

• 论 著 •

## LAMP 法检测耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 OXA-23 基因的研究\*

邓正华, 温先勇, 刘靳波, 彭 璜, 唐 敏

(泸州医学院附属医院检验科, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 建立一种简便、快速、特异、灵敏的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)OXA-23 基因分子检测方法,并用于临床标本检测,以便了解产 OXA-23 酶 CRAB 的耐药分布状况。**方法** 运用环介导等温扩增技术(LAMP),利用 PrimerExplorer 4.0 软件设计一套特异引物检测 CRAB 的 OXA-23 基因。通过优化 LAMP 检测方法的实验条件,应用 SYBR Green I 作为 LAMP 反应荧光显色物质,然后通过肉眼目测或电泳检测比较结果。同时,应用 LAMP 检测该院自 2013 年 12 月至 2014 年 3 月收集分离的 41 株多重耐药鲍曼不动杆菌。**结果** CRAB 的 OXA-23 基因菌株 LAMP 反应电泳产生了阶梯状条带,而其他不同菌株和阴性对照没有条带;向扩增产物中加入 1  $\mu$ L SYBR Green I,CRAB 的 OXA-23 基因菌株 LAMP 扩增产物的颜色由橙色变为绿色,而其他不同菌株和阴性对照仍为橙色;并检测出 CRAB 的 OXA-23 基因菌株纯培养物的灵敏度达到了 5 cfu/ $\mu$ L。对 41 株我院分离的多重耐药鲍曼不动杆菌进行 LAMP 检测,检出 OXA-23 基因 32 株,检出率为 78.04%。**结论** 该院分离的 CRAB OXA-23 基因的携带率较高,对常用抗菌药物有非常高的耐药率;本研究建立的 LAMP 技术检测 CRAB OXA-23 基因是一种简便、快速、特异、灵敏的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌检测方法,适于基层单位推广使用,对临床医生合理选择抗生素具有重要意义。

**关键词:**鲍曼不动杆菌; 环介导等温扩增技术; 耐药基因; 碳青霉烯类; OXA-23

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)04-0513-03

**The LAMP method applied in the detection of carbapenem-resistance acinetobacter baumannii OXA-23 genes\***

Deng Zhenghua, Wen Xianyong, Liu Jinbo, Pen Ying, Tang Min

(Department of Clinical Laboratory, the hospital Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 64600, China)

**Abstract: Objective** To establish a simple, rapid, highly specific and sensitive molecular detection of carbapenem-resistance acinetobacter baumannii(CRAB) OXA - 23 genes, and this method is used to detect the multiple drug-resistant acinetobacter baumannii in our hospital, and the purpose is to know the antibiotic resistance of CRAB OXA-23 genes. **Methods** The loop-mediated isothermal amplification(LAMP) was established for detection of the CRAB OXA-23 genes, and a set of specific primers were designed by special software, PrimerExplorer version 4. The LAMP assay was developed on using SYBR Green I for fluorescent chromogenic reaction substances, improved through a series of optimization tests, and through macroscopic observation and electrophoresis test comparison results. At the same time, the application of LAMP was used to test 41 multiple drug-resistant acinetobacter baumannii which were collected from December 2013 to March 2014 in our hospitalized patients. **Results** The ladder banding was produced in CRAB OXA - 23 genes strains by the LAMP detection through electrophoresis test, however, no ladder banding was observed in the others. The color of the amplification product in genes strain CRAB OXA-23 changed from orange to green by adding 1  $\mu$ L SYBR Green I, however it was still orange in others. The sensitivity of the LAMP detection in pure culture was 5 cfu / $\mu$ L of the CRAB OXA-23 genes cells. Application of LAMP was used to separate multiple drug-resistant acinetobacter baumannii from hospitalized patients, 32 strains were tested in 41 strains, the positive rate was 78.04%. **Conclusion** Separation of the CRAB OXA-23 genes carry rate is higher in our hospital, and they have very high resistance of commonly used antibacterial drugs. The LAMP method to test OXA-23 gene of CRAB was established in this research was simple, fast, sensitive and specific. Therefore, it is especially suitable wider use at the grass-roots unit, and it is of great significance for selecting reasonable choice of antibiotics by clinical doctor.

