

· 实验室研究 ·

# 鸡来源产超广谱 β-内酰胺酶大肠埃希菌携带整合子基因的研究

李景云 崔生辉 张力 胡昌勤 金少鸿 马越

**【摘要】** 目的 分析鸡肠道内共生的产超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌整合子携带状况以及其与多重耐药性的关系。方法 从甘肃、湖北、北京、四川地区养殖场鸡粪便标本中分离的大肠埃希菌,肉汤稀释法检测菌株的耐药性,WHONET 软件进行耐药性分析;筛选出的 ESBLs 菌株进行整合子的 PCR 检测和基因测序。结果 通过药敏试验从鸡粪中分离的 224 株大肠埃希菌中共检出产 ESBLs 的菌株 54 株,分离率为 24.1%。产 ESBLs 的菌株中 I 类整合子的携带率为 63.0%, I 类整合子可变区发现的耐药基因有 *aadA1*、*aadA2*、*aadA5*、*aadA22*、*dfrA12*、*dfrA17*、*dfrI*、*aar-3*, 分别介导氨基糖苷类、磺胺类抗生素以及利福平的耐药性。*aadA22* 是在国内菌株中首次报道。II 类整合子携带率为 5.6%, 携带的耐药基因包括 *sat*、*ereA*、*aadA1*。III 类整合子酶阳性的有 3 株菌,但其可变区未检出任何耐药基因。结论 I 类整合子主要介导氨基糖苷类抗生素和甲氧嘧啶的耐药性,在大肠埃希菌 ESBLs 菌株的多重耐药性中具有重要的作用,加强养殖动物大肠埃希菌耐药性以及整合子携带状况的监测,对防止耐药菌株的广泛传播,改善临床抗生素的疗效具有重要意义。

**【关键词】** 耐药性; 超广谱 β-内酰胺酶; 大肠埃希菌

**Study on integrons in *Escherichia coli* which producing extended-spectrum β-lactamases, isolated from stool specimen of chicken** LI Jing-yun, CUI Sheng-hui, ZHANG Li, HU Chang-qin, JIN Shao-hong, MA Yue. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

Corresponding author: MA Yue, Email: nicpbp@263.net

**【Abstract】** **Objective** To analysis the dissemination of integrons in the extended-spectrum β-lactamases(ESBLs) producing *Escherichia coli*, isolated from stool specimen of chicken and to study the relations between the resistance and the integrons of these isolates. **Methods** The *Escherichia coli* isolates were collected from Gansu, Hubei, Sichuan provinces and Beijing municipal city, and were isolated from stool specimen of chickens. Using WHONET software, the *Escherichia coli* producing ESBLs were selected, and then detected by PCR method class 1, 2, 3, 4 integrase. PCR products of the variable region of the integron were sequenced. **Results** 54 of the 224(24.1%) isolates were ESBLs producing *Escherichia coli*. Class 1 integron were detected in 63.0% of the isolates, and *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA22*, *dfrA12*, *dfrA17*, *dfrI*, *aar-3* were found in the variable region and *aadA* gene encodes resistant to streptomycin, spectinomycin, *dfr* gene to trimethoprim and *aar* to rifampicin. We realized that *aadA22* was the first time detected in China. Class 2 integron were detected in 5.6% of the isolates, Class 3 integron was detected in 3 isolates. **Conclusion** Class 1 integron was the most commonly seen integron in *Escherichia coli*, encoding the resistance to streptomycin, spectinomycin and trimethoprim. Integrons were contributed to the horizontal transfer of resistant genes in the same or different species, suggesting that the antimicrobial resistance and the dissemination of integrons should be monitored.

