

• 论 著 •

20 株奇异变形杆菌耐药基因和整合子分布及亲缘关系分析*

冯福英¹, 杨湘越², 洪 宇¹, 郑宗富¹, 张 薇¹, 蒋际城¹, 曾 琦¹

(1. 中国人民解放军第四七六医院检验科, 福建福州 350002;

2. 南京军区福州总医院医学检验研究所, 福建福州 350025)

摘 要:目的 了解该院神经内科病区奇异变形杆菌院内感染状况与耐药机制。方法 对 20 株不重复奇异变形杆菌采用 PCR 法检测超广谱 β 内酰胺酶 (ESBLs)、头孢菌素 (AmpC) 酶、碳青霉烯酶 (KPC) 和金属 β 内酰胺酶 (MBLs) 耐药基因并测序; PCR 法检测整合子并测序; 脉冲场凝胶电泳法分析菌株间亲缘关系; 对这 20 株奇异变形杆菌进行药敏试验并分析。结果 从这 20 株奇异变形杆菌中均检测出 TEM-1 和 CTX-M-14 型耐药基因, 10 株菌中分离出 CMY-2 型耐药基因。从 19 株菌中扩增出 I 类整合子, 分别整合的基因盒有“aacA4+cmlA1”, “dfrA12+orfF+aadA2”和“dfrA32+ereA+aadA2”。脉冲场凝胶电泳结果聚类分析 20 株菌可分为 P1~P11 的 11 个 PFGE 型别, 其中 P1~P3 的 12 株菌为同一克隆株。20 株菌对美罗培南、阿米卡星、氨曲南、头孢他啶和哌拉西林/他唑巴坦的敏感率高。结论 该院神经内科病区出现奇异变形杆菌同克隆株的传播; 携带的耐药基因以 CTX-M-14 和 CMY-2 型为主; I 类整合子携带率高, 耐药基因盒以“aacA4+cmlA1”和“dfrA12+orfF+aadA2”为主; 菌株对美罗培南、阿米卡星和氨曲南均为敏感; 临床科室应同样重视由奇异变形杆菌引起的院内感染, 加强感染控制措施。

关键词: 奇异变形杆菌; 耐药基因; 整合子; 脉冲场凝胶电泳

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)17-2461-03

Study on distribution of drug resistance gene and integron and analysis of genetic relationship of 20 isolates of *Proteus mirabilis**

Feng Fuying¹, Yang Xiangyue², Hong Yu¹, Zheng Zongfu¹, Zhang Wei¹, Jiang Jicheng¹, Zeng Qi¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the 476th Hospital of PLA, Fuzhou, Fujian 35002, China;

2. Institute of Laboratory Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: Objective To investigate the prevalence and resistance mechanisms of *Proteus mirabilis* in the ward of neurology department of our hospital. Methods For a total of 20 clinic isolates of *Proteus mirabilis*, PCR were used for the detection of AmpC, ESBLs, KPC and MBLs and then DNA sequencing was performed. The integrons were also detected by using PCR and then sequencing was carried out. The genetic relationship between isolates were detected and analysed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The results of drug sensitivity tests were analysed. Results TEM-1 and CTX-M-14 gene were found in all the 20 isolates, the 10 isolates of *Proteus mirabilis* were also found carrying CMY-2 gene. Class I integrons were amplified from 19 strains carrying gene cassettes "aacA4+cmlA1", "dfrA12+orfF+aadA2" and "dfrA32+ereA+aadA2" respectively. PFGE analysis revealed that the 20 isolates were grouped into 11 PFGE types P1-P11, the 12 isolates of P1-P3 were same clones. The sensitive rates of the isolates to Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Ceftazidime and Tazocin were high. Conclusion Nosocomial transmission of the same clone of *Proteus mirabilis* was appeared in the ward of neurology department of our hospital. The predominance drug-resistance genes were CTX-M-14 and CMY-2. The incidence of carrying class I integrons was high, and the major gene cassettes were "aacA4+cmlA1" and "dfrA12+orfF+aadA2". The 20 isolates were all sensitive to Meropenem, Amikacin and Aztreonam. Other Clinical departments should also pay attention to the nosocomial infection caused by *Proteus mirabilis* and strengthen the infection control measures.

