·论　　著·　　DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.008

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌Ⅰ类整合子及ISCR1与细菌耐药性的相关性研究*

储雯雯,刘　周,李　昕,管世鹤△
(安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601)

摘　要:目的　探讨耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌临床分离株Ⅰ类整合子和插入序列共同区(ISCR1)的分布情况以及所携带耐药基因的种类,分析其结构及其与耐药性关系。**方法**　收集并鉴定临床分离非重复碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌株44株。采用VITEK2 COMPACT全自动微生物鉴定药敏分析仪和纸片扩散法进行常规药物敏感试验,聚合酶链反应(PCR)检测整合酶Ⅰ、ISCR1及二者可变区携带的耐药基因。**结果**　44株肺炎克雷伯菌32株Ⅰ类整合子阳性,未检出Ⅱ/Ⅲ类整合子基因,29株Ⅰ类整合子可变区阳性,携带耐药基因aadA;6株ISCR1阳性,其中1株ISCR1携带的耐药基因sul1;5株同时携带Ⅰ类整合子和ISCR1基因的菌株有1株显示两种元件以串联的形式存在于耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌中。药敏试验结果显示,携带Ⅰ类整合子菌株比未携带Ⅰ类整合子菌株耐药性高。**结论**　Ⅰ类整合子广泛存在于耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌中,对菌株耐药性有影响。ISCR1携带较少,其中两种元件以串联形式存在的复合结构影响耐药基因在不同耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌株间的水平传播。

关键词:耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;　Ⅰ类整合子;　插入序列共同区;　耐药性
中图法分类号:R446.5　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1672-9455(2018)16-2386-04

Correlation of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae class Ⅰ integrons, ISCR1 and drug resistance*

CHU Wenwen, LIU Zhou, LI Xin, GUAN Shihe△
(*Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui* 230601, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the distribution of class Ⅰ integron and the inserted sequence common region (ISCR1) of the carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates and the types of drug-resistant genes, and to analyze its structure and its relationship with drug resistance. **Methods**　Totally 44 strains of non-replicative carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae were collected and identified. Conventional drug susceptibility was tested by VITEK2 COMPACT automatic microbial identification susceptibility analyzer and disc diffusion method. Meanwhile, polymerase chain reaction (PCR) method was used to detect resistant genes carried in class Ⅰ integron and ISCR1 as well as their variable-region genes. **Results**　Among the 44 strains of Klebsiella pneumoniae, 32 were positive class Ⅰ integron, no class Ⅱ/Ⅲ integrons were detected, the variable-regions of 29 strains of class Ⅰ integron were positive, and the resistant gene carried by class Ⅰ integron was aadA. Furthermore, there were six strains of positive ISCR1, among which one strain of ISCR1 carried the resistance gene sul1. In addition, in the five strains that carried class Ⅰ integron and ISCR1 simultaneously, one strain with two-component system were found to exist in tandem array in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. Drug susceptibility results showed that resistance of carry Ⅰ class integron strains was higher than those not carry Ⅰ class integron strain. **Conclusion**　Class Ⅰ integron exists commonly in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae, which influences on drug-resistant strains. ISCR1 was not widely carried. The composite structure in which two elements exist in tandem array affects the horizontal spread of drug resistance genes among different carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains.

Key words: carbapenem-resistant Klebsiella pneumonia;　class Ⅰ integron;　inserted sequence common region;　drug resistance

肺炎克雷伯菌(KNP)是临床常见的院内感染致病菌之一,除了易引起消化系统和呼吸系统疾病外,在泌尿系统及血液系统疾病的患者中也有较高的感染率[1],特别是免疫力低下的患者,其肺部、尿路感染

*　**基金项目:**安徽省卫生和计划生育委员会科研计划资助项目(2016QK036);安徽医科大学校科研基金资助项目(2017xkj040)。
作者简介:储雯雯,女,主管技师,主要从事细菌耐药方面的研究。　△　**通信作者**,E-mail:shiheguan@126.com。

的概率增加[2]。在治疗 KNP 感染过程中，碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)的分离率已随着碳青霉烯类药物的不规范使用逐年升高，在全世界范围内呈扩散态势，影响医生的治疗和患者的康复[3]。该类耐药菌株是以整合子、转座子以及插入序列共同区(ISCR/orf513)等可移动元件为媒介对其携带的耐药基因在同种或不同种细菌间相互传播[4]。本试验拟对临床分离的 CRKP 的Ⅰ类整合子和 ISCR1 进行试验分析，对本院 CRKP 耐药性进行研究。现将结果报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料来源　收集安徽医科大学第二附属医院 2013 年 2 月至 2015 年 6 月临床科室各类标本中分离的 CRKP 共 44 株，已通过药物敏感性鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。所有菌株均为产碳青霉烯酶(KPC)的 KNP。质控菌株为 KNP ATCCBAA-1705 和 ATCCBAA-1706。

