

· 论 著 ·

十二烷基硫酸钠对多重耐药大肠埃希菌 I 类整合子作用的初步探讨*

吴志鹏, 黄永茂[△], 王旭, 陈枫, 钟利, 林雁, 向成玉, 陈庄
(泸州医学院附属医院感染科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨十二烷基硫酸钠(SDS)对多重耐药大肠埃希菌(*E. coli*) I 类整合子的作用。方法 采用纸片扩散法(K-B法)测定 71 株大肠埃希菌对 3 类 4 种常用抗菌药物的药敏情况, 聚合酶链反应(PCR)检测 I 类整合子 3 个不同部位的基因。对经 SDS 处理的 I 类整合子阳性多重耐药大肠埃希菌的 I 类整合子基因与最低抑菌浓度(MIC)值进行测定与比较。结果 71 株大肠埃希菌的多重耐药率为 32.39% (23 株), I 类整合子的总检出率为 88.73%, 不同部位基因检出率分别为: 整合酶基因 74.65%、遗传标记基因 78.87%、可变区基因 21.13%。SDS 处理前、后多重耐药大肠埃希菌中的 I 类整合子基因阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$); 对庆大霉素、头孢噻肟的 MIC 值差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 SDS 对多重耐药大肠埃希菌的 I 类整合子有一定的影响。

关键词:整合子类; 十二烷基硫酸钠; 大肠埃希菌; 多重耐药

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)22-2202-04

Effects of SDS on the class I integron of multidrug resistant *Escherichia coli**

Wu Zhijuan, Huang Yongmao[△], Wang Xu, Chen Feng, Zhong Li, Lin Yan, Xiang Chengyu, Chen Zhuang

(Department of Infection, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To discuss the effect of SDS on the class I integron of multidrug resistant *Escherichia coli* (*E. coli*). **Methods** The susceptibilities of 71 *E. coli* strains to 4 antibiotics were detected by disk diffusion test. Genes localizing at 3 different places in class I integron were detected by PCR. The class I integron-positive *E. coli* strains, which were multidrug resistant, were treated with SDS, then detected by PCR and MIC values. **Results** There were 23 (32.39%) multidrug resistant strains in 71 *E. coli* strains. Class I integron-positive rate of 71 *E. coli* strains was 88.73%. The detection rates of IntII genes, genetic markers genes and variable region genes were respectively 74.65%, 78.87% and 21.13%. The class I integron-positive rate and gentamicin and cefotaxim MIC values of multidrug resistant *E. coli* strains decreased statistically with SDS. **Conclusion** SDS has some effect on the integron class I of multidrug resistant *E. coli*.

Key words: integrons; sodium dodecyl sulfate; *escherichia*; multidrug resistance

大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)属于肠杆菌科,为革兰阴性杆菌,常寄居于人和动物的肠道,是临床细菌感染性疾病的常见病原菌之一^[1]。随着抗生素在临床上的广泛应用,大肠埃希菌对常用抗生素出现了不同程度的耐药^[2]及多重耐药。其耐药机制很多,但其耐药基因的传递主要是通过水平方向上的传递,或者自身基因的突变累积,或者两种机制并存引起。而整合子可使耐药基因在同种和不同种菌属间水平传播,成为细菌多重耐药发展的重要原因。其中以 I 类整合子介导的耐药类型最为丰富,分布最为广泛。本研究通过对本地区临床分离大肠埃希菌的多重耐药及 I 类整合子分布情况进行分析,探讨 I 类整合子与细菌多重耐药性的可能关系。十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)是一种离子型表面活性剂,将其用于消除质粒的研究较多,但 SDS 对整合子有无干扰作用尚无确切报道。本研究旨在了解本地大肠埃希菌耐药以及多重耐药情况、I 类整合子分布情况,并探讨 SDS 对 I 类整合子的可能影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 菌株来源 实验菌株:71 株大肠埃希菌临床分离株(不含同一病例相同部位重复分离株)来自泸州医学院附属医院 2007 年 7 月至 2008 年 7 月感染大肠埃希菌的患者。其中

