

· 临床研究 ·

## I 类整合子在耐多药产 ESBLs 大肠埃希菌中的分布探讨\*

李佩波<sup>#</sup>, 蔡敏泓, 黄永茂<sup>△</sup>, 林雁, 邹永胜, 钟利, 陈枫, 陈庄, 向成玉  
(泸州医学院附属医院感染科, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 了解耐多药产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌中 I 类整合子携带情况。方法 纸片扩散法(K-B 法)测定大肠埃希菌对 6 种 3 类抗生素的敏感性并筛选出产 ESBLs 酶菌株;聚合酶链反应(PCR)检测整合子遗传标记 qacE $\Delta$ 1sull1。**结果** 71 株大肠埃希菌中 QacE $\Delta$ 1-sull1 共检出阳性菌株 55 株(74.46%),其中多耐模式检出率最高为 88.89%(40 株)。不同耐药模式中遗传标记基因的阳性率比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );产酶菌株在不同耐药模式中检出差异有统计学意义( $P < 0.05$ );非产酶菌株中检出差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 耐多药产 ESBLs 大肠埃希菌中 I 类整合子携带率高。

**关键词:**整合子类; $\beta$ 内酰胺酶类;大肠埃希菌;耐多药

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)06-0547-03

Distribution of class I integron in multi-drug resistant  $\beta$ -lactamases-producing strains of *Escherichia coli*\*Li Peibo<sup>#</sup>, Cai Minhong, Huang Yongmao<sup>△</sup>, Lin Yan, Zou Yongsheng, Zhong Li, Chen Feng, Chen Zhuang, Xiang Chengyu  
(Department of Infection, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract:** **Objective** To understand the carrier status of class I integron in multi-drug resistance  $\beta$ -lactamases-producing strains of *Escherichia (E.) coli*. **Methods** The disk diffusion test(K-B method) was used to detect the susceptibility of 71 strains of *E. coli* to 6 antibiotics and confirmed the ESBLs-producing strains. Polymerase chain reaction(PCR) was adopted to detect the genetic marker qacE $\Delta$ 1sull1 of class I integron. **Results** Among 71 strains of *E. coli*, 55 strains(74.46%) were positive qacE $\Delta$ 1sull1 of class I integron. The multi-drug resistant pattern had the highest detection rate(88.89%, 40 strains). The difference in positive rates of genetic marker gene had statistical significance among different drug resistance patterns( $P < 0.05$ ). The detection rate of different drug-resistance patterns had statistical difference in ESBLs-producing strains ( $P < 0.05$ ), while no significant difference in non-ESBLs-producing strains ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The ESBLs-producing strains carrying genetic markers of class I Integron is existed mostly in resistant strains, especially in the multi-drug resistant pattern.

**Key words:** integron; beta-lactamases; escherichia coli; multi-drug resistance

大肠埃希菌属于肠杆菌科,为革兰阴性短杆菌,属于条件致病菌,是临床上常见的细菌感染之一。近年来,随着  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类等抗菌药物在临床上广泛应用、不合理使用以及滥用,导致细菌出现了不同程度的耐药,甚至出现了交叉耐药和多重耐药的特点<sup>[1]</sup>。I 类整合子在大肠埃希菌中广泛存在,整合子相关耐药基因在该菌耐药性的形成和播散中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。近年来研究发现大肠埃希菌耐药情况严重,尤其是产 ESBLs 酶菌株更突出<sup>[3]</sup>。本研究对临床分离的 71 株大肠埃希菌进行耐药分析、ESBLs 鉴定和 I 类整合子遗传标记检测,并探讨其相关性,现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 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 10 月至 2008 年 10 月期间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 18 例,外科切口感染 14 例,全身感染 8 例,其他 2 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 ATCC 25922,购自国家临床检验中心。

## 1.2 方 法

**1.2.1 药物敏感试验** 采用美国全国临床检验标准委员会

(NCCLS)推荐的纸片扩散法(K-B 法)进行临床常用 3 类 6 种(LVE、CIP、FOX、S、A)抗菌药物的敏感性检测,并根据 NCCLS 2006 要求进行敏感性判断。

**1.2.2 ESBLs 鉴定** 初步筛选试验:选用头孢噻肟、头孢他啶、氨曲南、头孢曲松药敏纸片(杭州天和微生物试剂公司)对 71 株大肠埃希菌进行产 ESBLs 筛选试验,凡头孢他啶的抑菌环直径小于或等于 22 mm,头孢曲松小于或等于 25 mm,氨曲南或头孢噻肟小于或等于 27 mm,则提示为可疑产 ESBLs 菌株。纸片确认试验:将初筛可疑产 ESBLs 菌株同时用头孢他啶和头孢他啶加克拉维酸、头孢噻肟和头孢噻肟加克拉维酸作药敏试验,对任何一组药物,加克拉维酸前后抑菌环直径相差大于或等于 5 mm 可确认为产 ESBLs 菌株。