**Key words:** Acinetobacter baumannii; loop-mediated isothermal amplification; resistance genes; Carbapenem; OXA-23

鲍曼不动杆菌(AB)在医院各种环境中的分布极为广泛,是常见的院内感染条件致病菌之一,可致多种院内感染。目前,由于大量使用碳青霉烯类抗菌药物治疗 AB 的感染,导致耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)的比例显著增高。因此,建立一种简便、快速、灵敏、特异的检测 CRAB 的方法,及时检

测出临床样品中是否含有该耐药菌株非常重要,以便为临床医生及时选择合理的抗菌药物治疗患者和有效预防耐药菌株进一步增多提供理论依据。日本学者 Notomi 等<sup>[1]</sup>于 2000 年建立的环介导等温扩增技术(LAMP)具有操作简捷、高效、特异等优点,它克服了 PCR 技术在仪器设备方面的限制和操作繁

\* 基金项目:四川省卫生计生厅科研资助项目(120347);泸州市科技计划资助项目[2012-S-37(15/29)]。作者简介:邓正华,男,副主任技师,主要从事医学分子生物学的研究。

琐等缺点,在恒温的情况下即可完成核酸扩增,成为继 PCR 技术之后的又一检测技术。本文以 CRAB 的 OXA-23 基因为靶序列设计两对引物,建立了 LAMP 方法并对 RAB 进行检测,现报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 仪器与试剂** LAMP 试剂购自荣研生物科技(中国)有限公司,血平板和中和营养肉汤购自重庆庞通科技有限公司,核酸电泳 Marker DL2000 购自上海生物工程有限公司;细菌鉴定仪(Walkway96SI),PCR 扩增仪(C1000TM),凝胶成像仪(Bio-RAD),电泳仪(XH600)和高速冷冻离心机(SORVALL Primo R)。

**1.1.2 实验菌株** 铜绿假单胞菌(ATCC25853),AB(ATCC17978),金黄色葡萄球菌(ATCC25923)标准菌株购自中国微生物菌种保藏管理中心。CRAB 的 OXA-23 菌株、产  $\beta$ -内酰胺酶的金黄色葡萄球菌、耐碳青霉烯的铜绿假单胞菌、产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBL)大肠埃希菌、产 ESBL 肺炎克雷伯菌、产头孢菌素(AMPC)阴沟肠杆菌均来自本院检验科微生物实验室。

### 1.2 方 法

**1.2.1 引物设计** 根据 Genebank 公布的 CRAB OXA-23 基因序列,用 PrimerExplorer 4.0 引物设计软件进行目标序列引物设计,获取一套特异性的 LAMP 引物,包括外引物 F3、B3 和内引物 FIP、BIP,引物序列见表 1,所有引物由上海生物工程有限公司合成。

表 1 LAMP 检测 CRAB OXA-23 基因的引物序列

引物	引物序列	位置(bp)
FIP	5'-TGT CAT GTC TTT TTC CCA AGC G-3'	336~357
	5'-ATG AAA TAT TTA AAT GGA AGG GC-3'	296~318
	5'- GAA GCC ATG AAG CTT TCT GCA-3'	364~384
BIP	5'-ACT TCT TTT TGC ATG AGA TCA-3'	423~443
F3	5'- GGA GAA CCA GAA AAC GGA TA-3'	273~292
B3	5'- GCA TTA CCG AAA CCA ATA CG-3'	448~467

**1.2.2 DNA 模版的制备** 采用煮沸热裂解法<sup>[2]</sup>。挑取培养的纯菌落,置入经 DEPC 水处理过的内置 1 mL 生理盐水 Ep 管内,混匀;13 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液;加入裂解液 25  $\mu$ L 混匀,在恒温金属浴锅中 100  $^{\circ}$ C 煮沸 10 min;13 500 r/min 离心 10 min,取上清液冰浴待用。

