

奇异变形菌中整合子分布及耐药性分析

陈科达^{1,2} 李情操^{1,2,*} 吴巧萍² 屠艳辉² 高丽²

(1 宁波大学医学院, 宁波 315211; 2 宁波市医疗中心李惠利医院, 宁波 315040)

摘要: **目的** 了解院内奇异变形菌中各类整合子的携带分布情况、阳性菌株可变区基因盒类型以及其与宿主菌耐药表型的相关性, 从而为临床治疗和院内感染控制提供参考。 **方法** 采用PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳等方法, 将本院2016年1月—2018年12月份从临床标本中分离得到的150株奇异变形菌进行第1、2和3类整合子的筛选, 并对整合子阳性菌株可变区进行测序分析以及宿主菌的耐药性进行相关性分析。 **结果** 150株奇异变形菌中携带整合子的菌株共有91株, 阳性率为60.7%, 其中第1类整合子阳性菌株有30株, 占20.0%; 第2类整合子阳性菌株22株, 占14.7%; 同时携带第1和2类菌株39株, 占26.0%; 未筛出第3类整合子; 在91株整合子阳性菌株中, 86株可变区出现扩增产物条带, 其余5株可变区未见扩增产物; 第1类整合子阳性菌株可变区携带的耐药基因盒主要为AadA2、DfrA32, 第2类整合子阳性菌株可变区携带耐药基因盒主要为DfrA1; 可变区携带AadA2的菌株对庆大霉素和妥布霉素的耐药率显著高于整合子阴性菌株($P<0.01$), 可变区携带DfrA1或DfrA32的菌株对复方磺胺甲噁唑(即甲氧苄啶/磺胺甲噁唑)的耐药率也明显高于整合子阴性菌株($P<0.01$); 91株整合子阳性菌株对氨苄西林/舒巴坦、复方磺胺甲噁唑、环丙沙星、庆大霉素、头孢曲松、妥布霉素和左氧氟沙星的耐药率均显著高于整合子阴性菌株($P<0.01$)。 **结论** 临床分离的奇异变形菌携带整合子的比例较高, 其可变区所携带的耐药基因主要为编码氨基糖苷类和甲氧苄氨嘧啶类抗菌药物的基因, 整合子的携带与宿主菌产生的耐药性呈高度相关。

关键词: 奇异变形菌; 整合子; 可变区; 耐药性

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Analysis of integron distribution and drug resistance in *Proteus mirabilis*

Chen Ke-da^{1,2}, Li Qing-cai^{1,2}, Wu Qiao-ping², Tu Yan-ye² and Gao Li²

(1 Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211; 2 Ningbo Medical Center Lihuili Hospital, Ningbo 315040)

Abstract Objective To understand the distribution of integrons in *Proteus mirabilis*, the types of variable region gene cassettes of positive strains, and their correlation with drug resistance phenotypes of host bacteria, so as to provide references for clinical treatment and nosocomial infection control. **Methods** Using PCR amplification and agarose gel electrophoresis, 150 strains of *Proteus mirabilis* isolated from clinical specimens from January 2016 to December 2018 were screened for the class 1, 2 and 3 integrons. Sequencing analysis of variable regions of integron-positive strains and correlation analysis of drug resistance of host strains were carried out. **Results** There were 91 strains carrying 150 integrons in *Proteus mirabilis*. The positive rate was 60.7%, among which 30 strains were the first type of integron positive strains, accounting for 20%, 22 strains of the second type of integron positive strains, accounting for 14.7%, 39 strains carrying the first and the second type at the same time, accounting for 26%. No type 3 integrons were screened out. Among the 91 integron-positive strains, 86 mutant regions showed amplification product bands, and the other five strain regions showed no amplification products. The resistance gene cassettes carried by the variable region of the first type of integron positive strains were mainly AadA2 and DfrA32, and the variable region carrying the resistance class of the second type of integron positive strain was mainly DfrA1. The strain carrying

收稿日期: 2019-11-11

基金项目: 宁波市科技计划项目(No. 2018A610402)

