

• 基础研究论著 •

临床分离铜绿假单胞菌整合子检测及分析*

朱桂芳, 章震花, 常月琴, 孙光明

(江苏大学附属第四人民医院检验科, 江苏镇江 212001)

摘要:目的 了解 I 类、II 类和 III 类整合子在临床分离铜绿假单胞菌中的分布, 探讨整合子携带与耐药关系。方法 菌株的鉴定采用 API 板条, 药物敏感性测定采用 K-B 纸片扩散方法, 整合子检测采用 PCR 方法。结果 本院临床分离的 60 株铜绿假单胞菌中, 21 株(35%) I 类整合子检测阳性, 2 株(3.3%) II 类整合子检测阳性, 未检出 III 类整合子; 对于所测试的抗菌药物除亚胺培南和多黏菌素外, I 类整合子阳性菌株的耐药率明显高于 I 类整合子阴性菌株($P < 0.05$)。结论 本地区临床分离的铜绿假单胞菌携带的整合子类型为 I、II 类整合子, 且 I 类整合子与铜绿假单胞菌耐药密切相关。

关键词:假单胞菌, 铜绿; 整合子类; 抗药性, 细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2068-02

Detection and analysis of the integrons carried by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa**

Zhu Guifang, Zhang Zhenhua, Chang Yueqin, Sun Guangming

(Department of Clinical Medicine, the Fourth People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

Abstract: Objective To investigate the prevalence of type I, II and III integrons in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and to analyze the relation between the presence of integrons and antibiotic resistance. **Methods** All the clinical bacteria isolates were identified by API system, antimicrobial resistance was determined by K-B disk diffusion methods and screening of integrons was performed by PCR. **Results** Among the 60 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, 21 isolates(35%) carried type I integron, 2 isolates(3.3%) carried type II integron, and no isolate carried type III integron. The resistance rates to the antibiotics tested were significantly higher in integron I-positive isolates than negative ones($P < 0.05$), except for Polymyxin and Imipenem. **Conclusion** Type I and type II integrons might be the prevalent integron types in the region and the presence of type I integrons was closely linked to antibiotic resistance.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; integrons; drug resistance, bacterial

铜绿假单胞菌(PA)属于非发酵菌属,广泛存在自然环境中,是引起医院内感染的重要条件致病菌。随着抗菌药物的广泛应用,PA的耐药性增加,给临床抗感染治疗造成了极大的困难。PA的耐药机制比较复杂,除其菌株本身对多种抗菌药物耐药外,菌株通过基因水平的传播获得外界耐药基因是其快速形成耐药的主要原因^[1]。整合子元件与PA的获得性耐药密切相关。目前已经出现3种类型耐药整合子,其中I和II类整合子最为普遍,且与临床的关系也最为密切^[2-3]。为了解整合子携带与PA耐药性的关系,本研究对本地区临床收集的60株PA进行整合子的检测,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 本院2011年5~12月临床分离的非重复的PA菌株60株,其中分离自痰液标本50株、尿液标本6株、血液标本4株。菌株的鉴定均采用法国梅里埃公司API20NE板条。

1.2 方 法

1.2.1 药物敏感性测定 采用K-B纸片扩散法,结果判读参照2011年CLSI标准。共测试14种药物:哌拉西林、头孢哌酮、头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、左氧氟沙星、多黏菌素和磺胺甲恶唑/甲氧苄啶。药敏纸片购自Oxide公司。质控菌株大肠杆菌ATCC25922、金黄色葡萄球菌ATCC25923,来自江

苏省临检中心。

1.2.2 整合子基因检测 细菌模板提取采用煮沸法。引物设计参照文献[4],见表1。引物由上海英骏公司负责合成。PCR试剂购自大连宝生物公司。PCR反应体系为50 μL,包括10×PCR缓冲液5.0 μL, dNTP 4.0 μL,引物各1 μL,模板2 μL, Taq酶1 μL,其余为蒸馏水。PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸7 min。产物于1%的凝胶进行电泳,紫外灯下观察结果。

表1 整合子基因检测所需引物序列

检测基因	引物序列(5'→3')	产物片段大小(bp)
Int1	上游:ACG AGC GCA AGG TTT CGG T	565
	下游:GAA AGG TCT GGT CAT ACA TG	
Int2	上游:GTG CAA CGC ATT TTG CAG G	403
	下游:CAA CGG AGT CAT GCA GAT G	
Int3	上游:CAT TTG TGT TGT GGA CGG C	717
	下游:GAC AGA TAC GTG TTT GGC AA	