**1.2.3 LAMP 扩增方法与步骤** 配制 25  $\mu$ L LAMP 扩增反应体系,反应体系组成包括:2 $\times$ Reaction Mix 12.5  $\mu$ L, FIP 和 BIP 引物 1.6  $\mu$ L(40 pmol), F3 和 B3 引物 0.2  $\mu$ L(5 pmol)、Bst DNA 聚合酶大片段(8 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、DNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补充至 25  $\mu$ L,混匀;阳性对照:2 $\times$ Reaction Mix 12.5  $\mu$ L, Primer Mix DNA 2.5  $\mu$ L, Bst DNA 聚合酶大片段(8 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L 和 ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L,加入 2  $\mu$ L 阳性质控品;阴性对照:以 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 替代阳性质控品,其余组分及加入量一致,混匀;于 65  $^{\circ}$ C 恒温 60 min, 80  $^{\circ}$ C 灭活 10 min,中止反应;配制 1.5%琼脂糖凝胶,电泳分析 LAMP 扩增产物;同时加入 1  $\mu$ L SYBR Green I 于扩增产物中,观察分析扩增产物的颜色变化来判断目标基

因扩增与否。

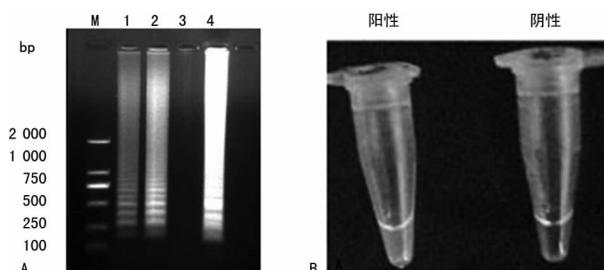
**1.2.4 特异性试验** 提取产 OXA-23 CRAB 及其他 8 种细菌的 DNA,用 LAMP 方法检测,以试剂盒阳性质控品为阳性对照, ddH<sub>2</sub>O 作为空白对照,验证方法的特异性。

**1.2.5 灵敏度试验** 取产 OXA-23 CRAB 菌株接种于中和营养肉汤培养基中,37  $^{\circ}$ C 培养 12 h,振荡摇匀中和肉汤,取 1 mL 培养的中和肉汤加入 9 mL 生理盐水进行 10 倍稀释,然后用平板倾注法进行培养和菌落计数;同时取 1 mL 不同浓度的稀释菌液提取并制备 DNA 模板,进行 LAMP 反应,取 8  $\mu$ L 产物观察琼脂糖电泳结果和荧光反应。

**1.2.6 临床标本的检测** 采用上述建立的 LAMP 方法,对 2013 年 12 月至 2014 年 3 月收集的 41 株 CRAB 进行 OXA-23 基因检测。

## 2 结 果

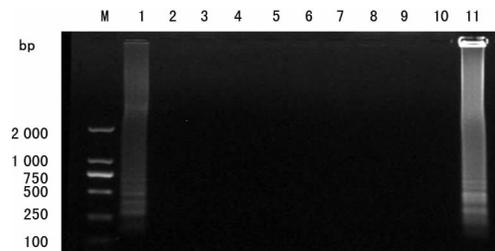
**2.1 LAMP 检测方法的建立** 本试验以 CRAB 的 OXA-23 基因组 DNA 设计的一套特异性引物进行 LAMP 反应,将 LAMP 扩增产物经琼脂糖电泳后观察,产 OXA-23 CRAB 菌株出现特有的阶梯状扩增条带,而阴性对照没有阶梯条带(见图 1A);另外,向扩增产物中加入 1  $\mu$ L SYBR Green I,在紫外下观察,OXA-23 基因 DNA 扩增产物由橙色变为绿色荧光,而阴对照仍为橙色(见图 1B)。上述研究结果表明,LAMP 反应体系能够有效扩增 CRAB 的 OXA-23 基因。



