

• 临床检验研究论著 •

铜绿假单胞菌整合子分布及基因盒携带情况分析

李春红

(青岛大学, 山东青岛 266012)

摘要:目的 了解烟台地区临床分离铜绿假单胞菌整合子的分布及耐药基因盒携带情况,探讨整合子与菌株耐药的相关性。方法 菌株鉴定及药敏试验采用 VITEK 2 全自动细菌分析仪。整合子及可变区检测采用 PCR 法,并采用限制性片段长度多态性分析和测序分析进一步确定可变区耐药基因盒类型。结果 在 100 株铜绿假单胞菌中 38 株(38%)检出 I 类整合子,未检出 II、III 类整合子。I 类整合子常见基因盒类型为 $aac(6')\text{II}-aadA13-clmA8-oxA10a$ 和 $aac(6')\text{II}-aadA13-oxA10a$,其中 $aac(6')\text{II}-aadA13-oxA10a$ 基因盒为首次出现的新基因盒排列方式,并已登录 Genbank:JN118546。结论 烟台地区铜绿假单胞菌整合子类型分布为 I 类整合子,整合子携带菌株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; 基因盒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)10-1187-02

Prevalence of integrons and inserted gene cassettes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Li Chunhong

(Qingdao University, Qingdao, Shandong 266012/Yantai Harbor Hospital, Yantai, Shandong 264002, China)

Abstract: Objective To investigate the prevalence of integrons and the inserted gene cassettes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Yantai and to discuss the correlation between integrons and drug resistance. **Methods** Identification of bacteria strains and antimicrobial susceptibility tests were performed by using VITEK2 system. Integrons and variable regions were detected by polymerase chain reaction(PCR) and inserted gene cassettes were further determined by restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis and sequencing. **Results** Of the 100 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, 38 isolates(38%) carried class I integrons and no isolates carried either class II or III integrons. Among the isolates carrying class I integrons, the common gene cassette arrays were $aac(6')\text{II}-aadA13-clmA8-oxA10a$ and $aac(6')\text{II}-aadA13-oxA10a$, of which the latter array containing $aac(6')\text{II}-aadA13-oxA10a$ genes was a novel gene cassette arrangement, whose sequence had been assigned to the Genbank with accession number: JN118546. **Conclusion** Class I integrons might be the prevalent integron types in Yantai, which could be closely related to drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *pseudomonas aeruginosa*; integrons; drug resistance; gene cassette

为了解整合子与铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)耐药的关系,本研究对 2008 年 10 月至 2010 年 9 月烟台地区三家综合医院(烟台毓璜顶医院、烟台山医院和烟台海港医院)临床分离的 100 株 PA 整合子类型及耐药基因盒进行了检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 PA 均来自 2008 年 10 月至 2010 年 9 月烟台地区三所医院临床分离并保存的非重复菌株 100 株。菌株鉴定及药敏试验均采用法国生物梅里埃公司 VITEK 2 全自动细菌分析仪。质控菌株采用 PA ATCC27853(山东省临床检验中心)。

1.2 仪器与试剂 引物由上海英骏公司合成, Taq 酶、dNTP、DNA maker2000 购自大连宝生生物公司, Rsa I、Hind I 酶、PCR 产物及克隆试剂盒、DNAmaker10000 购自上海捷瑞公司。仪器为法国生物梅里埃公司 VITEK 2 全自动细菌分析仪及配套的细菌鉴定和药敏鉴定板条、Tgradient Biometra 公司 PCR 扩增仪、美国 Bio-Rad 电泳仪、UVItec limited 凝胶成像系统等。

1.3 方法

1.3.1 整合子及整合子 I 可变区 PCR 检测 细菌模板提取采用煮沸法^[1]。IntI1、2、3 及可变区基因引物设计参照文献^[2],见表 1。整合子基因检测 PCR 反应体系设 50 μL ,其中 10 \times PCR Buffer 5 μL , dNTP 4 μL ,引物各 1 μL ,模板 2 μL ,Taq

酶 1 μL ,加蒸馏水至 50 μL 。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,反应 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。整合子可变区 PCR 检测采用长链高保真 PCR(Takala, EXhotstar),反应体系设 50 μL ,其中 10 \times PCR Buffer 5 μL , dNTP 4 μL ,引物各 1 μL ,酶 0.25 μL 。反应参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min,反应 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

表 1 整合子基因检测所需引物序列

整合子基因	引物序列(5'~3')	产物大小(bp)
IntI1	上: ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	565
	下: GAAAGGTCTGGTCATACATG	
IntI2	上: GTGCAACGCATTTTGCAGG	403
	下: CAACGGAGTCATGCAGATG	
IntI3	上: CATTGTGTGTGGACGGC	717
	下: GACAGATACGTGTTGGCAA	
可变区	上: GGCATCCAAGCAGCAAG	可变
	下: AAGCAGACTTGACCTGA	

