论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0278-04

志贺菌属整合子的耐药贡献与稳定性研究

朱静媛[1],段广才[2,3],范清堂[2],郗园林[3] (450001 郑州,郑州大学公共卫生学院:环境卫生学教研室[1],流行病学教研室[2];450052 郑州,郑州大学河南省分子医学重点学科开放实验室[3])

【摘要】 **目的** 分析志贺菌属整合子对耐药性的贡献及其稳定性。**方法** 对志贺菌属1类、2类整合子的耐药基因盒分别克隆、转化DH5α,观察阳性克隆菌对多种抗生素敏感性的变化。将整合子阳性克隆菌与多重耐药志贺菌进行质粒接合实验,并测定耐药性的改变。对10株耐药谱不同、携带整合子不同的志贺菌属细菌进行无抗生素压力下连续多次传代实验,检测其耐药性及整合子的变化。**结果** 志贺菌属1类整合子耐药基因盒dfrA17-aadA5阳性克隆菌对链霉素和甲氧苄啶的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,MIC)分别提高了8倍和32倍;2类整合子耐药基因盒dfrA1-sat1-aadA1阳性克隆菌对链霉素和甲氧苄啶的MIC分别提高了64倍和32倍;整合子阳性克隆菌经质粒接合传递后对抗生素的MIC无改变。1株携带2类整合子的志贺菌属菌株经过多次传代培养后丢失整合子及其耐药性。**结论** 志贺菌属整合子-耐药基因盒系统可引起特定抗生素的耐药性,对质粒接合传递耐药性无影响。志贺菌属的2类整合子可发生丢失。

【关键词】 志贺菌属;整合子;克隆;耐药性

【中图法分类号】 R378.25;R394-33;R969.3 【文献标志码】 A

Drug resistance of *Shigella* integrons and their stability

Zhu Jingyuan[1], Duan Guangcai[2,3], Fan Qingtang[3], Xi Yuanlin[2] ([1]Department of Environmental Health, [2]Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450001; [3]Henan Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

【**Abstract**】 **Objective** To analyze the drug resistance of *Shigella* integrons and their stability. **Methods** Drug-resistant gene cassettes of classes 1 and 2 *Shigella* integrons were cloned and transformed to *E. coli* DH5α, respectively, to observe changes in sensitivity of positive clones to multiple antibiotics. Positive clones were conjugated with multi-drug resistant *Shigella* integrons to conduct plasmid conjugating experiments, and drug resistance of and conjugants to antibiotics was detected. Ten drug-resistant *S. flexneri* strains with different resistant phenotypes and integrons were cultured continuously without any antibiotics, and changes in their resistance and integrons were detected. **Results** The minimal inhibitory concentration (MIC) of streptomycin and trimethoprim was increased 8-fold and 32-fold, respectively, for the positive clones of class 1 integron gene cassettes dfrA17-aadA5, and 64-fold and 32-fold, respectively, for the positive clones of class 2 integron gene cassettes dfrA1-sat1-aadA1. No change occurred in their drug resistance after conjugation. After 30 times of inoculation without antibiotics, one *S. flexneri* strain of class 2 *Shigella* integrons completely lost its resistance andintegron. **Conclusion** The integron gene cassettes in *Shigella* can lead to resistance to specific antibiotics and may have no impact on the resistance transferred by plasmid conjugate. Loss of class 2 integrons may occur in *Shigella*.

【**Key words**】 *Shigella*; integron; clone; resistance

Supported by the Foundation from Ministry of Health of China (WKJ2007-2-024). Corresponding author: Duan Guangcai, E-mail: gcduan@public2.zz.ha.cn

志贺菌属(*Shigella*)在临床频繁出现耐药菌株,甚至多重耐药株(multi-drug resistant bacteria, MDSR),严重影响临床治疗的疗效[1-2]。近年研究发现整合子-耐药基因盒系统与志贺菌属的耐药性有关[3-5],但整合子种类与耐药谱并无明确的对应关系[6],为了探索整合子-耐药基因盒系统对志贺菌属耐药性的真实贡献及其自身稳定性,对1类、2类整合子的耐药基因盒分别克隆、转化敏感菌,观察整合子耐药基因盒阳性克隆菌对多种抗生素的敏感性的变化;通过质粒接合

【基金项目】 卫生部科研基金(WKJ2007-2-024)

【通信作者】 段广才,E-mail:gcduan@public2.zz.ha.cn

传递实验探讨整合子阳性克隆对耐药性传递的影响；通过无抗生素压力下连续多次传代实验检测整合子及耐药性的变化，结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

