

· 论 著 ·

3 种基因分型方法在鲍曼不动杆菌中的应用评价*

姜 飞, 邓丽华, 康海泉, 赵晓杰, 马 萍, 李洪春

(徐州医学院附属医院检验科, 江苏徐州 221002)

摘 要:目的 比较 3 种基因分型方法在鲍曼不动杆菌中的应用。方法 采用琼脂稀释法检测重症监护室(ICU)分离的 30 株鲍曼不动杆菌的最小抑菌浓度(MIC);分别以肠杆菌科基因间重复一致性序列(ERIC)、基因外回文重复序列(REP)及随机多态性核苷酸序列(RAPD)为引物进行 PCR 扩增,利用电泳指纹图谱进行基因分型,并进行聚类分析。结果 30 株鲍曼不动杆菌仅对头孢哌酮/舒巴坦有较低的耐药率;ERIC-PCR 基因分型法的扩增条带最为丰富,能扩增出 4~7 个条带,RAPD 和 REP-PCR 扩增条带较少,分别扩增出 1~5 和 1~4 个条带;3 种方法分别将 30 株鲍曼不动杆菌分为 4、4、3 个群。结论 头孢哌酮/舒巴坦对于多重耐药鲍曼不动杆菌依然有较好的敏感性;本试验初步证实 3 种方法均可作为鲍曼不动杆菌基因分型的可选方法,ERIC-PCR 较另外两种方法扩增条带更丰富,分辨率更好。

关键词:肠杆菌科基因间重复一致性序列; 随机多态性核苷酸序列; 基因外回文重复序列; 鲍曼不动杆菌; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1195-03

Application evaluation of three kinds of genotyping methods in *Acinetobacter baumannii**

Jiang Fei, Deng Lihua, Kang Haiquan, Zhao Xiaojie, Ma Ping, Li Hongchun

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract:Objective To compare the application of three kinds of genotyping methods in *Acinetobacter baumannii*. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) of 30 strains of *Acinetobacter baumannii* collected from ICU was detected by adopting the agar dilution method. Thirty *Acinetobacter baumannii* strains were genotyped respectively by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences (ERIC), repetitive extragenic palindromic (REP) and nucleotide random amplified polymorphic sequence (RAPD) as the primers for PCR amplification. Genotyping was performed using electrophoresis fingerprint, and clustering analysis. **Results** Thirty strains of *Acinetobacter baumannii* had the low resistance rate only to cefoperazone / sulbactam. ERIC-PCR genotyping method could amplify out 4~7 bands, the most abundant amplification bands. Bands amplified by RAPD and REP PCR were less, 1~5 and 1~4 bands were amplified out respectively. Thirty strains of *Acinetobacter baumannii* could be divided into 4, 4 and 3 groups by three methods respectively. **Conclusion** Cefoperazone / sulbactam are still better sensitivity to multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii*. The test preliminary confirms that all of the three kinds of methods can be used as alternative method for genotyping *Acinetobacter baumannii*. Compared with the other two methods, bands of ERIC-PCR is more abundant and the resolution is better.

Key words: Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences; random amplified polymorphic sequence; repetitive extragenic palindromic sequence; *Acinetobacter baumannii*; genotyping

基因分型在医院感染的暴发流行中有着重要的意义,目前对病原菌常用的分子生物学方法有质粒分型、核糖体分型、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型及聚合酶链反应(PCR)指纹图谱分型^[1]。其中,PFGE 以其分辨率高、重复性好、结果稳定、易于标准化等优点被国内外流行病学研究者广泛接受,并被认为是细菌分子生物学分型技术的“金标准”^[2],但 PFGE 操作复杂,所需时间长且费用昂贵,对实验室条件要求比较高,不利于大范围推广。鉴于此,本研究选择肠杆菌科基因间重复一致性序列(ERIC)、基因外回文重复序列(REP)及随机多态性核苷酸序列(RAPD)3 种简便、快速的 PCR 指纹图谱分型方法对临床分离的鲍曼不动杆菌进行基因分型,并比较其在鲍曼不动杆菌基因分型中的应用优势。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集徐州医学院附属医院 2014 年 3~5 月重症监护室(ICU)分离的非重复鲍曼不动杆菌 30 株,其中分离自痰液标本 26 株,血液标本 2 株,尿液、脓液标本各 1 株。

1.2 仪器与试剂 主要仪器有 Phoenix-100 全自动细菌鉴定药敏分析仪(美国 BD 公司)、ABI2720 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)、DYY-8C 型电泳仪(北京六一仪器厂)、Bioshine GelX1850 凝胶成像分析系统(上海欧翔科学仪器有限公司)。主要试剂有 PCR Master Mix 试剂(北京百泰克生物技术公司)、M-H 琼脂试剂(英国 Oxoid 公司)。

