

• 论 著 •

多重 PCR 技术在检测鲍曼不动杆菌 β -内酰胺酶基因中的应用*杨培洪^{1,2}, 凌保东^{1△}

(1. 川北医学院药物研究所、药理学教研室, 四川南充 637007; 2. 四川省彭州市人民医院药剂科 611930)

摘要:目的 建立快速、高效检测鲍曼不动杆菌(AB) β -内酰胺酶基因的方法, 探讨 β -内酰胺酶基因与多药耐药性(MDR)的关系。方法 琼脂稀释法检测 90 株 AB 对 20 种常用 β -内酰胺类抗菌剂的最低抑菌浓度; 多重 PCR(M-PCR)技术检测 5 种常见 β -内酰胺酶基因。结果 90 株 AB 对头孢唑啉、氨曲南、头孢噻吩、头孢西丁、氯唑西林、氨苄西林、头孢哌酮的耐药率高达 82.8%~94.2%。64.4% 的 AB 检出 β -内酰胺酶基因, 其中 PER-1 50.0%、AmpC 45.8%、TEM-1 35.1%、SHV-5 22.4%、CTX-M2 6.8%。结论 β -内酰胺酶基因在 AB 中具有较高的检出率, 与其 MDR 密切相关; 所构建 M-PCR 检测体系能同时扩增多个 β -内酰胺酶基因, 是检测耐药基因快速有效的方法。

关键词: 鲍氏不动杆菌; 聚合酶链反应; β -内酰胺酶类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)02-0145-02

The Use of Multiple PCR in the Detection of *Acinetobacter baumannii* β -lactamase GenesYang Peihong^{1,2}, Ling Baodong^{1△}

(1. Institute of Materia Medica and Department of Pharmacology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China; 2. Pharmacy Department, Pengzhou People's Hospital, Sichuan 611930, China)

Abstract: **Objective** To establish a rapid and simple method for detection of β -lactamase genes and to investigate the association of β -lactamase genes with multi-drug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Methods** 90 non-duplicate clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* were collected from the teaching hospital of North Sichuan Medical College. Sensitivity of the 90 clinical strains was detected to 20 kinds of commonly used β -lactam antimicrobial drug. The distribution of five types of β -lactamase genes in these bacteria was analyzed by using multiple PCR. **Results** The resistant rates of 90 strains of *Acinetobacter baumannii* were 82.8%–94.2% to cefazolin, aztreonam, cephalothin, cefoxitin, chlorine cloxacillin, ampicillin and cefoperazone. The multiple PCR results revealed that 64.4% *Acinetobacter baumannii* isolates contained one to four kinds of β -lactamase gene, including genes for PER-1(50.0%), AmpC(45.8%), TEM-1(35.1%), SHV-5(22.4%), and CTX-M2(6.8%). For most antibacterials tested, the resistant rates of β -lactamase gene-positive strains were higher than the negative strains. The incidence of multidrug resistant isolates in β -lactamase gene-positive strains was much higher than those of negative strains. **Conclusion** High incidence of β -lactamase genes was found in *Acinetobacter baumannii* isolates and close association existed between β -lactamase genes and multiple drug resistance. The multiple PCR system can simultaneously amplify different types of β -lactamase genes, which provides a method for rapid detecting of resistance genes in *Acinetobacter baumannii*.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; polymerase chain reaction; β -lactamases

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)为非发酵型革兰阴性条件致病菌, 临床分离率仅次于铜绿假单胞菌, 且多药耐药性(multi-drug resistance, MDR) AB 临床分离率逐年上升^[1-4]。AB 产生 MDR 机制之一是通过分泌多种 β -内酰胺酶水解 β -内酰胺类抗菌剂。本研究采用多重 PCR(multiple PCR, M-PCR)技术检测 β -内酰胺酶基因, 以期建立一种快速、高效检测 β -内酰胺酶基因的方法, 并探讨 β -内酰胺酶基因与 MDR 的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 随机选择川北医学院附属医院微生物室 2007 年 2 月至 2008 年 10 月非重复分离 AB 90 株, 经 Vitek32 全自动微生物分析系统(法国梅里埃)鉴定并确认。质控菌株铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 由四川抗生素工业研究所提供。

