

以荤腥为主,同时生活缺少规律,饥饱无度、酗酒、劳逸失调等,均可能诱发胰腺癌。另外,过量进食甜品可使胰腺β细胞功能发生衰退,造成糖代谢障碍,进而使胰腺细胞发生突变。美国流行病学调查结果显示胰腺癌的发病率达 1/10 000,其病死率居恶性肿瘤的第 4 位。

胰腺癌的早期诊断仍旧困难,但就目前而言,只有早期得到诊断的病例,才有可能得到较好的治疗效果。肿瘤标志物主要是指癌细胞分泌或脱落到体液或组织中的物质,或是宿主对体内新生物反应产生并进入到体液或组织中的物质。肿瘤标志物的检测对胰腺癌的筛选、诊断术后复发及转移的监测,以及胰腺良恶性肿瘤的鉴别都有着重要作用<sup>[4]</sup>。自 1979 年 Korprowski 等发现与消化道肿瘤相关抗原 CA199 以来,由于单克隆技术的开发取得了突飞猛进的发展。目前临床常用的除 CA199 外,还有 CEA、CK19 等。若用两种或两种以上的肿瘤标志物检查可提高其阳性率。有关研究表明,如联合应用上述肿瘤标志物,在胰腺癌诊断中的敏感性及特异性均会有所提高。

CA199 是表达在相对分子质量较高的黏蛋白的糖类位点,它不是器官特异性的,在多种腺癌中均可升高<sup>[5]</sup>,但是在胰腺癌检查中具有高敏感性,是胰腺癌较为可靠的标志。CEA 存在于胚胎胃肠黏膜上皮与一些恶性组织的细胞表面,是一种糖蛋白<sup>[6]</sup>,在胰腺癌中均可升高,但特异性不高。CK19 是细胞体的中间丝,在胰腺癌诊断中有很大的价值,是比 CEA 更广谱的肿瘤标志物<sup>[7-9]</sup>。

本组对 64 例胰腺癌患者及 64 例健康体检者进行了血清肿瘤标志物 CEA、CA199 和 CK19 的检测,并分析其检查结果,发现 64 例胰腺癌患者血清肿瘤标志物单项检测,CEA、CA199 与 CK19 的敏感度各为 49.2%、69.8%和 76.1%,特异性各为 68.9%、79.6%和 85.4%;联合检测敏感度为 95.2%,特异性为 99.8%;胰腺癌患者 CEA、CA199 与 CK19 水平较健康体检者高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

总之,胰腺癌是消化道常见的恶性肿瘤之一,血清肿瘤标

志物的检测在胰腺癌诊断中占有重要地位,尤其血清肿瘤标志物联合检测可以较准确地对胰腺癌进行早期诊断,在敏感度及特异性方面优于单项检测,为胰腺癌诊治提供了指导,有很高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 贾志凌,下莉,刘畅,等.角蛋白 19 片段 KI 9-2G2 对肺癌诊断价值[J].中华实用诊断与治疗杂志,2010,21(7):671-673.
- [2] 马红岩,王丹丹.肿瘤标志物在胰腺癌早期诊断中的研究[J].中国医药导报,2010,6(1):14.
- [3] 安倩,王鑫,梁媛.胰腺肿瘤标志物的研究新进展[J].中国实用医药,2009,23(3):237-238.
- [4] 齐晓光,李栋,王立夫,等.多种肿瘤标志物在胰腺癌临床分期中的应用[J].胃肠病学和肝病杂志,2009,8(5):692-694.
- [5] 黄炳兴,徐捷.血清肿瘤标志物测定在胰腺癌中的意义[J].现代中西医结合杂志,2011,7(8):873-874.
- [6] 崔秀玉,李秀平,于谨铭,等.血清 CA199、CA242、CEA 联合检测对胰腺癌的临床意义[J].医学检验与临床,2010,5(1):14-15.
- [7] 贾志凌,张宏艳,刘畅,等.血清肿瘤标志物联合检测在胰腺癌诊断中应用[J].中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(2):130-131.
- [8] 刘汉起.肿瘤标志物 CEA、CA199、CA50 在联合诊断胰腺癌中的价值[J].临床和实验医学杂志,2009,8(5):3-5.
- [9] 潘定宇.基质金属蛋白酶-9 和色素上皮衍生因子在胰腺癌侵袭转移中的作用[J].中华实验外科杂志,2011,28(9):1504-1505.

