整治活动方案”中对 I 类切口手术围术期预

防性使用抗菌药物的整治要求。

MTP 是以监测 (monitoring)、培训 (training)、计划 (planning) 联用,去实施教育、管理和监督 3 个方面的策略,是 WHO 推荐的一种促进合理用药的工作模式。其方法是首先对存在的问题进行调研,确定干预目标,而后针对存在的问题开展 MTP 会议,对目标医生进行培训,针对问题的解决,建立改进计划^[1]。其独特之处是它影响着目标处方者,从提高医生认识以自觉改善处方行为入手,要他们自己决定如何去改善处方实践,使以往管理者与被管理者在实现管理目标中的对立情绪得到较好解决,管理者与被管理者成为合作伙伴关系,不是要我做,而是我要做,建立这种关系有利于合理用药工作的持续、健康发展。

本研究采用 MTP 模式,通过客观指标展现,在规范的工作流程中让目标处方者主动参与,共同制订可行的干预目标,以点带面,循序推广,共同促进了合理用药工作的开展。

[参考文献]

[1] Suryawati S. 医疗机构改善用药状况的 MTP 干预法[M]. 北京:中国科学技术出版社, 2006:78 - 87.

[2] 唐镜波,陈香谱,谭军,等. 合理用药调研的国际指标[J]. 中国药房, 1995, 6(4):5 - 7.