1.2 主要试剂和仪器 抗菌剂包括亚胺培南(默沙东), 美罗

培南(住友制药株式会社), 头孢西丁(海南轻骑海药), 氨苄西林(重庆药友制药), 美洛西林(山东天达生物), 头孢唑啉(上海先锋药业), 头孢噻吩(辉南长生生化药业), 头孢曲松、头孢他啶、头孢他啶/舒巴坦、头孢他啶/他唑巴坦、头孢噻肟、头孢噻肟/他唑巴坦(誉衡药业), 头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦、氯唑西林、哌拉西林/舒巴坦、阿莫西林/舒巴坦(哈药集团), 氨曲南、头孢吡肟(施贵宝); 2×Taq PCR master mix 为碧云天公司产品; PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、琼脂糖为 Biorad 公司产品。

1.3 药敏试验 采用琼脂平皿二倍稀释法测定菌株对 20 种抗菌剂的最低抑菌浓度(MIC), 质控菌株为 ATCC27853 和 ATCC25922, 结果判定参照 2006 年美国国家临床实验室标准化委员会公布的相关标准。

1.4 模板制备 挑取琼脂平板上单个菌落于 25 μ L 无菌双蒸水中, 煮沸 15 min, 5 000 g 离心 5 min 后吸上清-70 $^{\circ}$ C 保存

* 基金项目: 国家自然科学基金(No. 30973662)。△ 通讯作者, E-mail: bdling@nsmc.edu.cn。

待测。

1.5 引物合成 采用 Primer5.0 设计 PER-1、AmpC、TEM-1、SHV-5 和 CTX-M2 PCR 引物,由上海生物工程公司合成,见表 1。

表 1 PCR 引物序列			
目的基因	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段(bp)
PER-1	PER-1p1	tgatactgcacctgatcatc	300
	PER-1p2	gctatgttggtactgcatca	
SHV-5	SHV-5p1	ccgcgcgcattaccatgagc	500
	SHV-5p2	ttagcgttgacgtgctcga	
TEM-1	TEM1p1	cggtaagatccttgagagtt	700
	TEM1p2	ttaccaatgctaatacagtg	
CTX-M2	CTX-M2p1	atgatgactcagagcattcg	876
	CTX-M2p2	tcagaaacccgtgggttacga	
AmpC	AmpCp1	tagtacctcaatttatgcgg	1 080
	AmpCP2	tgattcagcacagcataag	

1.6 PCR 反应体系和条件 (1)常规 PCR:反应体系包括上、下游引物各 0.8 μL,2×Taq PCR master mix 10 μL,无菌双蒸水 7.4 μL,模板 DNA 1 μL。扩增条件为 94 ℃ 3 min; 94 ℃

30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,循环 30 次;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。(2)M-PCR:反应体系包括 5 对上、下游引物各 0.4 μL,2×Taq PCR master mix 10 μL,无菌双蒸水 5 μL,模板 DNA 1 μL。扩增条件为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,循环 30 次;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。

1.7 所有 PCR 产物均以 1%琼脂糖凝胶进行电泳,并用凝胶成像系统观察。

2 结 果

90 株 AB 对临床常用 20 种 β-内酰胺类抗菌剂耐药率分别为头孢唑啉 94.2%、氨曲南 92.8%、头孢噻吩 90.0%、头孢西丁 90.0%、氯唑西林 84.7%、氨苄西林 82.8%、头孢哌酮 82.9%、头孢曲松 72.9%、头孢吡肟 72.9%、阿莫西林/舒巴坦 72.8%、头孢他啶 65.7%、美洛西林 64.2%、哌拉西林/舒巴坦 62.8%、头孢噻肟 48.6%、头孢噻肟/他唑巴坦 44.3%、头孢他啶/他唑巴坦 40.0%、头孢他啶/舒巴坦 37.1%、亚胺培南 28.5%、美罗培南 20.0%、头孢哌酮/舒巴坦 5.7%;90 株 AB 对抗菌剂的 MIC50、β-内酰胺酶基因分布及其与 AB 耐药性的关系见表 2;仅 3 株 AB 检测出 4 种 β-内酰胺酶基因,未列出其 MIC50。

