

• 临床检验研究论著 •

# 整合子与多耐药铜绿假单胞菌的相关性研究\*

付建荣, 张艳红, 刘金伟, 阎俊, 刘静  
(天津市第四医院检验科, 天津 300222)

**摘要:**目的 研究分离自烧伤患者的铜绿假单胞菌(Pa)整合子携带情况及其与多药耐药的相关性。方法 对 50 株 Pa 采用 K-B 法进行药敏实验, 简并引物扩增法扩增整合子, 限制性片段长度多态性(RFLP)分析确定整合子类型。结果 50 株 Pa 对 22 种抗菌药物的耐药率达 90% 以上; 49 株(98%) 携带 I 类整合子, 未检出 II、III 类整合子。结论 该院 Pa 临床菌株对 β-内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类等抗菌药物耐药率较高, 多药耐药性可能与 I 类整合子有关。

**关键词:**假单胞菌, 铜绿; 整合子类; 抗药性, 多药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)18-2189-02

## Relativity between integrons and multi-drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*\*

Fu Jianrong, Zhang Yanhong, Liu Jinwei, Yan Jun, Liu Jing

(Clinical Laboratory, Tianjin Fourth Hospital, Tianjin 300222, China)

**Abstract: Objective** To investigate the types of integrons in *Pseudomonas aeruginosa*(Pa) isolated from patients with burn and to analyze the correlation between integrons and multi-drug resistance. **Methods** 50 strains of Pa were collected and detected for antibiotics susceptibility by K-B method, for integrons polymerase chain reaction using degenerate primers, for classification of integrons by restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay. **Results** The drug-resistance rates of 50 strains of Pa against 22 kinds of antibiotics were higher than 90%. Class I integrons were founded in 49 stains (98%). Neither class II nor class III of integrons were detected. **Conclusion** Pa might be with high resistance rates against β-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones, and class I integron could be closely associated with multi-drug resistance of Pa in the hospital.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; integrons; drug resistance, multiple

铜绿假单胞菌(Pa)为条件致病菌,是引起医院感染的主要致病菌,具有复杂的耐药机制,而对多种药物不敏感。近年来整合子在 Pa 耐药机制中的作用被广泛关注<sup>[1]</sup>。整合子可将许多耐药基因盒整合在一起,从而导致细菌形成多药耐药性。基因盒在整合酶作用下可在不同整合子间转移,因此整合子可使耐药基因互相交换,再借助转化、转导与接合使耐药性在病原菌中广泛传播<sup>[2]</sup>。在整合子介导细菌耐药机制中,第 I、II、III 类整合子起着主要作用。本研究通过简并引物聚合酶链反应(PCR)扩增法,对分离自烧伤创面的 Pa 进行了整合子检测,并用限制性片段长度多态性(RFLP)分析对整合子进行分类,现报告如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 分离自本院烧伤住院患者创面分泌物标本的 Pa 50 株(剔除同一患者的重复分离株)。

**1.2 仪器与试剂** VITEK-AMS 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃),JD801 型核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统(珠海黑马);药敏纸片(英国 Oxoid),MH 琼脂平板(天津金章),PCR 引物、限制性内切酶(Hinf I 和 Ava II)(广州达安);质控菌株 Pa ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 购自卫生部临床检验中心。

### 1.3 方法

**1.3.1 菌株鉴定及药敏试验** 采用 VITEK-AMS 全自动微生物鉴定系统进行菌株鉴定,以 ATCC27853 为阳性对照,以 ATCC25922 为阴性对照。采用 K-B 法测定 22 种抗菌药物的敏感性,并根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)2006 年版标准规定的界值判定结果。