呼吸道感染 29 例,泌尿系统感染 17 例,外科切口感染 14 例,全身感染 8 例,其他感染 3 例;全部菌株均重新经 VITEK 系统(BioMerieux, 法国)鉴定确认。标准菌株:大肠埃希菌 ATCC25922,购自国家临床检验中心。

1.1.2 主要实验试剂 抗菌药纸片:β-内酰胺类抗生素[头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)]、氨基糖苷类抗生素(庆大霉素 G)、氟喹诺酮类抗菌药[左氧氟沙星(L)]4 种药物纸片(杭州天和微生物试剂有限公司)。培养基:M-H 琼脂培养基、胰大豆蛋白胨肉汤、M-H 肉汤培养基(杭州天和微生物试剂有限公司)、胰蛋白胨大豆(TSB)肉汤、LB 培养基(上海生工)等。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)所需试剂:细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 引物序列(表 1)、分子量标准品(marker)、电泳琼脂糖(上海生工)等。PCR 扩增试剂盒 2 种:长片段 PCR 扩增试剂盒(购自 BBI 公司)和普通短片段 PCR 扩增试剂盒(购自天根公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感性试验(K-B法)^[5] 采用全国临床实验标准委员会(national committee for clinical laboratory standards, NCCLS)推荐的纸片扩散法(Kerby-Bauer 纸片扩散法, K-B 法)进行 4 种抗生素的敏感性检测,以大肠埃希菌 ATCC 25922 为质控菌株,并根据 NCCLS 2006 要求进行敏感性判断。

表 1 I 类整合子基因引物序列

靶基因	引物序列	产物长度(bp)
整合酶(IntI1)基因 ^[3]	P1:5'TTCGTGATGCCTGCTTGTT 3'	408
	P2:5'CGCCAGCTTCTGTATGG 3'	
I 类整合子可变区两侧保守区域	P1:5'GGCATCCAAGCAGCAAG 3'	不定
	P2:5'AAGCAGACTTGACCTGA 3'	
遗传标记基因 ^[4]	P1:5'TAGCGAGGGCTTTACCTAAGC 3'	300
	P2:5'ATTCAGAATGCCGAACACCG 3'	

1.2.2 PCR 反应 采用 Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取大肠埃希菌 DNA, 并使用前述 3 对引物(表 1)进行扩增。IntI1 和遗传标记基因进行扩增时用 25 μL PCR 反应体系:模板 DNA 2 μL, 上、下游引物各 1 μL, 0.1 U/μL Taq 聚合酶, 500 mmol/L dNTP, 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3), 100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环, 然后 72 °C 延伸 5 min。可变区基因进行扩增时用 50 μL PCR 反应体系:模板 DNA 3 μL, 上、下游引物各 1.5 μL, 10× 缓冲液 A 300 μL, 酶结合物 20 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 300 μL, dNTP 结合物(10 mmol/L)250 μL, 双蒸水(ddH₂O) 1 mL。PCR 扩增条件:92 °C 预变性 2 min, 92 °C 变性 15 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环, 然后 72 °C 延伸 7 min。用 1.5% 琼脂糖进行电泳, 以上 3 种基因任一基因阳性菌可说明 I 类整合子阳性。并取 PCR 扩增产物 100 μL, 送上海生工生物技术公司进行基因测序。

1.2.3 SDS 处理大肠埃希菌^[6] 用高温(41 °C)、高浓度(60 μg/mL)SDS 双重处理交替培养法处理筛选出的 I 类整合子阳性的多重耐药大肠埃希菌。将菌株接种于含 60 μg/mL SDS 的 LB 肉汤中, 41 °C 振荡培养 16 h; 取 20 μL 菌液接种于 2 mL LB 肉汤管中, 41 °C 振荡培养 16 h; 取 20 μL 菌液接种于含同样浓度 SDS 的 LB 肉汤管中, 41 °C 培养 16 h; 取 50 μL 菌液接种于 5 mL LB 肉汤管中, 37 °C 培养 16 h。