**【Key words】** Antimicrobial resistance; Extended-spectrum β-lactamases; *Escherichia coli*

由于畜牧养殖业中广泛使用抗生素,使动物肠道正常寄殖的大肠埃希菌产生耐药性。携带有各种耐药基因的大肠埃希菌可能是重要的潜在传染源,

通过污染环境而在人群间传播,或将其耐药基因传递给人体内源菌群。在美国,70%的抗生素用于农业,养殖动物被认为是耐药性菌株出现的重要储存宿主和场所<sup>[1-3]</sup>。近些年,超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)的肠杆菌科细菌,特别是大肠埃希菌,分离率明显增多,已引起国内外研究人员的普遍关注。

基金项目:科技部社会公益研究专项基金资助项目(2005DIB3J159)

作者单位:100050 北京,中国药品生物制品检定所抗生素室

通信作者:马越,Email: nicpbp@263.net

ESBLs 的广泛传播与环境中抗生素选择性压力、质粒或基因的水平传播有关<sup>[4]</sup>。整合子可以捕获、整合和表达耐药性基因盒编码的耐药基因,与转座子、质粒一起水平传播耐药基因,并使多种耐药基因结合在一起,通常编码对氨基糖苷类、 $\beta$ -内酰胺类、氯霉素和甲氧嘧啶的耐药,导致细菌的多重耐药性。目前研究较多的整合子分为四类,即 I、II、III、IV 类整合子<sup>[2,5]</sup>, I 类整合子的存在增加了产 ESBLs 菌在临床菌株中水平散播的危险,是造成多重耐药株在院内暴发流行的重要原因<sup>[6]</sup>。本研究采用 PCR 方法检测整合子在鸡标本分离的产 ESBLs 菌株中的分布情况,并研究这些整合子中的耐药基因对该类菌株多重耐药性的决定作用。

### 材料与方法

1. 菌株来源:在 2006 年 12 月至 2007 年 4 月期间,从甘肃省、湖北省、四川省和北京市每地 2 个共 8 个养殖场新鲜鸡粪便样本中分离大肠埃希菌 224 株,各地采样量分别为甘肃酒泉地区 118 份、湖北地区 50 份、四川新都地区 42 份和北京地区 70 份,合计 280 份,大肠埃希菌分离率为 80.0%,分离菌株数分别为 98、29、34、63 株,所有菌株采用 API20E 软件进行确认。

2. 材料:药敏板购自天津金章生物科技公司。所用引物均由上海英俊生物技术有限公司北京分公司合成。PCR 试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 扩增仪采用 Bio-rad 公司生产的 ICycler™ THERMAL CYCLER,凝胶成像系统采用 Bio-rad 公司生产的 Gel/chemi doc。

3. 药敏试验:采用微量肉汤稀释法。药敏结果判断、产 ESBLs 菌株的确诊参照 CLSI (2007) 标准<sup>[7]</sup>。头孢噻唑的判定标准参考头孢噻肟标准。检测的抗生素种类包括环丙沙星、萘啶酸、复方新诺明、氯霉素、四环素、庆大霉素、卡那霉素、亚胺培南。采用大肠埃希菌 ATCC25922、ATCC35218 作为质控菌株。

4. DNA 模板的制备:取已分纯的菌落 2~3 个,加入 100  $\mu$ l 无菌超纯水,制备浓菌液,100℃ 煮沸 10 min,10 000 r/min 离心 1 min 取上清备用。

#### 5. 整合子检测:

(1) 整合酶基因的检测:I、II、III、IV 类整合子的整合酶基因(*intI*)检测用引物及产物大小见表 1。PCR 反应体系为 50  $\mu$ l,含 2  $\mu$ l DNA 模板(约 100 ng),各

0.4 pmol/ $\mu$ l 整合酶正反向引物,1.5 U Taq DNA 聚合酶,0.1 mmol/L dNTP,5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR 缓冲液,2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>(宝生物公司)。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,I 类整合酶 55℃ 退火 1 min,II、III、IV 类整合酶 50℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。

表 1 整合酶基因检测用引物<sup>[2]</sup>

引物	引物序列	扩增长度 (bp)
int I 1-F	CCTCCCGCACGATGATC	280
int I 1-R	TCCACGCATCGTCAGGC	
int I 2-F	TTATTGCTGGGATTAGGC	233
int I 2-R	ACGGCTACCTCTGTATTATC	
int I 3-F	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	600
int I 3-R	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG	
int I 4-F	CGGTATGTCTAATGTCTCTTG	696
int I 4-R	TGGCCACAAAGACTCAATCAC	