**1.3.2 整合子检测** 挑纯培养菌落置 0.5 mL 离心管内(已预置 200 μg/L 蛋白酶 K 溶液),56 °C 水浴 2 h,95 °C 水浴 10

min,15 000 r/min 离心 30 s,吸取上清液移入新的 0.5 mL 离心管作为模板。简并引物序列 P1:5'-TGC GGG TYA ARG ATB TKG AT-3';P2:5'-CAR CAC ATG CGT RTA RAT-3'。PCR 总反应体积 50 μL,含引物 P1 及 P2(10 pmol/μL)各 1 mL,PCR 缓冲液 10 μL,dNTPs(10 mmol/L)1 μL,Taq 酶(3 U/μL)1 μL,模板 2 μL,重蒸水(ddH<sub>2</sub>O)34 μL。PCR 反应条件为:93 °C 5 min,93 °C 30 s,58 °C 45 s,72 °C 60 s 循环 40 次,72 °C 7 min。以纯水为阴性对照,以 I 类整合酶基因阳性质粒(由华南理工大学食品与生物工程学院石磊老师馈赠)为阳性对照。以 2% 琼脂糖凝胶,100 V 条件下电泳扩增产物 20 min。

**1.3.3 RFLP 分析** 用 Hinf I 和 Ava II 对 PCR 阳性产物进行 RFLP 分析,试验方法见文献[3]。

## 2 结果

**2.1 药敏试验结果** Pa 对常用 22 种抗菌药物的体外药敏试验结果见表 1。

表 1 Pa 体外药敏试验结果(%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
氨苄西林	100.0	0.0	0.0
氨苄西林/舒巴坦	100.0	0.0	0.0
哌拉西林	98.0	0.0	2.0
哌拉西林/他唑巴坦	94.0	0.0	6.0
头孢唑啉	100.0	0.0	0.0
头孢呋辛	100.0	0.0	0.0
头孢曲松	100.0	0.0	0.0
头孢他定	98.0	0.0	2.0
头孢哌酮	96.0	2.0	2.0

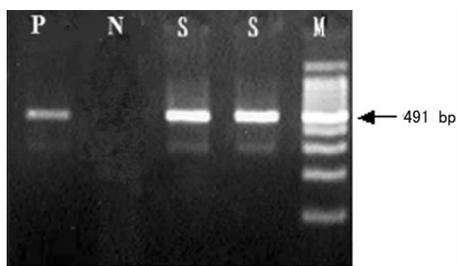
\* 基金项目:天津市卫生局课题资助项目(项目编号:05kyz14)。

续表 1 Pa 体外药敏试验结果 (%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
头孢噻肟	98.0	2.0	0.0
头孢吡肟	94.0	4.0	2.0
头孢西丁	100.0	0.0	0.0
氨曲南	94.0	2.0	4.0
左氧氟沙星	98.0	0.0	2.0
环丙沙星	98.0	0.0	2.0
庆大霉素	96.0	2.0	2.0
阿米卡星	80.0	14.0	6.0
妥布霉素	98.0	0.0	2.0
呋喃妥因	100.0	0.0	0.0
复方新诺明	100.0	0.0	0.0
亚胺培南	92.0	0.0	8.0
美洛培南	92.0	2.0	6.0

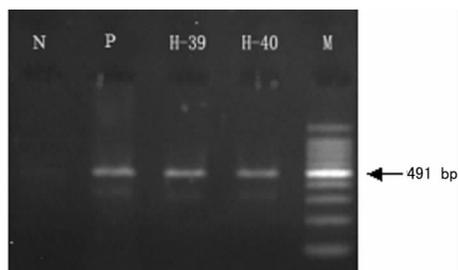
2.2 PCR 扩增结果 49 株 Pa 可扩增获得目的片段 (491 bp), 见图 1。

2.3 RFLP 分型 50 株 Pa 中, 有 49 株核酸 PCR 扩增阳性产物经 Hinf I 酶切可获得 491 bp 片段 (见图 2), 经 Ava II 酶切可获得 345、146 bp 片段 (见图 3), 该 49 株 Pa 携带 I 类整合子, 阳性率为 98%, 未检出 II、III 类整合子。



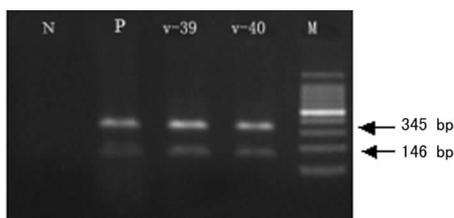
P: I 类整合子阳性对照株; N: 阴性对照; S: 标本; M: DNA 分子标记物 (从下往上分别为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000、1 500 bp, 下同)。

