

• 基础实验研究论著 •

多重 PCR 和反向线点杂交技术快速检测鲍曼不动杆菌 21 个主动外排基因及临床应用*

金萍¹, 肖克林², 熊礼宽², 卢月梅³, 吴劲松³, 吴丽娟⁴, 招悦¹, 刘纯义^{1△}

(1. 深圳市宝安区妇幼保健院儿科重症监护病房, 广东深圳 518133; 2. 深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室, 广东深圳 518133; 3. 深圳市人民医院检验科, 广东深圳 518000; 4. 深圳市宝安区妇幼保健院检验科, 广东深圳 518133)

摘要:目的 建立一种新的多重 PCR 和反向线点杂交技术(mPCR-RLB)快速同时检测鲍曼不动杆菌 21 个主动外排基因的方法并评价其临床应用价值。方法 根据 GenBank 中收录的多重耐药鲍曼不动杆菌 AYE 株 5 个外排泵蛋白基因家族, 选取其中 21 个基因(4 个来自 MFS 家族, 13 个来自 RND 家族, 2 个来自 MATE 家族, 1 个来自 SMR 家族, 1 个来自 ABC 家族)。设计 22 对引物及寡核苷酸探针(1 对鲍曼不动杆菌通用引物及探针), mPCR 同时扩增 22 个目的基因, PCR 产物再与固定在尼龙膜上的特异性寡核苷酸探针反向线点杂交, 同时检测上述 22 个基因。用该法对 40 株经过鉴定的鲍曼不动杆菌进行检测。结果 除 *cmlA5* 和 *cmlA* 基因未检出阳性外, 其余 19 个外排泵基因均呈阳性。除第 16 号菌株外排泵基因检测阴性外, 其余 39 株鲍曼不动杆菌临床株携带外排泵基因数量从 5~18 个不等。外排系统在多重耐药菌株及相对敏感菌株中均有分布。11 个外排泵基因在多重耐药鲍曼不动杆菌菌株中阳性率明显高于敏感株, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 建立的 mPCR-RLB 技术可快速同时检测鲍曼不动杆菌多个外排泵基因, 短时间内明确菌株携带外排泵基因情况, 对明确其多重耐药性的发生机制、避免药物成为外排泵对象、找到更有效的特异外排系统抑制剂均有重要意义。

关键词:聚合酶链反应; 核酸杂交; 鲍氏不动杆菌; 多重药物流出泵基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)12-1489-05

Rapid detection of 21 active efflux genes of *Acinetobacter baumannii* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization and its clinical application*

Jin Ping¹, Xiao Kelin², Xiong Likuan², Lu Yuemei³, Wu Jinson³, Wu Lijuan⁴, Zhao Yue¹, Liu Chunyi^{1△}

(1. Pediatric Intensive Care Unit, Baoan Maternal & Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China;

2. Central Laboratory, Baoan Maternal & Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China;

3. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China;

4. Department of Clinical Laboratory, Baoan Maternal & Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China)

Abstract: **Objective** To establish a new method for simultaneous rapid detection of 21 active efflux genes of *Acinetobacter baumannii* by using multiplex PCR and reverse line blot hybridization(mPCR-RLB) and evaluate its clinical application value. **Methods** 21 genes(4 from MFS family, 13 from RND family, 2 from MATE family, one from SMR family and one from ABC family) were selected based on GenBank records of 5 efflux pump gene families of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* AYE. 22 pairs of primers and oligonucleotide probes including a pair of universal *Acinetobacter baumannii* primers and probes were designed. mPCR was employed to amplify the 22 target genes simultaneously, and then the PCR products were subjected to reverse line blot hybridization with specific oligonucleotide probes which were fixed on nylon membrane. 22 genes mentioned above were detected simultaneously. The method was utilized to detect 40 strains of identified *Acinetobacter baumannii*. **Results** Except *cmlA5* and *cmlA* gene, 19 efflux pump genes were found to be positive. The numbers of efflux pump genes carried by 39 clinical strains of *Acinetobacter baumannii* were varied from 5 to 18 except the efflux pump gene in the No. 16 strain being negative. Efflux system was found both in multi-drug resistant bacterial strains and relatively sensitive bacterial strains. The positive rate of 11 efflux pump genes in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* strains was markedly higher than that in sensitive strains with statistically significant difference($P < 0.05$). **Conclusion** Established mPCR-RLB technology can be employed to detect numbers of efflux pump genes of *Acinetobacter baumannii* rapidly and simultaneously, and identify the status of bacterial strain carried efflux pump gene in a short time, which is important for clarifying its multi-drug resistant mechanism, avoiding drug being the target of efflux pump and seeking out more effective inhibitors of specific efflux system.

