

• 基础实验研究论著 •

I 类整合子与鲍曼不动杆菌耐药性相关性研究

宋晓萍¹, 孙明娥¹, 李程², 王建¹

(1. 青岛大学医学院附属海慈医院检验科, 山东青岛 266033; 2. 山东省青岛市市立医院检验科 266011)

摘要:目的 了解鲍曼不动杆菌整合子分布情况, 探讨 I 类整合子与其耐药性的关系。方法 琼脂稀释法检测 65 株鲍曼不动杆菌耐药率, 聚合酶链反应(PCR)检测 I ~ III 类整合子基因; 对 I 类整合子阳性菌株进行可变区扩增及序列分析。结果 I 类整合子检出率为 60% (39/65), 未检出 II、III 类整合子; I 类整合子阳性菌株对 14 种抗菌药物的耐药率高于阴性菌株 ($P < 0.05$); 92% (36/39) 的 I 类整合子阳性菌株可变区扩增阳性, 序列分析显示携带 3 种耐药基因 *aacA4*、*aadA1* 和 *catB8*。结论 I 类整合子与鲍曼不动杆菌耐药性密切相关, 在鲍曼不动杆菌多药耐药性形成机制中起重要作用。

关键词: 鲍氏不动杆菌; 多重耐药; I 类整合子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.004 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)06-0648-02

Relationship between class I integron and drug resistance of *Acinetobacter baumannii*

Song Xiaoping¹, Sun Ming'e¹, Li Cheng², Wang Jian¹

(1. Department of Laboratory Medicine, Qingdao University Medical College Affiliated Hiser Hospital, Qingdao Shandong 266033, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong 266011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of integrons in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and analyze the relationship between class I integron and drug resistance. **Methods** Agar dilution method was used to determine the drug resistance of 65 strains of *Acinetobacter baumannii*, polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify class I - III integrase genes. Variable region was amplified and sequenced in *intI1*-positive strains. **Results** The positive rate of *intI1* was 60% (39/65), and no class II and III integron was detected. The drug resistance of *intI1*-positive strains was significantly stronger than that of *intI1*-negative strains ($P < 0.05$). 92% (36/39) of *intI1*-positive strains was positive with variable region, and was demonstrated to carry three kinds of resistance genes: *aacA4*, *aadA1* and *catB8* by sequence analysis. **Conclusion** Class I integron could be closely related to drug resistance of *Acinetobacter baumannii* and play an important role in its multi-drug resistance.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; mutlidrug resistance; class I integron

近年来, 广谱抗菌药物的滥用导致鲍曼不动杆菌检出率及耐药率逐年攀升, 并呈从单一耐药向多药耐药发展的趋势^[1-4]。整合子作为具有移动性的遗传单位, 是介导细菌产生多药耐药性的主要机制。本研究旨在了解整合子在临床分离鲍曼不动杆菌中的分布情况, 并进一步探讨整合子与其耐药性的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2010 年 1 月至 2011 年 1 月海慈医院分离的鲍曼不动杆菌 65 株(同一患者无重复菌株), 来源包括痰液、血液、尿液、分泌物, 均经 VITEK2-compact 微生物鉴定系统 GNI 卡鉴定。质控菌株铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 由海慈医院微生物实验室保存。

1.2 仪器与试剂 VITEK2-compact 全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃), MIT-P 型多点接种仪(日本 Sakuma), Tanon EPS-100 型电泳仪(北京原平皓生物技术有限公司), PTC-200 型扩增仪、凝胶成像系统(美国伯乐)。哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、左氧氟沙星、环丙沙星、头孢哌酮/舒巴坦、头孢曲松、头孢他啶及头孢吡肟购自中国药品生物制品检定所; 庆大霉素、氯霉素、阿米卡星、亚胺培南及美罗培南购自杭州默沙东公司; PCR 试剂盒(美国 Promega)。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 方法 (1) 药物敏感试验: 采用琼脂稀释法检测菌株对 14 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC), 试验方法及结果判断参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)最新标准。(2) 整合酶基因及 I 类整合子可变区基因扩增: 煮沸法提取细菌