作者简介: 陈科达, 男, 生于1988年, 在读硕士研究生, 主要从事耐药机制研究, E-mail: keda419@qq.com

*通讯作者, E-mail: 582442405@qq.com

the AadA2 in the variable region was celebrated. The resistance rate against gentamicin and tobramycin was significantly higher than that of the integron-negative strain ($P<0.01$), and the resistance rate of the strains with DfrA1 or DfrA32 to the compound sulfamethoxazole was also significantly higher than that of the strains without integrons ($P<0.01$). The resistance rates of 91 integron-positive strains to ampicillin/sulbactam, compound sulfamethoxazole, ciprofloxacin, gentamicin, ceftriaxone, tobramycin, and levofloxacin were significantly higher than those without integrons ($P<0.01$). **Conclusion** The clinically isolated *Proteus mirabilis* had a higher proportion of carrying integrons, and the drug resistance genes carried in the variable region were mainly genes encoding aminoglycosides and trimethoprim antibacterial drugs. The host bacteria of the integrons and the resulting resistance was highly correlated.

Key words *Proteus mirabilis*; Integron; Variable region; Drug resistance

变形菌属主要分布于水、土壤以及被粪便污染的环境中，是寄居在人肠道内的正常菌群，也是院感常见的条件致病菌。奇异变形菌是变形菌属中临床最为常见的类型，随着各种抗菌药物的滥用，临床上的多重耐药菌株日益增多。目前认为多重耐药菌的快速生长主要来源于耐药基因的水平传播。其中整合子作为重要的移动基因元件，可以捕捉外来基因，通过整合酶将耐药基因在可变区重组来发挥重要的作用使宿主菌产生耐药^[1-2]。本研究对2016年1月—2018年12月份临床分离的150株奇异变形菌进行了第1、2和3类整合子筛查，还对整合子阳性菌株的可变区序列与其具有的耐药性是否有相关性进行了进一步分析，现报道如下。

1 对象与方法

1.1 菌株

实验菌株：由本院2016年1月—2018年12月份从痰液、中段尿、血液和创面分泌物等临床标本中非重复分离得到的150株奇异变形菌。

工程菌株：大肠埃希菌DH5a(第1、2和3类整合子阴性对照菌株)、奇异变形菌47437(第1、2类整合子阳性对照菌株)和黏质沙雷菌37586(第3类整合子阳性对照菌株)，均由魏取好教授赠送^[3]。

1.2 主要仪器与试剂

PCR扩增采用美国Bio-RAD公司生产的全自动荧光定量PCR仪；扩增产物电泳及结果观察采用美国Bio-RAD公司生产DYCP-31CN电泳仪和GELDOC XR凝胶成像分析系统；*Taq*酶及相关试剂采用由日本TaKaRa公司生产，华大基因生物有限公司合成第1类整合子筛查引物intF和P2R、第2类整合子筛查引物intI2F和intI2R、第3类整合子筛查引物intI3F和intI3R、第1类整合子可变区扩增引物5CS和3CS以及第2类整合子可变区扩增引物INF2和INB2，见表1^[4]。

1.3 方法

1.3.1 PCR模板制备

采用煮沸法。

1.3.2 PCR反应体系

PCR反应体系见表2。

1.3.3 PCR反应条件

PCR反应条件见表3~4。

表1 整合子筛查引物序列
Tab. 1 Integron screening primer sequence

Primer	Sequence(5'→3')	Target gene(s) or region
intF	CCAAGCTCTCGGGTAACATC	<i>intI1</i>
P2R	CCCGAGGCATAGACTGTA	
intI2F	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	<i>intI2</i>
intI2R	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	
intI3F	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	<i>IntI3</i>
IntI3R	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG	
5CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Class 1 integron variable region
3CS	AAGCAGACTTGACCTGA	
INF2	TGGGTGAGATAATGTGCATC	Class 2 integron variable region
INB2	TCGAGAGAGGATATGGAAGG	