Key words: polymerase chain reaction; nucleic acid hybridization; *Acinetobacter baumannii*; multidrug efflux pump genes

鲍曼不动杆菌目前已成为世界范围频繁引起医院感染暴发流行的重要条件致病菌。其多重耐药(MDR)甚至泛耐药(PDR)现象日趋严重, 给治疗带来极大困难, 已成为一个全球

范围的严重临床问题^[1-3]。近年来, 多重药物外排泵由于其底物广泛, 与多重耐药的关系越来越多地引起人们关注^[4]。随着鲍曼不动杆菌基因组序列的公布, 进一步增进了人们对耐药机

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2010561)。作者简介: 金萍, 女, 副主任医师, 主要从事感染和危重症研究。

△ 通讯作者, E-mail: chunyi618@163.com。

制的认识^[5-8]。Fournier 等^[9]在 MDR 鲍曼不动杆菌 AYE 株上,发现一个 86 kb 大小“耐药岛(*AbaR1*)”,它包含 25 个抗生素、20 个防腐剂及重金属的抗性基因,还发现 41 个与外排泵有关的基因。常规采用 PCR 检测鲍曼不动杆菌耐药基因,虽然结果可靠,但每次检测 1 个耐药基因,操作量大,且琼脂糖凝胶电泳染料对人体有毒害作用。本研究借助于多重聚合酶链反应(mPCR)和反向线点杂交技术(RLB),建立了同时快速检测鲍曼不动杆菌 21 个主动外排基因的方法,并利用其检测了 40 株临床分离的鲍曼不动杆菌,快速确定这些外排系统在临床菌株中的分布情况,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 40 株鲍曼不动杆菌(排除同一患者同一部位重复分离的菌株)均来自深圳市人民医院检验科细菌室菌种库,菌株鉴定采用 VITEK 系统(Bio-Merieux,法国)。

1.2 仪器与试剂 HotStart Taq 酶(澳大利亚 Qiagen 公司),EDAC(澳大利亚 Sigma 公司),化学发光增强(ECL)显影剂(德国 Roche 公司),链亲和素过氧化物酶接合物(POD)(德国 Roche 公司),16%EDAC,0.1 mol/L NaOH,0.5 mol/L NaHCO₃(pH8.4),0.5 mmol/L EDTA(pH8.0),20 mmol/L ED-

TA,2×SSPE,2×SSPE/0.1%SDS,2×SSPE/0.5%SDS,PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司),Biobyne C 尼龙膜(美国 Pall 公司),Miniblotter(美国 Immunetics 公司),Shellab 杂交箱(美国 Thermo 公司)和高敏 X 光底片(美国 Amersham 公司)。

1.3 方法

1.3.1 建立序列库 根据 GenBank 中收录的 MDR 鲍曼不动杆菌 AYE 株 5 个外排泵蛋白基因家族^[9],选取其中 21 个基因(4 个来自 MFS 家族,13 个来自 RND 家族,2 个来自 MATE 家族,1 个来自 SMR 家族,1 个来自 ABC 家族),下载上述 21 个外排泵基因各自序列保守片断并建立序列库。

1.3.2 设计特异性引物和探针 使用美国 PubMed 和澳大利亚生物数据库(Australilan National Genomic Information Service)Biomanager,进行 22 对引物(包括 1 对种特异引物)和 22 个探针(包括 1 个种特异探针)的设计和比较,应用 Sigma 软件检测引物和探针序列的特性,包括引物和探针的长度、Tm 值,有无二级结构及是否会形成二聚体等,并通过 BLASTn 确定特异性。所有探针的 5'端用氨基标记,使之能共价结合于尼龙膜上,引物 5'端用生物素标记,引物和探针由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,见表 1~2。

