

大肠埃希菌和铜绿假单胞菌耐药基因检测及其与医院感染的关系分析

赵丽霞,王家平,张晓梅

(常州市第二人民医院,江苏 常州 213003)

[摘要] **目的** 探讨医院大肠埃希菌和铜绿假单胞菌连续分离株的遗传标记与医院感染的关系。**方法** 以聚合酶链反应(PCR)法检测大肠埃希菌质粒 AmpC 酶基因 *ACT-1*、*DHA*, I 类整合酶基因 *Int I 1*, 耐消毒剂基因 *qacE Δ 1-sul1*; 铜绿假单胞菌 4 种整合子、转座子遗传标记(*qacE Δ 1-sul1*、*merA*、*tnpA*、*tnpU*)。 **结果** 大肠埃希菌质粒 AmpC 酶基因 *ACT-1*、*DHA* 阳性率分别为 57.50%、40.00%, I 类整合酶基因 *Int I 1* 阳性率为 47.50%, 耐消毒剂基因 *qacE Δ 1-sul1* 阳性率为 57.50%。铜绿假单胞菌中 *qacE Δ 1-sul1* 基因阳性率为 48.57%, *merA* 阳性率为 11.43%, 未检出 *tnpA*、*tnpU*。 **结论** 大肠埃希菌连续分离株携带质粒 AmpC 酶基因、I 类整合酶基因 *Int I 1* 及耐消毒剂基因 *qacE Δ 1-sul1*; 铜绿假单胞菌连续分离株携带 *qacE Δ 1-sul1*、*merA* 基因。不同菌株间的耐药基因可以相互传播,具有流行病学意义。

[关键词] 大肠埃希菌;铜绿假单胞菌;抗药性;微生物;耐药基因;医院感染;流行病学

[中图分类号] R378.2⁺1 R378.99⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)05-0322-04

Detection of drug-resistant genes of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and association with nosocomial infection

ZHAO Li-xia, WANG Jia-ping, ZHANG Xiao-mei (The Second People's Hospital of Changzhou, Jiangsu 213003, China)

[Abstract] **Objective** To explore the genetic marks of continuously isolated *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and the correlation with nosocomial infection (NI). **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect plasmid AmpC genes (*ACT-1* and *DHA*), class I integrase gene (*Int I 1*) and disinfectant-resistant gene (*qacE Δ 1-sul1*) of *E. coli*; Four kinds of genetic marks of integron and transposon (*qacE Δ 1-sul1*, *merA*, *tnpA*, *tnpU*) in *P. aeruginosa* were also detected by PCR. **Results** Among *E. coli*, the positive rate of plasmid AmpC genes of *ACT-1* and *DHA* was 57.50% and 40.00% respectively, the positive rate of *Int I 1* and *qacE Δ 1-sul1* was 47.50% and 57.50% respectively. Among *P. aeruginosa*, the positive rate of *qacE Δ 1-sul1* and *merA* was 48.57% and 11.43% respectively. There were neither gene *tnpA* nor gene *tnpU* in *P. aeruginosa* strains. **Conclusion** *E. coli* isolated from the clinic carries plasmid AmpC genes, *Int I 1* genes and *qacE Δ 1-sul1*; *P. aeruginosa* carries *qacE Δ 1-sul1* and *merA*. Resistant genes among different bacteria strains can be transmitted, which is significant in epidemiology.

