

• 论 著 •

尿标本来源大肠埃希菌 I、II 类整合子检测及基因分型研究

吴劲松, 卢月梅, 吴伟元, 李文青

(暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院检验科, 广东深圳 518020)

摘要: 目的 研究分离自尿标本的大肠埃希菌 (E. coli) I、II 类整合子分布情况, 并进行基因分型。方法 以 WHONET 5.4 软件对 100 株分离自尿标本的 E. coli 进行耐药性分析, 聚合酶链反应 (PCR) 检测 I、II 类整合子, 以肠杆菌科重复序列-聚合酶链反应 (ERIC-PCR) 进行基因分型。结果 100 株 E. coli 对氨苄西林、氨曲南、头孢他啶、环丙沙星、头孢噻肟、头孢唑林、庆大霉素、左氧氟沙星、哌拉西林、复方新诺明、四环素耐药率较高, 对碳青霉烯类抗菌剂耐药率为 0.0%。I 类整合子检出率为 66%, 未检出 II 类整合子。100 株 E. coli 分为 79 种基因型。结论 I 类整合子广泛存在于 E. coli, 并与其耐药性相关; ERIC-PCR 可用于临床分离 E. coli 菌株的基因分型。

关键词: 大肠杆菌; 尿; 整合子类; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)12-1281-02

Detection of class I and II integron and genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from urine samples

Wu Jingsong, Lu Yuemei, Wu Weiyuan, Li Wenqing

(Department of Laboratory Medicine, Shenzhen People's Hospital, the Second Clinical Medical College of Jilin University, Shenzhen Guangdong 518020, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of class I and II integron and analyze the genotype of *Escherichia coli* (E. coli) strains isolated from urine samples. **Methods** Drug resistance was analyzed by WHONET 5.4 software, entrobacter repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) was performed to analyze the genotype of isolated strains. Genes, coding class I and II integron, were detected by PCR. **Results** The resistance of isolated E. coli strains to aminoglycosides and quinolones antibiotics was serious. 66% (66/100) of all the strains were positive with class I integron and strain with class II integron was not found. 79 different genotypes were detected among the 100 stains. **Conclusion** Class I integron could be widespread in E. coli isolates. ERIC-PCR could be a convenient and effective method for genotyping clinical E. coli isolates.

Key words: *escherichia coli*; urine; integrons; polymerase chain reaction

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, E. coli) 是引起人类泌尿系统感染的常见细菌。近年来细菌耐药性问题的日趋严峻, 且耐药基因的水平传播可导致耐药菌的暴发流行及多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 的形成。整合子作为耐药基因盒捕获和传播系统组成部分之一, 是具有位点特异性重组功能的可移动件, 由 2 个保守区及其之间的基因盒构成, 基因盒可含有 1 个或多个耐药基因^[1]。整合子与细菌 MDR 和耐药基因播散密切相关。本研究主要对分离自尿标本 E. coli 进行整合子 I 和整合子 II 分布研究, 并以肠杆菌科重复序列-聚合酶链反应 (entrobacter repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, ERIC-PCR) 进行基因分型研究^[2]。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 100 株 E. coli 分离自 2009 年 6 月至 2010 年 9 月本院各临床科室送检的尿标本, 同一患者重复分离株不纳入本次研究。

1.2 试剂与仪器 dNTPs、Taq DNA 聚合酶、蛋白酶 K 和 DNA 分子标记由大连瑞真生物技术有限公司提供。引物由上海英潍捷基贸易有限公司提供。Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、10% 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecylsulphate, SDS) 为北京鼎国生物技术有限公司产品。德国 Eppendorf 公司 PCR 扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司凝胶成像仪, 法国生物梅里埃 VITEK-2 全自动微生物分析仪, 药敏纸片购自英国 OXOID 公司。质控菌株 E. coli ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 由本科室保存。