表 2 β-内酰胺酶基因分布与鲍曼不动杆菌的耐药性的关系(μg/mL)					
抗菌剂	MIC50	未检出 β-内酰	检出 1 种 β-内酰	检出 2 种 β-内酰	检出 3 种 β-内酰
	(n=90)	胺酶基因 MIC50	胺酶基因 MIC50	胺酶基因 MIC50	胺酶基因 MIC50
		(n=32)	(n=17)	(n=13)	(n=25)
亚胺培南	2	1	2	2	4
美罗培南	2	2	2	2	4
氨苄西林	256	128	32	128	512
美洛西林	512	16	256	256	1 024
氯唑西林	1 024	64	1 024	1 024	1 024
阿莫西林/舒巴坦	64	8	32	32	64
哌拉西林/舒巴坦	64	16	64	64	64
氨曲南	512	256	128	128	256
头孢唑啉	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024
头孢噻吩	1 024	512	1 024	1 024	1 024
头孢西丁	512	128	256	256	1 024
头孢曲松	512	64	128	1 024	512
头孢他啶	128	16	64	256	128
头孢他啶/舒巴坦	32	32	32	32	64
头孢他啶/他唑巴坦	64	16	64	512	1 024
头孢噻肟	32	16	32	32	128
头孢噻肟/他唑巴坦	64	64	64	64	64
头孢哌酮	1 024	256	1 024	1 024	1 024
头孢哌酮/舒巴坦	16	8	32	32	32
头孢吡肟	64	32	32	64	64

3 讨 论

本研究应用 M-PCR 对 90 株 AB 的 5 种 β-内酰胺酶基因进行检测,检出含 1 种 β-内酰胺酶基因为 17 株、含 2 种为 13 株、含 3 种为 25 株、含 4 种为 3 株,其中 PER-1 的检出率最高(50%),同 Vahaboglu 等^[6]的结果基本一致;除 CTX-M2 外,其他 4 种基因的检出率与陈榆等^[6]的报道一致。在 AB 中已有 SHV-5、SHV-12 和 SHV-56 等基因亚型的报道^[5,7-8],本研究检出了 SHV-5 亚型,检出率为 22.4%。药敏试验结果表明 90 株 AB 对氨曲南和第一、二代头孢菌素的耐药率最高,对广谱青霉素、耐酶青霉素、抗铜绿假单胞菌青霉素和第三、四代头孢菌素的耐药率次之,对 β-内酰胺类-β-内酰胺酶抑制剂复方

和碳青霉烯类抗菌剂较敏感^[9]。AB 产生 MDR 与上述 β-内酰胺酶基因密切相关^[6]。本研究表明 β-内酰胺酶基因在 AB 中检出率较高并与 MDR 关系密切,β-内酰胺酶基因阳性株对多种抗菌剂的耐药率高于阴性株,且随着基因检出种类的增多,阳性株 MDR 明显增强,提示 β-内酰胺酶基因检测可为 MDR 的判断提供依据。

M-PCR 是在同一反应体系中加入多对引物并同时检测不同目的基因的方法。以 M-PCR 技术检测 MDR-AB 的多种 β-内酰胺酶基因,快速了解基因存在情况,不仅可为临床诊断和治疗提供依据,也克服了常规 PCR 检测多个 β-内酰胺酶基因低效、费时的缺点^[10-11]。(下转第 149 页)

用本研究中平行(2)模式相关指标临界值筛查静止型 α -地贫,漏诊率较 TIF 标准低 12 倍。本研究结果为临床应用红细胞相关指标有效筛查静止型 α -地贫提供了比较科学的策略,也为地贫高发区,特别是尚未开展 DNA 诊断的医疗保健机构进行地贫遗传咨询提供了具有临床实用价值的科学预测数据,有利于降低临床风险。

参考文献

- [1] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.
- [2] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(2): 139-148.
- [3] Old J, Traeger-Synodinos J, Galanello R, et al. Prevention of Thalassaemias and other haemoglobin disorders (Volume 2: Laboratory Methods)[M]. Oxford: Thalassaemia International Federation Publications, 2004: 2.
- [4] 周玉球, 李文典, 徐湘民. 用于血红蛋白病遗传筛查的实验室诊断技术[J]. 国际遗传学杂志, 2008, 31(1): 17-22.
- [5] 张崇林. 轻型地中海贫血早期诊断中 RBC/MCV 比值的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(7): 654.
- [6] Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders [J]. Blood Rev, 2003, 17(1): 43-53.