[Key words] *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; drug resistance, microbial; drug-resistant gene; nosocomial infection; epidemiology

[Chin Infect Control, 2009, 8(5): 322-324, 342]

大肠埃希菌、铜绿假单胞菌已是医院感染病原菌最常见的菌种,国内已有上述两菌的耐药性与耐药基因报道^[1-5]。耐药菌或多重耐药菌的研究尽管能探讨耐药机制,但仍缺乏完整的流行病学数据,不

能为医院感染的控制决策提供参考依据。为了解大肠埃希菌、铜绿假单胞菌连续分离株的遗传学特征,我们对本院大肠埃希菌连续分离株的质粒 AmpC 酶基因、I 类整合酶基因 *Int I 1*、耐消毒剂基因

[收稿日期] 2009-08-12

[作者简介] 赵丽霞(1963-),女(汉族),江苏省常州市人,副主任护师,主要从事医院感染管理研究。

[通讯作者] 赵丽霞 E-mail: eygrglk@126.com

*qacE*Δ*1-sul1* 及铜绿假单胞菌连续分离株的整合子、转座子遗传标记(*qacE*Δ*1-sul1*、*merA*、*tnpA*、*tnpU*)进行检测,分析细菌所携带基因与医院感染的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及鉴定 40 株大肠埃希菌分离自 2005 年 10 月—2006 年 8 月本院住院患者送检标本,35 株铜绿假单胞菌为 2006 年 1—6 月间的连续分离株。采用法国生物梅里埃公司 VITEK 32 GNI 鉴定卡鉴定菌种。标准菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 细菌处理 挑纯培养菌落置入 0.5 mL 离心管内(内预置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200 μL),56℃ 水浴 2 h,改 95℃ 水浴 10 min,加入 Chelex-100

40 μL,离心(15 000 r/min)30 s。上清液即为基因检测的模板液,−20℃ 冰箱保存备用。

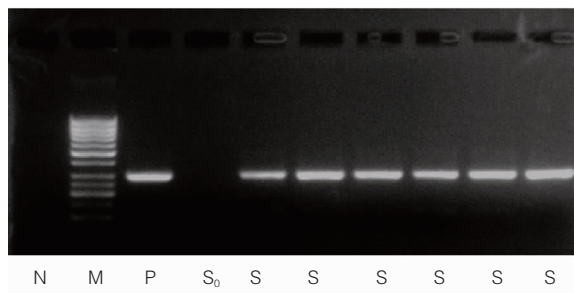
1.3 基因检测 均采用聚合酶链反应(PCR)法,靶基因引物序列和目的产物长度见表 1。靶基因 PCR 扩增体系均为:每反应体系 P1、P2 引物各 0.5 mmol/L, dNTPs 200 mmol/L, KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, NP₄₀ 0.5%, BSA 0.02% (w/v), Taq DNA 酶 1 U。总反应体积 20 μL (其中模板液 5 μL)。PCR 扩增热循环参数均为:93℃ 预变性 2 min,然后 93℃ 30 s→55℃ 30 s→72℃ 60 s,循环 35 周期,最后 72℃ 延长 5 min。扩增产物作 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶电泳成像仪下观察并记录结果。耐药基因检测试剂盒、靶基因 PCR 引物序列和阳性对照 DNA 由无锡市克隆遗传技术研究所提供。基因测序由无锡市克隆遗传技术研究所完成。

表 1 靶基因 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence of target gene

遗传标记	基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
整合子	<i>qacE</i> Δ <i>1-sul1</i>	P1: TAGCGAGGGCTTTACTAAGC	300
		P2: ATTCAGAATGCCGAACACCG	
转座子	<i>merA</i>	P1: GACCAGCCGCAGTTCGTCTA	462
		P2: GCAGCA(G/C)GAAAGCTGCTTCA	
	<i>tnpA</i>	P1: CGCCAGTCTTGATGAGCCGG	444
		P2: TTGCGGTTCCGGTCCGGCAA	
<i>tnpU</i>	P1: CCAACTGATGGCGGTGCCTT	403	
	P2: CGGTATGGTGGCTTTCGC		
质粒 AmpC 酶	<i>DHA</i>	P1: AACTTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
		P2: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
	<i>ACT-1</i>	P1: TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	303
		P2: CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
I 类整合酶	<i>Int I 1</i>	P1: CCGAGGATGCGAACCCTTC	373
		P2: CCGCCACTGCGCGGTTACCA	