表2 PCR反应体系
Tab. 2 PCR reaction system

整合子筛查体系(20μL)		整合子可变区基因扩增体系(50μL)	
试剂	体积	试剂	体积/μL
(1)去离子水	8.2μL	(1)去离子水	30.5
(2)整合子上下游筛查引物	各0.4μL	(2)10×LA PCR反应缓冲液	5
(3)Premix <i>Taq</i> TMDNA	10μL	(3)整合子可变区上下游扩增引物	各2
聚合酶		(4)dNTP Mix液	8
(4)上述制备的模板	1μL	(5)LA <i>Taq</i> DNA聚合酶	0.5
		(6)上述制备的模板	2

表3 整合子筛查PCR反应条件
Tab. 3 Integron screening PCR reaction conditions

预变性	变性	退火	延伸	延伸	停止
94℃ 4min	94℃ 40s	55℃ 1min	72℃ 1min	72℃ 5min	4℃
35个循环					

表4 可变区扩增PCR反应条件
Tab. 4 Variable region amplification PCR reaction conditions

预变性	变性	退火	延伸	延伸	停止
94℃ 4min	94℃ 40s	55℃ 1min	72℃ 5min	72℃ 15min	4℃
35个循环					

1.3.4 PCR产物电泳及结果判读

将PCR扩增产物在琼脂糖凝胶中进行电泳，每批均设阴、阳性对照，结束后，将琼脂糖凝胶置于凝胶成像分析仪下进行拍照分析。在阳性对照615bp附近出现明显条带者判为第1类整合子阳性。同理，在阳性对照788bp附近出现明显条带者判为第2类整合子阳性，在阳性对照580bp附近出现明显条带者判为第3类整合子阳性。可变区扩增产物电泳有明显条带者显示可变区有基因盒。

1.3.5 扩增产物确认

将可变区扩增产物有目的条带的菌株，经纯化后送华大基因进行双向测序，测得的序列结果与BLAST数据库进行匹配，明确可变区耐药基因盒的种类及排列方式。

1.3.6 统计学处理

运用SPSS 19.0统计软件对本实验数据进行统计分析，主要为 χ^2 检验， $P<0.05$ 视为有统计学意义。

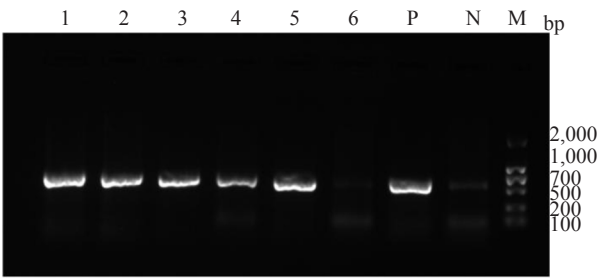
2 结果

2.1 整合子筛查及可变区扩增结果

150株奇异变形菌中携带整合子的菌株共有91株，阳性率为60.7%，其中第1类整合子阳性菌株有30株，占比20%，第2类整合子阳性菌株22株，占比14.7%，同时携带第1和第2类菌株39株，占比26%，未筛出第3类整合子；91株整合子阳性菌株中，有86株可变区可见扩增产物条带，其余5株可变区未见扩增产物，其中共有5种不同长度的PCR产物，分别约为0.7、1.0、1.5、2.0、2.5和3.5kb大小，其中以1.5、2.5和3.5kb为主，分别为25、18和49株，见图1~2。

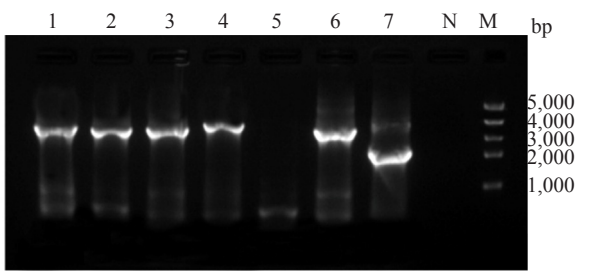
2.2 整合子可变区扩增产物测序结果

第1类整合子阳性菌株可变区PCR产物测序结果显示：其携带耐药基因分别为氨基糖苷类核苷酸转移酶基因(*aadA2*)、甲氧苄氨嘧啶抗性二氢叶酸还原酶基因(*dfrA32*)、EreA家族红霉素酯酶基因(*ereA*)、链霉素腺苷转移酶基因ANT(3')和B-3型氯霉素O-乙酰转移酶基因(*catB3*)，其中以*aadA2*和*dfrA32*为主；



