

论著 · 基础研究

PFGE、RAPD、Diversilab 及 MLST 四种分型技术在不动杆菌同源性分析中的应用比较^{*}

刘文静, 张小江, 杨启文, 徐英春[△]

(中国医学科学院/北京协和医学院/北京协和医院检验科, 北京 100730)

摘要:目的 比较几种分型技术在不动杆菌属同源性分析中的应用效果。方法 用亚胺培南和美罗培南体外筛选不动杆菌属碳青霉烯类耐药突变菌株, 用核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析(ARDRA)进行分子水平鉴定, 用 PFGE、RAPD、Diversilab 及 MLST 四种分型技术分析亲代敏感菌株和耐药突变菌株的同源性。结果 碳青霉烯类亲代敏感株和耐药突变菌株 ARDRA 结果一致, 包含了基因组 3 型不动杆菌、2 型鲍曼不动杆菌及 13TU 型不动杆菌。采用 PFGE、RAPD、Diversilab、MLST 4 种方法对菌株进行分型后, 发现每个菌株的体外选择耐药突变株和亲代敏感菌株的同源性密切相关; RAPD 和 Diversilab 的分辨力比 PFGE 差, 亲缘关系相近的菌株不能被区分, pu53 亲代敏感菌株及其耐药突变菌株与 pu61 亲代敏感菌株及其耐药突变菌株, PFGE 显示 2 株菌间相差 7 个条带以上, 无亲缘关系; RAPD 和 Diversilab DNA 密切相关; MLST 显示, 与其他分型方法相比, 表现为遗传背景一致的菌株具有相同的 ST 型, 尽管基因组 3 型不动杆菌 *gpi* PCR 和 *gdhB* 测序或扩增失败。rpoD 非简并引物对基因组 13TU 型不动杆菌和基因组 3 型不动杆菌扩增效果不好。结论 RAPD 和 Diversilab 适用于实验室快速同源性分析, 两者区分不好的再选用 PFGE 和 MLST。

关键词:不动杆菌属; 同源性分析; 分型; 耐药; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.24.006 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2018)24-3009-07 **文献标识码:**A

Evaluation of four molecular typing methods in the homology analysis of *Acinetobacter* species^{*}

LIU Wenjing, ZHANG Xiaojiang, YANG Qiwen, XU Yingchun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking

Union Medical College/Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: **Objective** To evaluate four molecular typing methods (PFGE, RAPD, Diversilab and MLST) in the homology analysis of *Acinetobacter* species. **Methods** Carbapenem-resistant mutant strains of *Acinetobacter* were screened by imipenem and meropenem in vitro. Molecular identification was carried out by using amplified ribosomal DNA restriction analysis(ARDRA). The homology of parental sensitive strains and resistant mutant strains was analyzed by using four typing techniques: pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), automatic Rep-PCR (Diversilab) and multilocus sequence typing (MLST). **Results** ARDRA of carbapenems parental susceptible strains and resistant mutant strains were consistent, including *Acinetobacter* genospecies 3, *Acinetobacter baumannii* genospecies 2 and *Acinetobacter* genospecies 13TU. The strains were typed by PFGE, RAPD, Diversilab and MLST. It was found that the homology between drug-resistant mutants selected in vitro and parental susceptible strains is closely related. RAPD and Diversilab had poorer resolution than PFGE, and similar strains could not be distinguished. PFGE showed that there were more than 7 bands between the parental susceptible strains of Pu53 and their drug-resistant mutants, and the parental susceptible strains of pu61 and their drug-resistant mutants, and there was no relationship between them. RAPD and Diversilab DNA are closely related. Compared with other typing methods, MLST showed that strains with the same genetic background had the same ST type, although *gpi*-PCR and *gdhB* sequencing or amplification of *Acinetobacter* genospecies 3 failed. RpoD non-degenerate primers did not amplify *Acinetobacter* genome 13TU and *Acinetobacter* genospecies 3. **Conclu-**

^{*} 基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(2016-I2M-1-014)。

作者简介: 刘文静, 女, 实习研究员, 主要从事临床微生物及分子检验。 [△] 通信作者, E-mail: xyecumch@139.com。

本文引用格式: 刘文静, 张小江, 杨启文, 等. PFGE、RAPD、Diversilab 及 MLST 四种分型技术在不动杆菌同源性分析中的应用比较[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(24): 3009-3014.

sion RAPD and Diversilab were suitable for rapid homology analysis in laboratory, PFGE and MLST should be selected if there were not well differentiated results.