1.3.2 整合子可变区双酶切分析 对于整合子可变区 PCR 扩增产物相似性条带采用 Rsa I 和 Hind I 进行双酶切以确定整合子基因盒类型。酶切反应体系为 PCR 产物 10 μL ,水 18 μL ,Tango buffer 2 μL , Rsa I 0.6 μL , Hind I 1.2 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,电泳分析。

1.3.3 PCR 产物纯化、克隆及测序 纯化后 PCR 产物连接 PMD18-T 载体转化至 CaCl₂ 制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经氨苄西林(100 mg/L)LB 培养基进行蓝白斑筛选,挑选白色菌落涂布平板,菌落 PCR 筛选阳性克隆,阳性克隆菌株提取质粒送上海英骏公司进行双向测序。

1.4 统计学处理 测序拼接结果在 Genbank 进行比对分析,确定整合子类型,并详细分析整合子可变区详细基因序列。各种率的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 整合子检测分析 100 株 PA 中 38 株检出 intI1 基因,检出率为 38%,未检出 IntI2、3 基因。

2.2 I 类整合子可变区检测分析 38 株 IntI1 阳性菌株扩增出两种大小相似条带,其中条带大小约为 4 500 bp 14 株,条带大小为 2 500 bp 24 株。两种条带分别显示同一种酶切类型,见图 1。从而确定为同一种整合子类型。分别选取其中 1 株 PCR 产物经纯化后克隆,克隆产物送上海英骏公司进行双向测序,测序结果经核酸序列比对(Blast)后显示两种类型整合子基因盒排列分别为 aac(6') II-aadA13-clmA8-oxA10a, aac(6') II-aadA13-oxA10a。其中 aac(6') II-aadA13-oxA10a 为一新的耐药基因盒排列方式,其序列已递交 Genbank,并已取得基因号(JN118546)。

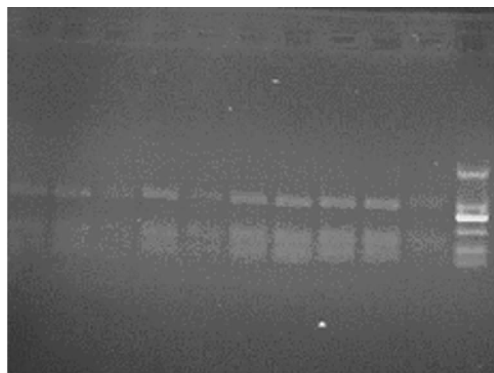


图 1 PA 2 500 bp 相似条带 Rsa I 和 Hind I 双酶切结果 (均为同一条带整合子,maker 为 DNA2000)

表 2 100 株 PA,以及 I 类整合子阴、阳性菌株耐药率比较

药物名称	PA (n=100)		I类整合子 阴性(n=62)		I类整合子 阳性(n=38)		P
	株	%	株	%	株	%	
哌拉西林	54	54.0	20	32.3	34	89.5	<0.01
头孢他啶	30	30.0	12	19.4	18	47.4	<0.01
头孢哌酮	34	34.0	12	19.4	22	57.9	<0.01
头孢噻肟	44	44.0	22	35.5	22	57.9	<0.01
头孢吡肟	16	16.0	0	0.0	16	42.1	<0.01
亚胺培南	6	6.0	4	6.5	2	5.3	>0.05
头孢哌酮/舒巴坦	12	12.0	2	3.2	10	26.3	<0.01
哌拉西林/他唑巴坦	20	20.0	4	6.5	16	42.1	<0.01
阿米卡星	20	20.0	2	3.2	18	47.4	<0.01
妥布霉素	16	16.0	6	9.7	10	26.3	<0.01
庆大霉素	28	28.0	6	9.7	22	57.9	<0.01
左氧氟沙星	40	40.0	22	35.5	18	47.4	<0.01
多粘菌素	0	0.0	0	0.0	0	0.0	-
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶	62	62.0	24	38.7	38	100.0	<0.01

-:表示无此项。

2.3 PA 耐药表型分析 见表 2。

3 讨 论

PA 由于具有多重耐药、易定植和易变异等特点已成为医院内感染的主要病原菌之一。据全国医院内感染监测网调查报告显示,PA 占医院内感染病原菌分离率的 10.3%,在革兰阴性杆菌中列第 2 位;其感染的发生与免疫受损、侵入性操作、广谱抗菌药物的使用有关。PA 耐药形成的一个重要原因是该菌具有超强获取外界耐药基因的能力^[3],并且借助基因传播元件如整合子、转座子和质粒在菌属内及不同菌属间水平传递耐药基因,造成耐药菌株广泛流行,已经成为世界范围内所面临的严重问题。