1.3 抗菌药物敏感性试验 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐,采用琼脂稀释法检测 9 种抗菌药物最小抑菌浓

* 基金项目:江苏省徐州市科技局资助项目(XZZD1326)。 作者简介:姜飞,男,硕士研究生,主要从事临床微生物学与免疫学研究。

△ 通讯作者,E-mail:13775891123@163.com。

度(MIC)值,结果参照 2013 版 CLSI 标准判读^[3]。

1.4 基因分型 煮沸法提取细菌 DNA。按照以下引物序列进行 PCR 扩增^[4-5];ERIC1R;5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3',ERIC2;5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3';REP1R;5'-III GCG CCG ICA TCA GGC-3',REP2;5'-ACG TCT TAT CAG GCC TAC;RAPD;5'-GAG GGT GGC GGT TCT。扩增体系均采用 50 μL 扩增体系,反应条件 ERIC-PCR、REP-PCR;94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 45 s,40 ℃ 45 s,65 ℃ 8 min,经 35 个循环,最后一个 65 ℃ 延长至 16 min。RAPD;94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 45 s,36 ℃ 45 s,72 ℃ 2 min,经 40 个循环,最后一个 72 ℃ 延长至 10 min。以上每种方法均扩增 3 次,产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析系统进行分析,根据电泳的指纹图谱对菌株进行基因分型。

1.5 聚类分析 利用 NTsys2.1e 分析系统,采用非加权组平均法(UPGMA)对 30 株细菌进行聚类分析。

2 结 果

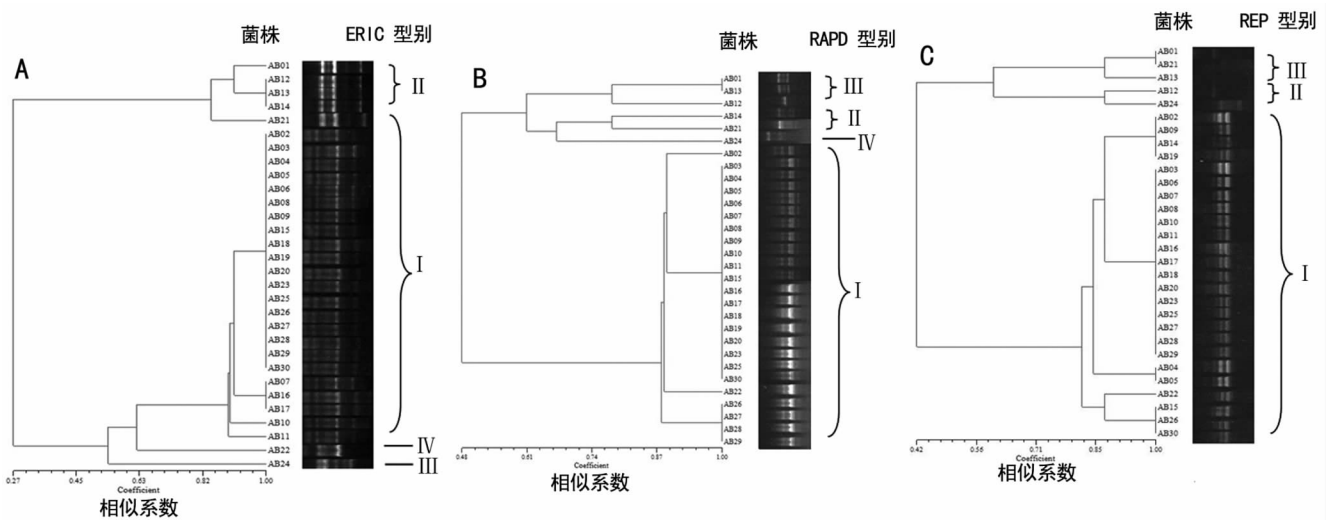
2.1 药敏试验结果 琼脂稀释法检测 MIC 值,表 1 结果显示:30 株鲍曼不动杆菌仅对头孢哌酮/舒巴坦有较低的耐药率,对其余抗菌药物均呈高水平耐药。

2.2 基因分型结果 3 种方法均扩增 3 次,得出的电泳指纹图谱较一致,重复性较好。ERIC-PCR 扩增出 4 ~ 7 个条带,相对分子质量 110 bp ~ 2×10³,将 30 株菌株分为 I (23 株)、II (5 株)、III (1 株)、IV (1 株)4 型。RAPD 扩增出 1 ~ 5 个条带,相对分子质量 380 bp ~ 2.2×10³,将 30 株菌株分为 I (25