* 基金项目:镇江市社会发展规划项目(2010041)。 作者简介:朱桂芳,女,主管检验技师,主要从事细菌耐药机制的研究。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,耐药率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PA 耐药表型分析 本院临床分离的 60 株 PA 对多黏菌素完全敏感,对亚胺培南的耐药率较低(5.0%),对哌拉西林(63.3%)、磺胺甲恶唑/甲氧苄啶(66.7%)和头孢噻肟(56.7%)耐药率较高,对其他种类的抗菌药物的耐药率为 16.7%~36.7%,见表 2。

2.2 整合子基因的 PCR 检测 60 株 PA 中,21 株检出 intI1 基因,检出率为 35%,2 株检出 intI2 基因,检出率为 3.3%,未检出 intI3 基因。2 株 intI2 基因检测阳性菌株同时也检出 intI1 基因,共同检出率为 3.3%。

2.3 I 类整合子基因携带与耐药表型的关系 见表 2, I 类整合子检测阳性菌株对除亚胺培南及多黏菌素外的其他种类的抗菌药物的耐药率高于 I 类整合子检测阴性菌株 ($P < 0.01$)。

表 2 60 株 PA 耐药表型与 I 类整合子基因携带的关系[n(%)]

抗菌药物	合计耐药 (n=60)	I 类整合子阴性 (n=39)	I 类整合子 阳性(n=21)
哌拉西林	38(63.3)	10(25.6)	18(85.7)
头孢他啶	16(26.7)	6(15.4)	10(47.6)
头孢哌酮	20(33.3)	6(15.3)	14(66.7)
头孢噻肟	34(56.7)	14(35.8)	20(95.2)
头孢吡肟	10(16.7)	2(5.1)	8(38.0)
亚胺培南	3(5.0)	1(2.5)	2(9.1)
头孢哌酮/舒巴坦	12(20.0)	3(7.6)	9(42.8)
哌拉西林/他唑巴坦	13(21.7)	2(5.1)	11(52.3)
阿米卡星	17(28.3)	3(7.6)	14(66.7)
妥布霉素	10(16.7)	3(7.6)	7(33.3)
庆大霉素	21(35.0)	5(12.8)	16(76.1)
左氧氟沙星	22(36.7)	9(23.0)	12(57.1)
多黏菌素	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
磺胺甲恶唑/甲氧苄啶	40(66.7)	19(48.7)	21(100.0)

3 讨 论

PA 感染已跃居医院内感染的前两位,且耐药率也不断攀升,备受医学界的关注^[5]。本研究显示,本院临床分离的 PA 对除多黏菌素外的 13 种抗菌药物的耐药率为 5.0%~66.7%,其中对哌拉西林、头孢噻肟及磺胺甲恶唑/甲氧苄啶耐药率较高,对头孢吡肟、妥布霉素及亚胺培南耐药率低。值得注意的是,尽管亚胺培南显示出对 PA 良好的抗菌活性,本院仍然出现 3 例对此类药物耐药的 PA 菌株,且其中 2 株表现多重耐药,应引起医院足够的重视。

耐药基因可以通过基因水平转移元件如整合子、转座子和质粒在菌株之间广泛传播,从而导致耐药范围的扩大,引起多重耐药菌株产生^[6]。整合子作为这一基因元件,是由 Stokes 等^[7]提出的,并被证实与细菌耐药密切相关^[2,8-9]。典型的整合子结构是由保守区和可变区两部分组成。保守区即整合酶活性区域,具有整合和切除耐药基因功能;可变区是由一系列

串联排列的耐药基因盒组成。整合子本身不可以移动,但是其常位于可移动基因元件如转座子和质粒上,从而介导耐药基因水平转移。根据整合酶基因编码氨基酸的差异,目前已经出现了四种耐药相关整合子,其中 I、II 和 III 类整合子与耐药基因的转移密切相关。