(2) 可变区检测:通过 I、II、III 类整合子的可变区检测用引物分别对不同整合子的可变区进行扩增(引物序列见表 2)。PCR 反应体系为 50  $\mu$ l,含 2  $\mu$ l DNA 模板(约 100 ng),各 0.4 pmol/ $\mu$ l 整合子正反向引物,1.5 U Taq DNA 聚合酶,0.1 mmol/L dNTP,5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR 缓冲液,2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>(宝生物公司)。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,I、II、III 类整合子 55℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。

表 2 I、II、III 类整合子可变区检测用引物

引物	引物序列
Integron 1 (L)	GGCATCCAAGCAGCAAG
Integron 1 (R) <sup>[8]</sup>	AAGCAGACTTGACCTGA
Integron 2 (L)	GACGGCATGACGATTGTGA
Integron 2 (R) <sup>[9]</sup>	GATGCCATCGAAGTACGAG
Integron 3 (L)	CTTGCTTCTCGGTGGCGAGAG
Integron 3 (R) <sup>[10]</sup>	GCAAACCACAAAAGCGCAACTGG

(3) 整合子可变区 PCR 产物检测:用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,EB 溶液染色,采用 Gel/chemi doc 凝胶成像系统记录实验结果。所有的 PCR 产物均由华大基因生物技术公司测序,测序结果采用 Sequencher 4.1.4 软件进行分析,并与 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中已有的序列进行对比,进一步阐明各基因盒的功能。

### 结果

通过药敏试验结果分析,从 224 株大肠埃希菌中共检出产 ESBLs 的菌株 54 株(24.1%)。所有的

产 ESBLs 株均为多重耐药株,β-内酰胺类以外的抗生素的耐药率:复方新诺明(89%)、氯霉素(61%)、卡那霉素(98%)、庆大霉素(74%)、四环素(98%)、萘啶酸(94%)和环丙沙星(81%),亚胺培南未发现耐药菌株。

表 3 显示,在 54 株产 ESBLs 菌株中,43 株(79.6%) I 类整合子酶阳性,34 株(63.0%) I 类整合子可变区扩增阳性。对 I 类整合子可变区进行序列测定后发现:12 株含有 *dfrA17*、*aadA5* 基因,13 株含有 *dfrA12*、*orfF*、*aadA2* 基因,4 株含有 *dfrI*、*aadA1* 基因,分离自北京地区的 1 株含有 *aar-3* 基因,还有 1 株菌携带 *aadA22* 基因分离自甘肃省,来自四川省 1 株菌所携带的基因未见报道,作用不明确,其进一步研究正在进行中,有 2 株菌携带空的整合子可变区。湖北地区分离株未检出整合子,其他三地区菌株中几类整合子的检出情况有所不同,甘肃分离株未发现 *aadA5*、*dfrA17* 两个基因盒。北京、四川两地检出的 I 类整合子类型最多。*dfr* 基因导致甲氧嘧啶的耐药性,*aadA* 基因多导致链霉素/大观霉素的耐药性,*aar-3* 基因介导利福平的耐药性。

II 类整合子整合酶基因检测出 5 株阳性菌,全部分离自甘肃省。其中可变区扩增阴性的 2 株;3 株阳性所携带的基因包括 *sat*、*ereA*、*aadA1*(携带率为 5.6%),分别导致氯霉素、红霉素、链霉素/大观霉素的耐药。同时这 3 株菌 I 类整合子可变区携带 *dfrA12*、*orfF*、*aadA2* 基因。

III 类整合子整合酶基因在此次调查的大肠埃希菌中检出 3 株菌,整合子可变区测序结果显示没有与耐药性相关的基因序列。

在此次调查的大肠埃希菌中未检出 IV 类整合子整合酶基因。

讨 论

大肠埃希菌是人类和动物肠道中的共生菌和条

件致病菌,食源性动物是携带耐药基因菌株的储存宿主,给临床抗生素的治疗带来潜在危害<sup>[11]</sup>。整合子在肠杆菌科细菌中分布广泛,包含编码多种抗生素耐药的基因盒,参与了大肠埃希菌多重耐药性的产生和耐药基因的传播,在没有抗生素选择压力的情况下仍可导致多重耐药大肠埃希菌克隆株的流行<sup>[1,3,5]</sup>。文献报道 I、II 类整合子在养殖动物分离的大肠埃希菌中较多见<sup>[2,11,12]</sup>。