**1.2.3 PCR 技术检测基因** 采用 Biospin 细菌基因组 DNA 试剂盒(上海生工生物技术公司)提取大肠埃希菌 DNA。根据 I 类整合子遗传标记 qacE $\Delta$ 1sull1 设计引物(上海生工生物技术公司提供)。上游引物基因序列 P1:TAG CGA GGG CTT TAC TAA GC;下游引物基因序列 P2:ATT CAG AAT GCC GAA CAC CG。

以提取的大肠埃希菌 DNA 为反应模板进行 PCR 扩增。所有 PCR 反应体系均为 25  $\mu$ L,其中 2 $\times$ Taq PCR MasterMix

\* 基金项目:四川省重点学科重点建设项目(SZD0241)。  $\Delta$  通讯作者, E-mail: huang5616@sina.com。 # 现在四川省绵阳市 404 医院/川北医学院第二附属医院感染科工作。

组成包括:0.1 U/ $\mu$ L 聚合酶,500 mmol/L dNTP,20 m mol/L Tris-HCl(pH 8.3),100 m mol/L KCl,3 m mol/L MgCl<sub>2</sub> 等。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。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳、紫外线检测仪观察结果,并将扩增产物送至上海生工生物技术公司进行基因测序。

**1.3 统计学处理** 所有实验结果均采用 SPSS13.0 录入建立数据库并行统计分析,统计方法采用  $\chi^2$  检验。当  $T < 1$  或  $N < 40$  时用确切概率法计算  $P$  值;若  $1 \leq T < 5$  且  $N \geq 40$  时用连续校正法处理。

## 2 结果

**2.1 药物敏感试验结果** 71 株临床分离的大肠埃希菌对 6 种抗生素耐药情况分别为:左氧氟沙星 45 株、环丙沙星 51 株、头孢噻肟 44 株、头孢西丁 9 株、链霉素 41 株、阿米卡星 6 株。其中耐药率最高为环丙沙星 72.86%,最低为阿米卡星 8.57%。不同耐药模式中以耐药药最多为 45 株(64.29%),全敏最少为 7 株(9.86%)。

**2.2 ESBLs 鉴定结果** 产 ESBLs 酶表型筛选试验初步筛出 55 株(77.46%),可疑产 ESBLs 菌株。通过进一步确认试验在 58 株疑产 ESBLs 菌株中共检出产 ESBLs 菌 35 株(49.30%)。

**2.3 大肠埃希菌中整合子遗传标记基因的 PCR 法检测情况**

**2.3.1 整合子遗传标记在不同耐药模式中检出结果见表 1。**

表 1 各种耐药模式中整合子遗传标记基因阳性率比较

耐药模式	阳性菌株	阴性菌株	总 $P$ 值	拆分 $P$ 值
多耐药(45)	40	5		$P_1 = 0.283$
双耐药(8)	6	2	0.024	$P_2 = 0.000$
单耐药(11)	2	9		$P_3 = 0.024$

注: $P$  表示不同耐药模式中整合子遗传标记检出率的比较, $P_1$  表示多耐药和双耐药比较, $P_2$  表示多耐药与单耐药比较, $P_3$  表示双耐药与单耐药比较。

**2.3.2 整合子遗传标志在产 ESBLs 酶菌株中检出结果见表 2。**

表 2 产 ESBLs 酶大肠埃希菌不同耐药模式中整合子遗传标记检出情况

耐药模式	阳性菌株	阴性菌株	总 $P$ 值	拆分 $P$ 值
多耐药(26)	20	6		$P_1 = 0.442$
双耐药(4)	2	2	0.002	$P_2 = 0.009$
单耐药(5)	0	5		$P_3 = 0.569$

注: $P$  表示产 ESBLs 酶大肠埃希菌不同耐药模式中整合子遗传标记检出率的比较, $P_1$  表示多耐药和双耐药的比较, $P_2$  表示多耐药和单耐药的比较, $P_3$  表示双耐药和单耐药的比较。