1.2.4 药物敏感性试验 采用琼脂二倍稀释法测定庆大霉素、头孢噻肟 2 种抗生素对 I 类整合子阳性的多重耐药大肠埃希菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC); MIC 结果判定参照 2006 年 NCCLS 公布标准, 并以 ATCC25922 作为质控菌株。

1.2.5 PCR 反应 将处理后的大肠埃希菌按 1.4 的步骤进行 DNA 的制备、PCR 扩增、电泳, 观察处理前、后电泳条带的变化。

1.2.6 MIC 值测定 将处理后的大肠埃希菌按 1.6 的步骤进行细菌药物敏感性试验, 观察处理前、后 MIC 值的变化。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 软件对数据进行统计, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大肠埃希菌的药物敏感性试验结果 71 株大肠埃希菌对 G 的耐药率为 66.20%(47 株), 对 L 的耐药率为 63.38%(45 株), 对 CTX 的耐药率为 59.15%(42 株), 对 CAZ 的耐药率为 18.31%(13 株)。耐药模式中多耐药株比例较高, 见表 2。

2.2 大肠埃希菌中 I 类整合子不同基因的 PCR 检测结果 71 株大肠埃希菌中共有 IntI1 基因阳性菌株 53 株(74.65%)、遗传标记基因(QacEΔ1-sulI 基因)阳性菌株 56 株(78.87%), 其扩增片段电泳, 见图 1; 可变区基因阳性菌株 15 株(21.13%), 其中有 8 株在 1 700 bp 处出现条带, 有 4 株在 1 000 bp 处出现条带, 所得的扩增片段电泳, 见图 2。I 类整合子基因阳性(即以上 3 种基因任一基因阳性)菌株 63 株(88.73%)。

表 2 大肠埃希耐药模式分布

耐药模式	n	%
多耐药株*	23	32.39
双耐药株*	25	35.21
单耐药株*	16	22.54
全敏菌株*	7	9.86
合计	71	100.00

*: 耐 3 类抗生素以上者为多耐药株; 耐任意 2 类抗生素者为双耐药株; 仅耐 1 种抗生素者为单耐药株; 对 3 类抗生素全部敏感者为全敏菌株。

表 3 经 SDS 处理前后多重耐药大肠埃希菌基因阳性率的比较[n(%)]

基因	SDS 处理前阳性	SDS 处理后阳性	χ ²	P
IntI1 基因	21(91.30)	1(4.35)	18.05	<0.005
可变区基因	11(47.83)	2(8.70)	7.11	<0.010
遗传标记基因	21(91.30)	5(21.74)	14.06	<0.005
I 类整合子基因	23(100.00)	7(30.43)	14.06	<0.005

2.3 SDS 的干扰作用

2.3.1 SDS 对多重耐药大肠埃希菌中 I 类整合子的干扰 71 株大肠埃希菌中共筛选出有 I 类整合子基因阳性的多重耐药大肠埃希菌 23 株。经用高温(41 °C)、高浓度(60 μg/mL)SDS 处理, 23 株多重耐药大肠埃希菌中的 I 类整合子基因阳性率有不同程度的降低, 处理前、后菌株的 I 类整合子基因阳性率差异有统计学意义, 见表 3、图 3。

2.3.2 SDS 对大肠埃希菌 MIC 值的干扰 对用高温(41 °C)、高浓度(60 μg/mL)SDS 处理前、后的 23 株多重耐药大肠埃希菌进行药物敏感性试验, 23 株多重耐药大肠埃希菌对硫酸庆大霉素的 MIC₅₀ 为 32 μg/mL, MIC₉₀ 为 64 μg/mL; 菌株经 SDS 处理后, MIC₅₀ 为 16 μg/mL, MIC₉₀ 为 32 μg/mL。

23 株多重耐药大肠埃希菌对 CTX 的 MIC_{50} 为 $64 \mu\text{g/mL}$, MIC_{90} 为 $128 \mu\text{g/mL}$; 菌株经 SDS 处理后, MIC_{50} 为 $64 \mu\text{g/mL}$, MIC_{90} 为 $128 \mu\text{g/mL}$ 。两种药物处理后与处理前对比 Z 值分别为 -3.535 和 -3.765 , 其 P 值均小于 0.05, 证明多耐药大肠埃希菌经 SDS 处理前、后其 MIC 值的差异有统计学意义。