整合子是一基因捕获并表达元件,是由 Stokes 和 Hall^[4]于 1989 年首次提出,被认为与细菌水平转移耐药基因密切相关。根据整合酶基因编码氨基酸的差异目前已出现 4 种耐药相关整合子,其中 I、II、III 类整合子与耐药基因的转移密切相关。

本研究结果显示,烟台地区 I 类整合子在 PA 中的检出率为 38%,与国内报道整合子检出率基本一致^[5]。本研究未发现 II、III 类整合子,推测可能与 II、III 类整合子在 PA 中检出率低有关。本研究同时显示,I 类整合子阳性菌株对多数抗菌药物耐药率显著高于 I 类整合子阴性菌株,提示 PA 多重耐药可能与 I 类整合子流行有重要关系^[6]。

本研究发现 I 类整合子阳性细菌所携带基因盒与其耐药表型关系密切,说明基因盒中耐药基因介导了细菌相应耐药性,整合子对介导细菌耐药性起重要作用。I 类整合子阳性 PA 对氨基糖苷类、喹诺酮类及头孢菌素类药物耐药率较高^[7]。目前已发现 I 类整合子所携带耐药基因盒超过 60 种^[8],本研究发现烟台地区 PA 氨基糖苷类修饰酶以 aadA13 亚型为主,其次为 aac(6') II 两种亚型。aadA13 基因盒编码氨基糖苷类药物腺苷酰基转移酶,介导对链霉素和壮观霉素的耐药;aac(6') II 编码氨基糖苷类药物乙酰基转移酶,介导对庆大霉素、妥布霉素和卡那霉素的耐药。

综上所述,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生素种类,为临床治疗、延缓耐药菌株的发生均有积极意义^[9]。

参考文献:

[1] 夏涵,府伟灵,陈鸣,等.快速提取细菌 DNA 方法的研究[J].现代预防医学,2005,32(5):571-573.
 [2] Barlow RS,Pemberton JM,Desmarchelier PM, et al. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection[J]. Antimicrob Agents Chemother,2004,48:838-842.
 [3] Rosser SJ,Young HK. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment[J]. J Antimicrob Chemother,1999,4(1):11.
 [4] 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.
 [5] 许宏涛,陈东科,张秀珍.多重耐药绿脓假单胞菌中 I 类整合子的研究[J].中华检验医学杂志,2005,28(7):721-723.
 [6] 刘峰,陆忠明,周剑波.江阴地区三类整合子在多重耐药铜绿假单胞菌中的流行率及 I 类整合子结构研究[J].国际检验医学杂志,2008,29(4):305-306,310. (下转第 1190 页)

1.3.4 检验步骤

1.3.4.1 总 RNA 每份样本取冻存组织 50~100 mg, 使用总 RNA 提取试剂盒, 用离心柱法进行总 RNA 提取。

1.3.4.2 hWAPL 基因 mRNA 逆转录合成 cDNA 和实时定量 PCR 基因 mRNA 表达测定采用王攀等^[4]方法, 使用 TURE script SYBR Green q 逆转录 (RT)-PCR Kit, 按说明书操作, 通过逆转录合成 cDNA, 反应条件为: 25 °C 5 min, 37 °C 1 h, 95 °C 5 min。采用 SYBR Green I 荧光染料掺入法进行实时定量 PCR 反应。每个样品做两个平行, 并设双蒸水空白对照。扩增条件: 93 °C 预变性 60 s; 93 °C 30 s, 55 °C 40 s, 40 个循环。

1.3.4.3 hWAPL 基因 mRNA 实时定量 PCR 检测 hWAPL 基因 mRNA 实时定量 PCR 检测^[4]标准曲线的制定为校正定量过程中不同样品 RNA 中 mRNA 含量的差异, 选用 β-actin 基因作为内参照对 RNA 含量变异进行校正。以 cDNA 为模板, β-actin 基因为引物进行扩增, 将此质粒原液各稀释度作为标准曲线参照品, 按 10¹⁰、10⁹、10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ copy/mL 与测定循环数 (Ct) 制作标准曲线。

1.3.4.4 高危型 HPV 检测 使用高危型 HPV (8 个型) 核酸定量检测试剂盒, 按说明书对相关样本进行检测。

1.3.4.5 样本检测 取慢性宫颈炎、CIN I~III 和宫颈癌组织各 20 份, 每份 200~500 mg 冻存, 每份样本再取 50~100 mg 提取 RNA, 逆转录合成 cDNA 和进行实时定量 PCR 检测, 并设双蒸水空白对照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hWAPL 基因 mRNA 检测 慢性宫颈炎组、CIN I~III 组和宫颈癌组 hWAPL 基因 mRNA 相对表达量分别为 5.28 × 10³、5.43 × 10³、4.22 × 10⁴、1.36 × 10⁵、6.79 × 10⁸ copy/mL, 慢性宫颈炎组、CIN I~III 组 hWAPL 基因 mRNA 相对表达量明显低于宫颈癌组 (P < 0.05), 慢性宫颈炎组与 CIN I~III 组比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

