

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2014.12.001

· 论 著 ·

多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性与整合子关系研究

黄 帆¹, 袁海宁¹, 覃金爱¹, 苏明华¹, 梁道斌², 郭世辉¹

(1 广西医科大学第一附属医院, 广西 南宁 530021; 2 玉林市红十字会医院, 广西 玉林 537000)

[摘要] **目的** 了解多重耐药鲍曼不动杆菌整合子的表达及耐药基因的携带情况。**方法** 收集 2012 年 8—10 月某院临床分离的 51 株多重耐药鲍曼不动杆菌, 对其进行药敏试验; 采用聚合酶链反应 (PCR) 检测 I、II、III 类整合酶基因及整合子可变区基因盒, 应用限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析和测序结果进行同源性分析。**结果** 多重耐药鲍曼不动杆菌整合酶基因阳性率为 78.43% (40/51), 均为 I 类整合子, 未检出 II、III 类整合子。I 类整合子阳性菌中, 39 株 (97.50%) 扩增出可变区, 检出 5 种耐药基因盒组合形式, 分别为 aacA4 (14 株)、aacA4 + catB8 (22 株)、arr-3 + aacA4 (1 株)、dfrA15 (1 株) 和 arr-3 (1 株)。**结论** 该院临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性可能与 I 类整合子表达有关。I 类整合子主要携带 aacA4、aacA4 + catB8、arr-3 + aacA4、dfrA15 和 arr-3 基因盒。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; 多重耐药性; 抗药性; 微生物; 整合子; 基因盒; 医院感染

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)12-0705-05

Relationship between resistance and integron of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

HUANG Fan¹, YUAN Hai-ning¹, QIN Jin-ai¹, SU Ming-hua¹, LIANG Dao-bin², GUO Shi-hui¹ (1 The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2 Yulin Red Cross Hospital, Nanning 537000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and resistant gene of integron in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR-Ab). **Methods** 51 strains of MDR-Ab isolated from a hospital in August-October 2012 were collected, antimicrobial susceptibility testing was performed. Class I (Int I), II (Int II) and III (Int III) of integrase genes and integron variable region gene cassettes were detected by polymerase chain reaction (PCR), and the homology of integron variable region was analyzed by detection results of restriction fragment length polymorphism (RFLP) and DNA sequencing. **Results** Positive rate of integrase gene in MDR-Ab was 78.43% (40/51). All genes belonged to Int I, while Int II and Int III were not found. Variable region cassettes were detected in 97.50% ($n=39$) of Int I, there were 5 types of integron gene cassettes: aacA4 in 14 strains, aacA4 + catB8 in 22 strains, arr-3 + aacA4 in 1 strain, dfrA15 in 1 strain and arr-3 in 1 strain. **Conclusion** MDR-Ab isolated from this hospital may be related with Int I expression. Int I carried gene cassettes as follows: aacA4, aacA4 + catB8, arr-3 + aacA4, dfrA15 and arr-3.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; multidrug-resistance; drug resistance, microbial; integron; gene cassette; healthcare-associated infection

[Chin Infect Control, 2014, 13(12): 705-709]

随着抗菌药物的广泛使用, 多重耐药鲍曼不动杆菌日渐增多。多重耐药鲍曼不动杆菌是指对下列

5 类抗菌药物中至少 3 类耐药的菌株, 包括抗假单胞菌头孢菌素、抗假单胞菌碳青霉烯类抗生素、含有

[收稿日期] 2014-05-07

[基金项目] 广西卫生厅基金资助项目 (Z2008098)

[作者简介] 黄帆 (1986-), 女 (壮族), 广西壮族自治区南宁市人, 研究生, 主要从事鲍曼不动杆菌耐药机制研究。

[通信作者] 覃金爱 E-mail: qinjinai2005@126.com

β-内酰胺酶抑制剂的复合制剂(包括哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、氨苄西林/舒巴坦)、喹诺酮类和氨基糖苷类药物。研究^[1]表明,鲍曼不动杆菌的多重耐药性与整合子有关。整合子可以分为 6 类,其中 I、II、III 类整合子与耐药性有明确关系^[2]。整合子-基因盒系统于 1991 年由 Hall 等^[3]正式提出,是细菌基因组中可移动的遗传物质,可将许多耐药基因整合在一起,从而形成细菌的多重耐药性^[4]。本研究组通过对临床收集的多重耐药鲍曼不动杆菌进行药敏试验、整合子及可变区基因盒检测,了解多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2012 年 8—10 月广西医科大学第一附属医院住院患者非重复分离的多重耐药鲍曼不动杆菌 51 株。标本包括痰液、创面分泌物、血液、尿液和组织等。质控菌为大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.1.2 主要试剂 PremixEXTaq PCR 反应液、Alul、10 × 酶切通用缓冲液及 DNA Marker DL1000、DL2000、DL5000,均购自北京康为世纪生物科技有限公司。聚合酶链反应(PCR)扩增试剂盒、PCR 引物及 PCR 产物测序均由生工生物工程(上海)有限公司提供。