(收稿日期:2011-11-13)

• 临床研究 •

# 整合子与大肠埃希菌耐药性的相关性研究\*

吴长生,伍严安,胡辛兰,李 宁(福建省立医院检验科,福州 350001)

**【摘要】 目的** 调查大肠埃希菌中 I 类、II 类和 III 类整合子的存在情况,分析细菌携带的整合子与大肠埃希菌耐药性的关系。**方法** 测定 87 株大肠埃希菌对抗菌药物的敏感性;应用简并引物聚合酶链反应(PCR)方法,同时扩增整合子 5'保守区的 I 类、II 类和 III 类整合酶基因,对阳性 PCR 产物用限制性内切酶 Hinf I 作限制片段长度多态性(RFLP)分析进行整合子分类。**结果** 30 株大肠埃希菌检测出 I 类整合子,未检出 II 类和 III 类整合子。I 类整合子阳性菌株对抗菌药物的耐药率普遍比整合子阴性菌株高。**结论** 大肠埃希菌临床分离株的耐药性强,细菌的多重耐药与 I 类整合子相关。

**【关键词】** 大肠埃希菌; 整合子; 整合酶; 耐药性

**DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.06.027** 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)06-0694-03

细菌耐药性通常由获得耐药基因引起,在抗菌药物选择性压力下,耐药基因的水平传播是一个日益严重的问题,耐药基因的水平传播使耐药菌株广泛流行<sup>[1]</sup>。本研究针对福建省立医院分离的 87 株大肠埃希菌,监测细菌的耐药性,采用聚合酶

链反应(PCR)法检测和分析细菌携带的整合子与大肠埃希菌多重耐药的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株** 87 株大肠埃希菌为 2008 年 1~12 月从福建省立

\* 基金项目:福建省卫生厅青年科研基金(39107)。

医院临床标本中分离,剔除耐药表型完全一致的菌株。I 类整合子阳性标准菌株 V517 由华南理工大学轻工与食品学院石磊教授惠赠,II 类整合子阳性对照株由福建疾病预防控制中心赠送。

**1.2 仪器** VITEK2 全自动细菌鉴定和药敏分析仪(法国 bioMerieux 公司),BIOER Tc-25/H 基因扩增仪(杭州博日科技有限公司),FX-DY-252 型水平电泳仪(上海复星高科技集团有限公司),凝胶成像系统(UVItec limited)。

**1.3 试剂** bioMerieux VITEK2 全自动细菌鉴定和药敏分析仪所用试剂,购自法国 bioMerieux 公司。药敏纸片和 M-H (Mueller-Hinton)琼脂为英国 Oxoid 公司产品。Chelex100 购自 BIO-RAD 公司。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Taq buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus),Hinf I 等均为 TaKaRa 公司产品。

**1.4 方法**

**1.4.1 细菌鉴定和药敏试验** 采用 bioMerieux VITEK2 全自动细菌分析仪,进行细菌鉴定和抗菌药物敏感性测定。每批均以 ATCC25922 作为质控菌株进行质量控制,结果按临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准进行判读。

**1.4.2 细菌总 DNA 的提取** 采用 Chelex100 法<sup>[2]</sup>提取细菌 DNA,用紫外分光光度计测量 A260、A280 nm OD 值,OD260/OD280 为 1.66~1.70。

**1.4.3 整合子检测及分类** 参照文献设计简并引物<sup>[1]</sup>,由宝生物工程(大连)有限公司合成。上游引物为 hep35:5'-TGC GGG TYA ARG ATB TKG ATT T-3',下游引物为 hep36:5'-CAR CAC ATG CGT RTA RAT-3',该引物可同时扩增整合子 5'保守区的 I 类、II 类和 III 类整合酶基因,预计扩增片段为 491 bp。参考有关文献<sup>[4-5]</sup>,采用 25 μL 反应体系:上下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL,模板 1.0 μL,dNTPs(200 μmol/L)2.0 μL,Taq buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus)2.5 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.125 μL,超纯水 17.375 μL。参考有关文献<sup>[5-6]</sup>和对循环条件的优化结果,确定以下 PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,52 °C 40 s,72 °C 40 s,循环 35 次;最后 72 °C 延伸 5 min。简并引物扩增的阳性产物用限制性内切酶 Hinf I 进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析,酶切反应体系:PCR 产物 8.0 μL,10×H buffer 2.0 μL,Hinf I (10 U/μL)1.0 μL,超纯水 9.0 μL。37 °C 水浴 4 h,酶切产物用含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析(电压 70 V,时间 30 min),对整合子进行分类,依据见表 1<sup>[3]</sup>。

表 1 整合子酶切分类依据

整合酶基因	预期扩增片段 (bp)	酶切后片段数目 (个)	片段大小 (bp)
intI1	491	1	491
intI2	491	2	300 191
intI3	491	2	372 119