2 结果

40 株大肠埃希菌中质粒 AmpC 酶基因 *ACT-1*、*DHA* 阳性率分别为 57.50%、40.00%, I 类整合酶基因 *Int I 1* 阳性率为 47.50%, *qacE*Δ*1-sul1* 检出率为 57.50%。*ACT-1* 基因 PCR 电泳图见图 1。35 株铜绿假单胞菌 *qacE*Δ*1-sul1* 检出率为 48.57%, *merA* 检出率为 11.43%, 未检出 *tnpA*、*tnpU*。各取一个 *qacE*Δ*1-sul1*、*merA* 基因 PCR 阳性产物进行双脱氧末端终止法测序,经 BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn) 比对,与美国 GenBank 已登录的相应序列 100% 相同。图 2、3 分别为 *qacE*Δ*1-sul1*、*merA* 基因 PCR 产物部分测序图。



M: 分子量标志物,由上而下分别为 1 000、900、800、700、600、500、400、300、250、200、150、100、50 bp; P: 阳性对照; N: 阴性对照; S: 标本阳性; S₀: 标本阴性

图 1 大肠埃希菌 *ACT-1* 基因 PCR 电泳图
Figure 1 Electrophoresis map for PCR product of *ACT-1* gene in *E. coli*

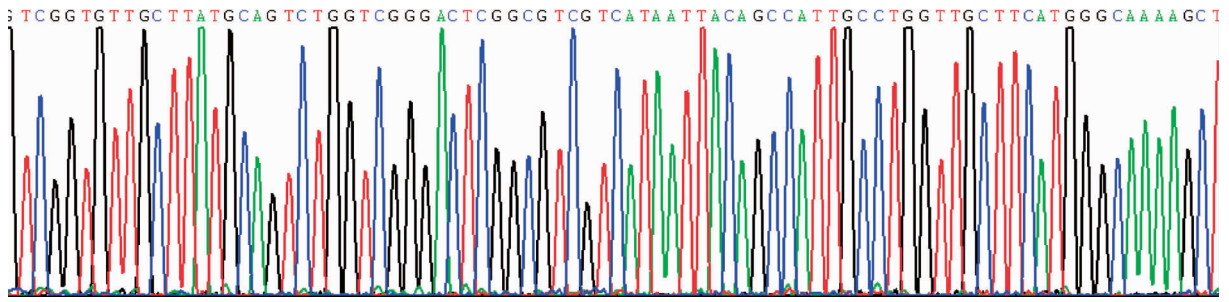


图 2 *qacE*Δ1-*sul1* 基因 PCR 产物部分测序图

Figure 2 Partial DNA sequencing result for PCR product of *qacE*Δ1-*sul1* gene

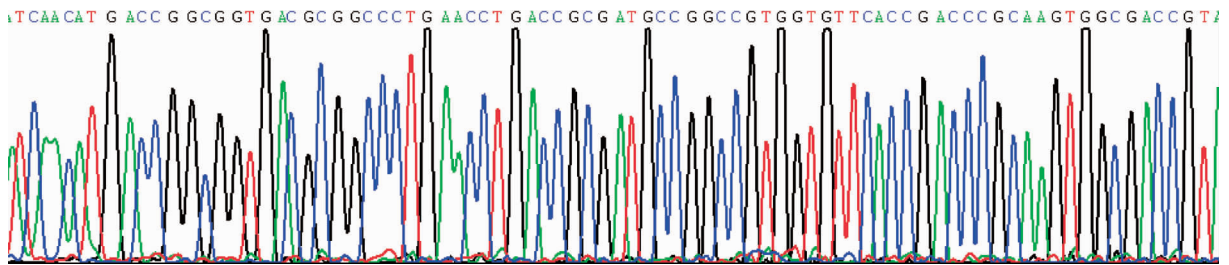


图 3 *merA* 基因 PCR 产物部分测序图

Figure 3 Partial DNA sequencing result for PCR product of *merA* gene

3 讨论