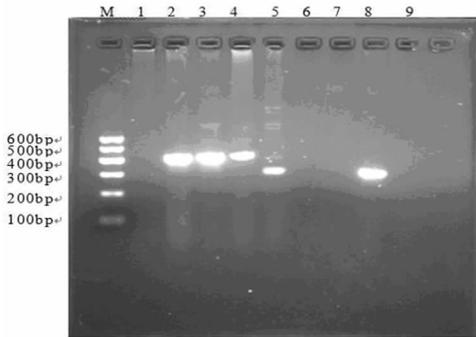


图 1 IntI1 基因和遗传标记基因片段电泳图
M: DNA 标准品; 1~4: 标本 1~4 用 PCR 法对 IntI1 基因扩增; 2~4: 阳性, 长 408 bp; 5~8: 标本 1~4 用 PCR 法对遗传标记基因扩增; 5, 8: 阳性, 长 300 bp; 9: 蒸馏水阴性对照。

图 1 IntI1 基因和遗传标记基因片段电泳图

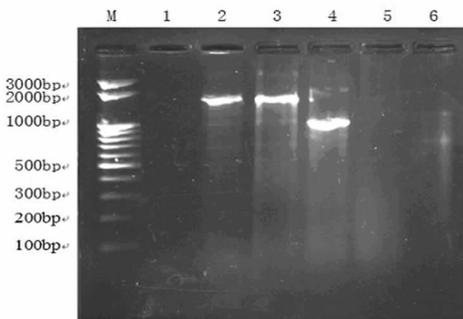


图 2 可变区基因电泳图
M: DNA 标准品; 1~5: 标本 1~5 用 PCR 法对可变区基因扩增; 2~4: 阳性, 其扩增长度分别为 1 700 bp、1 700 bp、1 000 bp; 6: 蒸馏水阴性对照。

图 2 可变区基因电泳图

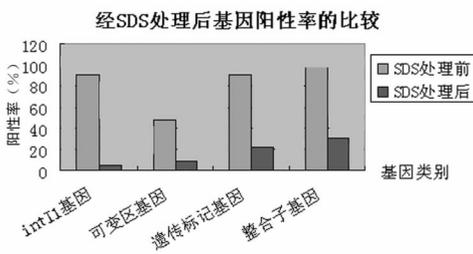


图 3 经 SDS 处理前、后 I 类整合子基因阳性率比较

2.4 基因测序结果 对 300、408、1 000、1 700 bp 的片段分别选取 1 株进行测序, 所得测序结果均在 GenBank 数据库中进行同源性比对。经比对后证实, 300 bp 的片段与遗传标记基因的同源性为 93%, 408 bp 的片段与 IntI1 基因的同源性为 98%, 1 000 bp 的片段与 aadA 基因的同源性为 98%, 1 700 bp 的片段与 dfr17-aadA5 基因的同源性为 99%。

3 讨 论

抗生素在临床上广泛、不合理使用以及滥用导致大肠埃希菌呈现多重耐药现象, 并越来越引起人们的高度重视。本研究

结果显示当地临床分离大肠埃希菌对 G、L、CTX 的耐药率均较高, 对 CAZ 的耐药率较低。这可能与抗生素选择压力下细菌耐药的地区性差异有关; 且多重耐药菌所占的比例较高, 这与国外的相关报道相符。有研究表明, 医院来源的大肠埃希菌多重耐药率为 48.00%, 远高于社区来源的 12.00%^[7], 提示临床医生应高度重视细菌的多种耐药现象。