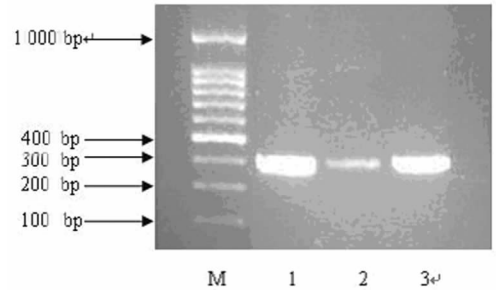
**2.3.3 整合子遗传标记在非产 ESBLs 酶大肠埃希菌中检出结果见表 3。**

表 3 非产 ESBLs 酶菌株不同耐药模式中整合子遗传标记基因阳性率的比较

耐药模式	阳性菌株	阴性菌株	$P$ 值
多耐药(19)	14	5	0.080
双耐药(4)	2	2	
单耐药(6)	0	6	

**2.4 整合子遗传标记 qacE $\Delta$ sul1 电泳图片和基因测序结果**

将本实验中 I 类整合子遗传标记(qacE $\Delta$ sul1)PCR 扩增产物序列测序后的基因在 BLAST 上进行比对发现与基因库中已登陆的基因相同,整合子遗传标记 qacE $\Delta$ sul1 电泳图见图 1。



M:Marker;1、2、3:样本孔,当扩增产物位于 300 bp 时表示 qacE $\Delta$ sul1 阳性。

图 1 整合子遗传标记 qacE $\Delta$ sul1 电泳图

## 3 讨论

本研究中菌株对左氧氟沙星、环丙沙星、头孢噻肟、链霉素耐药情况严重,尤其是在多耐药模式中更为突出,以 CTX+LVE/CIP+S 模式常见。但对头孢西丁和阿米卡星仍有较高的敏感性,这与头孢西丁对  $\beta$ -内酰胺酶高度稳定,阿米卡星对氨基糖苷类钝化酶稳定的抗菌作用特点有关。

大肠埃希菌产 ESBLs 在不同国家的检出有明显差异,如土耳其大肠埃希菌的 ESBLs 发生率仅为 12%<sup>[3]</sup>;而国内近年大肠埃希菌产 ESBLs 菌株检出率从 46.0% 上升至 63.4%,呈逐年增高的趋势<sup>[5]</sup>。CTX-M(以高度水解头孢噻肟为特征已 dn 为国内外流行最广的 ESBLs<sup>[6]</sup>)。本研究中大肠埃希菌 ESBLs 检出率为 49.30%(36 株),与文献所报道基本一致。

基因盒-整合子系统多见于革兰阴性杆菌,以肠杆菌、铜绿假单胞菌为主,是细菌尤其是革兰阴性菌多重耐药快速发展的主要原因<sup>[7]</sup>。依据整合酶基因序列的不同,将整合子分为 6 类,亦有文献报道为 8 类<sup>[8]</sup>,目前报道较多的仅有 4 类。I~III 类整合子已被证明与细菌耐药性有关,为耐药整合子,其中第 I、II 类整合子是最常见捕获和表达耐药基因的整合子<sup>[9]</sup>。近年来,国外大量文献报道整合子可介导病原体各种药基因获得整合子病原菌可表现为多药耐药<sup>[10-13]</sup>。QacE $\Delta$ 1-sul1 是 I 类整合子的遗传标记,实质是 qacE $\Delta$ 1 基因和 sul1 基因组成的重叠基因,位于 I 类整合子 3' 保守区。Dahmen 等<sup>[14]</sup>研究提示:6 种不同肠杆菌中 I 类整合子基因具有较高的检出率,整合子遗传标记以 sul1 常见,sul1 和 sul2 的重叠显现明显。有学者对血培养中的大肠埃希菌进行研究,发现几乎有一半菌株中整合子及 Sul 基因阳性,其中以经典类整合子 qacE $\Delta$ 1-sul1 最多。

本研究结果提示,I 类整合子在大肠埃希菌中有高的检出率(78.57%),与文献报道相近。实验结果提示:大肠埃希菌产 ESBLs 酶且整合子阳性者,出现耐药概率比单纯携带整合子或者产 ESBLs 酶的菌株要大,尤其在多耐药模式中更为明显。

## 参考文献:

[1] 李佩波,黄永茂.大肠埃希菌耐药及机制研究进展[J].西南军医,2011,13(1):95-97.