本研究中质粒 AmpC 酶基因 *ACT-1*、*DHA* 阳性率分别为 57.50%、40.00%，I 类整合酶基因 *Int I 1* 阳性率为 47.50%，提示存在克隆传播现象。整合子的存在是革兰阴性菌多重耐药迅速发展的主要原因^[6-7]。近年发现，整合子介导的耐药基因可以在同种菌和不同种菌中播散。整合子为可移动遗传元件，依据其整合酶基因序列差别，可分 4 类，其中 I 类整合子最常见。I 类整合子前端(5'末端)为整合酶基因(*Int I 1*)，中端为耐药基因盒(即为数量不等的 β-内酰胺酶基因、氨基糖苷类修饰酶基因以及二氢叶酸还原酶基因)，后端(3'末端)为消毒剂与磺胺耐药的重叠基因(*qacE*Δ1-*sul1*)。研究发现^[8-10]，I 类整合子不仅携带二氢叶酸合成酶的编码基因——*sul1*，有些同时还携带二氢叶酸还原酶的编码基因——*dfrA*(早期文献中以 *dhfr* 表示)。本研究的 40 株大肠埃希菌中 *Int I 1* 阳性 19 株(47.50%)，提示本组大肠埃希菌 I 类整合子携带率较高，具有流行病学意义。

merA 为转座子 Tn21 和 Tn501 共同的遗传标记，*tnpA* 为转座子 Tn1、Tn2、Tn3、和 Tn1000 共同的遗传标记，*tnpU* 为转座子 Tn1548 遗传标记。转

座子为跳跃基因，其与整合子、质粒一样为可移动的基因元件，极易在同类生物中横向传递。铜绿假单胞菌均携带 *merA* 基因，未发现 *tnpA*、*tnpU*。*tnpU* 为转座子遗传标记，最近从鲍曼不动杆菌中发现^[11-12]。*merA* 基因表达汞离子还原酶，阳性提示细菌对汞离子消毒剂和防腐剂耐受，并提示细菌携带 Tn21 和/或 Tn501 型转座子。*qacE*Δ1-*sul1*、*merA* 基因阳性率具有流行病学意义。

通过研究发现，引起本院某病区医院感染的细菌存在相同的基因，这一病区分离的 5 株大肠埃希菌、4 株铜绿假单胞菌均携带 I 类整合子、*qacE*Δ1-*sul1* 基因。由于这些基因可以在同种细菌间相互传播，也可以在不同种细菌间相互传播，从而导致医院内交叉感染。因此，对医院感染病原菌进行相关基因检测，对控制医院感染相当重要。通过检测相关基因，发现造成医院感染的根本原因，才能采取更为有效的预防和控制措施，避免医院感染的流行和暴发。

(致谢:PCR 引物由无锡市克隆遗传技术研究所糜祖煌老师完成设计,特此致谢)

[参 考 文 献]

[1] 钱小毛,赵仲农,王亚玲.绍兴地区铜绿假单胞菌亚胺培南耐药机制研究[J].中华医院感染学杂志,2005,15(7):815-818.