本研究采用 PCR 针对 3 个不同部位基因测定当地临床分离大肠埃希菌中 I 类整合子的分布情况。IntI1 基因的检出率为 74.65%, 可变区基因的检出率仅为 21.13%, 遗传标记基因的检出率为 78.87%, 可见 I 类整合子在大肠埃希菌中分布广泛。但不同地区、不同来源的大肠埃希菌 I 类整合子的检出率又有一定的差异。在中国东北地区, 从动物和农场工人所分离的大肠埃希菌中有 58.7% 的 IntI1 基因阳性^[8]; 在中国台湾, 从人类粪便中分离出的大肠埃希菌中 IntI1 基因的阳性率为 31.5%^[9]; 在美国, 从肾炎患者和动物中分离出的大肠埃希菌其 I 类整合子的携带率分别为 49.0% 和 28.0%^[10]; 有希腊学者研究发现, 分别从当地禽类、住院患者与非住院患者中分离的大肠埃希菌其 IntI1 基因的阳性率分别为 49.2%、26.2% 和 11.1%^[11]。

本地区临床分离大肠埃希菌中 I 类整合子的总体检出率为 88.73%, 高于既往的研究, 可能的原因有: (1) 从本研究所选菌株的来源看, 易发生耐药的医源性呼吸系统感染来源的细菌比例较高; (2) 本研究采用 PCR 同时对 I 类整合子的 3 种基因检测, 以提高其阳性率; (3) 临床分离的整合子有日趋上升的趋势; (4) 各地区抗生素使用的情况不同, 造成了菌株在抗生素选择压力下出现地区性的差异。

对检测到的 I 类整合子可变区基因进行测序, 经比对证实为 dfr17-aadA5 基因、aadA 基因, 可编码对磺胺类抗菌药和氨基糖苷类抗生素的耐药, 这与耐药表型上 G 在整合子阳性组的耐药率明显高于整合子阴性组的结果是吻合的, 亦与其他报道的常见基因和类型相吻合^[12-13]。这同样可以说明 I 类整合子与大肠埃希菌的耐药有关。在整合子可变区内检测出耐氨基糖苷类药物的耐药基因, 可能是由于其耐药基因整合于菌株基因中所致, 或者是由于感染动物的细菌通过整合子或其他途径将耐药基因传递给临床菌株^[14-16]。

细菌染色体 DNA 与质粒 DNA 的一个共同特点是它们均附着于细胞膜上进行复制。SDS 是一种离子型表面活性剂, 在合适的浓度下它能溶解膜蛋白, 破坏细胞膜, SDS 可改变质粒在细胞膜上的结合位点, 使其不能精确复制, 并最终导致质粒不能正确地分配到子细胞中, 从而达到消除质粒的目的。SDS 另一个可能的作用机制是: 当它进入细胞质后, 使某些与质粒复制及分配有关的蛋白部分或完全失活, 造成质粒的丢失。其消除效果与其浓度和作用温度密切相关。浓度太高, 会抑制细菌生长; 浓度太低, 质粒消除不理想; 同样, 适宜的温度也可以取得理想的质粒消除效果。杨春梅等^[6]将 SDS 法与高温法相结合, 经 41 °C 及 SDS 的有、无进行交替传代, 探索出高温-SDS 消除法, 同时达到了细菌的较好生长和较佳的质粒消除效果。

SDS 用于消除质粒的研究已较多^[17-18], 但对 I 类整合子有无作用, 目前国内外尚无类似报道, 故本研究采用 SDS 进行实验性研究。本实验结果显示, 经 SDS 处理后, 多重耐药大肠埃希菌中的 I 类整合子基因阳性率有不同程度的降低, 且处理前、后的差异有统计学意义; 就多耐药大肠埃希菌对 G、CTX

