

· 论 著 ·

I 类整合子介导的铜绿假单胞菌耐药性分析

王 寰¹, 范晓磊^{2△}, 王海澍³

(1. 大连医科大学附属二院检验科, 辽宁大连 116031; 2. 大连医科大学病原生物学教研室, 辽宁大连 116044; 3. 辽宁省大连市儿童医院检验科 116021)

摘要:目的 检测铜绿假单胞菌(PA)的 I 类整合子, 探讨其与细菌耐药性的关系。方法 以 VITEK-AMS 微生物自动分析仪进行细菌鉴定和药敏试验; PCR 扩增 I 类整合酶基因, 电泳分析 PCR 扩增产物。结果 116 株 PA 中, I 类整合子检出率为 25.9%(30/116)。I 类整合子阳性 PA 对氨基糖苷类、喹诺酮类及头孢菌素类药物的耐药率较高。I 类整合子阳性 PA 多药耐药率为 80.0%, 高于阴性菌株的 17.4%($P < 0.05$)。结论 I 类整合子与 PA 耐药性的形成和耐药基因的播散密切相关。

关键词:假单胞菌, 铜绿; 整合子类; 抗药性, 多药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)12-1304-02

Analysis of drug resistance mediated by class I integron in *Pseudomonas aeruginosa*

Wang Huan¹, Fan Xiaolei^{2△}, Wang Hailian³

(1. Department of Medical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Dalian

Medical University, Dalian Liaoning 116031, China; 2. Department of Microbiology, Dalian Medical University,

Dalian Liaoning 116044, China; 3. Dalian Children Hospital, Dalian Liaoning 116021, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the class I integron and drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (PA). **Methods** Identification and susceptibility test of PA were performed on VITEK-AMS automatic bacterial test systems. Class I integron gene in PA was amplified by polymerase chain reaction and the productions were examined by electrophoresis. **Results** In all 116 strains of PA, 25.9%(30/116) were positive with class I integron. The multi-drug resistance rate of PA, positive with class I integron, was 80.0%, higher the 17.4% of PA, negative with class I integron ($P < 0.05$). **Conclusion** Class I integron could be closely related with the emergence of drug resistance and the dissemination of drug resistance genes in PA.

Key words: pseudomonas aeruginosa; integrons; drug resistance, multiple

整合子通过位点特异性重组捕获耐药基因并使之表达, 是耐药基因水平播散的主要原因。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是引起医院感染的重要条件致病菌, 其耐药机制复杂多样。研究细菌整合子与耐药性的关系, 能为临床治疗感染提供依据。本文对 116 株 PA 进行分析, 以探讨整合子介导多药耐药性的机制。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 2009 年 5 月至 2010 年 5 月分离自临床标本的铜绿假单胞菌 116 株, 按菌株来源数排列依次为痰标本 53 株、脓液 23 株、咽拭子 12 株、尿 10 株、伤口分泌物 10 株、血液 8 株。

1.2 主要仪器与试剂 (1) 仪器: VITEK-AMS 自动鉴定系统及配套试剂 (Biomérieux, 法国)、9600 型聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪 (PERKIN ELMER, 美国)、Multiphor II 型 PCR 产物电泳仪 (Pharmacia LKB, 瑞典)、ImageQuant400 型凝胶成像系统 (GE Healthcare, 美国)。(2) 试剂: TaqDNA 聚合酶、dNTP 混合液 (25 mmol/L)、DNA 分子标准参照物、琼脂糖、溴化乙锭、DNA 纯化试剂盒、MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0、限制性内切酶 EcoR I、Hinf I 购自 Takara 公司, 引物由 Takara 公司合成。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853 (由卫生部临床检验中心提供)。携带 I 类整合子的 PA 菌株由本实验室保存, 作为 PCR 阳性对照。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 采用 GNS 检测卡测定 11 种抗菌剂对 116

株 PA 及质控菌株的最低抑菌浓度, 按仪器及试剂说明书要求进行操作。

1.3.2 DNA 模板的制备 将 116 株 PA 分别接种于 LB 培养基中, 37 °C 培养过夜, 取菌液 50 μL 加入 450 μL 双蒸水中, 沸水浴 10 min 后立即放至冰浴冷却, 10 000 r/min 条件下离心 3 min (离心半径 8.5 cm), 取上清液 -80 °C 保存备用。