A: LAMP 产物电泳结果,其中 M 为核酸 Marker DL2000,1、2 为 CRAB OXA-23 基因 LAMP 扩增条带,3 为阴性对照,4 为阳性对照; B: LAMP 产物 SYBR Green I 染色结果。

图 1 CRAB 菌株 OXA-23 LAMP 法检测结果

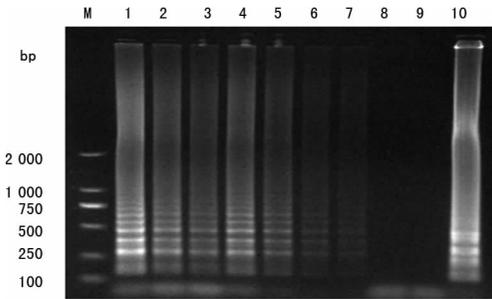
**2.2 LAMP 法特异性试验** 如图 2 所示,只有 CRAB 检出 OXA-23 基因,其他非 CRAB 及阴性对照未检出 OXA-23 基因。因此,本实验所设计的 CRAB OXA-23 基因 LAMP 检测方法具有良好的特异性。



M: 核酸 Marker DL2000; 1: CRAB; 2: 金黄色葡萄球菌(ATCC 23932); 3: 铜绿假单胞菌(ATCC25853); 4: AB(ATCC17978); 5: 产  $\beta$ -内酰胺酶的金黄色葡萄球菌; 6: 耐碳青霉烯的铜绿假单胞菌; 7: 产 ESBL 大肠埃希菌; 8: 产 ESBL 肺炎克雷伯菌; 9: 产 AMPC 阴沟肠杆菌; 10: 阴性对照; 11: 阳性对照。

图 2 LAMP 检测 CRAB OXA-23 基因特异性试验

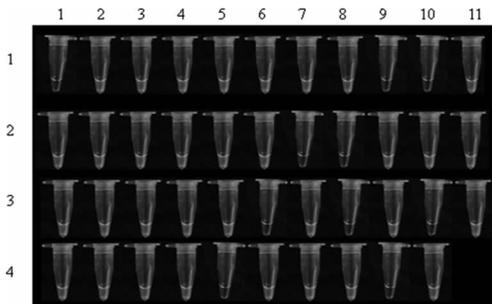
**2.3 LAMP 法灵敏度试验** CRAB 原始菌液浓度为  $5.0 \times 10^7$  cfu/mL, 取 1 mL 原始菌液加入 9 mL 生理盐水进行 10 倍倍比稀释, 混匀, 再分别取 1 mL 稀释菌液提取 DNA 模板, 进行 LAMP 扩增, 如图 3 可见, 第 7 管即稀释到  $5.0 \times 10^1$  cfu/mL, 仍可扩增出阶梯状条带, 第 8 管未见条带, 由此可见 LAMP 法检测细菌纯培养物的极限约为 5.0 cfu/mL。



M: 核酸 Marker DL2000; 1~8 泳道: 不同稀释浓度的细菌纯培养物分别是  $5.0 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^6$ 、 $5.0 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^3$ 、 $5.4 \times 10^2$ 、 $5.0 \times 10^1$ 、 $5.0 \times 10^0$  cfu/mL; 9: 阴性对照; 10: 阳性对照。