我们从鸡粪分离的 224 株大肠埃希菌中共检出产 ESBLs 菌株 54 株,分离率为 24.1%。这 54 株菌均为多重耐药株,除对亚胺培南未见耐药株外,对其他临床和养殖业中应用时间较长的常用抗生素(四环素类、喹诺酮类、氨基糖苷类、磺胺类、氯霉素)的耐药率都很高,由于使用 β-内酰胺类抗生素对上述菌株感染的治疗易引起失败,因而亚胺培南成了该类菌株所致临床重症感染的首选药物。

本研究中产 ESBLs 菌株 I 类整合子的携带率为 63.0%,与其他报道临床分离株的携带率接近<sup>[6,13]</sup>。I 类整合子可变区发现的耐药基因有 *aadA1*、*aadA2*、*aadA5*、*aadA22*、*dfrA12*、*dfrA17*、*dfrI*、*aar-3*,每组基因分别介导氨基糖苷类、磺胺类抗生素以及利福平的耐药性,与临床发现的结果类似。I 类整合子各种基因盒的组合中常见的是 *dfrA17*-*aadA5*,占有 I 类整合子可变区扩增产物的 34.3% (12/35),此型在食品分离株中也多见;*dfrA12*-*aadA2* 占有 I 类整合子可变区扩增产物的 40.0% (14/35);*dfrI*-*aadA1* 占有 I 类整合子可变区扩增产物的 11.4% (4/35),此基因型在欧洲临床和养殖动物分离菌株中多见<sup>[10]</sup>,而 *aadA22* 为首次在国内报道。本次研究显示,分离菌株中 II 类整合子携带率为 5.6%,携带的耐药基因包括 *sat*、*ereA*、*aadA1*,分别介导链丝菌素、红霉素、链霉素/大观霉素的耐药性,文献报道家禽分离株 II 类整合子的携带率可达 23%。分离菌株中 III 类整合子阳

表 3 整合子可变区包含的基因盒及其地域分布

整合子株数	携带基因	结 果	分 布
I 类	12	<i>dfrA17</i> 、 <i>aadA5</i> 与 <i>E. coli</i> P65 I 型整合子序列 2568~3356 的 <i>aadA5</i> 、3487~3960 的 <i>dfrA17</i> 序列同	四川(2 株)、北京(10 株)
	13	<i>dfrA12</i> 、 <i>orfF</i> 、 <i>aadA2</i> 与 pVI2402 I 型整合子序列 63~560 的 <i>dfrA12</i> 、672~962 的 <i>orfF</i> 、968~1759 的 <i>aadA2</i> 序列同	甘肃(4 株)、北京(4 株)、四川(5 株)
	4	<i>dfrI</i> 、 <i>aadA1</i> 与 <i>E. coli</i> 1012 I 型整合子序列 176~634 的 <i>dfrI</i> 、727~1518 的 <i>aadA1</i> 序列同	甘肃(3 株)、北京(1 株)
	1	<i>aar-3</i> 与 <i>E. coli</i> 质粒 pHS2 编码的 I 类整合子 In37 序列 3981~4700 <i>aar-3</i> 基因序列同	北京(1 株)
	1	<i>aadA22</i> 与 I 类整合子基因序列 119~898 的 <i>aadA22</i> 序列同	甘肃(1 株)
II 类	3	<i>sat</i> 、 <i>ereA</i> 、 <i>aadA1</i> 与 <i>E. coli</i> pIP1100 质粒 2 型整合子所含的部分基因序列同	甘肃(3 株)