选择本实验室保存的志贺菌属临床分离株，均为对3种以上抗生素耐药的多重耐药菌。福氏志贺菌05100作为与转化子进行质粒接合转移试验的供体菌，对四环素、氯霉素、磺胺和氨苄青霉素耐药。

1.2 主要试剂

提取细菌基因组DNA的试剂盒与DNA分子量标准1 kb ladder为Axygen公司产品；具有高保真功能的*Taq* plus DNA聚合酶和10×dNTPs产自北京天根生化科技有限公司。引物合成及测序由北京博尚生物公司完成。

1.3 志贺菌属1类、2类整合子目的基因的PCR扩增与克隆

针对1类整合子耐药基因盒区域的扩增引物为hep58（5′-GCATCCAAGCAGCAAGC-3′）和hep59（5′-AAGCAGACTTGACCTGAT-3′）；针对2类整合子耐药基因盒区域，设计扩增引物为V2F（5′-CGGGATCCCGGAGGCATGCACGATTTGTA-3′）与V2R（5′-CCGAATTCGATGCCATCGCAAGTACGAG-3′），分别添加了限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ的识别位点。针对2类整合子的整个区域，设计上游引物intI2FH，添加了限制性内切酶*Hind*Ⅲ的识别位点（5′-CGCAAGCTTAGGGGCTACTCAGGGCTA-3′），下游引物为V2R。PCR检测2类整合子整合酶基因intI2的上游引物为intI2FH，下游引物为5′-GCCTGCAGCAGTTGCAAGACAAGGAG-3′。

试剂盒提取细菌基因组DNA，应用具有高保真功能的*Taq* plus DNA聚合酶进行PCR扩增，经琼脂糖凝胶电泳证实扩增片段单一、清晰。将目的片段从凝胶中切割下来，用凝胶回收试剂盒回收纯化。将1类整合子耐药基因盒片段直接与pMD18-T载体连接；将2类整合子耐药基因盒片段、2类整合子整个区域基因片段分别与PUC18质粒经双酶切后连接；分别转化处于感受态的DH5α细胞，通过蓝白斑实验筛选白色菌落，用质粒小提试剂盒提取质粒，经过双酶切和PCR扩增证实重组构建成功。将鉴定重组阳性的白色菌落增菌后送测序分析，确定序列无误后保存备用。

1.4 质粒接合实验和抗生素敏感性测定

质粒接合实验按照文献[7]略加改动，在麦康凯固体培养基平板上观察菌落形态挑选接合子。对含有志贺菌属整合子耐药基因盒的阳性克隆菌株、质粒接合传递菌株进行药敏试验。采用琼脂稀释法测定最低抑菌浓度（minimum inhibition concentration，MIC），参照CLSI颁布的Methods for Dilution of Antibiotic Susceptibility Tests进行。选用的抗生素是：四环素（tetracycline，TET）、氯霉素（chloramphenicol，CHL）、环丙沙星（ciprofloxacin，CIP）、链霉素（streptomycin，STR）、甲氧苄啶（trimethoprim，TMP）和磺胺异噁唑（sulfamethoxazole，SSS）。

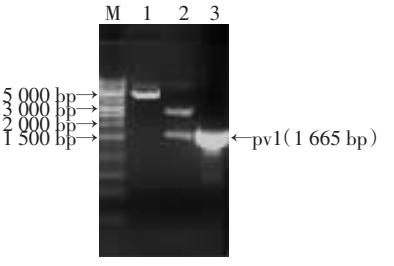
1.5 志贺菌属整合子的稳定性测定

对耐药谱不同、携带整合子不同的10株福氏志贺菌，进行多次传代培养。将所选菌株挑单个菌落经LB肉汤过夜增菌后，1∶100倍LB肉汤稀释，继续37 ℃，200 r/min振荡培养3～4 h，至*D*（600）值约为0.08～0.12之间后，继续1∶100倍LB肉汤稀释37 ℃，200 r/min振荡培养3～4 h。这样，1 d传3代，连续培养10 d。在此期间，每隔5次传代就进行菌株的分离，并进行最低抑菌浓度的药敏实验和整合子的PCR检测。