图 3 LAMP 检测 CRAB OXA-23 基因的灵敏度

**2.4 临床标本 LAMP 检测结果** 应用 LAMP 法对 41 株 CRAB 进行 OXA-23 检测, 检出 OXA-23 基因阳性菌株 32 株, 检出率为 78.04%, 见图 4。



注: 第 4 排 9 号为阴性对照, 10 号为阳性对照。

图 4 41 株 CRAB 菌株 LAMP 检测结果

### 3 讨论

自 1985 年发现具有碳青霉烯水解活性的 OXA 酶能够水解亚胺培南以来, 越来越多的研究者认为 AB 产生的碳青霉烯酶是该菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的机制之一。因此很多学者进行 CRAB 的 OXA-23 基因研究<sup>[2]</sup>。目前, 国内临床上常用亚胺培南等碳青霉烯类抗菌药物治疗 AB 感染患者, 但随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用, 对其耐药率也越来越高, 已引起广泛关注。因此, 建立一种快速、有效的检测耐药 AB 的方法非常必要。2000 年日本学者 Notomi 等建立的 ALMP 技术已大量用于各种食源性致病菌和病原微生物的检测<sup>[3-5]</sup>。本试验针对 CRAB 的 OXA-23 基因序列设计两对引物, 利用链置换 Bst DNA 聚合酶, 在 65 °C 温育条件下, 60 min 扩增出 OXA-23 基因片段, 扩增产物电泳产生阶梯状条带或向扩增产物中加入 1 μL SYBR Green I 后, 颜色由橙色变为绿色, 因而该法不需要模板的热变性、长时间温度循环等过程即可观察结果。本研究采用所建立的 LAMP 方法分别对 9 株实验菌株进行检测, 结果仅有产 OXA-23 酶 CRAB 菌株为阳性, 其他 8 株非 CRAB 菌株均为阴性, 同时对产 OXA-23 酶 CRAB 菌株纯

培养菌液进行极限稀释检测, 灵敏度达到 5.0 cfu/mL, 这一结果与文献<sup>[6-7]</sup>报道的细菌纯培养物检测结果基本相似。因此, 本研究所建立的 LAMP 方法不仅灵敏度高、特异性强, 而且检测流程时间短, 因而适用于 CRAB 的常规检测。

近年来, AB 分离率不断增加, 耐药率也不断上升, 2013 年 12 月至 2014 年 3 月本院分离获得 41 株 CRAB, 用 LAMP 方法对这 41 株进行 OXA-23 基因检测, 结果检出 OXA-23 基因阳性 32 株, 阳性率为 78.04%, 较王政等<sup>[8]</sup>报道阳性率低, 可能是因不同地区患者情况、医生使用抗菌药物的习惯和感染菌株不同, 使感染细菌的耐药特性有所差异, 因而要加强对各地区细菌耐药的流行情况及机制研究, 才能有效地为临床合理用药提供依据。本院临床分离的 CRAB 菌株 OXA-23 基因的高携带率表明, OXA-23 耐药基因可能为本院 CRAB 对碳青霉烯类抗菌药物高度耐药的机制之一。

综上所述, 本研究建立的 CRAB OXA-23 基因 LAMP 检测方法具有特异性强、灵敏度高、操作简便快速、成本低等特点, 检测过程中不需要凝胶成像仪、PCR 仪和荧光定量 PCR 仪等专业仪器设备, 只需普通恒温器, 且检测结果可肉眼直接观察, 适合相对落后地区和基层医疗单位的推广应用; 可以为临床及时检出 OXA-23 基因阳性耐药鲍曼不动杆菌, 对耐药基因予以监测提供新的方法。

### 参考文献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (12): 63-67.
- [2] Mugnier PD, Poirel L, Naas T, et al. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(1): 35-40.
- [3] Scheel CM, Zhou YT, Theodoro RC, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(2): 483-488.
- [4] Xu X, Zhang S, Wu Q, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus faecalis* in drinking water [J]. *J Food Saf*, 2014, 34(2): 103-110.
- [5] 马寅众, 陈江源, 房国梁, 等. 环介导等温扩增法快速检测阪崎肠杆菌 [J]. *食品科学*, 2010, 31(22): 322-325.
- [6] Yeh HY, Shoemaker CA, Klesius PH. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Channel catfish Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri* [J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 63(1): 36-44.
- [7] Hayashi N, Arai R, Tada S. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Food Microbiol*, 2007, 24(7/8): 778-785.
- [8] 王政, 刘丁, 陈萍, 等. 重症监护室产 OXA-23 碳青霉烯类酶的鲍曼不动杆菌的分子流行病学研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(9): 1316-1324.