

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.09.16

儿童与成人金黄色葡萄球菌分离株 I 类整合子调查分析

李相新, 郑芬, 李凯(南方医科大学附属佛山妇幼保健院检验科, 广东佛山 528000)

摘要:目的 调查金黄色葡萄球菌中 I 类整合子携带情况和所携带 I 类整合子可变区基因分布。方法 收集临床分离金黄色葡萄球菌 600 株, 分别分离自儿童 447 株和成人 153 株, 用 BD Phoenix 100 进行细菌鉴定和药物敏感性试验; PCR 扩增 I 类整合子; 用限制性片段长度多态性分析和 Sanger 测序技术进行基因盒分析, 并比较分析不同分群分离菌株基因盒携带情况及与耐药性的关系。结果 600 株金黄色葡萄球菌中 236 株检出 I 类整合酶基因, 检出率为 39.3%; 检出 14 种基因盒并组成 13 种组合形式, 可介导氨基糖苷类抗菌药物、氯霉素、甲氧苄啶及季铵盐耐药。成人与儿童 I 类整合酶和整合子可变区阳性检出率差异无统计学意义, *dfrA12* 基因盒在儿童分离株检出率高于成人分离株 ($P < 0.05$)。儿童与成人分离株在甲氧苄啶、环丙沙星和红霉素的耐药率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。儿童与成人分离株均表现出携带耐药基因盒的菌株对相关抗菌药物的耐药率更高。结论 儿童与成人分离金黄色葡萄球菌 I 类整合子及可变区检出率较高, 并参与相应药物耐药; 儿童分离菌株所携带磺胺类耐药基因盒高于成人分离株。

关键词: I 类整合子; 金黄色葡萄球菌; 儿童; 基因盒; 耐药

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

整合子是细菌中天然的克隆表达系统, 是一种具有位点特异性重组功能的基因片段, 能识别、俘获及表达外来移动性基因盒^[1]。作为可移动性基因元件, 一方面整合子可通过对基因盒的捕获和剪切使基因盒发生移动, 另一方面整合子自身可位于转座子、质粒等可移动基因元件上, 借助可移动耐药元件使整合子发生移动, 造成耐药基因的播散。研究显示, 大多数革兰阴性杆菌均携带 I 类整合子结构, 其中尤以肠杆菌科细菌携带率高, 携带耐药基因盒种类多样并不断演变出新的耐药基因盒组合方式^[2-4]。而对革兰阳性球菌中整合子的研究较少。本研究将调查临床分离金黄色葡萄球菌 I 类整合子携带情况, 并比较分析儿童和成人分离菌株间携带的差异性以及和耐药性的关系。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 收集 2018 年 1 月至 2019 年 6 月南方医科大学附属佛山妇幼保健院临床分离金黄色葡萄球菌 600 株, 剔除重复分离菌株, 其中分离自成人和儿童分别为 153 株和 447 株; 来源于呼吸道 268 株、脓液 171 株、生殖道分泌物 57 株、脐分泌物 51 株、眼分泌物 20 株、尿液 16 株、粪便 11 株和血液 6 株。用 BD Phoenix 100 进行细菌鉴定和药敏试验, 根据美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) M100 2018 年标准^[5]进行药敏结果判读。金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 由广东省临床检验中心提供; I 类

整合酶和整合子阳性对照菌株 NF813152 由南方医院惠赠, 阴性对照菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 由广东省临床检验中心提供。

1.2 主要仪器和试剂 Phoenix 100 细菌鉴定和药敏分析仪 (美国 BD 公司); PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司); GeldocXR 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); 细菌组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen 公司); Taq DNA 聚合酶、dNTPs、蛋白酶 K、*Hinf* I、引物合成 (日本 TaKaRa 公司)。