2 结果

2.1 志贺菌属整合子基因的克隆及鉴定

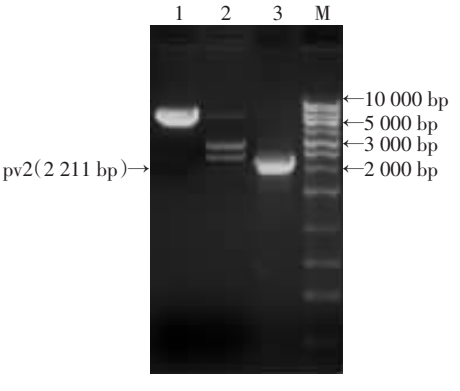
挑选志贺菌属1类整合子耐药基因盒的阳性克隆puc-pv1进行*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切及PCR鉴定如图1。经测序证实为正向连接的耐药基因盒序列dfrA17-aadA5，长度为1 665 bp。序列提交GenBank数据库获得登录号为FJ895301。



M：Axygen 1 kb ladder；1：puc-pv1质粒*Eco*RⅠ单酶切；2：puc-pv1质粒*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切；3：pv1的PCR产物

图1 重组质粒puc-pv1酶切鉴定结果

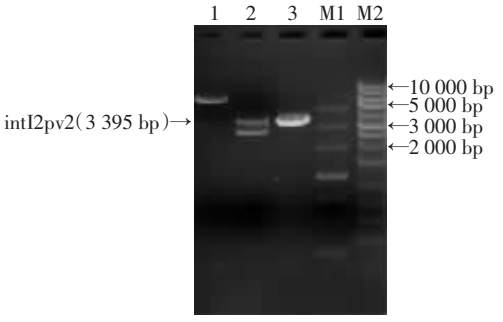
对志贺菌属2类整合子耐药基因盒的阳性克隆puc-pv2进行*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切及PCR鉴定如图2。经测序证实为耐药基因盒序列dfrA1-sat1-aadA1，长度为2 211 bp。序列提交GenBank数据库获得登录号EF634237。



M：Axygen 1 kb ladder；1：puc-pv2重组质粒*Eco*RⅠ单酶切；2：puc-pv2重组质粒*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切；3：pv2的PCR产物

图2 重组质粒puc-pv2酶切鉴定结果

对志贺菌属2类整合子完整序列的阳性克隆puc-intI2pv2进行*Hind*Ⅲ、*Eco*RⅠ双酶切及PCR鉴定如图3。经测序证实为完整的intI2基因序列和耐药基因盒dfrA1-sat1-aadA1序列，长度为3 395 bp。



M1:Tiangen Marker Ⅲ;M2:Axygen 1kb ladder;1:puc-intI2pv2 重组质粒 *Eco*RⅠ单酶切;2:puc-intI2pv2 重组质粒 *Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ双酶切;3:intI2pv2 的 PCR 产物

图3 重组质粒 puc-intI2pv2 酶切鉴定结果

2.2 志贺菌属1类、2类整合子耐药基因盒阳性克隆对几种抗生素敏感性的测定

将含有克隆质粒 puc18 的大肠杆菌 DH5α 命名为 DH5α-puc18;将含有 1 类整合子耐药基因盒(dfrA17-aadA5)阳性质粒 puc-pv1 的大肠杆菌 DH5α 命名为 DH5α-puc-pv1;将含有 2 类整合子耐药基因盒(dfrA1-sat1-aadA1)阳性质粒 puc-pv2 的大肠杆菌 DH5α 命名为 DH5α-puc-pv2。分别检测 DH5α-puc18、DH5α-puc-pv1 和 DH5α-puc-pv2 对不同抗生素的最低抑菌浓度(MIC)。以 DH5α-puc18 为对照菌株,结果发现与阴性对照菌相比,1 类整合子耐药基因盒(dfrA17-aadA5)阳性克隆菌株和 2 类整合子耐药基因盒(dfrA1- sat1- aadA1)阳性克隆菌株分别能使链霉素(STR)的 MIC 提高 8 倍和 64 倍,同时能使甲氧苄啶(TMP)的 MIC 提高 32 倍,而对其他抗生素的 MIC 未见影响,结果见表 1。

表1 志贺菌属1类、2类整合子耐药基因盒阳性克隆对抗生素最低抑菌浓度的测定(μg/ml)

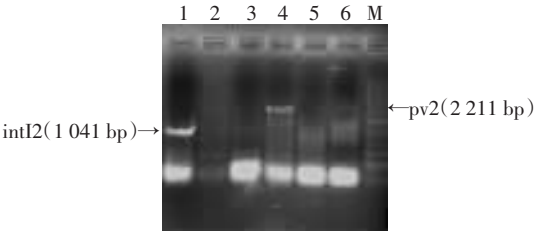
抗生素	DH5α-puc18	DH5α- puc-pv1	DH5α-puc-pv2
四环素	2.000	2.000	2.000
氯霉素	4.000	4.000	4.000
链霉素	0.500	4.000	32.000
甲氧苄啶	2.000	64.000	64.000
磺胺异噁唑	8.000	8.000	8.000
环丙沙星	0.015	0.015	0.015