**1.5 统计学方法** 统计分析采用 SPSS13.0 软件,率的比较用卡方检验或 Fisher 确切概率法检验。

**2 结果**

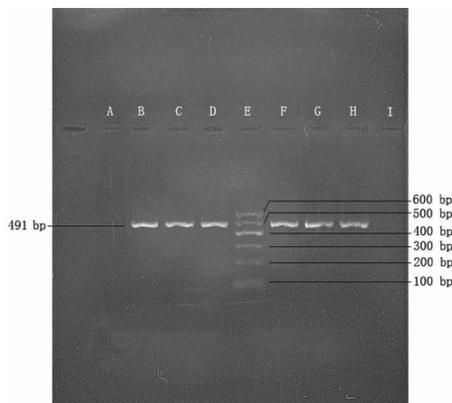
**2.1 整合子检测及分类结果** 在 87 株大肠埃希菌中有 30 株检出整合子,检出率为 34.5%,整合子检测电泳图见图 1。PCR-RFLP 结果显示均为 I 类整合子,未检出 II 类和 III 类整合子,整合子酶切分类电泳图见图 2。

**2.2 I 类整合子与大肠埃希菌耐药和多重耐药的关系** 对 I 类整合子阳性和 I 类整合子阴性的大肠埃希菌的药敏情况(耐药、中介、敏感)进行分析,结果显示:头孢唑啉、头孢噻肟、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦钠、庆大霉素、丁胺卡那霉素共 6 种抗菌药物在整合子阳性组的耐药率明显高于整合子阴性组,并且差异具有统计学意义(P<0.05),详见表 2。

表 2 大肠埃希菌 I 类整合子与耐药类型的关系(%)

抗菌药物	I 类整合子阳性(n=30)		I 类整合子阴性(n=57)		P 值
	耐药率	敏感率	耐药率	敏感率	
氨苄西林	100	0	98.2	0	>0.05
头孢唑啉	83.3	16.7	5.30	24.5	<0.05
头孢噻肟	66.7	33.3	52.6	47.4	<0.05
头孢他啶	30.0	70.0	28.1	71.9	>0.05
头孢吡肟	36.7	63.3	35.9	64.1	>0.05
头孢替坦	0	100	0	100	>0.05
氨基曲南	40	60	40.4	59.6	>0.05
亚胺培南	0	96.7	0	100	>0.05
哌拉西林/他唑巴坦	6.7*	76.6	1.80	96.4	<0.01
头孢哌酮/舒巴坦钠	3.33*	86.7	0	100	<0.05
左氧氟沙星	70.0	30.0	68.4	31.6	>0.05
庆大霉素	76.7*	23.3	64.9	35.1	<0.01
丁胺卡那霉素	10	90	0	100	<0.05

注:与 I 类整合子阴性菌株比较,\* P<0.05。



注:A 为阴性对照;B 为 I 类整合子阳性对照;H 为 II 类整合子阳性对照;C~D,F~G 为阳性标本;I 为阴性标本;E 为 100 bp Marker。

图 1 整合子检测电泳图

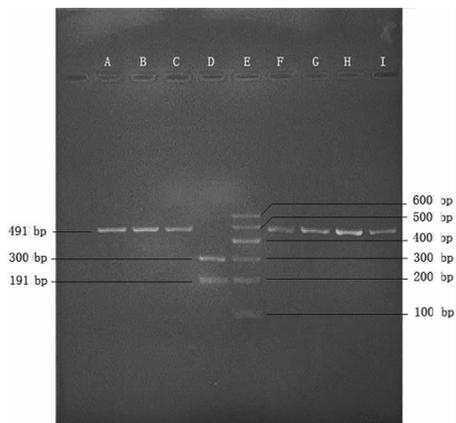
表 3 两组细菌的多重耐药发生率的比较

组别	多重耐药	非多重耐药	合计	多重耐药发生率(%)
整合子阳性	28	2	30	93.3
整合子阴性	36	21	57	63.2
合计	64	23	87	73.6

注:χ<sup>2</sup>=7.72,χ<sub>0.05,1</sub><sup>2</sup>=3.84。

在 I 类整合子阳性的 30 株大肠埃希菌中,多重耐药菌(耐受 3 种以上抗菌药物)有 28 株,占 93.3%;而 I 类整合子阴性的 57 株大肠埃希菌中,多重耐药菌只占 63.2%(36/57)。对两组细菌的多重耐药发生率进行比较,结果显示:I 类整合子

阳性菌株的多重耐药发生率比 I 类整合子阴性菌株高,二者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明整合子与细菌多重耐药的发生有关,见表 3。