表 1 鲍曼不动杆菌 1 对种特异引物和 21 对外排泵基因特异性引物信息

引物*	靶基因	外排泵 基因家族 [#]	Tm(℃)	GenBank 序列号	引物序列(5'~3')	产物片段 大小(bp)
AbrecASb	<i>A. baumannii</i>	—	67.29	L26100	CCTGAATCTTCTGGTAAAAC	424
AbrecAAb	<i>A. baumannii</i>	—	55.28	L26100	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	
1_173Sb	<i>cmlA5</i>	MFS 家族	63.87	CT025832	ATGGAGTGCCAAAGGTGAAC	125
1_173Ab	<i>cmlA5</i>	MFS 家族	67.17	CT025832	CAGACCGAGCACGACTGTTG	
1_88Sb	<i>cmlA</i>	MFS 家族	63.83	CT025832	TTATGGCTCCCTTCGACATC	138
1_88Ab	<i>cmlA</i>	MFS 家族	64.09	CT025832	ACACCGAGCATCACCATGTA	
10_186Sb	<i>norM</i>	MFS 家族	63.46	CT025781	TAAGGCTTCGGCTTATCGAA	101
10_186Ab	<i>norM</i>	MFS 家族	63.71	CT025781	AAACCAATTGGCAGACCAAG	
12_508Sb	MFS 12_508	MFS 家族	63.61	CT025783	CTTGTTGGGTATGCCGCTTAT	101
12_508Ab	MFS 12_508	MFS 家族	63.72	CT025783	CGGGAAGTGTGCTAAACCAT	
29_139Sb	<i>qacEdelta1</i>	SMR 家族	63.48	CT025799	GATTGCCTATGCCATTTGGT	100
29_139Ab	<i>qacEdelta1</i>	SMR 家族	63.64	CT025799	ACCAATGCAGGCAGCTAAGT	
36_503Sb	MATE 36_503	MATE 家族	63.93	CT025821	TGGACGTTGTTGCATTTTGT	133
36_503Ab	MATE 36_503	MATE 家族	63.71	CT025821	ATAAGCCGAGGCAATTGATG	
36_127Sb	MATE 36_127	MATE 家族	63.47	CT025818	CAATGGCCGGTTTAGTCATT	145
36_127Ab	MATE 36_127	MATE 家族	63.91	CT025818	TTGTGCTGCAAAGATTGAGG	
2_694Sb	ABC 2_694	ABC 家族	64.20	CT025804	TGGTCAACTTGCACAAGAG	130
2_694Ab	ABC 2_694	ABC 家族	63.81	CT025804	ATGGTTCCATTGGTTTTGGA	
32_431Sb	<i>adeA</i>	RND 家族	63.77	CT025811	TCGCTCAAATGAAAGCATTG	147
32_431Ab	<i>adeA</i>	RND 家族	63.85	CT025811	ATGGTTGCCATCGTATTGGT	
32_436Sb	<i>adeB</i>	RND 家族	63.92	CT025812	ATGCCATTGTTGTCGTTGAA	135
32_436Ab	<i>adeB</i>	RND 家族	63.61	CT025812	AATACTGCCGCCAATACCAG	
32_437Sb	<i>adeC</i>	RND 家族	63.72	CT025813	CAGCCGGTTTACCAAGTGAT	125
32_437Ab	<i>adeC</i>	RND 家族	63.70	CT025813	TCAGGCTTATGGTTGGGAAC	
32_497Sb	<i>adeR</i>	RND 家族	63.39	CT025814	ACGCCAAAAAGCTCAGACTC	140
32_497Ab	<i>adeR</i>	RND 家族	64.02	CT025814	GCCTGAACTCTAGCGACGAC	
32_498Sb	<i>adeS</i>	RND 家族	63.87	CT025815	TTAGTCACGGCGACCTCTCT	149
32_498Ab	<i>adeS</i>	RND 家族	64.33	CT025815	CATGTGCGATAGCTGCATTC	
16_10Sb	<i>adeI</i>	RND 家族	63.73	CT025787	GTAGCAAAGGCTCCGATGAG	129
16_10Ab	<i>adeI</i>	RND 家族	63.74	CT025787	GCTGAAGTACGGCCTGAAAG	
16_18Sb	<i>adeJ</i>	RND 家族	63.97	CT025788	TCATGACCACCTAGCCTTC	106

续表 1 鲍曼不动杆菌 1 对种特异引物和 21 对外排泵基因特异性引物信息

引物*	靶基因	外排泵 基因家族 [#]	Tm(℃)	GenBank 序列号	引物序列(5′~3′)	产物片段 大小(bp)
16_18Ab	<i>adeJ</i>	RND 家族	63. 92	CT025788	TACGCCACCAAGTACACCAA	106
16_20Sb	<i>adeK</i>	RND 家族	63. 91	CT025790	ACCGCTCAGCAACGTCTAGT	
16_20Ab	<i>adeK</i>	RND 家族	64. 10	CT025790	CGCTGTGCATCAAGAACTGT	
10_632Sb	RND 10_632	RND 家族	63. 86	CT025782	TCTCGCCGAGCTTTAGATGT	146
10_632Ab	RND 10_632	RND 家族	63. 61	CT025782	TGCGTTTTTCTCGGCTAACT	120
17_36Sb	<i>nolF</i>	RND 家族	63. 60	CT025792	GCAATCAGGGACAAACCATT	
17_36Ab	<i>nolF</i>	RND 家族	63. 79	CT025792	TATCGTTGCTCAACCACTCG	
5_879Sb	RND 5_879	RND 家族	63. 61	CT025827	GCGCAAATTACCTCAATGGT	106
5_879Ab	RND 5_879	RND 家族	63. 93	CT025827	GCATCACGGTCATCAATACG	125
29_167Sb	RND 29_167	RND 家族	63. 61	CT025801	CGTCTACGTTTACGCCCAAT	
29_167Ab	RND 29_167	RND 家族	63. 74	CT025801	ACCGAAGAATACGGCAACAC	
36_440Sb	RND 36_440	RND 家族	63. 92	CT025820	CAATGACATTCGCCATGAAC	142
36_440Ab	RND 36_440	RND 家族	63. 73	CT025820	GCAAACGATCGGCATATTCT	