泳道1~6是部分试验菌株；泳道P是阳性对照；泳道N是阴性对照；泳道M是DNA Marker

图1 整合子筛查产物的电泳图。
Fig. 1 Electropherogram of the integrated sub-screening product



泳道1~7是部分试验菌株；泳道N是阴性对照；泳道M是DNA Marker

图2 整合子阳性菌株的可变区扩增产物的电泳图
Fig. 2 Electropherogram of variable region amplification products of integron positive strains

第2类整合子阳性菌株可变区携带耐药基因为甲氧苄氨嘧啶抗性二氢叶酸还原酶基因(*dfrA1*)(表5)。

2.3 可变区耐药基因盒与耐药表型关系

可变区携带*aadA2*的整合子阳性菌株对阿米卡星、庆大霉素和妥布霉素的耐药率与可变区无此类基因盒但整合子阳性菌株相比无统计学差异($P>0.05$)，但对庆大霉素和妥布霉素的耐药率显著高于整合子阴性菌株($P<0.01$)。可变区携带*dfrA1*或*dfrA32*的整合子阳性菌株对复方磺胺甲噁唑的耐药率与可变区无此类基因盒但整合子阳性菌株相比无统计学差异($P>0.05$)，但却显著高于整合子阴性菌株($P<0.01$)(表6)。

2.4 整合子阳性和阴性菌株耐药性比较

表5 整合子可变区PCR扩展产物的测序结果

Tab. 5 Sequencing results of the integron variable region PCR extension product

整合子类型	例数	长度/kb	耐药基因盒	GenBank/提取码 [△]
第1类	46	946	氨基糖苷类核苷酸转移酶基因(<i>aadA2</i>)	NZ_CP020121.1
	53	612	甲氧苄氨嘧啶抗性二氢叶酸还原酶基因(<i>dfrA32</i>)	NZ_CP011628.1
	8	1101	EreA家族红霉素酯酶基因	NZ_CP014646.1
	40	934	链霉素3'-腺苷酰转移酶基因	NC_011751.1
	13	939	B-3型氯霉素O-乙酰转移酶基因(<i>catB3</i>)	NZ_CP007557.1
第2类	49	710	甲氧苄氨嘧啶抗性二氢叶酸还原酶基因(<i>dfrA1</i>)	NZ_FIZD01000004.1

注：“[△]”表示可变区序列与GenBank提取码中所对应序列的同源性>95%

表6 实验菌株对可变区所携带主要耐药基因对应抗菌药物的耐药率情况

耐药基因	株数	阿米卡星		庆大霉素		妥布霉素		复方磺胺甲噁唑	
		R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%
<i>aadA2</i>	37	0	100.0	48.6	21.6	29.7	18.9	/	/
<i>dfrA1</i> 或 <i>dfrA32</i>	61	/	/	/	/	/	/	77.0	6.5
整合子阳性但无上述基因盒	16	0	100.0	37.5	37.5	12.5	62.5	87.5	12.5
整合子阴性	64	0	98.4	31.3	93.8	0	93.8	10.9	84.4

注：“/”代表此抗菌药物不适用于此耐药基因

91株整合子阳性菌株对氨苄西林/舒巴坦、复方磺胺甲噁唑、环丙沙星、庆大霉素、头孢曲松、妥布霉素和左氧氟沙星的耐药率分别为56.0%、89.0%、72.5%、40.7%、42.9%、20.9%和26.4%，均显著高于整合子阴性菌株($P<0.01$)(表7)。

3 讨论

奇异变形菌是院内常见的条件致病菌，常可引起泌尿系统的感染，亦可引起消化道、呼吸道及伤口的感染，近年来标本中的分离率越来越高，其致病力也越来越受到重视，同时临床上广谱抗菌药物的大量使用，也导致奇异变形菌的耐药性日益上升。过去大家认为主要是染色体的基因突变导致的细菌耐药，但近年来发现这种由基因突变引起的耐药是不能进行水平传播的，大部分的细菌是由于获得了外源性耐药基因而产生的耐药。因此，一些具有水平传播能力的基因元件成为了近年研究的重点，整合子因其具有捕获、整合并表达外来基因的能力，被当作细菌的新耐药机制^[5]。整合子是一种可移动的基因元件，它的携带位