1.3 方法 (1) E. coli 鉴定及药敏试验: 以 VITEK-2 全自动

微生物分析仪对菌种进行鉴定和抗菌剂药敏试验。药敏试验采用 K-B 法。质控菌株为 ATCC25922 和 ATCC27853。(2) 基因组 DNA 抽提: SDS-蛋白酶 K-酚-氯仿法提取细菌 DNA, 以 TE 溶解后 -20 ℃ 保存。(3) I 及 II 类整合子检测: PCR 法检测 I 及 II 类整合子, 引物及目的片段大小见表 1^[3]。两种整合子的检测均使用 20 μL 反应体系, 包括含 Mg²⁺ 10×缓冲液 2 μL, dNTP 终浓度为 200 μmol/L, 上下游引物终浓度分别为 0.2 μmol/L, DNA 模板 1 μL, Taq DNA 聚合酶 1 U, 加入灭菌去离子水至 20 μL。I 类整合子反应条件为 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 40 s, 30 个循环; 72 ℃ 5 min。II 类整合子退火温度为 52 ℃, 其他条件和 I 类相同。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中 (含 0.5 g/mL 溴化乙锭), 电压 5 V/cm, 电泳 20 min, 凝胶成像仪观察结果。(4) 同源性分析: 以 ERIC-PCR 扩增菌株基因并进行同源性分析。引物序列 ERIC-2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGGCG-3'。反应体系同整合酶, 反应条件为 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 26 ℃ 2 min, 72 ℃ 1 min, 4 个循环; 94 ℃ 1 min, 40 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 40 个循环; 72 ℃ 10 min。

表 1 PCR 扩增引物

目的基因	引物序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)
I类整合酶基因	F:GCATCCTCGGTTTCTGG R:GGTGTGGCGGGCTTCGTG	457
II类整合酶基因	F:CGTGCCTGGAGGGAAAGAC R:CATGACGGTAAGGGTGGG	207

1.4 统计学处理 以WHONET5.4软件分析菌株耐药情况。采用SPSS13.0软件进行数据统计学分析。组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 时比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 耐药结果及统计分析 100株E.coli对常用抗菌剂的总耐药率及整合酶I阳性或阴性菌株耐药率,见表2。

表2 100株E.coli耐药率(%)

抗菌剂	总耐药率	整合酶I阳性株	整合酶I阴性株
阿莫西林/克拉维酸	14.0	15.2	11.8
阿米卡星	5.0	6.0	2.4
氨苄西林	88.0	89.4	85.3
氨曲南	59.0	68.2*	41.2
头孢他啶	58.0	68.2*	38.2
氯霉素	40.0	45.5*	29.4
环丙沙星	62.0	68.2*	50.0
头孢哌酮/舒巴坦	9.0	9.1	8.8
头孢噻肟	58.0	63.6*	47.1
头孢唑林	64.0	72.7*	47.1
庆大霉素	58.0	65.2*	44.1
亚胺培南	0.0	0.0	0.0
左氧氟沙星	60.0	71.2*	38.2
美洛培南	0.0	0.0	0.0
米诺环素	42.0	50.0*	26.5
哌拉西林	86.0	92.4*	73.4
氨苄西林/舒巴坦	42.0	48.5*	29.4
复方新诺明	73.0	83.4*	52.9
四环素	77.0	86.4*	58.8
哌拉西林/他唑巴坦	7.0	7.6	5.9

*: $P < 0.05$,与整合酶I阴性株耐药率比较。

2.2 整合子检测结果及基因分型 PCR结果显示,有66%(66/100)的分离菌株为I类整合子阳性,未检出II类整合子。100株E.coli菌株ERIC-PCR分为79个型。66株I类整合子阳性菌株ERIC-PCR基因型呈散发性,仅5株具有相同基因型。

3 讨 论

尿路感染是临床常见感染性疾病,致病菌主要是革兰阴性肠杆菌科细菌,并以E.coli为主^[4-5]。随着广谱和超广谱抗菌剂的大量应用及现代诊疗技术的广泛使用,E.coli感染率不断增加,且耐药性越来越强。有表2可见,碳青霉烯类抗菌剂仍可作为治疗E.coli感染的首选药,E.coli对阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦的敏感率也较高,与国内相关报道结果相似^[6];对其他的 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类抗菌剂耐药率较高。