DNA, I、II、III 类整合酶基因扩增引物及反应条件参照文献[5], 对 I 类整合酶基因阳性菌株进行 I 类整合子可变区基因扩增, 扩增引物及反应条件参照文献[6], 聚合酶链反应(PCR)产物经琼脂糖凝胶电泳后采用凝胶成像系统照相保存结果; 引物序列见表 1。(3) PCR 产物测序: 由上海英骏生物技术有限公司采用 ABI377 全自动 DNA 测序仪完成进行 PCR 产物双向测序; 结果在 GenBank 中比对分析。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
Int-1F	CAGTGGACATAAGCCTGTTC	160
Int-1R	CCCGAGGCATAGACTGTA	
Int-2F	TTGCGAGTATCCATAACCTG	288
Int-2R	TTACCTGCACTGGAT TAAGC	
Int-3F	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	147
Int-3R	ACGGATCTGCCAAACCTGACT	
Int15-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	800~3 000
Int13-CS	AAGCAGACTTGACCTGA	

1.4 统计学处理 采用统计软件 WHONET5.4 和 SPSS13.0 进行数据分析; 计数资料组间比较采用 χ^2 检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

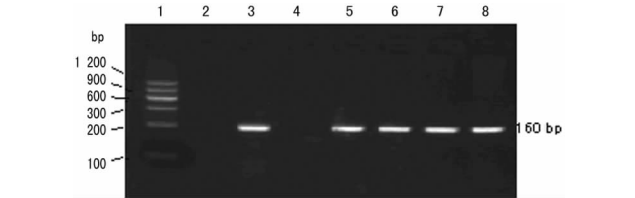
2 结 果

2.1 65 株鲍曼不动杆菌 I 类整合子基因阳性率为 60% (39/65), 所扩增特异性条带约 160 bp, 未检出 II 类及 III 类整合子。

电泳结果见图 1。随机选择 4 个样本进行测序及比对,与 Gen-Bank 基因序列 AJ640197.1 同源性为 100%。

2.2 I 类整合子阳性和阴性菌株对 14 种抗菌药物的耐药率比较见表 2。 χ^2 检验显示, I 类整合子阳性菌株对各种抗菌药物的耐药率均高于阴性菌株($P<0.05$)。

2.3 39 株 I 类整合子阳性菌株中, I 类整合子可变区基因扩增阳性检出率为 92%(36/39),且产物片段大小一致。随机选择 3 个样本进行测序及比对,发现整合子可变区与 GenBank 序列 AY922989 同源性为 99%,均含有 aadA1, aacA4 和 catB8 耐药基因。



1: DNA 分子标记; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照; 4~8: 临床菌株。

图 1 I 类整合酶基因 PCR 产物电泳结果

表 2 I 类整合子阳性和阴性菌株耐药率比较 (%)		
抗菌药物	阳性菌株(n=39)	阴性菌株(n=26)
哌拉西林	96.8	51.9
哌拉西林/他唑巴坦	61.3	10.6
头孢曲松	87.2	15.7
头孢他啶	88.8	16.0
头孢吡肟	80.3	25.9
亚胺培南	36.4	2.0
美罗培南	38.7	3.5
庆大霉素	80.2	30.2
阿米卡星	89.2	11.5
环丙沙星	78.0	30.1
左氧氟沙星	87.7	30.5
氯霉素	100.0	76.8
头孢哌酮/舒巴坦	38.8	3.2
氨曲南	87.4	34.1