株),II (2 株),III (2 株),IV (1 株)4 型。REP-PCR 扩增出 1 ~ 4 个条带,相对分子质量 150 bp ~ 2×10³,将其分为 I (25 株),II (4 株),III (1 株)3 型。其中,12 号菌株由 ERIC 的 II 型归类为 RAPD 的 III 型,归类为 REP 的 II 型,14 号菌株由 ERIC 的 II 型归类为 RAPD 的 II 型,归类为 REP 的 I 型,其他菌株不存在分型差异。

2.3 聚类分析结果 30 株菌株经聚类分析(图 1),按照 80% 的相似系数,ERIC-PCR 将其分为 4 个群,RAPD 将其分为 4 个群,REP-PCR 将其分为 3 个群。聚类分析显示 12 号和 14 号菌株的分型差异与 PCR 指纹图谱显示的结果相符合。

表 1 30 株鲍曼不动杆菌药敏试验结果				
抗菌药物	MIC50 (mg/L)	MIC90 (mg/L)	耐药率 (%)	MIC 范围 (mg/L)
头孢吡肟	64	128	100.0	32~512
哌拉西林/他唑巴坦	256	256	100.0	128~512
头孢哌酮/舒巴坦	32/16	128/64	45.2	8/4~128/64
氨苄西林/舒巴坦	64/32	256/128	100.0	16/8~256/128
庆大霉素	128	256	100.0	32~256
阿米卡星	32	64	80.0	32~64
环丙沙星	128	512	100.0	64~>512
亚胺培南	32	128	100.0	32~256
美罗培南	64	256	100.0	32~256



A:ERIC-PCR 基因分型图谱;B:RAPD 基因分型图谱;C:REP-PCR 基因分型图谱;AB01-30:鲍曼不动杆菌 1-30 号;I-IV:菌株型别。

图 1 30 株鲍曼不动杆菌基因分型图谱

3 讨 论

鲍曼不动杆菌是临床常见的条件致病菌,亦是引起院内感染的主要病原菌之一。ICU 患者由于病情危重、住院周期长、接受介入性治疗、免疫力严重低下等原因较易引起感染。本研究表明,ICU 病区的鲍曼不动杆菌主要引起呼吸系统感染,且分离菌株均为高水平耐药的三重耐药菌株,头孢哌酮/舒巴坦是仅有的对鲍曼不动杆菌具有良好抗性的药物,但仍需要对其合理使用,防止造成普遍耐药。

由于克隆流行所造成的鲍曼不动杆菌医院内感染在国内

外均有所报道^[6-7],其流行机制主要为耐药基因通过转移元件在不同菌株间的水平传播。因此,准确的基因分型对了解细菌是否存在院内暴发流行、预防和控制多重耐药菌的传播、指导临床感染控制工作具有重要意义。在病原菌基因分型的方法中,PCR 指纹图谱分型具备简便、经济、快速等特点,较易被推广。RAPD 利用单个随机多态核苷酸序列(通常为 8 ~ 10 个碱基对)为引物来扩增基因组 DNA,由于基因组 DNA 序列不同,就会产生不同的指纹图谱,其灵敏度高,但重复性易受模板完整性、退火条件的影响^[5]。REP-PCR 和 ERIC-PCR 是基因

间重复序列中的两个重要技术^[8],利用细菌基因组中广泛存在的短重复序列,通过电泳条带比较分析,揭示基因组间的差异。在本研究中,这 3 种基因分型方法对鲍曼不动杆菌的基因分型结果显示:(1)每种方法 3 次扩增所得出的条带数量及相对分子质量大小较一致,说明在本试验条件下,3 种方法具有较好的可重复性。(2)试验中 REP-PCR 和 RAPD 虽能够满足分型需求,但扩增条带并不丰富,分析可能原因是技术水平的限制,以及试验中仅对扩增条件做了优化而未对扩增体系进行优化。(3)3 种基因分型方法对个别菌株的分型存在差异,可能是因为 3 种方法作用于基因组 DNA 锚定位点的不同所致^[9],但并不影响整体的分型结果。有文献报道,在鲍曼不动杆菌的基因分型中,ERIC-PCR 分辨率较强,结果较为可靠,并且与“金标准”PFGE 有一定的相关性,说明 ERIC-PCR 有其自身的优势,本研究亦证明其较另外两种方法有较好的分型效果。30 株菌株经聚类分析后,得到与电泳指纹图谱分型相一致的结果,说明在不进行统计分析的情况下,根据电泳条带的数量和相对分子质量大小进行分类亦可达到较好的分型结果。