* : A 代表正向, S 代表反向, b 代表生物素标记的引物; [#] : 多药及毒物外排(MATE)家族, ATP 结合盒(ABC)超家族, 小多重耐药(SMR)家族, 主要易化因子(MFS)超家族, 耐药-结节-细胞分化(RND)家族; — : 该基因不属于外排泵家族。

表 2 鲍曼不动杆菌 1 个种特异和 21 个外排泵基因特异性寡核苷酸探针信息

探针*	靶基因	外排泵家族 [#]	Tm(℃)	Genbank 序列号	探针序列(5′~3′)
AbrecASp	<i>A. baumannii</i>	—	57. 60	L26100	AATTACGGGTAATGCTAAACGTTTC
1_173Sp	<i>cmlA5</i>	MFS 家族	63. 28	CT025832	GTCGTGTACTGTTTGACCCTTG
1_88Sp	<i>cmlA</i>	MFS 家族	63. 85	CT025832	TAATCCAACTCACGTTGAGCC
10_186Sp	<i>norM</i>	MFS 家族	62. 08	CT025781	TGACTTGGGTTAAAAGAATTTTACAG
12_508Sp	MFS 12_508	MFS 家族	62. 36	CT025783	TGAAGCTAACGAGTGTGCAAT
29_139Sp	<i>qacEdelta1</i>	SMR 家族	61. 51	CT025799	GCTGGATATTTTACAAACAACATTTAG
36_503Sp	MATE 36_503	MATE 家族	61. 70	CT025821	CGGTTTCATGTTTATTTTTCCTT
36_127Sp	MATE 36_127	MATE 家族	60. 87	CT025818	AGCGATTTCGATCTCTATCG
2_694Sp	ABC 2_694	ABC 家族	61. 52	CT025804	AAGCTCTTACGTGCTGAATCA
32_431Sp	<i>adeA</i>	RND 家族	66. 61	CT025811	AAGGTGCATTGGTCGGTCA
32_436Sp	<i>adeB</i>	RND 家族	61. 41	CT025812	AGCCCATTATTGGTATTACG
32_437Sp	<i>adeC</i>	RND 家族	62. 32	CT025813	CAAATATTGGTGCTGCTAAAGC
32_497Sp	<i>adeR</i>	RND 家族	62. 78	CT025814	GAAGCCTTTTAACCCAAATGAA
32_498Sp	<i>adeS</i>	RND 家族	64. 63	CT025815	TCAAAAATGCGCAGGTTTG
16_10Sp	<i>adeI</i>	RND 家族	62. 39	CT025787	ACAAAGTGTTGAACAAAGCGTT
16_18Sp	<i>adeJ</i>	RND 家族	63. 72	CT025788	GGAAGTCAGCACTCTGTAGGCT
16_20Sp	<i>adeK</i>	RND 家族	61. 29	CT025790	CGTGCTGGTATTGATAGTTACTTG
10_632Sp	RND 10_632	RND 家族	60. 88	CT025782	AAAGCAAACCTTGATTAAGTCCAGTA
17_36Sp	<i>nolF</i>	RND 家族	61. 51	CT025792	AATCAAACAATTCAAGTCAAAA
5_879Sp	RND 5_879	RND 家族	68. 58	CT025827	CGCGGTGATGTGCTGGTT
29_167Sp	RND 29_167	RND 家族	66. 65	CT025801	TCTGAAATGCGACATGCGAT
36_440Sp	RND 36_440	RND 家族	64. 06	CT025820	CTTTGACTACGCGCTTTTGAA

* : A 代表正向, S 代表反向, p 代表 5′端用氨基标记的特异性寡核苷酸探针; [#] : 多药及毒物外排(MATE)家族, ATP 结合盒(ABC)超家族, 小多重耐药(SMR)家族, 主要易化因子(MFS)超家族, 耐药-结节-细胞分化(RND)家族; — : 该基因不属于外排泵家族。

1.3.3 模板制备 使用快速裂解方法,直接挑取菌落于 200 μL 样品预处理液中,旋涡振荡 30 s,充分混匀后置 100 ℃ 10 min,取出,13 000 r/min 离心 5 min,取上清 20 μL 即为 DNA 模板,—20 ℃保存。

1.3.4 mPCR 反应 对鲍曼不动杆菌及外排泵基因特异序列进行扩增。反应体积 28 μL,包括 22 个正向(50 pmol/L)和 22 个反向(50 pmol/L)引物各 0. 075 μL,2. 4 μL dNTPs(每个 dNTP 为 2. 5 mmol/L),3 μL 10×PCR 缓冲液(1. 5 mmol/L MgCl₂),4. 2 μL 25 mmol/L MgCl₂(终浓度 4. 5 mmol/L),0. 2

μL Hotstar Taq DNA 聚合酶(5 U/L)和 2 μL DNA 模板。反应条件参考文献[10],95 ℃ 15 min 后再 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s 和 72 ℃ 1 min,35 个循环,最后 72 ℃ 10 min。