注:A 为 I 类整合子阳性对照;D 为 II 类整合子阳性对照;B~C, F~I 为 I 类整合子阳性标本;E 为 100 bp Marker。

图 2 整合子扩增阳性产物酶切后电泳图

### 3 讨 论

大肠埃希菌是引起人类感染最常见的肠杆菌科细菌<sup>[7]</sup>,在泌尿道感染中为主要的致病菌,此外还可引起呼吸道感染、化脓性感染和菌血症等。

本研究结果显示,大肠埃希菌的耐药现象十分普遍,多重耐药菌株占细菌总数的 73.6%,对青霉素类、头孢菌素类、庆大霉素、左氧氟沙星均具有很高的耐药率。敏感率较高的有头孢替坦、亚胺培南、丁胺卡那霉素、头孢哌酮/舒巴坦和哌拉西林/他唑巴坦。

整合子是根据整合酶基因的 DNA 碱基序列的不同而进行分类的,其中研究得较多的、得到公认的有 4 类: I 类、II 类、III 类和 IV 类整合子。I 类、II 类和 III 类整合子与细菌耐药关系比较密切,又常被合称为耐药整合子(resistance integron, RI)。

本研究应用的简并引物可同时扩增整合子 5' 保守区的 I 类、II 类和 III 类整合酶基因,再通过 PCR-RFLP 分析确定整合子的类别,可节省实验时间,降低成本,是一种对大量临床菌株进行整合子筛选的理想方法。

本研究结果显示,大肠埃希菌中整合子的检出率为 34.5%,酶切结果显示均为 I 类整合子,明显低于国内的相关报道<sup>[9-11]</sup>,而高于国外的相关报道,推测主要是与标本的选择和地域差异有关。本研究在收集标本时剔除了耐药表型完全相同的菌株,避免了同一来源菌株的重复收集;国内的相关报道阳性率高达 85%,可能与阳性菌株的暴发流行有关;而国外相关研究的标本来自于不同国家不同医院。本次研究未检出 II 类和 III 类整合子。

整合子具有通过位点特异重组机制整合多个耐药基因盒的能力,介导多药耐药的形成<sup>[12-14]</sup>。本研究中,许多抗菌药在 I 类整合子阳性组的敏感率明显低于 I 类整合子阴性组,并且具有统计学意义;统计结果显示,整合子与细菌多重耐药的发生有关。

大肠埃希菌作为动物和人类肠道中的正常菌群,也是引起人类感染最常见的肠杆菌科细菌,是耐药基因的重要储存库,在整合子和基因盒的传播中发挥着重要的作用。对整合子介导和传播耐药性的研究,有助于理解革兰阴性菌耐药性和多重耐药性的分子基础,进一步探讨参与细菌耐药性的分子机制,

获得整合子、基因盒在大肠埃希菌中的分子流行病学资料,为制定抗菌药物的相关政策、合理使用抗菌药物和控制细菌耐药性发展提供理论基础。

### 参考文献

- [1] Severino P, Magalhaes VD. The role of integrons in the dissemination of anti-biotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil[J]. Res Microbiol, 2002, 153(4): 221-226.
- [2] 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.
- [3] White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(9): 2658-2661.
- [4] Levesque C, Piche L, Larose C, et al. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(1): 185-191.
- [5] Daly M, Buckley J, Power E, et al. Molecular characterization of Irish *Salmonella enterica* serotype typhimurium: detection of class I integrons and assessment of genetic relationships by DNA amplification fingerprinting[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(2): 614-619.
- [6] Didier M, Broderick D, Vera A, et al. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel aad Gene[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1568-1574.
- [7] Sotto A, De Boever CM, Fabbro-Peray P, et al. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 438-444.
- [8] 杜艳, 郭种, 胡莹, 等. 整合子介导的大肠埃希菌临床菌株多重耐药研究[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(2): 88-90.
- [9] Martinez-Freije P, Fluit AC, Schmitz FJ, et al. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds[J]. J Antimicrob Chemother, 1998, 42: 689-696.
- [10] 吴劲松, 卢月梅, 吴伟元, 等. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(12): 1281-1282.
- [11] 吴志鹏, 黄永茂, 王旭, 等. 十二烷基硫酸钠对多重耐药大肠埃希菌 I 类整合子作用的初步探讨[J]. 重庆医学, 2011, 40(22): 2202-2205.
- [12] 蔡敏泓, 黄永茂. 整合子与大肠埃希菌耐药基因水平转移关系的研究进展[J]. 西南军医, 2011, 12(1): 124-126.
- [13] 文道标. 大肠埃希菌 I 类整合子与耐药性分析[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 11(15): 3538-3540.
- [14] 徐彬, 曹弟勇, 周歧新, 等. 大肠埃希菌临床分离株 I 类整合子分布与耐药相关性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(10): 784-787.