1.3 细菌 DNA 模板制备 按照细菌组 DNA 提取试剂盒说明书进行模板 DNA 的提取, 洗脱后的 DNA 置于无菌 EP 管, 于 -20 °C 保存。

1.4 I 类整合酶基因扩增 参照文献[2]合成 I 类整合酶基因, 采用 PCR 方法进行扩增检测。引物为 int1-F: 5'-GCATCCTCGGTTTTCTGG-3' 和 int1-R: 5'-GGTGTGGCGGGCTTCGTG-3', 目的片段长度为 457 bp。PCR 反应总体系为 20 μL: 含 Mg²⁺ 的 10×buffer 2 μL, dNTP 1.6 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, Taq DNA 聚合酶 1 U, 加入灭菌去离子水至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 57 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 10 min。每个 PCR 反应均设相应的阳性对照和阴性对照。PCR 反应结束后, 取 5 μL 扩增产物行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并用 GeldocXR 凝胶成像仪读取电泳结果。

1.5 I 类整合子可变区扩增 参照文献[2]合成整

基金项目: 佛山市科学技术局医学类科技攻关科技计划项目 (2017AB002991)。

作者简介: 李相新, 1963 年生, 男, 主任技师, 大学本科, 主要从事细菌耐药机制研究。

合子可变区扩增引物,引物序列为 kb-5:5'-GGCAT CCAAGCAGCAAG-3'和 kb-3:5'-AAGCAGACTTGAC CTGA-3',扩增片段长度可变。PCR 反应体系同 I 类整合酶基因扩增体系,反应条件:95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 57 °C 4 min, 35 个循环;72 °C 10 min。每次 PCR 反应设相应的阳性对照和阴性对照。PCR 反应产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.6 I 类整合子可变区限制性片段长度多态性 (RFLP) 及序列测定 将 1.5 部分可变区阳性 PCR 产物采用核酸限制性内切酶 *Hinf* I 进行酶切^[2],并经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察。选取不同酶切谱型中 1~2 株送华大基因公司用 ABI 3730XL 测序仪进行 Sanger 双向测序分析,结果经 Blast 比对分析。

1.7 统计学分析 用 SPSS 18.0 软件进行分析。率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 I 类整合酶基因分布及可变区基因盒 600 株金黄色葡萄球菌中 236 株检出 I 类整合酶基因,检出率为 39.3%。236 株 I 类整合酶基因阳性菌株中有 193 株 I 类整合子可变区扩增阳性,43 株未检测到基因盒。RFLP 分型显示,可变区分为 13 种酶切类型,经测序检出 14 种基因盒,以 *aadA1* 和 *dfrA1* 检出最多,均为 37 株。儿童分离株中 *dfrA12* 检出率最高,成人分离株中 *aadA1* 检出率最高;成人与儿童分离株中 I 类整合酶和整合子可变区阳性检出率差异无统计学意义;*dfrA12* 基因盒在儿童分离株检出率显著高于成人分离株,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 成人与儿童整合子检出率比较[n(%)]

基因盒	介导耐药性或抗性	成人(n=153)	儿童(n=447)	χ^2 值	P 值
<i>dfrA12</i>	甲氧苄啶	0(0)	30(6.71)	10.809	0.001
<i>dfrA1</i>	甲氧苄啶	10(6.54)	27(6.04)	0.048	0.826
<i>aadA2</i>	氨基糖苷类	6(3.92)	24(5.37)	0.503	0.478
<i>aadA1</i>	氨基糖苷类	14(9.15)	23(5.15)	3.160	0.075
<i>aadA1+dfrA1</i>	甲氧苄啶、氨基糖苷类	4(2.61)	13(2.91)	0.000	1.000
<i>dfrA12+orf+aadA2</i>	甲氧苄啶、氨基糖苷类	1(0.65)	13(2.91)	1.650	0.199
<i>cmlA6</i>	氯霉素	2(1.31)	12(2.68)	0.441	0.507
<i>qacH</i>	季铵盐	2(1.31)	5(1.12)	0.000	1.000
<i>dhfrV+aadA4</i>	甲氧苄氨、氨基糖苷类	0(0)	3(0.67)	0.124	0.725
<i>aacA4</i>	氨基糖苷类	0(0)	1(0.22)	0.000	1.000
<i>aadB</i>	氨基糖苷类	0(0)	1(0.22)	0.000	1.000
<i>aadA4</i>	氨基糖苷类	1(0.65)	0(0)	0.316	0.574
<i>dfrA17+aadA5</i>	甲氧苄啶、氨基糖苷类	1(0.65)	0(0)	0.316	0.574
I 类整合酶阳性	—	60(39.22)	176(39.37)	0.001	0.972
I 类整合子可变区阳性	—	41(26.80)	152(34.00)	2.713	0.100