2.3 志贺菌属整合子基因克隆对质粒接合传递耐药性的影响

用 DH5α-puc-pv1、DH5α-puc-pv2、DH5α-puc-intI2pv2 和 DH5α-puc18 作为受体菌,以多重耐药福氏志贺菌 05100 为供体菌,分别进行质粒接合传递实验,对接合子的耐药性进行测定,结果发现,含有整合子阳性克隆的大肠杆菌经质粒接合传递后,与大肠杆菌空菌一样,对多种抗生素的 MIC 并无变化。

2.4 志贺菌属整合子与耐药性稳定性测定结果

经过 30 次无抗生素选择压力下传代实验后,10 株志贺菌属菌株中有 6 株整合子携带情况和耐药性状均无任何改变;有 3 株整合子未发生改变、但耐药性状有所改变,分别在第多次传代过程中丢失了对 CHL、SMZ 和 CIP 的抗性。只有福氏志贺菌 06218 的整合子携带情况和耐药性状都发生了改变,在第 10 次传代时发现丢失了原来具备的所有抗生素抗性,即对 TET、SMZ 和 AMP 的抗性,同时原来具备的 2 类整合子整合酶基因(intI2,1 041 bp)和耐药基因盒(pv2,2 211 bp)检测均变为阴性,见图 4。



M:标准;1、2、3:06218 第 5 次、第 20 次和第 30 次传代菌的 intI2 PCR 产物;4、5、6:06218 第 5 次、第 20 次和第 30 次传代菌的 pv2 PCR 产物

图4 福氏志贺菌 06218 不同代次 intI2 和 pv2 的 PCR 检测结果

3 讨论

本研究对来自志贺菌属临床分离多重耐药株的 1 类、2 类整合子进行克隆和转化,发现 1 类整合子阳性克隆携带的耐药基因盒为 dfrA17-aadA5,编码对甲氧苄啶和氨基糖苷类抗生素的耐药性;2 类整合子阳性克隆携带的耐药基因盒为 dfrA1-sat1-aadA1,编码对甲氧苄啶、链丝菌素和氨基糖苷类抗生素的耐药性。将上述阳性克隆分别转化大肠杆菌 DH5α,发现携带 1、2 类整合子阳性克隆的转化子对链霉素(STR)和甲氧苄啶(TMP)的 MIC 都得到明显的提高(8 ~ 64 倍,见表 1),提示转化子得到耐药基因后确实获得了相应的抗生素耐药性。转化子对 STR 和 TMP 以外的其他抗生素的敏感性均未见变化,提示整合子介导的耐药性仅限于自身所携带的耐药基因盒所针对的抗生素种类。同时,可以看到 DH5α-puc-pv1 中耐药基因盒 aadA5 使得 DH5α 对 STR 的 MIC 提高了 8 倍,而 DH5α-puc-pv2 中耐药基因盒 aadA1 使得 DH5α 对 STR 的 MIC 提高了 64 倍,提示 aadA1 比 aadA5 具有更强的赋予细菌 STR 耐药性的能力,编码相同抗生素耐药性的不同耐药基因盒引起的耐药程度不同,这与既往研究结果相似[8]。由整合子-耐药基因盒系统自身直接引起的耐药是特异性的,但其耐药程度则可能与耐药基因盒的分类等多种因素有关。

大量研究发现整合子阳性的细菌多数是多重耐药株,但耐药种类并不局限于耐药基因盒种类,而与整合子-耐药基因盒系统以外的很多耐药机制有关,如质粒介导的耐药、细菌自身基因组基因突变引起的耐药等。本研究试图探索整合子-耐药基因盒系统对质粒介导耐药性是否产生影响,结果发现,整合子阳性克隆,包括耐药基因盒阳性克隆和整合子的完整序列阳性克隆,并不能提高大肠杆菌经质粒接合传递后的耐药性,