1.3.5 标膜及探针标记^[10] 用 0. 5 mol/L NaHCO₃(pH8. 4)稀释鲍曼不动杆菌种特异性探针及 21 个外排泵基因探针至 10 μmol/L 浓度。室温下将 Biodyne C 膜于 16% EDAC 中孵育 10 min,洗膜 1~2 min。将膜放入 Miniblotter 中,分别依次加入 145~147 μL 已稀释的探针,0. 5 mol/L NaHCO₃ 加入第 1 道及第 24 道作为阴性对照,鲍曼不动杆菌种特异性探针加

入第 2 道及第 25 道作为阳性对照。室温孵育 5 min。将膜放入 0.1 mol/L NaOH 液中灭活 9 min。2×SSPE 洗膜 1~2 min 后用 60 ℃ 2×SSPE/0.1%SDS 液孵育膜 5 min,再在室温下用 20 mmol/L EDTA 孵育 20 min。密封 4 ℃ 保存。

1.3.6 RLB 杂交^[10] 取 20 μL PCR 产物与 150 μL 2×SSPE/0.1%SDS 液混匀,100 ℃,10 min。快速置冰浴。于 Miniblotter 中分别依次加入上述混合液,60 ℃,60 min,使生物素标记 PCR 产物与特异的相应探针在尼龙膜上进行斑点杂交。用 60 ℃ 2×SSPE/0.5%SDS 液洗膜 2×10 min。杂交后的尼龙膜在 2×SSPE/0.5%SDS 和 POD(500 U/mL)混合液中孵育 42 ℃,60 min,利于 POD 结合在 PCR 产物上。用 42 ℃ 2×SSPE/0.5%SDS 洗膜 2×10 min。室温下用 2×SSPE 洗膜 2×5 min。加 ECL 显影剂于膜上 2 min,感光 X 胶片覆盖膜上置于暗盒内曝光 5 min 后冲洗胶片显影。阳性标本位置可见背景下黑色信号出现在格中。

1.3.7 特异性检测 40 株鲍曼不动杆菌临床分离株。对 mPCR-RLB 方法确定的阳性标本,选取其中部分如 *adeB*、*adeR* 及 *adeS* 阳性菌株用单步 PCR 分别扩增出目的片段后进行序列测定(广州达晖生物技术有限公司进行),与 GenBank 发表序列相比较。

1.3.8 药敏试验 采用 K-B 法测定 40 株鲍曼不动杆菌对临床常用的 14 种抗生素的抑菌环直径,根据 CLSI 2008 年版的标准^[11]进行判读。抗菌药物哌拉西林(PIP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢吡肟(FEP)、头孢曲松(CRO)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)和复方磺胺甲噁唑(SXT)药敏纸片及 MH 培养基均购自英国 Oxoid 公司。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 购自中国药品生物制品检定所。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计数资料采用卡方检验。

2 结 果

2.1 mPCR-RLB 特异性 经 VITEK 系统鉴定为鲍曼不动杆菌的 40 株临床株均与鲍曼不动杆菌种特异探针杂交,而与阴性对照无反应,显示了特异的杂交模式。对于 mPCR-RLB 阴性结果进行单项 PCR 检测排除假阴性。对于阳性结果随机挑选部分进行基因测序。选取 *adeB*、*adeR* 及 *adeS* 阳性菌株用常规 PCR 分别扩增出目的片段后进行序列测定,应用 NCBI 中的 BLASTn 软件进行比对分析,结果与 GenBank 中 AF370885 鲍曼不动杆菌 *adeB*、*adeR* 及 *adeS* 基因同源性达 100%。

2.2 mPCR-RLB 结果 应用 mPCR-RLB 技术检测 21 个外排泵基因在 40 株鲍曼不动杆菌临床分离株中的分布,结果显示:除 *cmlA5* 和 *cmlA* 基因未检出阳性外,其余 19 个外排泵基因均有阳性携带株;除第 16 号菌株外排泵基因检测阴性外,其余 39 株鲍曼不动杆菌临床株携带外排泵基因数量从 5~18 个不等,菌株外排泵基因的携带率从 23.8%~85.7%。MFS 家族的 *norM*、MATE 家族的 *MATE 36_127*、ABC 家族的 *ABC 2_694*、RND 家族的 *adeC*、*adeI*、*adeJ*、*adeK*、*nolF*、RND 10_632、RND 36_440 及 RND 5_879,多重耐药鲍曼不动杆菌菌株所携带以上外排泵基因的阳性率明显高于敏感株,11 个外排泵基因的携带率差异均具有统计学意义($P<0.05$),6 个外排泵基因在 40 株临床株中阳性率在 90%以上:*adeI*、RND 5_879、RND 29_167、MATE 36_503、*qacEdelta1* 和 RND 10_632;在 MDR 菌株中表达阳性率 100.0%的是:MATE 36_503、*adeI*、RND 10_632、RNA 5_679 和 RND 29_167。见表 3。