1.1.3 主要仪器 包括 VITEK-II 全自动微生物鉴定药敏分析仪(法国生物梅里埃公司)、PE 9700 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)、稳压电泳仪(北京六一仪器厂 DYY-8B)、水平电泳槽(北京六一仪器厂 DYCP-31DN)、Bio-Rad GelDoc 凝胶电泳成像分析系统(美国 Biorad 公司)、离心机(德国 Eppendorf 公司 Centrifuge 5424)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养、菌种鉴定及药敏检测 鲍曼不动杆菌的分离和培养严格按照《全国临床检验操作规程》操作。采用 VITEK-II 细菌鉴定仪配套的 GNI 卡鉴定菌种,检测其对抗菌药物的敏感性;按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2010 年标准判读结果。使用 ATCC 25922 和 ATCC 27853 标准菌株进行质控。

1.2.2 细菌 DNA 模板的制备 细菌 DNA 模板的提取按照上海生工柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒实验操作步骤进行。

1.2.3 扩增整合酶基因 引物参考文献^[5]合成,见表 1;反应体系参考文献^[6],反应条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,53℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1.5 min,共 35 个循环,最后延伸 72℃ 7 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶、100V 恒压电泳 35 min,选用 5 μL DL1000 分子量标准的 Marker。于凝胶成像系统成像,挑选 4 株阳性产物送生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.2.4 I 类整合子可变区 参考文献^[7],应用 primer premier 5.0 引物设计软件设计引物,见表 1。反应体系参考文献^[6],反应条件为 94℃ 预变性 10 min,94℃ 变性 1 min,56℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 5 min,共 30 个循环,最后延伸 72℃ 7 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶、100V 恒压电泳 35 min,选用 5 μL DL5000 分子量标准的 Marker。凝胶成像系统成像。

表 1 各类引物
Table 1 All kinds of primers

Primer	Sequence of nucleic acid	Product length(bp)
Int I -F	ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	565
Int I -R	GAAAGGTCTGGTCATACATG	565
Int II -F	GTGCAACGCATTTTGCAGG	403
Int II -R	CAACGGACATGCAGATG	403
Int III -F	CATTTGTGTTGTGGACGGC	717
Int III -R	GACACATACGTGTTTGGCAA	717
IntCS-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	800-3 000
IntCS-R	AAGCAGACTTGACCTGA	800-3 000

IntCS: variable region of Int I cassettes

1.2.5 酶切体系及电泳条件 对于条带大小相同的可变区扩增产物,用限制性片段长度多态性(RFLP)分析法进行同源性分析。酶切体系:Alul 0.50 μL (10 U/μL),PCR 产物 10 μL,10 × 酶切通用缓冲液 2 μL,无菌去离子水 7.50 μL,共 20 μL;37℃ 水浴 1 h。将酶切后的 10 μL PCR 产物加 2 μL 10 × 缓冲液上样。用 1% 琼脂糖凝胶、100V 恒压电泳 35 min,选用 5 μL DL 2000 分子量标准的 Marker。凝胶成像系统成像。将不同结构的可变区扩增产物各挑选 1 株送生工生物工程(上海)有限公司测序。

2 结果

2.1 药敏试验结果 51 株多重耐药鲍曼不动杆菌

表 2 I 类整合子阳性和阴性鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物的耐药性比较
Table 2 Resistance of Int I positive and negative Ab to commonly-used antimicrobial agents