Key words: Acinetobacter species; homology; molecular typing methods; drug resistance; mutant

不动杆菌属,尤其是鲍曼不动杆菌是医院内感染的重要致病菌之一。不动杆菌容易在医院内引起暴发流行,特别是在 ICU 中。由于不动杆菌的广泛传播可以在医院内,甚至是医院间。因此,如何建立起一套可靠、有效的分子流行病学方法,追踪不动杆菌流行克隆的传播规律将有助于医院对感染的控制,具有重要价值。本研究在体外模拟在抗菌药物选择性压力的作用下,对碳青霉烯类抗菌药物敏感的不动杆菌变成耐药突变菌株,原则上亲代敏感和耐药突变菌株应为亲缘关系密切相关,可以很好地评价目前常用分型方法在同源性分析方面的应用。

1 材料与方法

1.1 材料 6 株碳青霉烯类敏感的不动杆菌:鲍曼不动杆菌 ATCC19606、pu53、sx54、dl56、xj56、zj69。其中 pu53、pu61 对喹诺酮类、头孢菌素类、氨基糖苷类等抗菌药物均耐药,但对碳青霉烯类敏感;其他 4 个菌株对各种抗菌药物均敏感。其他使用的耗材包括一次性接种环(意大利 COPAN 公司,规格 1、10 μ L)、枪头(10、200、1 000 μ L)、EP 管(北京欣隆福医药销售有限公司,200 μ L、1.5 mL 和 2.0 mL)、一次性无菌塑料培养皿(青岛阿尔发医疗器械有限公司,环氧乙烷灭菌,规格 90 mm \times 15 mm)。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 涡旋混合器(海林市其林贝尔仪器制造有限公司)、CHEF-Mapper 脉冲场凝胶电泳仪(美国伯乐 BIO-RAD 公司)、UV 凝胶成像紫外分析仪(美国伯乐 BIO-RAD 公司)、电子天平(Denver Instrument Company,型号 AA-250)、Nanodrop2000 分光光度计(基因有限公司)、UV 凝胶成像紫外分析仪(北京宾达英创新科技有限公司)、Agilent 2100 Bioanalyzer、BioPhotometer 生物分光光度计(德国 Eppendorf 公司)、DNA Lab Chip、芯片涡旋器、凝胶注射器、电脑、不间断电源、ABI3730XL 测序仪、计时器(bioMérieux 配套提供)。

1.2.2 试剂培养基 血琼脂平板、胰大豆 TSB 肉汤、MH 平板为英国 Oxoid 公司产品;亚胺培南和美罗培南 E-test 条为 bioMérieux 公司产品;美罗培南、亚胺培南药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品;ApaI 内切酶和蛋白酶 K 为 NEB 公司产品;低熔点琼脂糖 SeaKem Gold agarose 为 Sigma 公司产品;EDTA、十二烷基肌氨酸钠、Tris 碱购自北京鼎国生物公司;Diversilab 试剂盒为 bioMérieux 公司产品。普通 PCR 试剂:2 \times Taq PCR StarMix 及 DNA 标志物 DL2000, CfoI、AluI、MboI、RsaI、MspI 五种限制性内切酶购自 TAKARA 公司;16S rDNA 基因扩增引物由上海生工

生物工程技术服务有限公司合成;2 \times EasyTaq PCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司;电泳用琼脂糖为 Biowest Agarose(西班牙琼脂糖)。

1.3 方法

1.3.1 体外筛选不动杆菌碳青霉烯类耐药突变菌株并用 ARDRA 进行分子水平鉴定 体外筛选不动杆菌碳青霉烯类耐药突变菌株,参考文献[1]进行。并用 E-test 条测定亚胺培南和美罗培南体外药敏结果。ARDRA 分子水平鉴定参考文献[2]进行:每批 PCR 反应均以 ddH₂O 作为阴性对照,以鲍曼不动杆菌 ATCC19606 作为阳性对照。阳性对照酶切结果正确,阴性对照 PCR 产物无条带,结果方可信。