1.3.3 I 类整合子基因检测 I 类整合子基因扩增引物: 上游 5'-CCT CCC GCA CGA TGA TC-3', 下游 5'-TCC ACG CAT CGT CAG GC-3', 扩增片段为 285 bp (与 intI1 片段大小相符^[1])。50 μL PCR 反应体系为 10 × PCR 缓冲液 5 μL、dNTP 混合液 5 μL、25 Mm MgCl 4 μL、TaqDNA 聚合酶 0.25 μL、引物各 1 μL、模板 DNA 2 μL。PCR 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min、56 °C 1 min、72 °C 1 min, 循环 35 次; 72 °C 10 min。扩增产物用含溴化乙锭的 20% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.3.4 I 类整合子可变区扩增及 DNA 序列分析 I 类整合子可变区扩增引物: 上游 5'-GGCATCCAAGCAAGC-3', 下游 5'-AAGCAGACTTGACCTGAT-3'。PCR 反应体系同上。PCR 扩增条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s、55 °C 45 s、72 °C 3 min, 循环 35 次; 72 °C 10 min。扩增产物点用分析同上。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计学分析软件。率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 时比较差异有统计学意义。

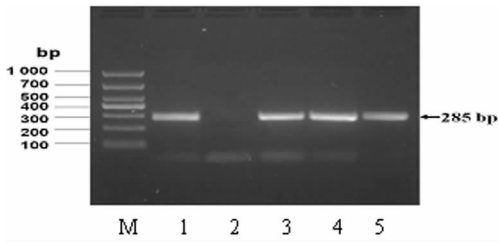
2 结 果

2.1 I 类整合子基因检测 25.9%(30/116) 的菌株检出 I 类

△ 通讯作者, E-mail: DHGXY2000@163.com。

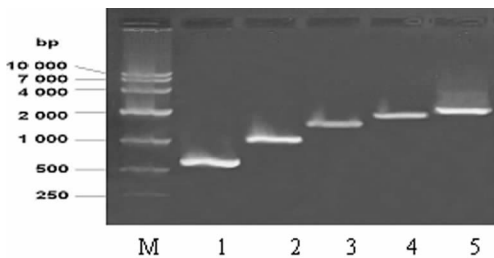
整合子。I 类整合子 PCR 产物电泳结果见图 1。

2.2 I 类整合子可变区检测 30 株 I 类整合子阳性菌株扩增出的 I 类整合子可变区大小包括 600、1 000、1 600、1 900 和 2 100 bp。根据以质粒 DNA 为模板检出的 I 类整合子可变区的大小,可将质粒 DNA 上的整合子分为 5 种整合子谱,见图 2。



M: DNA 分子标准参照物; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~5: 临床阳性菌株。

图 1 I 类整合酶基因扩增产物电泳结果



M: DNA 分子标准参照物; 1~5: 依次为 600、1 000、1 600、1 900 和 2 100 bp。

图 2 5 种整合子谱电泳分析

2.3 I 类整合子与细菌耐药性关系 I 类整合子阳性与阴性菌株对抗菌剂的耐药率分析结果见表 1。

表 1 I 类整合子阳性及阴性菌株耐药率

抗菌剂	阳性菌株 耐药率(%)	阴性菌株 耐药率(%)	χ^2	P
氨苄青霉素	90.5	43.1	28.08	<0.05
庆大霉素	85.7	31.9	35.91	<0.05
环丙沙星	35.7	25.9	1.45	>0.05
阿莫西林/克拉维酸	33.3	12.3	9.26	<0.05
头孢他啶	40.4	25.9	3.06	>0.05
哌拉西林	57.1	37.1	5.05	<0.05
哌拉西林/他唑巴坦	26.2	14.7	2.79	>0.05
丁胺卡那	76.2	3.4	92.98	<0.05
复方新诺明	100	25	70.1	<0.05
头孢噻肟	9.5	6.0	0.17	>0.05
亚胺培南	2.3	3.6	0.01	>0.05

2.4 I 类整合子与细菌 MDR 的相关性 I 类整合子阳性菌株多药耐药率为 80.0% (24/30), 阴性菌株多药耐药率为 17.4% (15/86), 二者比较差异有统计学意义 ($\chi^2=55.31, P<0.05$)。

3 讨 论

PA 是下呼吸道感染主要致病菌,对多种抗菌剂耐药,易导致感染的反复发作,甚至暴发流行,这与其所具有的复杂的耐药机制密切相关^[2]。研究细菌整合子有利于了解细菌多药耐药性发生和转移的机制。本研究显示,在 PA 阳性标本中,

56% (65/116) 来源于呼吸道标本,比严莲珍等^[3]的报道 (44.01%) 略高,可能与气管插管、流感病毒感染及其他各种炎症等因素导致呼吸道黏膜损伤,在鞭毛或蛋白酶作用下,PA 易于移生、黏附在呼吸道黏膜有关^[4]; 28.4% (33/116) 的 PA 阳性标本来源于伤口创面,可能与 PA 分布广泛和医院隔离消毒不彻底有关^[5]。药敏试验显示,本次所分离的 PA 对多种抗菌剂耐药,对青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、单环 β -内酰胺类以及磺胺类抗菌剂呈多药耐药。