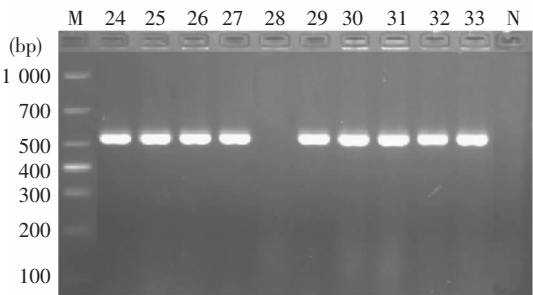
Antimicrobial agents	Positive of int I (n=40)			Drug resistance rate (%)	Negative of int I (n=11)			Drug resistance rate (%)	χ^2	P
	S	I	R		S	I	R			
Amikacin	24	2	14	35.00	9	0	2	18.18	0.487	0.485
Ampicillin	0	0	40	100.00	0	0	11	100.00	—	—
Aztreonam	1	1	38	95.00	0	0	11	100.00	0.000	1.000
Ceftazidime	1	0	39	97.50	0	1	10	90.91	0.014	0.904
Ciprofloxacin	1	0	39	97.50	1	0	10	90.91	0.014	0.904
Ceftriaxone	0	1	39	97.50	0	1	10	90.91	0.014	0.904
Cefotetan	0	0	40	100.00	0	0	11	100.00	—	—
Cefazolin	0	0	40	100.00	0	0	11	100.00	—	—
Cefepime	2	2	36	90.00	0	0	11	100.00	0.211	0.646
Gentamicin	1	0	39	97.50	1	4	6	54.55	11.476	0.001
Imipenem	5	2	33	82.50	0	0	11	100.00	0.998	0.318
Levofloxacin	5	2	33	82.50	1	9	1	9.09	17.749	0.000
Nitrofurantoin	0	0	40	100.00	0	0	11	100.00	—	—
Ampicillin/salbactam	5	2	33	82.50	0	0	11	100.00	0.998	0.318
Sulfamethoxazole /trimethoprim	1	0	39	97.50	1	0	10	90.91	0.014	0.904
Tobramycin	2	0	38	95.00	3	0	8	72.73	2.649	0.104
Piperacillin/tazobactam	1	4	35	87.50	0	2	9	81.82	0.000	1.000

S;sensitive; I;intermediate; R;resistant

2.2 整合子分类 40 株菌携带 I 类整合酶基因，挑选其中 4 株测序，结果显示，均为 Int I 型基因，未检出 II、III 类整合子。整合酶基因电泳图及测序图谱见图 1~2。

2.3 可变区扩增结果及酶切图谱 I 类整合子阳性菌中,39 株(97.50%)扩增出可变区。可变区阳性菌株扩增产物共有 4 种类型大小条带，分别为 2 300 bp (36 株)、1 400 bp (1 株)、700 bp (1 株)和 120 bp (1 株);其中 2 300 bp 的产物经 RFLP 分型后分为 2 个类型,即 A 型(14 株)和 B 型(22 株)。I 类整合子可变区电泳图、测序图谱及酶切产物电泳图见图 3~5。

中,40 株(78.43%)携带 I 类整合酶基因。I 类整合子阳性和阴性菌株对庆大霉素、左氧氟沙星的耐药率差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。见表 2。



M: Marker; N: Negative control; Lane 24—27, 29—33: Int I gene
图 1 整合酶基因扩增电泳图
Figure 1 Agarose gel electrophoresis map of PCR product of integrase gene

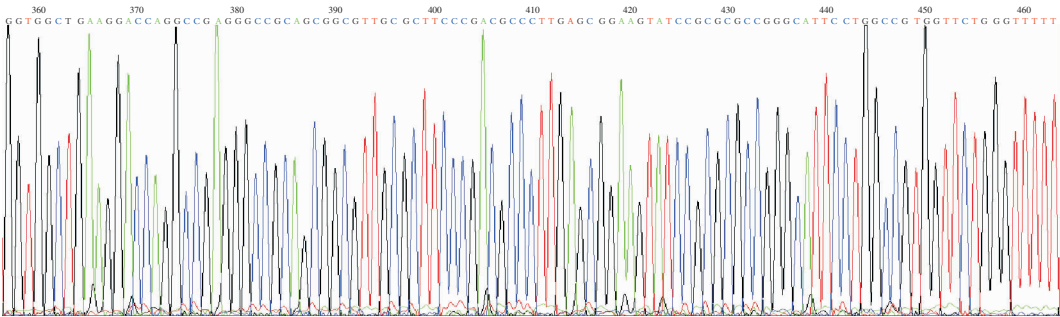


图 2 整合酶基因多重 PCR 产物基因部分测序结果图
Figure 2 Sequencing result of partial PCR product of integrase gene