- [2] Diaz-Mejta JJ, Amabile-Cuevas CF, Rosas I, et al. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins [J]. *Microbiology*, 2008, 154 (1): 94-102.
- [3] 褚云卓, 田素飞, 王玉珏, 等. 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌的临床调查中 [J]. *国实验诊断学*, 2009, 13 (10): 1423-1425.
- [4] Qzqunes I, Erben N, Kiremitci A, et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in clinical isolates and risk factors [J]. *Scan Med J*, 2006, 27(5): 608-612.
- [5] 战榕, 陈菁, 黄心宏, 等. 2004~2009 年我院常见病原菌的耐药性变迁分析 [J]. *福建医科大学学报*, 2010, 44 (3), 205-209.
- [6] Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56 (3): 451-454.
- [7] 吴志鹃, 黄永茂. 基因盒-整合子系统介导细菌多重耐药的研究进展 [J]. *国外医药抗生素分册*, 2010, 31 (1): 34-37.
- [8] Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, et al. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. [J] *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(3): 28-38.
- [9] Weldhagen GF. Integrons and  $\beta$ -lactamases—a novel perspective on resistance [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 23(6): 556-562.
- [10] 林宁, 孙海平. 多药耐药大肠埃希菌整合子、转座子遗传标记研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, 18(10): 1361-1363.
- [11] Kang SG, Lee DY, Mshin SJ, et al. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class I integron carriage among *Escherichia coli* isolates [J]. *J Vet Sec*, 2005, 6(3): 201-205.
- [12] Doi Y, Adams JM, Yamane K, et al. Identification of 16s RNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(11): 4209-4210.
- [13] 糜祖焯, 秦玲. 多耐药鲍氏不动杆菌 5 类抗菌药物机制研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, 18(7): 901-904.
- [14] Dahmen S, Mansour W, Boujuafar N, et al. Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia [J]. *Microb Drug Resist*, 2010, 16(1): 43-47.

(收稿日期: 2011-07-23 修回日期: 2011-10-17)

(上接第 546 页)

- [4] Iizuka T, Hoshihara Y, Hoteya O, et al. A case of gastric cancer presenting with obstructive jaundice and responding to biweekly CPT-11 and CDDP combination administration [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2006, 33(5): 659-661.
- [5] Reed DN Jr, Vitale GC, Martin R, et al. Bile duct carcinoma: trends in treatment in the nineties [J]. *Am Surg*, 2000, 66(8): 711.
- [6] 董家鸿, 曾永毅. 梗阻性黄疸减黄研究热点与难点 [J]. *中国实用外科杂志*, 2007, 10(27): 768-769.
- [7] 熊翔. B 超引导下 PTCD 在恶性梗阻性黄疸姑息治疗中的应用 [J]. *临床外科杂志*, 2008, 16(12): 854-855.
- [8] 王忠敏, 贡桔, 伍超贤, 等. 40 例恶性梗阻性黄疸双介入治疗 [J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(23): 1366-1367.
- [9] 陈颀, 颜志平, 王建华, 等. 表阿霉素在恶性梗阻性黄疸治疗中的应用 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(5): 397-399.
- [10] Eschelmann D J, Shapiro M J, Bonn J, et al. Malignant biliary duct obstruction: long-term experience with Gianturco stents and combined modality radiation therapy [J]. *Radiology*, 1996, 200(3): 717-724.
- [11] 高健, 杜湘珂, 金龙, 等. 自膨胀式支架在梗阻性黄疸治疗中的应用 [J]. *中国医学影像技术*, 2002, 18(5): 419-421.
- [12] 曹广, 杨仁杰. 金属支架姑息治疗恶性梗阻性黄疸的术后随访及生存分析 [J]. *北京大学学报*, 2008, 40 (2): 121-124.
- [13] 姜卫剑, 姚力, 任安, 等. 经皮胆道内支架置入术姑息性治疗恶性梗阻性黄疸 [J]. *中华放射学杂志*, 1997, 31(10): 729-733.
- [14] 张战利, 张焱, 张东超. 恶性梗阻性黄疸双介入疗法的临床应用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2004, 20(5): 289-290.
- [15] 甄彦利, 马和平, 张学军, 等. 恶性梗阻性黄疸的双介入治疗 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2006, 38(3): 211-212.
- [16] 夏进东, 王道梅. 恶性梗阻性黄疸双介入治疗 18 例临床分析 [J]. *中国实用内科杂志*, 2001, 21(2): 113-114.
- [17] 陈颀, 王小林, 王建华, 等. 胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗恶性梗阻性黄疸 [J]. *复旦大学学报: 医学科学版*, 2001, 28(6): 516-518.
- [18] Polikarpov AA, Kozlov AV, Tarazov PG, et al. Role of interventional radiography in the treatment of the hepatopancreato-duodenal area, complicated by obstructive jaundice [J]. *Vopr Onkol*, 2002, 48(2): 238-243.

(收稿日期: 2011-09-03 修回日期: 2011-11-11)