2.3 临床菌株的药物敏感性 40 株鲍曼不动杆菌中 20 株为多重耐药菌株(至少对 β-内酰胺类、碳青霉烯类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类中的 3 种药物同时耐药),20 株为敏感菌株。

表 3 40 株鲍曼不动杆菌菌株 21 个外排泵基因的携带情况及检测阳性率(%)

外排泵蛋白家族	基因	总阳性率($n=40$)	多重耐药鲍曼不动杆菌($n=20$)	敏感鲍曼不动杆菌($n=20$)
MFS 家族	<i>norM</i>	65.0	85.0*	45.0
MFS 家族	MFS 12_508	72.5	95.0	50.0
MFS 家族	<i>cmlA5</i>	0.0	0.0	0.0
MFS 家族	<i>cmlA</i>	0.0	0.0	0.0
MATE 家族	MATE 36_503	92.5	100.0	85.0
MATE 家族	MATE 36_127	65.0	90.0*	40.0
ABC 家族	ABC 2_694	25.0	10.0*	40.0
SMR 家族	<i>qacEdelta1</i>	92.5	95.0	90.0
RND 家族	<i>adeA</i>	37.5	20.0	35.0
RND 家族	<i>adeB</i>	7.5	10.0	5.0
RND 家族	<i>adeC</i>	40.0	70.0*	10.0
RND 家族	<i>adeR</i>	55.0	55.0	55.0
RND 家族	<i>adeS</i>	35.0	40.0	30.0
RND 家族	<i>adeI</i>	97.5	100.0*	95.0
RND 家族	<i>adeJ</i>	75.0	95.0*	55.0
RND 家族	<i>adeK</i>	72.5	90.0*	55.0
RND 家族	RNA 10_632	90.0	100.0*	80.0
RND 家族	<i>nolF</i>	67.5	90.0*	45.0
RND 家族	RND 36_440	67.5	90.0*	45.0
RND 家族	RND 5_879	97.5	100.0*	95.0
RND 家族	RND 29_167	95.0	100.0	85.0

*: $P<0.05$,与敏感鲍曼不动杆菌比较。

3 讨 论

主动外排系统广泛存在于革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌及哺乳类细胞中,它可以将底物排出细胞外,从而保护细胞免受毒性生物分子的侵害。细菌外排泵作用除导致临床耐药之外,与细菌致病性也有关(在宿主体内的定植与生存)^[12-13]。

近年研究证实有 5 个外排泵蛋白家族参与细菌多重耐药^[14]:MATE 家族、ABC 超家族、SMR 家族、MFS 超家族、RND 家族。上述 5 个外排泵蛋白家族分别被相应基因家族编码。AdeABC 外排系统与细菌对氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素、红霉素、氯霉素、甲氧苄啶,甚至替环吉素耐药有关^[15-16]。AdeIJK 外排系统与细菌对喹诺酮类、 β 内酰胺类、林可霉素、四环素、氯霉素、红霉素、利福霉素及甲氧苄啶耐药有关^[17]。AdeDE 外排系统细菌对与阿米卡星、环丙沙星、头孢他啶、美罗培南、氯霉素、红霉素、四环素及利福霉素耐药有关^[18]。国内外目前对外排泵蛋白家族的研究主要集中在 RND 家族^[4,14,19-21],与已知的 AYE 菌株上众多外排泵蛋白家族相比数量有限,不能全面反映这些外排系统在鲍曼不动杆菌临床菌株中的分布状况,其研究基因数量有限与通常采用相对传统检测方法有关。

mPCR-RLB 技术具有能同时检测多个基因,具有高通量的特点,已成功地应用于多种病原的检测与鉴别^[22-23]。本研究将 5' 端用氨基标记的特异性寡核苷酸探针共价结合在尼龙膜上制备成膜芯片,用 mPCR 方法扩增出生物素标记产物,POD 标记后的 PCR 产物与特异的相应探针在尼龙膜上进行反向线点杂交,进行化学发光检测。与同位素标记探针结合放射性自显影技术相比,该技术无放射性污染。化学发光检测具有检测信号放大作用,其敏感度较高。从检测结果看,21 个外排泵基因除 *cmlA5* 和 *cmlA* 基因未检出阳性外,其余 19 个外排泵基因均有阳性携带株,这些外排泵基因检出率分别为:MFS 家族(65.0%~72.5%)、MATE 家族(65.0%~92.5%)、ABC 家族(25.0%)、SMR 家族(92.5%)及 RND 家族(7.5%~97.5%)。除第 16 号菌株外排泵基因检测阴性外,其余 39 株鲍曼不动杆菌临床株携带外排泵基因数量从 5~18 个不等,外排系统在多重耐药菌株及敏感菌株中均有分布。但 AdeABC 外排系统在本次研究中并未显示出优势,而 AdeIJK 却显示高检测率,尤其在 MDR 鲍曼不动杆菌与相对敏感鲍曼不动杆菌中携带率差异有统计学意义($P < 0.05$)。张静萍等^[20]研究显示 *adeSR-adeABC* 具有高检测率。Hou 等^[4]研究提示对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌超过 80% 携带 *adeB*、*adeR*、*adeS*、*adeJ* 及 *adeM* 基因。本研究结果与上述研究结果有一定差异,与临床菌株本身存在表型或基因型的地域差异有关,耐药机制也可能存在地域差异。