1.2　仪器与试剂　法国梅里埃公司的全自动微生物鉴定仪 VITEK2 COMPACT；电泳仪购自美国 Biored 公司；Tanon1600 型全自动凝胶成像分析系统采购自上海天能科技有限公司；聚合酶链反应(PCR)引物由上海生物工程有限公司合成；Flexcycler 型梯度 PCR 扩增仪来自德国 Analytikjena 公司；琼脂糖、PCR 相关试剂从上海生物工程有限公司和大连宝生物 Takara 技术公司采购；头孢哌酮/舒巴坦和美罗培南纸片由英国 Oxoid 公司生产。

1.3　方法

1.3.1　基因组 DNA 提取　煮沸法提取细菌 DNA[5]，−80 ℃保存菌株。在室温复苏后，转种于哥伦比亚血琼脂平板上进行 4 区划线分纯，37 ℃培养 24 h 后，挑取 2～3 个单个菌落个放在已有 200 μL 无菌蒸馏水的 EP 管内密封，加热至 100 ℃、10 min。完成后用低温高速离心机中以 15 000 r/min 的速度离心 10 min，将上清液转移到另一无菌管中，放置−20 ℃保存备用。

1.3.2　引物设计与合成　参照文献[6]设计耐药基因引物序列，引物由上海生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

1.3.3　PCR 反应条件　50 μL PCR 反应体系，mix(2×)25 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，DNA 模板 1 μL，双蒸水(ddH_2O)22 μL。反应过程：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，退火 55 ℃ 30 s，72 ℃延伸 50 s，循环 35 次后，72 ℃延伸 10 min，4 ℃保持。PCR 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳，经凝胶成像系统显像观察结果。

1.3.4　Ⅰ类整合子可变区扩增产物限制性片段长度多态性分型(RFLP)　HinfⅠ反应体系为 20 μL：PCR 产物 10 μL，HinfⅠ2 μL、限制性内切酶缓冲液 1 μL，ddH_2O 7 μL。判读结果：根据扩增片段的大小，将大小一致且 RFLP 分型结果认为同一带型的序列判定为相同片段，并选择两株相同 PCR 产物进行测序分析。

1.3.5　PCR 产物分析　随机挑选 2 株Ⅰ类整合子和 ISCR1 可变区扩增阳性产物，将其送至上海生物工程有限公司测序分析，结果在 GenBank 中进行比对。

1.3.6　药物敏感试验　采用 VITEK2 配套 GN13 药敏板进行药物敏感试验，抗菌药物包括亚胺培南、厄他培南、头孢曲松、头孢吡肟、头孢他啶、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、氨曲南、环丙沙星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、哌拉西林/他唑巴坦，美罗培南和头孢哌酮/舒巴坦用纸片扩散法检测，质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922，参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)的标准进行操作方法及结果判断。

表 1　目的基因引物序列及长度

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
Ⅰ类整合子基因	ACA TGT GAT GGC GAC GCA CGA ATT TCG GTC CTG GCT GGC GA	569
Ⅱ类整合子基因	CGC CAA TGC CTG ATC TAC TT TCA CTC GTT TGC TAC GCA TC	192
Ⅲ类整合子基因	CCG GTT CAG TCT TTC CTC AA GAG GCG TGT ATC TGC CTC AT	155
ISCR1	ATG GTT TCA TGC GGG TT CTG AGG GTG TGA GCG AG	475
Ⅰ类整合子可变区	GGC ATC CAA GCA GCA AG AAG CAG ACT TGA CCT GA	未知
ISCR1 可变区	GGC AAG AAG CCC GAC AAA TC CGC TGC GCT GAG TGC ATA AC	未知
Ⅰ类整合子 3′CS 与 ISCR1 间的序列	AGC CAA ACT ATC AGG TCA A ATC TTC GGC ATA GAC ACC A	2 270

1.4　统计学处理　采用 WHONET5.6 软件分析系统对细菌药敏试验结果进行耐药性分析。计数资料以百分数表示，组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