Key words: *Proteus mirabilis*; drug resistance gene; integron; pulsed-field gel electrophoresis

奇异变形杆菌为条件致病菌, 也是院内感染菌之一。本院 2012 年 12 月至 2013 年 2 月从神经内科住院患者临床标本中密集地分离出奇形变形杆菌。为了解本科室住院患者奇异变形杆菌耐药基因和整合子的分布及它们的亲缘关系, 笔者对 20 株不重复菌进行了头孢菌素 (AmpC) 酶、超广谱 β 内酰胺酶 (ESBLs)、碳青霉烯酶 (KPC) 和金属 β 内酰胺酶 (MBLs) 等耐药基因的扩增, 进行了整合子的检测和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 的分析和药敏试验, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 分离的 20 株奇异变形杆菌来自神经内科住

院患者标本, 包括 14 例痰液、5 例尿液、1 例胸腔脓液。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及药敏试验 采用美国 BD 公司 PhoenixTM 100 革兰阴性杆菌复合板条 (NMIC/ID-4) 进行菌株鉴定及药敏试验, 依据 CLSI M100-S23 版文件的标准判读药物敏感试验结果。

1.2.2 细菌基因组模板制备 用 OMEGA Bio-Tek 公司生产的细菌基因组抽提试剂盒抽提菌株基因组, 基因组样品终体积为 50 μ L。

1.2.3 质粒 DNA 模板制备 用 OMEGA Bio-Tek 公司生产

* 基金项目: 南京军区医药卫生科研课题项目 (11MA118); 南京军区医学科学技术研究项目 (06MA149)。 作者简介: 冯福英, 女, 副主任医师, 主要从事临床微生物学与检验的研究。

的小量质粒抽提试剂盒(Plasmid Mini Kit I)抽提菌株质粒,质粒样品终体积为 50 μL。

1.2.4 耐药基因的检测 采用 PCR 法, AmpC 酶和 ESBLs 基因的引物合成和扩增条件按文献[1]进行; KPC 和 MBLs (IMP、VIM、NDM)基因的引物合成和扩增条件见表 1。采用大连宝生物有限公司的 TaKaRa Taq™ Hot Start Version 试剂盒。

表 1 KPC 和 MBLs 基因 PCR 引物序列					
基因名称	引物	序列(5'→3')	产物长度 (bp)	Tm (℃)	
KPC	KPC1	ATC GCC GTC TAG TTC TGC TG	811	58	
	KPC2	TCG CTG TGC TTG TCA TCC TT			
IMP	IMP1	TCC TAA ACA CGG CTT GGT GG	340	58	
	IMP2	TAC GTT ATC TGG AGC GTG CC			
VIM	VIM1	TCC ACG CAC TTT CAT GAC GA	481	58	
	VIM2	TAT GCC GCA TCT GCT ACT CG			
NDM	NDM1	CCA CGC ACT TTC ATG ACG AC	251	58	
	NDM2	ATA GAG CAC ACT CGC AGA CG			

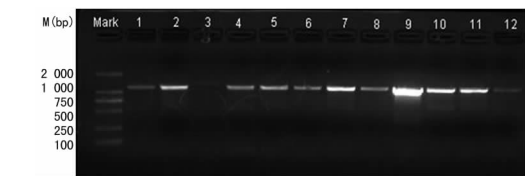
1.2.5 整合子的检测 采用 PCR 法,在整合子的保守序列中设计引物 5'CS:5'-GGC ATC CAA GCA GCA AG-3',3'CS:5'-AAG CAG ACT TGA CCT GA-3'。

1.2.6 PCR 产物测序与分析 产物在含 0.5 g/mL 溴化乙锭的 1.0%琼脂糖凝胶中电泳,出现目的条带的判为阳性,切胶回收纯化;纯化产物委托伯尚生物技术上海有限公司测序;所测序列与 GenBank 数据库进行比对以确定基因型。

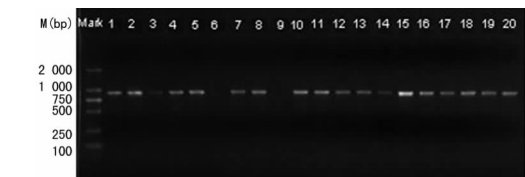
1.2.7 PFGE 用限制性内切酶 Sfi I (NEB 公司产品)进行酶切。实验方案参照美国病原菌分子分型监测网络 PulseNet 标准实验方案进行;用 Bionumerics 软件 Cluster analysis 模块进行聚类分析。

2 结 果

2.1 耐药基因检测 20 株菌中均检测到 β-内酰胺酶的 TEM-1 型和 ESBLs 的 CTX-M-14 型基因,从 10 株菌中检测到 AmpC 酶的 CMY-2 型基因;未检测到 SHV 型、KPC 和 MBLs (IMP、VIM、NDM)基因;部分 PCR 产物电泳结果见图 1、2。



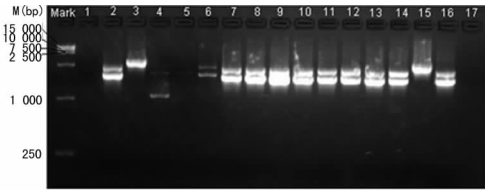
M:DL2000 DNA 标记物;1~2、4~12:目的条带。
图 1 CMY(146 bp)PCR 扩增产物电泳图