多重耐药鲍曼不动杆菌菌株所携带 11 个外排泵基因阳性率明显高于敏感株,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。6 个外排泵基因在 40 株临床株中表达阳性率在 90% 以上:*adeI*、RND 5_879、RND 29_167、MATE 36_503、*qacEdelta1* 和 RND 10_632;5 个外排泵基因在 MDR 菌株中表达阳性率 100%:MATE 36_503、*adeI*、RND 10_632、RNA 5_679 和 RND 29_167。国内有学者进一步采用实时荧光定量 PCR 技术比较了敏感菌株和多重耐药菌株 *adeA* 与 *adeJ* 基因的 mRNA 相对表达水平,结果显示多重耐药菌株这 2 种基因的 mRNA 表达水平显著提高^[24]。

本研究率先将 mPCR-RLB 技术用于鲍曼不动杆菌的外排系统研究,建立了同时检测鲍曼不动杆菌多个主动外排基因的

方法,并对 40 株临床分离株进行了检测,确定 40 份标本中多个主动外排基因的分布情况,随机选取部分阳性结果进行序列测定以验证。结果表明,检测鲍曼不动杆菌外排基因的 mPCR-RLB 方法快速、特异、准确,在短时间内了解病原菌携带多个外排泵基因情况,必将对明确其多重耐药性的发生机制、避免药物成为外排泵对象、找到更有效的特异外排系统抑制剂具有重要意义。

致谢:引物和探针的设计在悉尼大学感染性疾病和微生物中心孔繁荣博士指导下完成;40 株临床分离株由肖克林副主任技师在悉尼大学感染性疾病和微生物中心完成,在此对孔繁荣博士和悉尼大学感染性疾病和微生物中心表示感谢。

参考文献

- [1] Munoz-Price LS, Weinstein RA. Acinetobacter infection[J]. N Engl J Med, 2008, 358(12): 1271-1281.
- [2] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.
- [3] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471-3484.
- [4] Hou PF, Chen XY, Yan GF, et al. Study of the correlation of imipenem resistance with efflux pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in clinical isolates of Acinetobacter baumannii[J]. Chemotherapy, 2012, 58(2): 152-158.
- [5] Adams MD, Goglin K, Molyneux N, et al. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. J Bacteriol, 2008, 190(24): 8053-8064.
- [6] Iacono M, Villa L, Fortini D, et al. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant acinetobacter baumannii strain belonging to the European clone II group[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(7): 2616-2625.
- [7] Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, et al. New insights into Acinetobacter baumannii pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis[J]. Genes Dev, 2007, 21(5): 601-614.
- [8] Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, et al. Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles[J]. PLoS One, 2008, 3(3): e1805.
- [9] Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii[J]. PLoS Genet, 2006, 2(1): e7.
- [10] 熊礼宽, 程锦泉, 向华国, 等. PCR-反向线点杂交技术鉴定慢生长分支杆菌的方法学研究[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(8): 867-871.
- [11] CLSI. M100-S18 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2008.
- [12] Buckley AM, Webber MA, Cooles S, et al. The AcrAB-TolC efflux system of salmonella enterica serovar typhimurium plays a role in pathogenesis[J]. Cell Microbiol, 2006, 8(5): 847-856.
- [13] Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8): 629-636.
- [14] Wicczorek P, Sacha P, Hauschild T, et al. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii—the role of AdeABC(RND family) efflux pump in resistance to antibiotics[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(3): 257-267.
- [15] Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-(下转第 1496 页)

2.4 重组蛋白 Western blot 鉴定 以患者 EV71 阳性血清为一抗(1:500),以 HRP 标记的羊抗人 IgM(1:5 000)为二抗,在 48×10³ 处出现阳性条带。见图 4。

3 讨 论

自 1974 年 Schmidt 等^[7]首次报道从表现为中枢神经系统症状的患者标本中分离到 EV71 后, EV71 的流行在不同的国家或地区相继被报道,近十年来 HFMD 在亚太地区的发病率显著增加,而在过去 3 年,中国 HFMD 流行的持续增加,已经使其成为不可忽视的公共健康问题,由于缺乏有效的针对重症 EV71 感染的抗病毒药物,发展预防 HFMD 的有效疫苗成为控制 EV71 感染的首选。