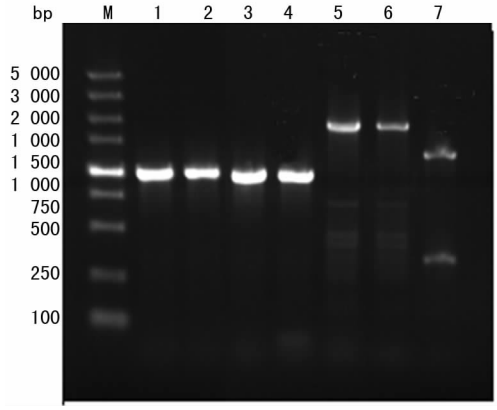
2　结　　果

2.1　PCR 扩增结果　44 株 CRKP 中共有 32 株检测出携带Ⅰ类整合子，其中Ⅰ类整合子可变区阳性的共有 29 株，阳性率是 72.7%，1.0、1.2、1.7 kbp 分别有 24、3、2 株，见图 1。ISCR1 扩增片段阳性有 6 株，阳性率为 13.65%；1 株 ISCR1 可变区扩增出约为 1.0 kbp 的条带。在 5 株同时检测出Ⅰ类整合子和 ISCR1 的菌株中显示携带串联结构的阳性菌株有 1 株，片段大小约为 2.0 kbp。

2.2　Ⅰ类整合子可变区酶切图谱　对 1.0 kbp 片段菌株的 PCR 产物进行酶切鉴定，显示所有的酶切图谱为相同带型。

2.3　序列分析结果　将测序结果进行比对分析，显示Ⅰ类整合子可变区各片段所含的耐药基因盒均为 aadA，ISCR1 可变区携带的耐药基因序列分析显示为 sul1。5 株共同携带Ⅰ类整合子和 ISCR1 的菌株中有

1 株 CRKP 检测出串联结构。



注：M 为 DL5000 DNA 标志物；1～4 为 1.0 kbp 片段可变区阳性菌株；5～6 为 1.7 kbp 片段可变区阳性菌株；7 为 1.2 kbp 片段可变区阳性菌株

图 1　Ⅰ类整合子可变区扩增结果

2.4　Ⅰ类整合子阴性和阳性性菌株药敏试验结果对比　经数据统计，阳性菌株和阴性菌株对抗菌药物美罗培南、亚胺培南、厄他培南、头孢曲松及氨曲南的耐药率差异无统计学意义（$P>0.05$）。而Ⅰ类整合子阳性菌株对其他抗菌药物的耐药率明显高于Ⅰ类整合子阴性菌株，且差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见表 2。

表 2　Ⅰ类整合子阳性菌株与阴性菌株的耐药结果[n(%)]

抗菌药物	Ⅰ类整合子阳性菌株(n=32)	Ⅰ类整合子阴性菌株(n=12)	χ^2	P
美罗培南	32(100.0)	12(100.0)	<0.001	>0.99
亚胺培南	32(100.0)	12(100.0)	<0.001	>0.99
厄他培南	32(100.0)	12(100.0)	<0.001	>0.99
头孢吡肟	32(100.0)	8(66.7)	11.7	<0.05
头孢曲松	32(100.0)	11(91.7)	2.7	>0.05
头孢他啶	32(100.0)	8(66.7)	11.7	<0.05
庆大霉素	31(96.9)	2(16.7)	29.9	<0.05
阿米卡星	30(93.8)	0(0.0)	35.4	<0.05
妥布霉素	32(100.0)	5(41.7)	22.2	<0.05
氨曲南	32(100.0)	11(91.7)	2.7	>0.05
环丙沙星	30(93.8)	2(16.7)	26.1	<0.05
左氧氟沙星	29(90.6)	0(0.0)	31.9	<0.05
复方磺胺甲噁唑	19(59.3)	1(8.3)	9.2	<0.05
头孢哌酮/舒巴坦	31(96.9)	9(75.0)	5.1	<0.05
哌拉西林/他唑巴坦	32(100.0)	5(41.7)	22.2	<0.05

3　讨　论

院内感染多重耐药菌中以 KNP 多见，其致病力和毒力比铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌更强。在众多的抗菌药物中，能有效抑制产 AmpC 酶和超广谱 β-内酰胺酶肠杆菌科细菌生长的碳青霉烯类抗菌药物曾被认为是治疗所有多重耐药菌的热门药物[7]。但近年来，由于感染患者在抗感染治疗过程使用了大量广谱抗菌药物，KNP 本身也易出现耐药菌株，造成该菌株耐药耐药率逐年上升，在 CRKP 的分离率大幅增加的同时，也给抗感染治疗带来新的挑战[8]。