整合子是在对耐药质粒和转座子进行系统研究的过程中被发现的^[7],作为基因移动原件,由5'保守末端和3'保守末端及两者间的可变区三部分组成,常根据不同整合酶基因的DNA序列进行分类,跟耐药相关的是I~III类,其中I类整合子最为常见。整合子通过位点特异性重组捕获外源基因并

使之表达,并且整合子可以位于转座子、质粒等可移动基因原件上,在不同种的细菌之间进行水平转移,是细菌形成MDR和耐药性扩散的重要原因。本研究用PCR检测整合酶的方法对分离自尿标本的100株E.coli进行I、II类整合子筛查;结果显示,整合子检出率为66%,与国内文献报道一致^[8],表明整合子广泛存在于E.coli菌中。耐药统计结果表明,I类整合子阳性和阴性菌株对氨曲南、头孢他啶、氯霉素、环丙沙星、庆大霉素、头孢唑林、左氧氟沙星、氨苄西林/舒巴坦的耐药率存在差异,说明I类整合子与临床分离E.coli菌株对喹诺酮类和(或)氨基糖苷类抗菌剂的耐药性密切相关。国外研究也显示I类整合子上常携带的有氨基糖苷类和甲氧磺胺嘧啶类耐药基因及 β -内酰胺酶基因等,它们既可单独存在,也可以不同组合方式存在于1个整合子中,介导对产生多种抗菌剂的耐药性^[9]。

E.coli是尿路感染的主要病原菌,也是医院感染的重要致病菌^[10]。ERIC-PCR是以肠杆菌科细菌基因间的重复序列为引物进行PCR扩增的方法,能扩增出多态性DNA图谱,可根据扩增产物的电泳条带来鉴定细菌型别。由于其快速、经济、简便、重复性较好,已被广泛应用于各类细菌的分型。本研究中,100株E.coli可分为79种基因型,提示不存在院内暴发流行的可能;ERIC-PCR结果也显示ERIC-PCR具有分型率高、分辨率强及重复性好的优点,是较好的基因分型方法,适用于临床实验室进行大量细菌的遗传特点分析。

参 考 文 献

- [1] Di Conza JA, Gutkind GO. Integrons: gene collectors [J]. Rev Argent Microbiol, 2010, 42(1): 63-68.
- [2] Wilson LA, Sharp PM. Enterobacterial repetitive intergenic consensus(ERIC) sequences in Escherichia coli: Evolution and implications for ERIC-PCR [J]. Mol Biol Evol, 2006, 23(6): 1156-1168.
- [3] 顾兵,童明庆,刘根焰,等.整合子介导大肠埃希菌和克雷伯菌多重耐药机制的研究[J].中华检验医学杂志,2006,29(8):725-729.
- [4] 叶会明,张柄伟,叶邦芬,等.尿路感染病原菌构成及其耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2009,30(2):172-173.
- [5] 张芳,李玉敏,常军霞.2007~2009年尿路感染大肠埃希菌的耐药性变化分析[J].中国抗生素杂志,2010,35(10):793-795,799.
- [6] 郑颖.尿路感染病原菌的分布及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2009,30(5):488-489.
- [7] Shaheen BW, Oyarzabal OA, Booth DM. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical E. coli isolates from the US [J]. Vet Microbiol, 2010, 144(3-4): 363-370.
- [8] 翁幸壁,糜祖煌.大肠埃希菌尿液分离株可移动遗传元件研究[J].中华医院感染学杂志,2010,20(5):607-610.
- [9] Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, et al. Use of inverse PCR for analysis of class 1 integrons carrying an unusual 3' conserved segment structure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(2): 943-945.
- [10] 张炽伦,孙各琴,吴秀娟,等.2007~2008年大肠埃希菌医院感染耐药变迁[J].中国病原生物学杂志,2010,5(12):935-926,929.

(收稿日期:2011-05-06)