点有重组特异性，能将多种耐药基因盒重组在一起，从而使细菌拥有多重耐药性。奇异变形菌作为临床常见分离菌，其耐药性和耐药机制有着自身特点，本研究通过对其各类整合子和可变区耐药基因的检测分析，来了解整合子在奇异变形菌中的分布情况及其在宿主菌产生耐药中所发挥的作用。

结果显示参检的150株奇异变形菌中，携带整合子的菌株共有91株，阳性率为60.7%，其中第1类整合子阳性菌株有30株，占20%，第2类整合子阳性菌株22株，占14.7%，同时携带第1和2类菌株39株，占26%，未检出第3类整合子。本次实验的奇异变形菌携带整合子的比例较高，这与国内相关报道一致，但第2类整合子携带率明显高于同类报道^[6-8]。第2类整合子在临床菌株的检出率远低于第1类整合子，是因为第2类整合酶基因的阅读框内插入了一个终止密码子，不能合成完整的整合酶蛋白，使得第2类整合酶无法剪切和整合基因盒。但本研究的第2类整合子检出率达到了接近于第1类整合子的40.7%，究其原

表7 91株整合子阳性和59株整合子阴性奇异变形菌对抗菌药物耐药率(%)

Tab. 7 Result of the drug susceptibility in 91 integron positive and 59 integron negatives *Proteus mirabilis*(%)

抗菌药物	整合子阳性($n=91$)				整合子阴性($n=59$)				P 值
	耐药		敏感		耐药		敏感		
	株数	耐药率/%	株数	敏感率/%	株数	耐药率/%	株数	敏感率/%	
阿米卡星	1	1.0	90	98.9	0	0	59	100.0	>0.05
氨苄西林/舒巴坦	51	56.0	40	44.0	5	8.5	54	59.3	<0.01
氨曲南	2	2.2	89	97.8	2	3.4	57	96.6	>0.05
厄他培南	0	0	91	100.0	0	0	59	100.0	>0.05
复方磺胺甲噁唑	81	89.0	10	11.0	6	10.2	53	89.8	<0.01
环丙沙星	66	72.5	25	27.5	6	10.2	53	89.8	<0.01
哌拉西林/三唑巴坦	0	0	91	100.0	1	1.7	58	98.3	>0.05
庆大霉素	37	40.7	30	33.0	2	3.4	55	93.2	<0.01
头孢吡肟	2	2.2	88	96.7	1	1.7	58	89.8	>0.05
头孢曲松	39	42.9	50	54.9	6	10.2	53	89.8	<0.01
头孢他啶	3	3.3	88	96.7	2	3.4	57	96.6	>0.05
头孢替坦	0	0	91	100.0	0	0	59	100.0	>0.05
妥布霉素	19	20.9	43	47.3	0	0	56	94.9	<0.01
左氧氟沙星	24	26.4	48	52.7	2	3.4	56	94.9	<0.01
头孢哌酮/舒巴坦	1	1.2	83	91.2	1	1.7	56	94.9	>0.05

因可能与功能性2类整合子的存在有关^[7],第2类整合酶基因中的终止密码子TAA被CAA所替代,使整合酶基因能够表达完整的整合酶蛋白,该蛋白能剪切与重组基因盒,从而使得第2类整合子分布率增加,该现象有待后续整合酶基因的检测证实。