- [7] Chan LC, Ma SK, Chan AYY, et al. Should we screen for globin gene mutations in blood samples with mean corpuscular volume (MCV) greater than 80fl in areas with a high prevalence of thalassaemia? [J]. J Clin Pathol, 2001, 54: 317-320.
- [8] Mark G. Receiver-operating characteristic (Roc) plots: Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine [J]. Clin Chem, 1993, 30(4): 561-567.
- [9] 周玉球, 张永良, 李莉艳, 等. 单管多重 PCR 快速检测中国人 3 种常见缺失型 α -地中海贫血基因 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(2): 180-184.
- [10] Chan V, Yam I, Chen FE, et al. A reverse dot-blot method for rapid detection of non-deletion alpha thalassaemia [J]. Br J Haematol, 1999, 104(3): 513-515.
- [11] 余松林. 医学统计学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 164-178.
- [12] 周天红, 张新华, 刘志昂, 等. 轻型地中海贫血和静止型基因携带者平均红细胞体积截断值及应用 [J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(5): 625-627.
- [13] 李亚红, 梁玉全, 岑妙珍, 等. 地中海贫血基因携带者产前筛查及实验室指标的评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 673-680.
- [14] Yeo GS, Tan KH, Liu TC. Screening for beta thalassaemia and HbE traits with the mean red cell volume in pregnant women [J]. Ann Acad Med Singapore, 1994, 23(3): 363-366.

(收稿日期: 2010-05-07)

(上接第 146 页)

M-PCR 虽理论上可在设计过程中排除各引物间形成引物二聚体的可能性,但在应用过程中仍会受引物种类、dNTP、 Mg^{2+} 、缓冲液、DNA 聚合酶等因素影响,更应注意多对引物间量的比例、引物和产物 G、C 含量、扩增反应条件是否一致等,因此需进行大量预试验以探索最佳反应条件,否则仍有可能产生引物二聚体或非目的 DNA 片段^[12]。本研究结果证实所建立的 M-PCR 体系具有较好的准确性和灵敏度,可广泛应用于多个耐药基因的检测,也为耐药基因芯片或快速检测试剂盒的研发和生产提供了依据^[13]。

参考文献

- [1] Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeABC, adeDE and adeIJK, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33(1): 27-32.
- [2] Jin H, Xu XM, Mi ZH, et al. Drug-resistant gene based genotyping for *Acinetobacter baumannii* in tracing epidemiological events and for clinical treatment within nosocomial settings [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(3): 301-306.
- [3] 李文波, 贾晓冬, 张文杰, 等. 鲍曼不动杆菌临床分布及耐药表型检测分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1063-1065.
- [4] 武大伟, 马全珍, 魏殿军, 等. 鲍曼不动杆菌 ESBLs 和金属酶的基因型分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 323-325.
- [5] Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, et al. Widespread detection of

- PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(10): 2265-2269.
- [6] 陈榆, 黄支密, 单浩, 等. 1999~2003 年鲍氏不动杆菌耐药变迁与 β -内酰胺酶表型及基因型检测 [J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(1): 12-17.
- [7] Naas T, Namdari F, Réglier-Poupet H, et al. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(5): 1174-1176.
- [8] 黄支密, 毛培华, 陈榆, 等. 鲍氏不动杆菌 SHV 型 β -内酰胺酶基因分子流行病学研究 [J]. 中国流行病学杂志, 2004, 25(5): 425-427.
- [9] 朱德妹, 张婴元, 汪复, 等. 2008 年上海地区细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(6): 401-411.
- [10] 闫中强, 沈定霞, 罗燕萍, 等. 多重 PCR 方法检测多耐药鲍曼不动杆菌基因型 [J]. 临床检验杂志, 2008, 26(6): 442-424.
- [11] 马真, 蔡绍曦, 佟万成, 等. 多重聚合酶链反应技术快速鉴定鲍曼不动杆菌 [J]. 热带医学杂志, 2009, 9(9): 991-993.
- [12] Elfath EM, Ashshi AM, Cooper RJ, et al. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(4): 559-570.
- [13] 高兴, 王景林. 基因芯片技术在病原细菌检测中的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 100-104.

(收稿日期: 2010-05-04)