整合子是存在于细菌质粒、染色体或转座子上的遗传结构,可以捕获耐药基因,使细菌产生多药耐药性,给临床治疗带来极大的困难^[6]。整合子自身不能移动,但可作为转座子的一部分或借助可移动性质粒在同种或不同种细菌间播散,造成细菌耐药性的扩大,也是细菌产生多药耐药性的重要原因。根据整合酶的不同可将整合子分为 6 类,在临床分离菌株中以 I 类整合子最为常见^[7]。I 类整合子由三部分组成,两端为高度保守序列 (conserved sequence, CS),即 5'CS 和 3'CS,二者间为由 1 个或多个外来插入基因盒组成的可变区^[8]。整合酶介导的基因盒的整合主要发生在 attC 和 attI 之间,通过整合子的整合,使耐药基因不断累积,从而使细菌获得耐药性和(或)多药耐药性。目前在 I 类整合子可变区中发现的基因盒已超过 80 种,多为耐药基因盒,其编码产物可使细菌对几乎全部常用抗菌剂耐药^[9]。本研究中, I 类整合子携带率为 25.9% (30/116), I 类整合子阳性菌株的耐药率高于阴性菌株,且 I 类整合子阳性菌株的多药耐药率达 80% (24/30),与文献报道^[10]略有差异,有待进一步深入探讨。

研究发现 I 类整合子可变区以 800、1 000 和 1 500 bp 最为常见^[11]。不同地区来源菌株或不同种属菌株若整合子基因簇的大小相同,通常所含的耐药基因也相同。本研究所检测的整合子可变区片段大小包括 600、1 000、1 600、1 900 bp 和 2 100 bp,属于广泛分布的优势整合子。

I 类整合子在与 PA 产生耐药性的遗传机制密切相关,是引起细菌多药耐药的重要因素。由于抗菌剂的种类和用量日趋增多,导致细菌面临更大的抗菌剂选择压力^[12]。本研究客观反映了本院临床分离 PA 菌株整合子携带情况,发现整合子阳性菌株多药耐药率高于阴性菌株,证实整合子介导了多药耐药性的水平播散。抗菌剂的使用越广泛,携带新耐药基因的优势菌越多,为 I 类整合子介导的多药耐药性细菌提供了选择性压力,有可能使其耐药种类更多、传播更广泛。因此,需重视 I 类整合子介导的细菌耐药性,加大监测力度,预防医院感染的发生。

参考文献

- [1] 凌华志,李涛,徐元宏,等.假单胞菌中整合子的分布及其可转移耐药性研究[J].临床检验杂志,2007,25(1):10-12.
- [2] 孙景勇,倪语星,汪复,等.2007 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2009,9(3):192-195.
- [3] 严莲珍,仲华,刘祖德,等.呼吸道感染患者铜绿假单胞菌耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2010,26(3):337-339.
- [4] 宁立芬,汪玉珍,谢彬,等.286 株铜绿假单胞菌耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2009,19(4):458-460.
- [5] 何萍,丁云芳.铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展[J].国际检验医学杂志,2010,31(8):23-25.
- [6] van Essen, Zandbergen A, Smith H, et al. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in Escherichia coli, Salmonella and Campylobacter spp in the Netherlands [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(6):746-758.

也呈正相关,相关系数分别为 0.39、0.33、0.35 和 0.34 ($P < 0.05$)。

3 讨论

PICP 是反映成骨细胞活动和骨形成,以及胶原合成速度的特异性指标^[5]。本研究显示,甲亢患者血清 PICP 水平高于对照组 ($P < 0.05$),且与 TT3、TT4 呈正相关,说明甲亢时伴随骨的形成和吸收增加^[6]。Rizzoli 等^[7]发现成骨细胞上存在三碘甲腺原氨酸核受体(nuclear triiodothyronine receptors, NT3R),甲状腺激素与其结合促成骨细胞生物活性和数量增加。

ICTP 时新近建立的反映骨吸收的最佳生化指标,是目前唯一知道的 I 型胶原特异标志物,其血浓度不受年龄、性别影响^[8]。骨吸收过程中,在胶原酶作用下 I 型胶原纤维裂解释放的 ICTP 以完整的免疫蛋白原形式进入血循环,是尿中可测定的吡酚脱氧吡啶的前体。血清 ICTP 能确切反映骨胶原转化率的微小变化^[9]。甲亢组 ICTP 水平上升,与 TT3、TT4 呈正相关,表明甲亢时因骨分解代谢异常活跃,骨吸收过程加速致 ICTP 升高,而与其清除率降低无关^[10-11]。由于 ICTP 由骨组织释放入血后不再进一步降解,保持其原有结构不变;血 ICTP 经肾脏排出,只有肾小球滤过率小于 50 mL/min 时才引起血 ICTP 升高(本研究中所有受试者均排除肾脏疾患);目前尚未发现肝脏参与 ICTP 代谢,故受试对象即使存在肝损害也不会影响血 ICTP 水平。因此,可以认为本研究中,甲亢组血 ICTP 升高系骨吸收加强所致。