图 1 琼脂糖凝胶电泳图



P: I 类整合子阳性对照株; N: 阴性对照; H: PCR 阳性产物; M: DNA 分子标记物。

图 2 Hinf I 酶切图



P: I 类整合子阳性对照株; N: 阴性对照; V: PCR 阳性产物; M: DNA 分子标记物。

图 3 Ava II 酶切图

### 3 讨论

目前已发现 6 类整合子, 可编码不同的整合酶, 其中革兰阴性菌以 I 类整合子最常见<sup>[4-5]</sup>。II 类整合子在 Pa 中检出率较低 (1.37%)<sup>[6]</sup>, 在志贺菌属中检出率最高<sup>[7]</sup>。II 类整合子含有 1 个终止密码子, 其所编码的整合酶不能催化基因盒的整合与剪切, 因而在耐药基因水平传播中作用有限。III 类整合子最初是在耐碳青霉烯类粘质沙雷菌质粒上发现的<sup>[8]</sup>, 曾有在 Pa 中检出 III 类整合子的报道<sup>[9]</sup>。本研究则未检出 II 类和 III 类整合子。

本研究中的 Pa 菌株均分离自烧伤患者创面分泌物标本, 药敏试验结果显示其对  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类及碳青霉稀类等抗菌药物的耐药率高达 90% 以上, 多药耐药现象非常严重。碳青霉烯类曾是治疗 Pa 感染的敏感药物, 但随着该类药物的大量应用, 耐药率逐渐增高。

对 50 株 Pa 进行简并引物 PCR 扩增, 只有 1 株经多次扩增, 均未获得阳性条带, 可能不携带整合酶基因。药敏试验结果显示, 该菌株对喹诺酮类、氨基糖苷类、三代头孢以及碳青霉烯类敏感, 说明整合子阳性 Pa 耐药性更强<sup>[4]</sup>。其他 49 株多药耐药 Pa 均携带 I 类整合子, 检出率远高于王寰等<sup>[10]</sup>报道的 25.9%。I 类整合子与药敏试验具有较好的符合率, 但是否可通过 I 类整合子检测以预测菌株是否具有多药耐药性尚需进一步研究。

值得注意的是, 本研究中的菌株均分离自烧伤患者标本, 且 I 类整合子检出率较高, 但不能以此认为是同一菌株引起的院内感染, 需对菌株进行 DNA 指纹分析以进一步分型。

### 参考文献

- [1] 付建荣, 刘群, 张艳红, 等. 烧伤患者铜绿假单胞菌感染株的消毒剂-磺胺耐药基因、I 类整合酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(8): 844-845.
- [2] 付建荣, 刘群, 王玉莲, 等. 一株铜绿假单胞菌携带多种耐药基因的研究[J]. 天津医药, 2007, 35(4): 259-260.
- [3] 李心晖, 石磊, 杨维青, 等. 三类整合酶基因(int I)的简并引物 PCR 方法建立及应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(2): 156-160.
- [4] 胡锡浩, 许小敏, 糜祖煌, 等. 烧伤创面铜绿假单胞菌耐药性与可移动遗传元件的关系[J]. 中华烧伤杂志, 2009, 25(2): 103-105.
- [5] 郭宇, 王欢, 张正, 等. 铜绿假单胞菌整合子与其多药耐药的相关性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(1): 6-8.
- [6] 凌华志, 徐元宏, 李涛, 等. 革兰阴性杆菌中 II 类整合子的分布与结构分析及分子定位[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(9): 1055-1058.
- [7] 胡小行. 整合子与细菌耐药性关系的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2009, 30(6): 255-258.
- [8] Collis CM, Kim MJ, Pad SR, et al. Characterization the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines [J]. Bacteriol, 2002, 184(11): 3017-3026.
- [9] Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(4): 272-288.
- [10] 王寰, 范晓磊, 王海燕. I 类整合子介导的铜绿假单胞菌耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(12): 1304-1307.

(收稿日期: 2012-04-09)