2.2 高危型 HPV 检测 见表 1。

表 1 各组高危型 HPV 检测结果比较

组别	n	检出率 (%)
慢性宫颈炎组	20	15
CIN I 组	20	20
CIN II 组	20	45
CIN III 组	20	65
宫颈癌组	20	85

3 讨论

hWAPL 基因编码一种聚合锚定蛋白, 有利于其在分裂前

期适时从染色体臂解离。hWAPL 基因过表达使姐妹染色单体过早解离, 并且扰乱有丝分裂和胞质分裂, 从而诱导染色体不稳定性, 促进肿瘤形成^[1-5]。Kuroda 等^[6]实验显示, 在 CIN 和宫颈癌组织中 hWAPL 基因表达增加, 预示 hWAPL 基因高表达可作为宫颈癌早期诊断指标。有研究表明 hWAPL 基因是宫颈癌特异性高表达基因。曹春霞等^[7]用 RT-PCR 技术扩增 hWAPL-cDNA 片段连接到 pMD182T 载体, 证实载体能够表达 hWAPL 蛋白。本研究应用 FQ-PCR 检测慢性宫颈炎、CIN I~III 和宫颈癌组织中 hWAPL 基因 mRNA 表达, 结果表明在所有实验组中均有 hWAPL 基因 mRNA 表达, 且随宫颈病变程度加重 hWAPL 基因 mRNA 表达量逐渐上升。宫颈癌组表达量明显高于慢性宫颈炎组、CIN I~III 组, 表明 hWAPL 基因在宫颈癌发生、发展中可能起极其重要的作用。

高危性 HPV 感染是宫颈癌及癌前病变主要标志物^[8]。本研究对临床样本进行高危型 HPV 检测, 在宫颈癌组织中的检出率达到 85%, 慢性宫颈炎、CIN I~III 组织中的检出率为 15%~65%, 表明高危型 HPV 与宫颈癌发生密切相关, 与文献报道较一致, 但并不能直接说明发生宫颈癌变, 而 hWAPL 基因 mRNA 高表达才能说明发生宫颈癌变。本研究结果表明, 检测 hWAPL 基因 mRNA 表达对宫颈癌有诊断价值, 但还需对大批量宫颈临床样本进行检测, 结合病理分析, 确定 hWAPL 基因 mRNA 表达的临界值, 才能将这一方法用于临床样本检测, 成为一项诊断宫颈癌的既有价值又实用的技术。

参考文献:

- [1] Gandhi R, Gillespie PJ, Hirano T. Human wapl is a cohesion-binding protein that promotes sister2chromatid resolution in mitotic prophase[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(24): 2406-2417.
- [2] 曹利仙, 沈忠飞, 潘巍巍. 半翼基因的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2010, 41(1): 27-29.
- [3] 黄莫婉, 马英. 宫颈癌研究新进展[J]. *重庆医学*, 2006, 35(23): 2185-2187.
- [4] 王攀, 郑志保, 李招云, 等. 荧光定量 PCR 检测肝细胞癌患者 GPC3mRNA 和 AFPmRNA 的诊断价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(6): 1448-1450.
- [5] 卢博奇, 蔺莉. 实时定量聚合酶链反应检测人半翼基因在宫颈病变中的表达及意义[J]. *中国全科医学*, 2011, 14(10): 3345-3347.
- [6] Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, et al. Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL[J]. *Cancer Letters*, 2005, 221(1): 21-28.
- [7] 曹春霞, 马军, 寻萌, 等. 宫颈癌相关新癌基因 hWAPL 的原核表达和免疫原性分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(6): 562-564.
- [8] 卢晓芬, 张树泉. hWAPL 基因在宫颈癌中作用的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2007, 13(6): 509-511.

(收稿日期: 2011-10-28)

(上接第 1188 页)

- [7] 王寰, 范晓磊, 王海燕. I 类整合子介导的铜绿假单胞菌耐药性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(12): 1304-1305, 1307.
- [8] Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, et al. Class 1 integrons in Dutch Salmonella enterica serovar Dublin isolates from clinical cases of bovine salmonellosis[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 117(2): 192-

200.

- [9] 陈丹华, 张如霖, 丁星, 等. 整合子耐药机制的动态检测[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(1): 19-21.

(收稿日期: 2011-10-03)