3 讨 论

整合子-基因盒系统由 Hall 等^[7]于 1991 年提出,是细菌基因组中可移动的遗传物质,携带位点特异性重组系统组分,可将许多耐药基因盒整合在一起,从而形成细菌多药耐药性。整合子与鲍曼不动杆菌多药耐药性密切相关。尤其是在抗菌药物选择性压力下,整合子不断进化,生成新的耐药形式,使鲍曼不动杆菌感染更加难以治疗。整合子根据基因序列不同可分为 6 类, I、II、III 类整合子与耐药性的关系较为明确,其中以 I 类整合子最为常见。I 类整合子基因包括位于两端的 5' CS 和 3' CS,以及中间的可变序列; 5' CS 包括编码整合酶的 intI 基因和 1 个启动子, 3' CS 包括 3 个开放阅读框架(ORF): 磺胺耐药基因(sulI)、季铵盐化合物溴乙锭耐药基因(qacEA1)和 1 个功能尚不明确 ORF^[8-10]。

本研究中, I 类整合子基因阳性率为 60%(39/65),与其他学者报道基本一致^[11-12],未检出 II 及 III 类整合子; I 类整合子阳性菌株对 14 种抗菌药物的耐药率均高于阴性菌株($P<$

0.05),提示 I 类整合子与鲍曼不动杆菌耐药性密切相关,在介导鲍曼不动杆菌多药耐药性中起重要作用。但 I 类整合子阴性鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物的耐药率也较高,表明鲍曼不动杆菌多药耐药性不仅与 I 类整合子相关,也可能与其他耐药机制相关。39 株 I 类整合子阳性菌株中,有 36 株可扩增出可变区片段,可能是因为整合子基因较整合子可变区基因更易扩增,且可变区扩增引物是根据 3' CS 和 5' CS 序列设计的,而少数 I 类整合子没有 3' CS,故以扩增整合子可变区筛选整合子易造成漏检。对 I 类整合子可变区 PCR 阳性产物的比对分析发现其包含 3 个耐药基因: catB8、aacA4 和 aadA1,其中 catB8 编码氯霉素乙酰转移酶,引起氯霉素耐药性; aacA4 编码 6'-N-氨基糖苷乙酰转移酶,引起妥布霉素、阿米卡星耐药性; aadA1 编码氨基糖苷核苷转移酶,引起大观霉素和链霉素耐药性。整合子系统普遍存在,且与细菌多药耐药性密切相关。因此,应积极对整合子及整合子耐药基因盒进行监测,从而预测并控制细菌耐药性。

参考文献

[1] 施蔚,王琴,孟曙芳,等. 鲍曼不动杆菌 3 年耐药性监测结果分析[J]. 现代实用医学, 2009, 21(1): 41-42.

[2] 李文波,贾晓冬,张文杰,等. 鲍曼不动杆菌临床分布及耐药表型检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1063-1065.

[3] 武大伟,马全珍,魏殿军,等. 鲍曼不动杆菌 ESBLs 和金属酶的基因型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 323-325.

[4] 史俊艳,张小江,徐英春,等. 2007 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(3): 196-200.

[5] Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, et al. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(2): 453-460.

[6] Lévesque C, Piché L, Larose C, et al. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes[J]. Antimicrob Agents Chemothe, 1995, 39(1): 185-191.

[7] Hall RM, Brookes DE, Stokes HW. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of their combination cross-over point[J]. Mol Microbiol, 1991, 5(8): 1941-1953.

[8] Ramírez MS, Bello H, González Rocha G, et al. Tn7: In 28 dispersion in multidrug resistant isolates of Acinetobacter baumannii from Chile[J]. Rev Argent Microbiol, 2010, 42(2): 138-140.

[9] Lee YT, Huang LY, Chen TL, et al. Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of Acinetobacter baumannii bacteremic strains harboring class 1 integrons[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2009, 42(2): 210-219.

[10] Long YB, Faagali J, Bodman J, et al. Persistence of multiple antibiotic resistant strains of Acinetobacter baumannii carrying class 1 integron in a hospital setting[J]. Microb Drug Resist, 2009, 15(3): 167-172.

[11] 侯天文,尹晓琳,李玮,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌相关耐药基因检测分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(4): 79-83.

[12] 应春妹,翁文浩,汪雅萍,等. 鲍曼不动杆菌整合子相关耐药基因研究[J]. 检验医学, 2008, 23(1): 34-37.

(收稿日期: 2011-12-22)