随着对整合子基因盒研究的不断深入,不仅发现了许多新的基因盒类型^[9],而且在不同菌种间能检出相同的基因盒组成和排列顺序,进一步证明了整合子具有捕获、携带、重组基因盒的能力还能在不同菌种间进行传播^[10]。本次分离的第1和2类整合子阳性菌株可变区的耐药基因盒主要为、*dfiA32*和*dfiA1* 3种,其通过表达氨基糖苷类核苷酸转移酶和甲氧苄氨嘧啶抗性二氢叶酸还原酶来介导氨基糖苷类和磺胺类抗菌药物的耐药,其中携带的菌株对庆大霉素和妥布霉素的耐药率明显高于整合子阴性的菌株,携带*dfiA1*或*dfiA32*的菌株对复方磺胺甲噁唑的耐药率也明显高于整合子阴性的菌株。该现象可能跟临床上长期广泛使用这些抗菌药物有关,使这些基因盒有了足够的时间和选择压力从而进行广泛播散。随着临床上不断研发使用新的抗菌药物,也出现越来越多新的耐药基因盒^[11],一旦具有足够的时间和选择压力下,这些针对新型抗生素的耐药基因就会在临床菌株中发生播散,应当引起我们的重视。此外,本次实验菌株中有5株整合酶阳性的菌株可变区未见扩增产物,其原因可能与整合子3'CS发生了基因突变或缺失、基因盒个数较多总长度过长、内部基因盒结构复杂或是新的基因盒以及普通PCR无法获取产物等因素有关^[8]。通过对此类菌株可变区结构的分析研究,可以增加我们对整合子的进一步了解。

本次研究发现,可变区携带AadA2、DfiA32和DfiA1的整合子阳性菌株对阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素以及复方磺胺甲噁唑的耐药率与可变区无此类基因盒但整合子阳性的菌株无统计学差异。同时,91株整合子阳性的菌株对氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、头孢曲松和左氧氟沙星4种抗菌药物的耐药率分别为56.0%、72.5%、42.9%和26.4%,均显著高于整合子阴性的菌株,可整合子可变区中未检出与这些抗生素相关的耐药基因盒。这与笔者先前的报道一致^[12]。这可能不是巧合,究其原因可能与整合子周围的基因环境有关。质粒作为整合子传播的常见载体,除整合子以外所携带的基因元件和耐药基因也较为丰富,而整合子这种基因盒以外的作用机制是独立存在发挥效应,还是与其他耐药机制有协同作用,这有待对其所在的基因环境

和结构特点进行进一步的研究揭示。

综上所述,医院的奇异变形菌检出的整合子主要是第1和2类整合子,总体携带率较高,且整合子阳性菌株的可变区所携带的耐药基因与其耐药表型之间呈高度相关性。而功能性2类整合子的存在和整合子周围的基因环境对耐药基因的传播和宿主菌耐药性的表达可能发挥着重要作用,有待进一步确认和研究。

参考文献

- [1] Cameron F H, Groot Obbink D J, Ackerman V P, *et al*. Nucleotide sequence of AAD(2'') aminoglycoside adenyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfr* II in R388[J]. *Nucl Acids Res*, 1986, 14: 8625-8635.
- [2] Mazel D. Integrons: Agents of bacterial evolution[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(8): 608-620.
- [3] Wei Q, Hu Q, Li S, *et al*. A novel functional class 2 integron in clinical *Proteus mirabilis* isolates[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(4): 973-976.
- [4] Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, *et al*. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(10): 3996-4001.
- [5] 丁元廷. 细菌耐药机制的国内外最新研究进展[J]. *现代预防医学*, 2013, 40(6): 1109-1111.
- [6] Wu K, Wang F, Sun J, *et al*. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(3): 264-267.
- [7] Wei Q, Hu Q, Li S, *et al*. A novel functional class 2 integron in clinical *Proteus mirabilis* isolates[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(4): 973-976.
- [8] 张亚培, 章嫣芸, 李梅梅, 等. 变形菌多重耐药性与整合子相关性分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(2): 141-144.
- [9] Japoni-Nejad A, Farshad S, van Belkum A, *et al*. Novel cassette array in a class 1 integron in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from central Iran[J]. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303(8): 645-650.
- [10] Japoni-Nejad A, Farshad S, van Belkum A, *et al*. Novel cassette array in a class 1 integron in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from central Iran[J]. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303(8): 645-650.
- [11] Poirel L, Naas T, Guibert M, *et al*. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(3): 573-581.
- [12] 李情操, 卢雯君, 吴巧萍, 等. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌整合子检测及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(10): 2176-2178.