医院内感染的致病菌中，CRKP 的地位不容忽视，控制和减少 CRKP 及其耐药性发生机制等问题已成为社会和医务人员关注的焦点。碳青霉烯类药物易造成 KNP 被选择性诱导耐药，其原因多与该细菌获得碳青霉烯酶和携带整合子有关[9]，近年来关于肠杆菌科细菌耐药机制研究文献报道中以各种可移动遗传元件如质粒、转座子、整合子和插入序列共同区的介绍较多[10]。正是细菌的基因-整合子系统不断地募集和表达外源基因，并通过各种传播媒介如接合性质粒、转座子、整合型噬菌体等在不同种和同种菌属间相互传播，当细菌接收到这些耐药基因并高表达出耐药特性时，其危害性和严重性不言而喻。整合子在染色体、质粒或者转座子上，具有捕获耐药基因并对其进行传播功能。它包括 3 个基本结构，分别为 5′保守区（CS）、可变区及 3′CS[11]。可变区含有不同类型的耐药基因盒，其中整合子中的耐药基因盒涵盖了多数抗菌药物[12]。在本研究中，本院 CRKP 中检出整合子均为Ⅰ类整合子，携带耐药基因盒 aadA，因此认为携带Ⅰ类整合子使 CRKP 在医院内传播更加迅速广泛，并导致 CRKP 对多种抗菌药物尤其是氨基糖苷类耐药。ISCR 作为一类与整合子具有相似的功能耐药基因传播元件具有强大的捕获能力，它以相邻染色体位置上染色体基因移位的方式，将相邻序列移动到接合性质粒上，并通过该类载体帮助染色体携带的耐药基因进入其他细菌的菌体内导致耐药基因在细菌之间的传播流行。复合Ⅰ类整合子的结构主要是由Ⅰ类整合子的 3′CS 与 ISCRl 及其下游的耐药基因直接连接形成，有时在 ISCR1 携带的耐药基因下游还会有另一个 3′CS 相连接。关于复合Ⅰ类整合子当前国内报道较少，有文献显示由于同时携带两种可移动耐药元件，复合Ⅰ类整合子在携带多种耐药基因的基础上，也会引起耐药性的广泛传播[13]。药敏试验结果显示，Ⅰ类整合子阳性菌株对头孢吡肟、头孢他啶、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦的耐药性耐药率高于阴性菌株。本试验中，携带 ISCR1 的 6 株菌株仅有 1 株 ISCR1 可变区检出携有耐药基因盒，有可能是因为 ISCR1 下游连接的另一个 3′CS 可有部分缺失或被截断。该试验中的 44 株 CRKP 中在 1 株同时具有Ⅰ类整合子和 ISCR1 结构的菌株中检测出串联结构的存在，可以推断本次实验 CRKP 中可能存在复合Ⅰ类整合子结构，值得深入研究。而在此试验中也发现不同大小的整合子可变区所携带的是相同的耐药基因盒，与一些文献报道不一致[12-13]，这也需要进一步的深入探讨。

综上所述，在细菌耐药性监测中发现整合子和插入序列共同区介导引起的细菌耐药现象具有重要意义。当在细菌中同时发现有二者存在时，它们携带的耐药基因可能会在使用某种抗菌药过程中而被诱导并表达，从而表现出多重耐药性；而停止或减少使用

该抗菌药物后，可能会造成耐药性的消失。因此，尽量在完善治疗方案的基础上拒绝抗菌药物的不规范使用，同时在熟悉整合子和 ISCR1 介导的细菌耐药及其播散机制的基础上，在细菌耐药性监测中全面开展系统地表型和基因检测，才有可能减少Ⅰ类整合子和 ISCR1 介导的耐药性的表达或产生，阻止耐药菌的扩散和传播，为临床提供可靠的流行病学资料，从而更好地指导临床合理应用抗菌药物[14]。

参考文献

[1] 赵晓杰，邓丽华，施德仕，等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志，2015，25(17)：3851-3853.

[2] WU H S，WANG F D，TSENG C P，et al. Characteristics of healthcare-associated and community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremia in Taiwan[J]. J Infect，2012，64(2)：162-168.

[3] 胡付品，朱德妹，汪复，等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志，2014，14(5)：365-374.

[4] GORDON N C，WAREHAM D W. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii：mechanisms of virulence and resistance[J]. Inter J Antimicrob Agents，2010，35(3)：219-226.