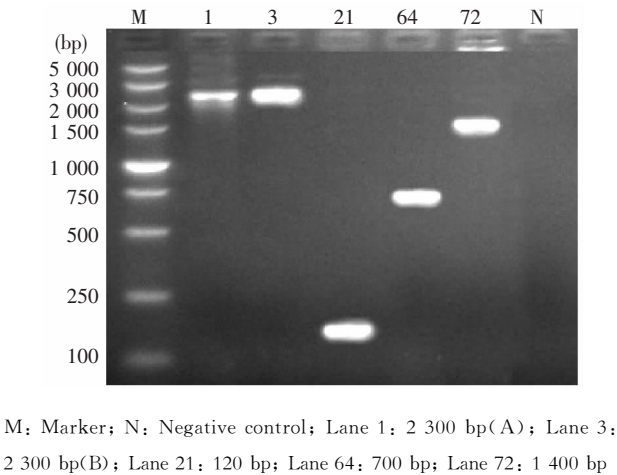


图 3 5 类不同结构 I 类整合子可变区电泳图

Figure 3 Agarose gel electrophoresis map of variable region of 5 different Int I

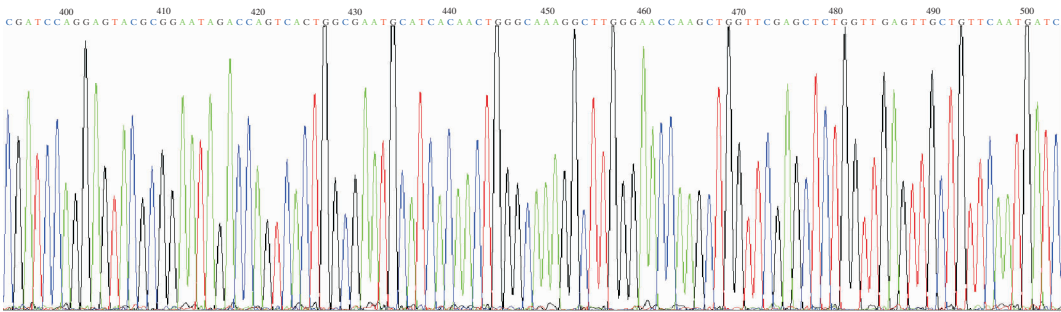


图 4 部分 I 类整合子可变区测序结果图

Figure 4 Sequencing result of variable region of partial Int I

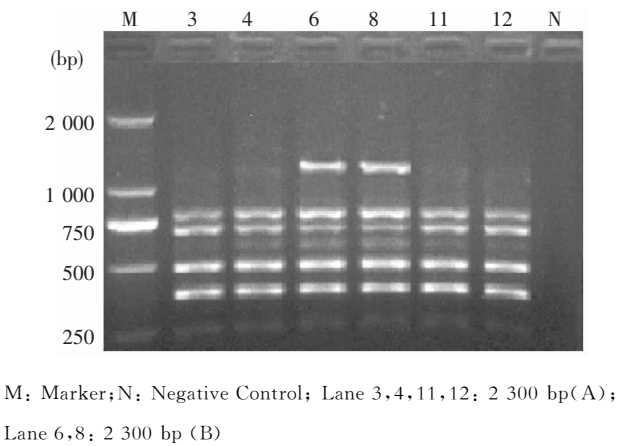


图 5 RFLP 酶切电泳图

Figure 5 Endonuclease electrophoresis map of RFLP

3 讨论

近年来,随着抗菌药物的广泛应用,鲍曼不动杆菌的多重耐药性已成为日趋严重的问题。携带整合

2.4 I 类整合子可变区测序 将 4 种不同条带的可变区 PCR 扩增产物进行测序(2 300 bp 产物 A、B 型各随机挑选 1 株),经 BLAST 比对分析,2 300 bp (A 型)、2 300 bp (B 型)、1 400 bp、700 bp、120 bp 的可变区基因盒组合分别为 aacA4、aacA4 + catB8、arr-3 + aacA4、dfrA15、arr-3。各型扩增产物序列分别与 GenBank 中的登录号对比,其序列同源性均为 99%。