3 讨论

腹部的手术和创伤最易并发感染,在腹部外科,因肠道、胆囊等手术污染的机会多,术后切口感染较为常见^[1]。本组调查 193 例普通外科手术患者,手术切口感染率为 6.74%,与何瑾玢等报道的 101 例普通外科手术切口感染率 6.94%^[2]相近,低于王红梅等报道的普通外科手术切口感染率 9.62%^[3]。普通外科手术切口感染与患者自身及手术操作、环境、手术时间等多种因素相关^[4]。表 2 显示,各类手术切口感染率居前 3 位者依次为胆囊切除术(20.00%)、胃肿瘤根治术(16.67%)、肠道修补/切除术(16.00%)。胆囊切除术切口感染率明显高于邓良全等的报道(7.25%)^[5]。开展手术医生切口感染专率监测,让医生了解自己手术质量的水平,促使手术医生主动及早改进手术操作技能,以求降低手术切口感染率,这也是提高医疗水平的一种行之有效的措施。监测中发现个别医生手术切口感染率较高,经危险因素评分,调整感染专率后,则差别不大;同时显示,危险指数增高,感染概率随之升高^[4]。手术的污染程度在决定发生感染的概率上很重要,随着污染程度的增加,感染率明显增加,切口类型与术后切口感染的发生密切相关($0.01 < P < 0.05$)。随着手术时间的延长,术后切口感染率亦明显增加($P < 0.01$)。不同性别及手术性质(急症/择期)者手术

切口感染率无明显差别。本组调查择期手术切口感染者以结肠肿瘤手术为多,而急症手术以阑尾炎切口感染为多,是否与疾病种类、手术操作、患者的身体状况、手术例数等因素有关,有待于进一步探讨。

降低手术切口感染率是一项复杂的系统工程,涉及因素很多,需要全方位的努力与配合,包括医生的手术技巧、麻醉方式、手术类型、围手术期抗菌药物使用、手术后患者的医护管理以及患者全身状况等,在短期内很难取得明显效果。手术医生感染专率监测是将监测与控制结合起来,针对存在的问题,及时采取干预措施;取得手术医生配合,提高医生对医院感染控制的意识与责任,以逐步降低手术切口感染率。

[参考文献]

[1] 李莹,黄存林,朱小琴,等. 1 878 例外科腹部手术切口感染调查[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(4):382-384.
 [2] 何瑾玢,李卿,江金燕. 101 例普外科手术切口感染调查及分析[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12(2):110-115.
 [3] 王红梅,张梅. 普通外科手术切口感染调查与分析[J]. 中国感染控制杂志,2007,6(1):33-34.
 [4] 易洪仪,王效杰,唐英. 手术医生切口感染专率调查[J]. 中华医院感染学杂志,2005,15(1):29-30.
 [5] 邓良全,林彬,项敏. 腹部外科手术医生感染率监测[J]. 中华医院感染学杂志,2001,11(3):183-184.

(上接第 324 页)

[2] 王家平,赵丽霞,王苏建,等. 二家医院铜绿假单胞菌连续分离株耐药性与整合子、转座子遗传标记研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(1):4-7.
 [3] 王伟,金辉,糜祖煌. 多重耐药绿脓假单胞菌耐药基因及菌株亲缘性分析[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(9):843.
 [4] 王苏建,王家平,张晓梅,等. 二家医院铜绿假单胞菌连续分离株 16SrRNA 甲基化酶、氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(11):1501-1504.
 [5] 金辉,糜祖煌,钱小毛,等. 铜绿假单胞菌耐药基因的分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(2):134-136.
 [6] Fluit A C, Schmitz F J. Resistance integrons and super-integrons[J]. Clin Microbiol Infect, 2004,10(4):272-288.
 [7] Fluit A C, Schmitz F J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999,18(11):761-770.
 [8] Lee J C, Oh J Y, Cho J W, et al. The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in

urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea[J]. J Antimicrob Chemother, 2001,47(5):599-604.
 [9] Lindstedt B A, Heir E, Nygard I, et al. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica subsp. enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals[J]. J Med Microbiol, 2003,52(2):141-149.
 [10] Dalsgard A, Forslund A, Serichantalergs O, et al. Class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* 0-serotype strains isolated in Thailand[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000,44:1315-1321.
 [11] 糜祖煌,秦玲. 多药耐药鲍氏不动杆菌 5 类抗菌药物耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(7):901-904.
 [12] Doi Y, Adams J M, Yamane K, et al. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* Clinical strains in North America[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(11):4209-4210.