本次研究在 60 株 PA 菌株中共检出 21 株 I 类整合子阳性菌株,检出率为 35%。通过对整合子阳性菌株与整合子阴性菌株耐药率对比结果发现,整合子携带菌株对多数抗菌药物的耐药率明显高于整合子检测阴性菌株,提示整合子携带的 PA 菌株更容易形成耐药。研究证实,整合子不仅可以整合外界耐药基因,并且可以充分表达这些耐药基因。这些基因以基因盒形式排列于整合子可变区,因此,整合子携带的菌株往往表现多重耐药。目前已经发现的耐药基因盒约 200 多种,编码的耐药基因包含了对 β -内酰胺类、氨基糖苷类以及喹诺酮类等革兰氏阴性杆菌关键药物耐药^[2]。本实验初步证实了整合子携带与这些药物耐药形成的相关性,然而是否在这些菌株整合子可变区携带相关耐药基因盒有待进一步深入研究。本研究检测出两株 II 类整合子菌株,并且这两株 PA 同时也携带 I 类整合子。国内已有相关报道在 PA 同时携带 I 类和 II 类整合子^[10],但比较少见,本次结果进一步证实的此种菌株在国内的流行。本次研究未发现 III 类整合子,与国内报道相一致,结果可能与 III 类整合子在世界范围内的检出率比较低有关^[11-12]。

综上所述,本研究表明,在临床微生物实验室开展整合子类型检测不仅有助于监测菌株耐药动态,控制耐药菌株的传播和流行,而且可以通过对整合子介导的分子耐药机制的深入研究,开发新型抗菌药物,对临床抗菌治疗和减少耐药菌株的产生有积极意义。

参考文献

- [1] 顾兵,童明庆. 整合子与细菌耐药[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(3): 226-229.
- [2] Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, et al. Gene cassettes and cassette arrays in Mobile resistance integrons[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(4): 757-784.
- [3] 张宏梅,石磊,李琳,等. 细菌耐药基因盒的捕获和表达机理的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(11): 703-704.
- [4] Jie F, Lei S, Zeng X, et al. Construction and application of multi-PCR assay to screen antibiotic resistance integrons in bacteria[J]. Chin J Antibiot, 2003, 30(10): 599-603.
- [5] 陈建国,戴晓莉,蒋玉凤,等. I 类整合子多重耐药铜绿假单胞菌中的分布与结构分析[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(8): 873-875.
- [6] Poirel L, Carrère A, Pitout JD, et al. Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(6): 2492-2498.
- [7] Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially Mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons[J]. Mol Microbiol, 1989, 3(12): 1669-1683.
- [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): 838-842.
- [9] Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, et al. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance(下转第 2072 页)

3 讨 论

轮状病毒感染的治疗无特效药,疫苗是控制疾病最重要的措施,能极大地降低轮状病毒在世界范围内,尤其是发展中国家与低收入国家导致的死亡^[9]。快速诊断出某一时间某一地区轮状病毒感染的亚型,再配合相应疫苗进行防控,对抑制疫情的爆发具有重要意义。

现有的轮状病毒检测方法存在诸多不足,例如:电泳法价格昂贵,技术要求高;病毒分离培养法操作繁琐,周期较长;核酸杂交法和酶联免疫法的灵敏度较低;常规的 PCR 方法只能扩增一种模板,扩增产物需电泳鉴定,不仅不能在短时间内完成大批量的检测,还容易造成交叉污染而出现假阳性。光谱学的方法,虽然灵敏有效,但不能同时处理大批量样品^[10]。目前,除常规的 RT-PCR 外,反转录巢式和半巢式 PCR,免疫 PCR 以及 qPCR 已被用于轮状病毒的检测^[11-14]。qPCR 具有灵敏度高,特异性强,实时性好的优点,早已用于分子诊断的开发^[15],并且采用探针法可做多重检测^[16]。多重 qPCR 以单重 qPCR 为基础,在体系中加入多对引物和多条探针,通过探针上不同的发光基团对病毒亚型进行区分,在样品处理量较大时,可以节省成本与时间,能够做到快速、灵敏、高通量。但是,多重荧光定量体系较为复杂,对引物试剂的要求较高,同时还要保证不同探针的荧光基团之间没有互相干扰。

本研究使用的 2 条探针 5'端分别标记荧光基团 FAM 和 JOE,3'端都标记同样的淬灭基团 BHQ1,大大降低了背景值。在 S 型曲线中,平台期的出现主要靠引物和探针的用量来控制。且二重反应中各组分的量都比单重荧光多,某一引物过量,则会夺取反应体系,使另一个反应受到抑制,通过反复筛选,本研究得出了优化后的反应体系。