EV71 病毒颗粒为 20 面体立体对称的球形结构,无包膜和突起,直径 24~30 nm。病毒衣壳由 60 个亚单位构成,每个亚单位是由 4 种衣壳蛋白(VP1~VP4)组装而成,其中 VP4 位于衣壳的内侧,VP1~VP3 均暴露在病毒颗粒的表面,带有中和抗原位点,因而抗原决定簇主要位于这 3 种结构蛋白上^[8]。

以往用动物感染模型开发疫苗的研究中,发现多数中和抗体是由位于 VP1 蛋白上的抗原决定簇所引起,因而大部分相关研究均集中于 VP1 蛋白,然而 VP2 和 VP3 作为 EV71 病毒颗粒的重要组分,暴露在 EV71 病毒衣壳的外部存在一定的免疫压力,在感染过程中它们必然会引起一定的免疫反应。

急性病毒感染时都会产生一定抗原决定簇诱导的 IgM 反应(IgM 反应作为早期疾病诊断的重要标志)。然而几乎所有已知的位于 VP1 的抗原决定簇仅是诱导 IgG 反应,而 IgG 作为保护性抗体出现在 IgM 之后,两者相比较, IgM 出现早消失快, IgG 出现晚消失慢,血清学诊断 EV71 IgG 阳性的病例往往有一部分为既往隐性感染的儿童, EV71 急性期感染的确诊主要还是依靠 IgM, IgM 对于早期诊断更有意义。已有相关文献报道, IgM 的抗原决定簇主要位于 VP2 和 VP3 衣壳蛋白上, VP1 上仅有 1 个引出强烈 IgM 反应的多肽位点,而另一个位于 VP1 的多肽位点本研究采用 pET32a(+)/BL21 大肠杆菌表达体系高效表达的 EV71 衣壳蛋白 VP2,获得具有诊断价值的重组 VP2 抗原, Western blot 实验的阳性结果,确认 VP2 抗

原上有与 EV71 IgM 抗体结合的位点,进一步确认了 VP2 上存在 IgM 的抗原决定簇, IgM 在病毒感染后出现较早,是 EV71 急性期感染的一个重要指标,本研究成功表达了具有 EV71 病毒 IgM 抗原决定簇的 VP2 蛋白,为进一步研制用于临床 EV71 病毒感染早期血清学诊断的试剂盒及病毒疫苗的研制提供了参考。

参考文献

[1] Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases[J]. J Neurovirol, 2005, 11(5):424-433.
[2] Kiener TK, Jia Q, Lim XF, et al. Characterization and specificity of the linear epitope of the enterovirus 71 VP2 protein[J]. Virol J, 2012, 9(1):55.
[3] Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. Scavenger receptor b2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases[J]. Front Microbiol, 2012, 3(1):32.
[4] Chan LG, Parashar UD, Lye MS, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease[J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(3):678-683.
[5] 朱冰, 钟家禹, 夏慧敏, 等. 2008 年广州地区手足口病的病原学研究[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(2):127-130.
[6] Wang SM, Liu CC, Tseng HW, et al. Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological[J]. Lancet, 1999, 354(9191):1682-1686.
[7] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patient with disease of the central nervous system[J]. J Infect Dis, 1974, 129(3):304-309.
[8] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001:606-613.
[9] Gao F, Wang YP, Mao QY, et al. Enterovirus 71 viral capsid protein linear epitopes: Identification and characterization[J]. Virol J, 2012, 9(1):26.

(收稿日期:2013-01-07)

(上接第 1493 页)

nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12):3375-3380.
[16] Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, et al. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(8):1589-1593.
[17] Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii* [J]. Anti-microb Agents Chemother, 2008, 52(2):557-562.
[18] Chau SL, Chu YW, Houang ET. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(10):4054-4055.
[19] 董涛, 王睿, 童卫杭, 等. 51 株鲍曼不动杆菌耐药表型及外排蛋白基因表达研究[J]. 中国药房, 2007, 18(13):979-981.

[20] 张静萍, 朱婉, 褚云卓, 等. 鲍曼不动杆菌多重耐药性与主动外排机制的相关性研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(3):244-247.
[21] 林丽, 周岐新, 凌保东. 鲍曼不动杆菌主动外排系统 AdeABC、AdeIJK 与多重耐药相关性[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(2):100-103.
[22] Kong F, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)—a practical epidemiological and diagnostic tool[J]. Nat Protoc, 2006, 1(6):2668-2680.
[23] Wang Y, Kong F, Yang Y, et al. A multiplex PCR-based reverse line blot hybridization(mPCR/RLB) assay for detection of bacterial respiratory pathogens in children with pneumonia[J]. Pediatr Pulmonol, 2008, 43(2):150-159.
[24] 朱晓华, 周岐新, 凌保东. 鲍曼不动杆菌耐药表型与外排泵基因表达水平的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(2):138-142.

(收稿日期:2013-01-05)