研究结果表明,多重耐药的 I 型流行株已在该院 ICU 病区广泛存在,且 I 型流行株的多重耐药谱较为相似,分析原因可能为携带多种耐药基因的接合性质粒等遗传元件在不同菌株之间的传递从而导致多重耐药性的传播,对此,还需进一步试验证实。

综上所述,该院 ICU 病区存在鲍曼不动杆菌多重耐药现象,头孢哌酮/舒巴坦对其依然有较好治疗效果。初步试验证明,3 种 PCR 指纹图谱基因分型方法均可作为简便、经济、快捷的基因分型方法对鲍曼不动杆菌进行分型。其中,ERIC-PCR 扩增条带较多,分辨率较好,但本研究仅局限于 30 株菌株,还有待扩大试验菌株数量,同时结合“金标准”分型方法——PFGE 进一步比较分析,以得出更为准确的结论。

(上接第 1194 页)

文献法和专家咨询法等方法估算样本含量,这些方法主观因素对估算结果影响大,而统计软件由于操作简单,考虑的客观因素多,计算结果相对合理。统计软件除了本文介绍的 PASS 软件和 Stata 软件外,还有 nQuery Advisor 软件、SamplePower 软件(SPSS 公司研发)、SASA 软件和 SAS 软件等,使用方法都大同小异。本文采取的 3 种方法计算结果不相同但却都是合理有效的,因为医学试验研究中样本含量不是唯一的,不同的研究方法、研究目的,研究要求和研究资料决定了不同的样本含量,从表 1 中可看出样本含量也并不是越大越精确。这些样本含量估算方法参考了研究个体的变异度、研究结果的精确度(抽样误差),但未考虑研究成本、可行性与伦理学要求对样本含量的影响。

总之,估算样本含量的方法有许多,统计软件具有更客观、更全面和简单方便的优势,在参数选择正确的情况下其计算结果都是合理有效的,试验研究人员要熟练掌握和运用,并以其计算结果为依据,正确分析试验研究性质,再综合考虑研究成

参考文献

- [1] 王璐,任微,褚美玲,等.耐碳青霉烯的多重耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学研究[J].现代检验医学杂志,2010,25(1):87-89.
- [2] 李永丽,应春妹,陈艺升.ERIC-PCR 技术在鲍曼不动杆菌基因分型中的应用评估[J].检验医学,2013,28(7):621-624.
- [3] Clinical Laboratory Standards Institute. M100-S23 Twenty-third Informational Supplement[S]. Wayne,DA,USA:CLSI,2013.
- [4] Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp [J]. J Clin Microbiol,1997,35(12):3071-3077.
- [5] Maluping RP, Ravelo C, Lavilla-Pitogo CR, et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Philippines by PCR-based methods[J]. J Appl Microbiol, 2005, 99(2): 383-391.
- [6] Zhong Q, Xu W, Wu Y, et al. Clonal spread of carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in a teaching hospital in China[J]. Ann Lab Med, 2012, 32(6): 413-419.
- [7] Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, et al. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009)[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(8): 737-742.
- [8] Ishii S, Sadowsky MJ. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution[J]. Environ Microbiol, 2009, 11(4): 733-740.
- [9] 张永,陈余清,唐英春,等. ARDRA 联合 RAPD 对不动杆菌基因型鉴定的研究[J].微生物学通报,2007(2):303-306.

(收稿日期:2015-01-21)

本、可行性与伦理学要求对样本含量的影响,最终确定合适的样本数。

参考文献

- [1] 吴圣贤,王成祥. 临床研究样本含量估算[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:1-2.
- [2] 常靖,常亮.单因素重复测量设计样本含量的估算及不同计算方法之间的比较[J].数理医药学杂志,2012,25(5):505-508.
- [3] 喻宁芬,喻宁芳,邓礼,等.磷酸酰肌醇-3 激酶抑制剂对小鼠气道炎症影响的实验研究[J].现代医院,2008,3(4):7-9.
- [4] Dattalo P. A review of software for sample size determination[J]. Eval Health Prof, 2009, 32(3): 229-248.
- [5] 何胜东,赖克方,姚卫民,等.小鼠哮喘模型气道反应性检测方法的建立[J].广东医学,2006,27(11):1659-1661.
- [6] 李河,李卫,杨学宁,等.临床试验设计中样本含量的理解[J].循证医学,2012,12(6):374-376.

(收稿日期:2014-12-25)