注:“序列同”是指 100% 完全相同

性的 5 株菌中,可变区扩增阳性的 3 株菌没有携带已知的耐药基因,其中 2 株菌同时携带 I 类整合子。IV 类整合子未在实验菌株中检出,与 Goldstein 等<sup>[2]</sup>报道结果相同。本研究在国内首次进行动物来源大肠埃希菌分离株 III、IV 类整合子基因的检测。四环素、喹诺酮类抗生素的耐药基因在整合子中未检测到。文献报道,部分介导  $\beta$ -内酰胺类抗生素的基因存在于整合子可变区<sup>[14,15]</sup>,但我们的测序结果显示,整合子中未见相关基因序列,文献报道整合子与头孢噻肟型  $\beta$ -内酰胺酶基因 (*blaCTX*) 经质粒共同转移的频率高于 TEM、SHV 两类抗性编码基因,提示 CTX 型酶的编码基因具有更强的扩散优势<sup>[13]</sup>,两者可能作为连锁基因而存在。同一种抗生素的耐药性可由不同的耐药基因盒来介导,同时大肠埃希菌还存在其他耐药机制,如外排泵、核糖体保护,而导致产 ESBLs 菌株的耐药谱与整合子之间的关系还不十分明确<sup>[16]</sup>,另外由于四环素、喹诺酮类抗生素的耐药也与整合子无关,整合子不能完全解释产 ESBLs 菌株的多重耐药性,但是其对耐药菌株的传播,对氨基糖苷类、磺胺类等多种抗生素的多重耐药性起到决定性的作用是显而易见的。

由表 3 的结果显示各地分离菌株整合子的携带状况有所不同,说明整合子在菌株间的分布存在一定地域差异,其他影响整合子携带状况的原因包括抗生素应用情况、菌株自身的生物学特性、宿主的生物特性、养殖人员的养殖习惯,从而导致耐药菌的相互传播。文献报道使用四环素类抗生素可以导致 I 类整合子携带率降低,使用喹诺酮类抗生素可以导致 II 类整合子携带率降低<sup>[11]</sup>。推测当前三代头孢菌素中的头孢噻唑、喹诺酮类抗生素、氨基糖苷类抗生素在家禽养殖中多用,四环素类用得很少是携带 I 类整合子的产 ESBLs 菌株流行的重要原因之一。

在整合子中新出现的一些基因盒如 *blaIMP* (编码亚胺培南和超广谱内酰胺类抗生素的耐药性基因)、*aacA7* (编码阿米卡星、奈替米星的耐药性基因) 等有可能伴随抗生素选择压力的增大而逐渐发展成为优势的基因盒<sup>[9]</sup>,虽然某些耐药基因盒在整合子中不表达,但是基因盒的可传播性及表达的可调控性也使抗生素这些菌株感染的治疗带来威胁<sup>[16]</sup>。清除了抗生素选择压力,细菌的耐药性并不会很快的彻底消失<sup>[3,5]</sup>。总之,加强临床和家养禽畜分离的大肠埃希菌整合子携带状况的监测,对于

动物养殖业中抗生素的应用策略、消除共生的大肠埃希菌的多重耐药性及防止其扩散具有一定的指导意义。

#### 参 考 文 献

- [1] Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, et al. Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(1): 156-161.
- [2] Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, et al. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(3): 723-726.
- [3] Khachatryan AR, Hancock DD, Besser TE, et al. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in Dairy Calves. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(2): 752-757.
- [4] Oteo J, Navarro C, Cercenado E, et al. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 2359-2366.
- [5] Skurnik D, Menach AL, Zurakowski D, et al. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 3062-3065.
- [6] 王襄, 范晓磊, 王海涟. 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌 I 类整合子检测与耐药性关系. *中国微生态学杂志*, 2007, 19(3): 273-275.
- [7] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th Informational Supplement. M100-S17. Wayne Pennsylvania: CLSI, 2007: 32-37.
- [8] Levesque C, Fliche L, Larose C, et al. PCR Mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(1): 185-191.
- [9] White PA, Mciver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(9): 2658-2661.
- [10] 刘渠, 林琳, 刘衡川, 等. 食品中大肠埃希菌整合子与耐药性的关系研究. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(3): 276-279.
- [11] Smith JL, Drum DJV, Dai Y, et al. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(5): 1404-1414.
- [12] Solberg OD, Ajitboye RM, Riley LW. Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(4): 1347-1351.
- [13] 付英梅, 张凤民, 张文莉, 等. 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 I 类整合子及其与 ESBLs 基因关系的研究. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(3): 241-245.
- [14] Machado E, Ferreira J, Novais A, et al. Preservation of integron types among *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(6): 2201-2204.
- [15] Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA. *BlaCTX-M22* is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(7): 2303-2306.
- [16] Zhao SH, White DG, GE BL, et al. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(4): 1558-1564.

(收稿日期: 2008-06-13)

(本文编辑: 张林东)