[5] TURTON J F，SHAH J，OZONGWU C，et al. Incidence of acinetobacter species other than A. baumannii among clinical isolates of Acinetobacter：evidence for emerging species[J]. Clin Microbiol，2010，48(4)：1445-1449.

[6] 童辉，蒋虹. 多药耐药鲍氏不动杆菌转座子与插入序列及整合子遗传标记研究[J]. 中华医院感染学杂志，2011，21(12)：2385-2388.

[7] FARIDA H，GASEM M H，SURYANTO A，et al. Viruses and Gram-negative bacilli dominate the etiology of community-acquired pneumonia in Indonesia，a cohort study[J]. Inter J Infect Dis，2015，38：101-107.

[8] 潘慧琼，袁雪峰，周敏，等. 重症监护病房耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌同源性分析[J]. 中国感染控制杂志，2015，14(12)：827-829.

[9] MOLTON J S，TAMBYAH P A，ANG B S，et al. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria：a perspective from Asia[J]. Clin Infect Dis，2013，56(9)：1310-1318.

[10] FERNANDO D，KUMAR A. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in Acinetobacter baumannii ATCC 19606[J]. J Antimicrob Chemother，2012，67(3)：569-572.

[11] 丁宸，裴蕴锋，徐玉玲. 鲍曼不动杆菌的院内感染分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(1)：118-119.

[12] GARNACHO-MONTERO J，AMAYA-VILLAR R. Multiresistant Acinetobacter baumannii infections：epidemiology and management[J]. Curr Opin Infect Dis，2010，23(4)：332-339.

[13] 李春红，孙小轩，王桂花. 肺炎克雷伯菌整合子的分布及耐药基因携带情况[J]. 国际检验医学杂志，2017，38(18)：2062-2064.

[14] CHENG C，SUN J，ZHENG F，et al. New structures simultaneously harboring class 1 integron and ISCR1-linked resistance genes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria[J]. BMC Microb，2016，16(1)：71.

（收稿日期：2017-12-28　修回日期：2018-02-22）

（上接第 2385 页）

参考文献

[1] XU Y，WANG L，HE J，et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA，2013，310(9)：948-958.

[2] 曹怡，陈力，郝晓军，等. 基于社区慢病档案对糖尿病患者 DR 患病率和认知度的调查[J]. 国际眼科杂志，2018，18(2)：302-304.

[3] 邹海东，张晢，朱剑锋，等. 上海市北新泾街道糖尿病患者视网膜病变的患病率调查[J]. 中华眼底病杂志，2006，22(1)：31-34.

[3] 熊毅，刘丽萍，陈雁，等. 上海淞南社区糖尿病患者对糖尿病视网膜病变的认知度调查[J]. 国际眼科杂志，2015，15(7)：1117-1122.

[4] 李小妹. 护理学导论[M]. 3 版. 北京：人民卫生出版社，2012：304.

[5] 钱荣立. 关于糖尿病的新诊断标准与分型[J]. 中国糖尿病杂志，2000，8(1)：4-5.

[6] WILKINSON C P，FERRIS F L，KLEIN R E，et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales[J]. Ophthalmology，2003，110(9)：1677-1682.

[7] 顾静意. 运用知信行模式对社区糖尿病患者进行健康教育的效果评价[J]. 中国实用护理杂志，2012，28(22)：79-80.

[8] WOLFFSOHN J S，COCHRANE A L. Design of the low vision quality-of-life questionnaire (LVQOL) and measuring the outcome of low-vision rehabilitation[J]. Am J Ophthalmol，2000，130(6)：793-802.

[9] 叶任高. 内科学[M]. 北京：人民卫生出版社，2004：795.

[10] 张玉枝，王丽，曹莎. 持续健康教育在糖尿病并发视网膜病变患者中的应用[J]. 中华现代护理杂志，2015，21(4)：406-409.

[11] 孙胜男，赵维纲，董颖越，等. 糖尿病患者自我管理现状及影响因素分析[J]. 中华护理杂志，2011，46(3)：229-233.

[12] 牛林艳，黄金. 糖尿病患者胰岛素使用的问题及教育管理现状[J]. 中华护理杂志，2013，48(2)：179-181.

[13] 崔丽萍. 临床路径在糖尿病视网膜病变患者健康教育中的应用[J]. 河南职工医学院学报，2013，25(3)：331-332.

（收稿日期：2018-01-06　修回日期：2018-03-02）