BGP 是目前最为灵敏的骨形成指标,由成骨细胞产生并沉淀在骨基质。从骨髓中快速释放入血的 BGP 能真实反映 BGP 水平,其降解及转换过程迅速,可直接反映瞬间成骨细胞活性和数量变化。本研究显示,甲亢组血清 BGP 含量高于对照组 ($P < 0.05$),且 BGP 含量与血清 TT3、TT4 水平相关,与年龄、性别及病程无关,说明甲亢患者血清 BGP 水平测定对于甲亢性骨病的诊断、治疗及了解甲状腺的功能状态均有重要意义。

ALP 在骨形成中由成骨细胞释放,促进骨质矿化,并引起血清 ALP 增高。研究表明,甲亢组 ALP 高于对照组,与 TT3、TT4 呈正相关,说明 ALP 活性升高与血清 TT3、TT4 增高有关^[12]。

综上所述,甲亢使骨吸收和骨形成在高位运行,呈现高转

换型骨代谢紊乱;甲状腺激素可直接参与骨代谢,且骨吸收过程增加较为明显,造成骨量丢失,容易发生骨质疏松。深入研究甲亢治疗过程中 PICP、ICTP、BGP 和 ALP 的变化特征,对甲亢骨质疏松的防治具有重要临床意义。

参考文献

- [1] 李杨亮,陈烽,刘柳. Graves 甲亢¹³¹I 治疗中动态监测血清 TPO-Ab 的临床价值[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(10):960-962.
- [2] 李郑芳,明庆华,涂汝昌,等. 甲状腺疾病与骨钙素[J]. 中华骨质疏松杂志,2000,6(2):26-27,18.
- [3] 姜海红,刁迎斌,赵宏,等. Graves 病患者甲状腺激素与骨密度及骨转换指标的相关[J]. 中国骨质疏松杂志,2010,16(7):480-482.
- [4] 仇颖,邹艾桂,刘艳梅. 甲状腺功能亢进患者的骨代谢变化[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2006,9(12):1296.
- [5] Rotteveel J, Schoute E, Delemarre-van de Waal HA. Serum procollagen I carboxyterminal propeptide(PICP) levels through puberty: relation to height velocity and serum hormone levels[J]. Acta Paediatr, 1997, 86(2):143-147.
- [6] Miyakawa M, Tsumishima T, Demura H. Carboxy-terminal propeptide of type I procollagen(PICP) and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen(ICTP) as sensitive markers of bone metabolism in thyroid disease[J]. Endocr J, 1996, 43(6):701-708.
- [7] Rizzoli R, Poser J, Bürgi U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells[J]. Metabolism, 1986, 35(1):71-74.
- [8] Risteli J, Elomaa I, Niemi S, et al. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation[J]. Clin Chem, 1993, 39(4):635-640.
- [9] 徐浩, Eichstaedt H. 甲亢患者骨密度和血清骨代谢指标的变化[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1998, 14(4):244-247.
- [10] 李启欣, 李炜焯, 陈斌鸿, 等. 不同化学发光检测系统 FT3、FT4、TSH 结果的可比性和倚倚评估[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(8):790-791.
- [11] 费成英. 血清 TT3、FT3、TT4、FT4 以及 TSH 检测意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2):121-122.
- [12] 陈宏毅. FT3、FT4、TSH 与 T3、T4 联检评价甲状腺功能及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(4):318-319.

(收稿日期:2011-02-22)

(上接第 1305 页)

- [7] Mazel D. Integrins: agents of bacterial evolution[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8):608-620.
- [8] 王志锐, 李力, 张坚磊, 等. 耐药铜绿假单胞菌携带的整合子及其耐药基因盒检测分析[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(7):802-803.
- [9] Diaz-Mejia JJ, Amabile-Cuevas CF, Rosas I, et al. An analysis of the evolutionary relationships of integron I integrases, with emphasis on the prevalence of class I integrons in Escherichia coli isolates from clinical and environmental origins[J]. Microbiology,

- 2008, 154(1):94-102.
- [10] 吴志奇, 顾兵, 董明庆, 等. II 类整合子与志贺菌耐药的相关性分析[J]. 南京医科大学学报, 2009, 26(4):225-229.
- [11] 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.
- [12] 汪宏良, 邹春义, 罗卓越, 等. 多药耐药铜绿假单胞菌耐药基因研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7):662-663, 666.

(收稿日期:2010-12-31)