子是鲍曼不动杆菌的耐药机制之一。整合子可根据整合酶的不同分为 6 类,其中 I、II、III 类整合子与耐药性有关。

本实验结果显示,51 株鲍曼不动杆菌中,有 40 株携带 I 类整合子,未发现 II、III 类整合子,提示 I 类整合子可能是本院多重耐药鲍曼不动杆菌最常见整合子类型。国内其他地区报道医院感染多重耐药鲍曼不动杆菌亦以携带 I 类整合子为主^[8]。40 株携带 I 类整合子的菌株中,39 株扩增出可变区,测序结果显示所携带基因盒形式有 5 种类型,即 aacA4、aacA4 + catB8、arr-3 + aacA4、dfrA15 和 arr-3。所用引物是根据 I 类整合子可变区两侧的保守区设计,可以认为所检出基因位于 I 类整合子可变区内。aacA4 编码氨基糖苷乙酰基转移酶,介导阿米卡星、奈替米星、妥布霉素等耐药;catB8 编码氯霉素乙酰转移酶,介导氯霉素耐药;arr-3 编码利福平 ADP-核糖基转移酶,介导利福平耐药;dfrA15 编码二氢叶酸还原酶,介导甲氧苄啶耐药。aacA4、catB8、arr-3

和 aadA1 是国内各地报道鲍曼不动杆菌最常见的耐药基因盒。Lai 等^[9]认为,细菌耐药基因的出现与抗菌药物使用频率有关。本院多重耐药鲍曼不动杆菌中未检出 aadA1,该基因编码氨基糖苷核苷转移酶,引起对链霉素和大观霉素耐药,可能与本院很少使用这两类抗菌药物有关。

dfrA15 编码二氢叶酸还原酶,介导甲氧苄啶耐药。甲氧苄啶是复方磺胺甲噁唑的药物成分之一。近年来,临床已基本不使用该类药物,而本研究却检出 dfrA15,原因不明。

本研究共检出 5 种基因盒组合形式,每种组合最多携带 2 种耐药基因盒,这与药敏试验中的多重耐药性不吻合。分析原因,可能是基因盒片段过长,不能有效扩增。常规 PCR 扩增有效产物大小应在 2~3 kb,有些整合子可变区含多个耐药基因盒,超过有效扩增范围,且若 1 株菌同时存在 2 个以上大小片段不等的整合子结构,则 PCR 扩增时可能仅扩出小片段整合子^[10]。因此,本实验中 I 类整合子可变区的结构仍有待进一步深入研究。

本组药敏试验结果显示,I 类整合子阳性和阴性菌株对亚胺培南的耐药率差异无统计学意义($P>0.05$)。据梁道斌等^[11]研究推测,本院鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药的原因可能是含有碳青霉烯酶。

为明确整合子可变区所携带的耐药基因,需进行 DNA 测序分析,当样本量较大时,对所有标本进行测序则经济成本过高。运用 RFLP 技术对条带大小相同的可变区扩增产物进行同源性分析,如果 RFLP 带型相同,可以认为两个扩增产物属同一类型,具有相同的基因结构,仅需选取 1 株进行测序,所得结果代表了这一类型的可变区片段所携带的基因。这一方法应用于整合子耐药基因分析,可以节约实验成本,降低工作量。

综上所述,该院多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性与 I 类整合子密切相关,且仍可能存在其他耐药机制,如质粒、转座子、整合型噬菌体及主动外排系统等,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Gombac F, Riccio M L, Rossolini G M, et al. Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(11): 3665 - 3668.
- [2] 徐文, 伍勇. 整合子系统与细菌多重耐药关系的研究进展[J]. *实验与检验医学*, 2009, 27(1): 79 - 81.
- [3] Hall R M, Brookes D E, Stokes H. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point[J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5(8): 1941 - 1959.
- [4] 唐吉斌, 宋有良. 整合子与鲍曼不动杆菌多重耐药机制研究进展[J]. *医学综述*, 2009, 15(7): 984 - 987.
- [5] 严冰, 盖俊惠, 艾辉, 等. 不动杆菌整合子基因及其耐药性关系的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(2): 306 - 307.
- [6] 毛璞, 傅威, 杨淳, 等. ICU 分离的多重耐药鲍曼不动杆菌 PFGE 分型及 I 型整合子介导的耐药研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2012, 11(6): 417 - 421.
- [7] Levesque C, Piche L, Larose C, et al. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(1): 185 - 191.
- [8] Barbolla R, Catalano M, Orman B E, et al. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 666 - 669.
- [9] Lai C C, Wang C Y, Chu C C, et al. Correlation between antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria causing healthcare-associated infections at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2009[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(6): 1374 - 1382.
- [10] 马全玲, 武大伟, 魏殿军, 等. 鲍曼不动杆菌整合酶基因测定及可变区基因盒结构分析[J]. *天津医药*, 2011, 39(2): 101 - 104.
- [11] 梁道斌, 玉艳红, 覃金爱, 等. 耐亚胺培南鲍氏不动杆菌碳青霉烯酶基因分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(7): 1481 - 1483.

(本文编辑:左双燕)