2.2 I 类整合子检出与耐药率的比较 236 株 I 类整合子阳性分离菌株对苯唑西林、庆大霉素、红霉素、环丙沙星、复方磺胺、克林霉素、甲氧苄啶和氯霉素耐药率高于 364 株 I 类整合子阴性分离菌株,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 成人和儿童耐药率及整合子的检出比较 儿童分离株对甲氧苄啶和红霉素的耐药率高于成人分离株,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而成人分离株对环丙沙星耐药率高于儿童分离株,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。介导磺胺类耐药基因盒在儿童分离株中有较高携带率 (19.24%, 86/447),高于成人分离株 (10.46%, 16/153),差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.23, P = 0.013$),其他基因盒的携带情况在上述人群分布差异无统计学意义。

表 2 I 类整合子阳性菌株与阴性菌株耐药率比较[n(%)]

抗菌药物	I 类整合子 阳性(n=236)	I 类整合子 阴性(n=364)	χ^2 值	P 值
青霉素	214(90.68)	328(90.11)	0.053	0.818
苯唑西林	81(34.32)	84(23.08)	9.081	0.003
阿米卡星	1(0.42)	0(0)	1.545	0.214
庆大霉素	14(5.93)	0(0)	22.109	0.000
四环素	51(21.61)	71(19.51)	0.392	0.532
红霉素	120(50.85)	143(39.29)	7.774	0.005
环丙沙星	16(6.78)	7(1.92)	9.161	0.002
利福平	22(9.32)	25(6.87)	1.194	0.274
复方磺胺	41(17.37)	0(0)	67.875	0.000
克林霉素	93(39.41)	99(27.20)	9.808	0.002
莫匹罗星—高水平	3(1.27)	3(0.82)	0.289	0.591
奎奴普汀/达福普汀	2(0.85)	1(0.27)	0.944	0.331
甲氧苄啶	112(47.46)	0(0)	212.392	0.000
氯霉素	26(11.02)	13(3.57)	13.060	0.000

表 3 成人与儿童分离株耐药率比较[n(%)]

抗菌药物	成人	儿童	χ^2 值	P 值
庆大霉素	5(3.27)	9(2.01)	0.787	0.375
阿米卡星	1(0.65)	0(0)	2.926	0.087
甲氧苄啶	18(11.76)	94(21.03)	6.444	0.011
复方磺胺	9(5.88)	32(7.16)	0.292	0.589
氯霉素	7(4.58)	32(7.17)	1.252	0.263
青霉素	139(90.85)	403(90.16)	0.063	0.802
苯唑西林	33(21.57)	132(29.54)	3.624	0.057
四环素	36(23.53)	86(19.24)	1.295	0.255
红霉素	56(36.60)	207(46.31)	4.363	0.037
环丙沙星	11(7.19)	12(2.68)	6.275	0.012
利福平	9(5.88)	38(8.50)	1.083	0.298
克林霉素	50(32.68)	142(31.77)	0.037	0.847
莫匹罗星—高水平	1(0.65)	5(1.12)	0.249	0.618
奎奴普汀/达福普汀	1(0.66)	2(0.45)	0.097	0.755