也就是说整合子的存在可能并不影响质粒传递耐药性的能力。关于整合子介导耐药和其他耐药机制的相互作用和关系，尚需更多深入的研究。

拥有一些适应性基因、质粒的复制表达等对于细胞的生存并不是必需的，因此当抗生素选择压力消失时，细菌对某些抗生素的敏感性会恢复[9-11]。另一方面，整合子基因结构虽然具有一定稳定性[12]，但整合子-耐药基因盒系统作为一个整体也可能发生丢失现象。2009年临床随机对照随访试验[13]发现，使用抗生素治疗的儿童，比使用安慰剂的儿童，其粪便中肠道杆菌的多重耐药率及整合子阳性率都要高，然而1年后抗生素组的整合子阳性率恢复到基线水平，对多种抗生素的敏感性也恢复到基线水平，提示随着使用抗生素后时间的延长，由整合子介导的多重耐药肠道杆菌菌群消失。在本研究中发现1例志贺菌属菌株的2类整合子及其耐药基因盒系统丢失的情况。虽然只有1例，但证实了整合子是可以丢失的。伴随整合子丢失的是对3种抗生素耐药性的丢失。这3种抗生素(TET、SMZ和AMP)的耐药性和该菌株所携带的2类整合子耐药基因盒所介导的耐药性(TMP和STR)并不完全相符，提示一定还有其他的耐药基因同时丢失，从而导致了该菌株对3种抗生素敏感性的恢复。那些和整合子-耐药基因盒系统连接在一起的其他基因结构值得进一步的关注。已知细菌整合子-耐药基因盒系统与耐药相关的质粒、转座子、插入序列之间存在着紧密的联系[14-15]。整合子系统作为其中一部分可参与各种基因活动，如插入序列和整合子介导了多个肠道菌中多重耐药质粒的形成[16]等。正是整合子的这一特性使得整合子与耐药性关系复杂化。

总之，志贺菌属整合子-耐药基因盒系统直接引起的耐药性是特异的，其对志贺菌属耐药性形成的贡献是有限的，在一定条件下整合子-耐药基因盒系统可以发生丢失。因此，对整合子-耐药基因盒系统的监测有利于防控细菌多重耐药性的形成和传播，而从分子水平对整合子与其他耐药基因元件之间相互作用的研究，将有助于人们深入理解细菌多重耐药形成的机制。

参考文献：

[1] Sivapalasingam S, Nelson J M, Joyce K, *et al*. High prevalence of antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the United States tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(1): 49-54.

[2] Nguyen T V, Le P V, Le C H, *et al*. Antibiotic resistance in diarrheagenic Escherichia coli and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(2): 816-819.

[3] Peirano G, Agerso Y, Aarestrup F M, *et al*. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(3): 301-305.

[4] Ahmed A M, Furuta K, Shimomura K, *et al*. Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(12): 1685-1691.

[5] Mammina C, Pontello M, Dal-Vecchio A, *et al*. Identification of *Shigella* sonnei biotype g isolates carrying class 2 integrons in Italy (2001 to 2003)[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2467-2470.

[6] Dubois V, Parizano M P, Arpin C, *et al*. High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1333-1340.

[7] Ahmed A M, Kawamoto H, Inouye K, *et al*. Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7 causing a family outbreak in Japan[J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt 9): 867-872.

[8] Pan J C, Ye R, Meng D M, *et al*. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella* sonnei and Shigella flexneri[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(2): 288-296.

[9] Kaneene J B, Warnick L D, Bolin C A, *et al*. Changes in tetracycline susceptibility of enteric bacteria following switching to nonmedicated milk replacer for dairy calves[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6): 1968-1977.

[10] Martinez J L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria[J]. Proc Biol Sci, 2009, 276(1667): 2521-2530.

[11] Reinhardt A, Kohler T, Wood P, *et al*. Development and persistence of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: a longitudinal observation in mechanically ventilated patients[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1341-1350.

[12] Weldhagen G F. Genetic stability of class 1 integron-borne blaGES-type genes under short-term in vitro antibiotic stress[J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 28(5): 481-483.

[13] van-der-Veen E L, Schilder A G, Timmers T K, *et al*. Effect of long-term trimethoprim/sulfamethoxazole treatment on resistance and integron prevalence in the intestinal flora: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in children[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(5): 1011-1016.

[14] Martinez N, Mendoza M C, Rodriguez I, *et al*. Detailed structure of integrons and transposons carried by large conjugative plasmids responsible for multidrug resistance in diverse genomic types of Salmonella enterica serovar Brandenburg[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(6): 1227-1234.

[15] Bahl M I, Hansen L H, Goesmann A, *et al*. The multiple antibiotic resistance IncP-1 plasmid pKJK5 isolated from a soil environment is phylogenetically divergent from members of the previously established alpha, beta and delta sub-groups[J]. Plasmid, 2007, 58(1): 31-43.

[16] Miriagou V, Carattoli A, Tzelepi E, *et al*. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(8): 3541-3543.

(收稿 2010-09-16 修回 2010-10-27)

(编辑 汪勤俭)