的处理前、后 MIC 值进行统计学分析,差异均较显著。经查阅文献,SDS 对整合子的干扰机制尚无报道,故有待于进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 胡静,姚云清,傅静亦,等. 2005~2007 年医院病原学分布和耐药性分析[J]. 重庆医学,2009,38(7):811-814.
- [2] Saeed MA, Haque A, Ali A, et al. Relationship of drug resistance to phylogenetic groups of *E. coli* isolates from wound infections[J]. Infect Dev Ctries, 2009, 3(9):667-670.
- [3] 顾兵,童明庆,刘根焰,等. 整合子介导大肠埃希菌和克雷伯菌重耐药机制的研究[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(8):725-729.
- [4] 李智山,周乐翔,赵建忠,等. 大肠埃希菌 I 类整合子遗传标记研究[J]. 世界感染杂志,2008,8(2):113-114,127.
- [5] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 南京:东南大学出版社,2006:896-912.
- [6] 杨春梅,马志平,王志鹏,等. 黄连素、溴化乙锭、十二烷基硫酸钠对痢疾杆菌耐药质粒的消除作用[J]. 西北医药杂志,2000,15(2):64-65.
- [7] Ahmed MO, Clegg PD, Williams NJ, et al. Antimicrobial resistance in equine faecal *Escherichia coli* isolates from North West England[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2010,9:12.
- [8] Zhang XY, Ding LJ, Yue J. Occurrence and characteristics of class 1 and class 2 integrons in resistant *Escherichia coli* isolates from animals and farm workers in northeastern China[J]. Microb Drug Resist, 2009, 15(4):323-328.
- [9] Yang CM, Lin MF, Lin CH, et al. Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan[J]. Jpn J Infect Dis, 2009, 62(3):177-181.
- [10] Ajiboye RM, Solberg OD, Lee BM, et al. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections[J]. Clin Infect Dis,

2009,49(3):365-371.

- [11] Vasilakopoulou A, Psychogiou M, Tzouveleakis L, et al. Prevalence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* of poultry and human origin[J]. Foodborne Pathog Dis, 2009, 6(10):1211-1218.
- [12] Xu H, Su Z, Wang S, et al. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from Zhenjiang, China[J]. Curr Microbiol, 2009, 59(2):113-117.
- [13] Nawaz M, Khan AA, Khan S, et al. Molecular characterization of tetracycline-resistant genes and integrons from avirulent strains of *Escherichia coli* isolated from catfish[J]. Foodborne Pathog Dis, 2009, 6(5):553-559.
- [14] Shaheen BW, Oyarzabal OA, Boothe DM. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical *E. coli* isolates from the US[J]. Vet Microbiol, 2010, 144(3/4):363-370.
- [15] Ishida Y, Ahmed AM, Mahfouz NB, et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt[J]. Vet Med Sci, 2010, 72(6):727-734.
- [16] Verner-Jeffreys DW, Welch TJ, Schwarz T, et al. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water[J]. PLoS One, 2009, 4(12):e8388.
- [17] Krivoshein YS, Achkasova YN, Bryzgunova NI, et al. Effect of detergents on pathogenicity plasmids of *Escherichias*[J]. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1988, 32(3):345-352.
- [18] Jia AQ, Liu WH, Guo AZ, et al. Characterization of *Salmonella typhimurium* multidrug resistance and the reversal of antimicrobial resistance[J]. Wei Sheng Xue Bao, 2006, 46(5):789-795.

(收稿日期:2011-03-06 修回日期:2011-04-12)

(上接第 2201 页)

- [9] Lin JS, Lyou YJ, Chen YJ, et al. Screening for platelet antibodies in adult idiopathic thrombocytopenic purpura: a comparative study using solid phase red cell adherence assay and flow cytometry[J]. J Chin Med Assoc, 2006, 69(12):569-574.
- [10] 张国栋, 闵捷. 细胞免疫及体液免疫在 ITP 发生发展中的作用及其机制探讨[J]. 山东医药, 2007, 47(17):35-36.
- [11] 叶任高, 陆再英, 谢毅, 等. 内科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:659.
- [12] 赵增虎, 黄勇, 郜小兵, 等. ITP 患者脾脏、骨髓的病理变

化及其与 PA-IgG 的关系[J]. 山东医药, 2008, 48(31):84.

- [13] 王纓, 夏卫军. 加味小柴胡颗粒及其组方对 ITP 模型小鼠免疫功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(2):131-134
- [14] 林静华, 蔡应木, 陈彦融, 等. ITP 患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化及临床意义[J]. 中国热带医学, 2008, 8(12):2146, 2173.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-04-22)