3 讨论

本研究中金黄色葡萄球菌 I 类整合酶检出率为 39.3%, 与相关报道基本一致^[6], 表明 I 类整合子可普遍存在于金黄色葡萄球菌中。本文检出的基因盒有氨基糖苷类耐药基因 (*aacA4*、*aadA1*、*aadA2*、*aadA4*、*aadB*、*aadA5*)、氯霉素耐药基因 (*cmlA6*)、甲氧苄啶耐药基因 (*dfiA1*、*dfiA12*、*dfiA17*、*dhfrV*)、季铵盐耐药基因 (*qacH*)，主要介导编码氨基糖苷类、氯霉素、甲氧苄啶及季铵盐耐药，与文献报道基本一致^[6]。本研究以 *aadA1* 和 *dfiA1* 两种整合子基因检出率最高，而文献^[5] 以 *dfiA1+aadA1* 检出最多，可见金黄色葡萄球菌 I 类整合子携带 *aadA1* 和 *dfiA1* 耐药基因盒居多。通过比较发现 I 类整合子阳性菌株对庆大霉素、复方磺胺、甲氧苄啶和氯霉素的耐药率均高于 I 类整合子阴性菌株，与菌株所携带相应耐药基因盒介导菌株对相关抗菌药物耐药具有一致性。同时发现，I 类整合子阳性菌株较不含 I 类整合子菌株对苯唑西林、红霉素、克林霉素和环丙沙星表现出更高的耐药性。由此可见，菌株携带 I 类整合子可能同时介导其他多种抗菌药物的联合耐药表型。

本研究发现，成人与儿童分离金黄色葡萄球菌 I 类整合酶和 I 类整合子可变区阳性检出率差异无统计学意义。对检出的 13 种 I 类整合子基因盒比较发现，仅 *dfiA12* 在儿童分离株中较成人高

($P < 0.05$)。将同类基因盒合并统计分析，发现介导磺胺类耐药基因盒 (*dfiA1*、*dfiA12*、*dfiA17*、*dhfrV*) 在儿童分离株中有更高的携带率 ($P < 0.05$)，而介导氨基糖苷类耐药基因盒 (*aacA4*、*aacA4*、*aadA1*、*aadA2*、*aadA4*、*aadB*、*aadA5*)、氯霉素 (*cmlA6*) 和季铵盐 (*qacH*) 耐药基因盒携带率在成人与儿童分离株中的检出率差异无统计学意义。比较分析成人与儿童分离菌株对各类抗菌药物的耐药率发现，仅有甲氧苄啶、红霉素和环丙沙星表现出耐药性差异。甲氧苄啶在儿童分离菌株中表现出更高的耐药率，而磺胺类耐药基因盒，尤其是 *dfiA12* 在儿童分离菌株中的检出率更高，具有一致性。本次研究未检出红霉素和环丙沙星耐药基因盒，表明 I 类整合子未参与耐药形成。儿童分离菌株对红霉素的耐药率高于成人，环丙沙星在成人分离株中耐药率更高，可能与儿童和成人的用药习惯有关。

4 参考文献

- [1] Akrami F, Rajabnia M, Pournajaf A. Resistance integrons; a mini review[J]. Caspian J Intern Med, 2019, 10(4): 370-376.
- [2] Sun JJ, Zheng F, Wang FP, et al. Class I integrons in urinary isolates of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern China during the past five years[J]. Microb Drug Resist, 2013, 19(4): 289-294.
- [3] Chen MX, Wu YQ, Yu SL, et al. Drug resistance and integron genes in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2019, 19(9): 5989-5993.
- [4] 丁梦珊, 蔡蕊, 花璇, 等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶耐药基因及整合子检测与分析[J]. 临床检验杂志, 2016, 24(10): 795-797.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S28[S]. Wayne PA: CLSI, 2018.
- [6] Li L, Zhao X. Characterization of the resistance class I integrons in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of lactating dairy cattle in Northwestern China[J]. BMC Vet Res, 2018, 14(1): 59-63.

(收稿日期:2020-05-04)

(本文编辑:周万青,刘群)