本研究建立的方法可以通过对标准品绘制标准曲线,采用绝对定量的方法估算出样品中病毒的含量^[17]。轮状病毒感染的患者往往会出现混合感染的情况,且在混合感染中一种亚型的量与另一种亚型的量可能相差较大。本研究所构建的检测体系中,当混合模板浓度相差 10⁴ 倍时依然可以检测到 2 种亚型,说明此方法适用于 G1 与 G9 亚型的临床检测。同时,此方法的检测限为 10³ copies/ μ L,结果稳定可靠,有助于 A 组轮状病毒 G1 与 G9 亚型的早期诊断。该方法容易掌握,且所需的时间短,在 2 h 以内即可完成检测过程;特异度高,可准确诊断出 G1 与 G9 亚型的感染情况,适合基层单位使用,同时也为轮状病毒不同亚型展开细致而深入的流行病学调查研究打下了基础。

参考文献

[1] 王娟,刘寓,李蓬.不同年龄段婴幼儿腹泻轮状病毒感染分析[J].价值工程,2011,30(34):278.

[2] Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges [J]. Lancet, 2006, 368 (9532):323-332.

[3] 金奇.医学分子病毒学[M].北京:科技出版社,2001:565-578.

[4] Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(2):304-306.

[5] 廖扬,陈军华,朱朝敏,等.重庆婴幼儿轮状病毒分子流行病学特征及相关临床资料分析[J].第三军医大学学报,2010,32(1):77-80.

[6] 陈元鼎,刘晓,熊新宇,等. A 组人轮状病毒全基因组克隆和基因型分析[J].中国生物工程杂志,2008,28(2):25-31.

[7] Gouvea V, Glass RI, Woods P, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(2):276-282.

[8] Kottaridi C, Spathis AT, Ntova CK, et al. Evaluation of a multiplex real time reverse transcription PCR assay for the detection and quantitation of the most common human rotavirus genotypes [J]. J Virol Methods, 2012, 180(1/2):49-53.

[9] Fischer Walker CL, Black RE. Rotavirus vaccine and diarrhea mortality: quantifying regional variation in effect size [J]. BMC Public Health, 2011, 11(Suppl 3):S16.

[10] Driskell JD, Zhu Y, Kirkwood CD, et al. Rapid and sensitive detection of rotavirus molecular signatures using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. PLoS One, 2010, 19, 5(4):e10222.

[11] 陈小岳,谈立峰,吉俊敏,等.水中轮状病毒实时荧光 RT-PCR 法检测[J].中国公共卫生,2009,25(2):242.

[12] 张德友,何晓青,程莉,等.轮状病毒检测技术概述[J].现代农业科学,2009,16(2):11-12.

[13] 陈小金,陈建飞,时洪艳,等.猪轮状病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2010,40(2):174-179.

[14] Modares S, Rahbarimanesht AA, Edalat R, et al. Human rotavirus genotypes detection among hospitalized children, a study in Tehran, Iran [J]. Arch Iran Med, 2011, 14(1):39-45.

[15] Liu Y, Shi ZX, Ma YK, et al. Development of SYBR green I real-time RT-PCR for the detection of Ebola virus [J]. Bing Du Xue Bao, 2012, 28(5):567-571.

[16] Vandemeulebroucke E, De Clercq K, Van der Stede Y, et al. A proposed validation method for automated nucleic acid extraction and RT-qPCR analysis: an example using Bluetongue virus [J]. J Virol Methods, 2010, 165(1):76-82.

[17] 唐永凯,贾永义.荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨[J].生物技术,2008,18(3):89-91.

(收稿日期:2013-03-12)

(上接第 2069 页)

integrons in poultry litter [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(18):7118-7122.

[10] Xu Z, Li L, Shirliff ME, et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients in southern China [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(1):230-234.

[11] Gu B, Pan S, Wang T, et al. Novel cassette arrays of integrons in

clinical strains of Enterobacteriaceae in China [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(6):529-533.

[12] Xu H, Su Z, Wang S, et al. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from zhenjiang, China [J]. Curr Microbiol, 2009, 59(2):113-117.

(收稿日期:2013-03-08)