M:DL2000 DNA 标记物;1~5、7~8、10~20:目的条带。
图 2 CTX-M-G4(876 bp)PCR 扩增产物电泳图

2.2 整合子检测 19 株菌检测到 I 类整合子;17 株菌扩增出的二个可变区中,2 256 bp 大小的可变区内含“aacA4 +

cmlA1”基因盒,1 864 bp 大小的可变区内含“dfrA12+orfF+aadA2”基因盒;2 菌株扩增出 3 002 bp 的可变区,内含“dfrA32+ereA+aadA2”基因盒;1 菌株未扩增出整合子;部分整合子 PCR 产物电泳结果见图 3。



M:DL15000 DNA 标记物;2~4、6~16:阳性结果。

图 3 整合子扩增产物电泳图

2.3 药物试验 20 株分离菌的药敏试验结果见表 2。

表 2 20 株奇异变形杆菌药敏试验结果[n(%)]

抗菌药物	敏感	中介	耐药
氨苄西林	0(0)	0(0)	20(100)
阿莫西林/克拉维酸	19(95)	0(0)	1(5)
氨苄西林/舒巴坦	7(35)	9(45)	4(20)
阿米卡星	20(100)	0(0)	0(0)
氨基糖苷	20(100)	0(0)	0(0)
头孢唑啉	2(10)	0(0)	18(90)
哌拉西林	3(15)	1(5)	16(80)
头孢他啶	19(95)	1(5)	0(0)
头孢噻肟	3(15)	0(0)	17(85)
头孢吡肟	2(10)	7(35)	11(55)
环丙沙星	2(10)	0(0)	18(90)
左氧氟沙星	2(10)	3(15)	15(75)
氯霉素	2(10)	0(0)	18(90)
庆大霉素	1(5)	1(5)	18(90)
四环素	0(0)	0(0)	20(100)
复方磺胺甲噁唑	3(15)	0(0)	17(85)
亚胺培南	4(20)	0(0)	16(80)
美罗培南	20(100)	0(0)	0(0)
哌拉西林/他唑巴坦	18(90)	2(10)	0(0)

2.4 PFGE 及聚类分析 20 株菌 PFGE 后,可见 8~14 条大小不一的电泳条带。聚类分析显示,菌株间条带相似度为 47.013%~100.000%之间;按照 100%的相似度可将菌株酶切图谱分为 11 种型别(PFGE type),记为 P1~P11,大部分型别只有 1 个菌株,P1 型包含 10 个菌株。PFGE 聚类分析结果见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

分析的 20 株奇异变形杆菌均为产 ESBLs 菌株,ESBLs 的检出率明显高于文献[2-3]报道的 16.1%和 10.7%,20 株菌携带的耐药基因型均为 CTX-M-14,与文献[2]报道的以 CTX-M-15 基因型为主的结果略有差异,但均为 CTX-M 型耐药基因;从 10 株菌中扩增出 AmpC 酶 CMY-2 型基因,50%的检出率明显高于文献[4-5]报道的 1.4%和 0.1%,基因型与文献[4-6]报道的基因型相同;20 株菌中 10 株菌同时产 ESBLs 和 AmpC 酶,产超超广谱 β-内酰胺酶(SSBL)菌的阳性率为 50%。

本院检出的奇异变形杆菌的 ESBLs 基因型以 CTX-M 型为主, AmpC 酶的基因型以 CMY 型为主。

整合子是细菌中的一种可移动性基因元件,在耐药基因的水平转移中起到了至关重要的作用。分析的 20 株奇异变形杆菌中 19 株扩增出 I 类整合子,阳性率(95%)明显高于文献[7] 38.6%的报道。整合的耐药基因产物可导致奇异变形杆菌对氯霉素、三甲氧苄啶、红霉素、链霉素和壮观霉素的耐药。

药敏试验结果提示美罗培南、阿米卡星、氨曲南、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦和头孢他啶可作为对奇异变形杆菌感染治疗的首选用药或经验用药。16 株菌对亚胺培南耐药,与文献[8]报道的主要因产碳青霉烯酶所致耐药的原因不同,均未检出碳青霉烯酶和金属酶,可能与其他机制有关,有待进一步研究。

按 80%的相似度为标准^[9],PFGE 聚类分析中的三个 PFGE 型别的 1~12 号菌株判为同一菌株来源;通过临床调查,分离出奇变形杆菌的这些病患均有住过该病区 ICU 病房的经历,而该 ICU 病房因危重患者多,床位之间的距离未达到一米以上的要求,加之可能的其他感染控制措施的不到位,造成了此次奇异变形杆菌的院内感染。

此次研究结果揭示本院神经内科病区出现奇异变形杆菌的院内感染;均为产 ESBLs 株,其中 SSBL 菌占 50%,携带的耐药基因型为 CTX-M-14 和 CMY-2;I 类整合子的携带率高达 95%;美罗培南、氨曲南、阿米卡星、头孢他啶和加酶抑制剂的抗菌药物可作为首选用药或经验用药;本院分离的耐亚胺培南株与 KPC 和 MBLs 无关;临床科室应加强院内感染控制措施的落实,避免或减少院内感染的发生。

参考文献

[1] 冯福英,胡望平,杨湘越,等.耐头孢西丁革兰阴性杆菌高产

(上接第 2460 页)

的缺点,只需加样培养 24 h,直接观察菌落颜色,即可对细菌作出鉴定,不需配制培养基,操作简单,便于携带,检测时间短,非检验人员均可操作,特别适合在舰船远航及野外环境等特殊情况下开展。但细菌测试片法也存在一定不足,如测试片加样后马上盖上薄膜,液体易溢出;测试片种类比较少,只能检测十几种常见细菌;对于一些混合细菌感染的标本,使用一种测试片不能同时检测和鉴定多种病原菌等。

金黄色葡萄球菌测试片具有良好的特异性,在被测定的 26 种细菌中,除金黄色葡萄球菌呈蓝绿色菌落、表皮葡萄球菌呈黑色菌落外,其余 24 种非目的菌均不生长。金黄色葡萄球菌测试片灵敏度高,对纯菌的检测灵敏度可达 1 CFU/mL,对菌落数目在 1~9 个范围内的菌液,测试片法与平皿法一样均能检测出来。对于一些无菌部位的体液标本,如腹水、脑脊液、关节液等,其检出阳性结果具有一定临床意义。用测试片法与培养法同时检测临床标本 75 份,其检测结果一致。测试片在短时间使用和运输中,无需采取特殊保存措施。因此,在一些特殊情况下,如野外环境训练、抢险救灾开展医疗服务,舰船远航进行卫勤保障,发生食物中毒后指导突发事件的处理等,金黄色葡萄球菌测试片都具有重要的应用价值。

参考文献

[1] 孙霞,许如苏,卢新.金黄色葡萄球菌测试片的检测性能研究[J].

AmPC 酶发生率及基因型与耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(6):601-604.

[2] 范建中,董晓勤,王贤军. 奇异变形杆菌耐药性和超广谱 β -内酰胺酶基因型研究[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(2):378-379.

[3] 石兰峰,钮博. 奇异变形杆菌 ESBL 和 AmpC 酶的检测与耐药分析[J]. 中国厂矿医学,2009,22(1):75-76.

[4] 陈晓莉,徐元宏,黄颖,等. 变形杆菌临床分离株的耐药性分析及其 AmpC 酶的检测[J]. 安徽医科大学学报,2007,42(4):395-398.

[5] Yamasaki K, Komatsu M, Abe N, et al. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9):3267-3273.

[6] Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:171548.

[7] 陈奕慧,林红燕. I、II 类整合子在变形菌属中的分布及耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(3):526-528.

[8] 胡丽庆,史煜波,孙定河,等. 奇异变形杆菌耐药性的 4 年监测及碳青霉烯类耐药株的耐药机制研究[J]. 中国微生物学杂志, 2012,24(7):611-614.

[9] 陈辉,俞慕华,黄锐敏,等. 奇异变形杆菌的脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 现代预防医学,2008,35(13):2484-2486.

(收稿日期:2015-04-14)



中国卫生检验杂志,2009,19(5):1053-1054,1195.

[2] 陈德云,陈国雄,巫结冰,等. 测试片法快速检验食品中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(8):1456-1457.

[3] 袁丹茅,金建潮,陈前进,等. 金黄色葡萄球菌快速检测试片在食品检验中的应用[J]. 中国卫生工程学,2008,7(5):301-302.

[4] Silva Bo, Caraviello DZ, Rodrigues AC, et al. Evaluation of petri-film for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples [J]. J Dairy Sci, 2005, 88(8):3000-3008.

[5] Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, et al. Microbiology[M]. 4th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1990. 561-587.

[6] 郁庆福. 现代卫生微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:31-34.

[7] 李凡,刘晶星. 医学微生物学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:63-67.

[8] 杨自副,陈默燕. 定位显色培养基在细菌快速初步鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(7):760-762.

[9] 吴清平,周艳红,蔡芷荷,等. 卫生微生物特异性显色培养基的研究与应用[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(1):124-126.

[10] 吴许文,吴清平,张淑红,等. 细菌测试片的冷水可凝固剂初步研究和应用[J]. 微生物学通报,2009,36(11):1783-1788.

(收稿日期:2015-02-28)