1.3.2 随机扩增 DNA 多态性(RAPD) 按照参考文献[3]提供的引物和实验方案,引物设计如下:A-mer5 5'-GCCGGGGCCT-3'。采用 50 μ L PCR 反应体系,各成分及浓度如下:DNA 模板 4 μ L, dNTPs 0.2 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Taq 聚合酶 1.25 U, Primers 1 pmol/ μ L。PCR 反应条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min;按以下 3 步进行 40 个循环,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 33 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 40 s;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳,在电压 110 V 条件下,电泳时间 2 h。然后根据电泳结果对 PCR 产物进行分型:条带相差在 2 个条带以上认为无亲缘关系。

1.3.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE) 本研究 PFGE 的具体步骤同文献[4]中的描述。结果的判读是按照美国疾病控制和预防中心的 TENOVER 等^[5]推荐的方法来进行的。条带相差 7 条及以上的认为无亲缘关系;相差 4~6 条带的认为可能相关图谱完全相同的定为一个型;相差 2~3 条带的认为亲缘关系密切;彼此之间相差 1 条带的定为同一型的不同亚型;随机地选择不同的字母如 A、B、C 等顺序分型。

1.3.4 Diversilab(Rep-PCR 自动分型系统) 严格按照其说明说进行:细菌纯培养提取 DNA,将菌株信息录入 Diversilab 软件,Rep-PCR 反应,准备 Gel-Dye Mix,装载芯片,在 Agilent 2100 Bioanalyzer 上利用微流体 LabChip 技术产生独特的 DNA 指纹图谱,利用 Diversilab 软件进行指纹图谱分析。

1.3.5 多位点序列分析(MLST) 不动杆菌 MLST 中的 7 个管家基因分别为:DNA 回旋酶亚基 B (gyrB)、葡萄糖脱氢酶 B (gdhB)、同源重组因子 (recA)、60 kD 伴侣蛋白 (cpn60)、6-磷酸葡萄糖异构酶 (gpi)、柠檬酸合成酶 (gltA)、RNA 聚合酶 ζ 因子 (rpoD)。MLST 7 个管家基因用 PCR 扩增并对扩增后的产物进行序列分析:试验中本研究设计的引物为

扩增和测序引物, MLST 7 个管家基因及其对应的引物详见表 1, 性能不好的引物用官方网站 <http://pubmlst.org/abaumannii/> 提供的引物进行。PCR 反应体系为 50 μ L: 25 μ L 2 \times PCR Mix, 上、下游引物 (100 μ mol/L) 各 0.1 μ L, DNA 2 μ L, 用 ddH₂O 补充剩余体积。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 按下面 3 步进行 30 次循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 100 bp DNA 标志物 3 μ L, PCR 反应产物 5 μ L, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳的电压设定为 110 V, 进行的时间为 40 min。凝胶成像记录电泳结果在 312 nm 紫外光下进行。有阳性条带的 PCR 产物, 切胶纯化后送北京擎科生物技术有限公司用 ABI 3730XL 测序仪测序。确定菌株的序列型(ST 型): 去除两端多余的序列, 将每

个管家基因的测序结果与其标准序列进行比对, 然后在 MLST 官方网站 blast 得出其等位基因数值。确定每株菌相应的 ST 型是通过 7 个管家基因位点的等位基因数值共同构成的 1 个等位基因谱来进行的。值得注意的是, 每个等位基因谱或管家基因的等位基因均应与 MLST 数据库中完全相同, 若有不一致的情况出现, 则应该给 MLST 数据库管理者提交序列, 待其审核后命名新的 ST 型或新的等位基因数值。

2 结 果

2.1 碳青霉烯类耐药突变菌株筛选及所有菌株 ARDRA 分子鉴定结果 亚胺培南和美罗培南体外筛选的碳青霉烯类耐药突变菌株 18 株, 耐药突变菌株 ARDRA 结果与亲代敏感菌株一致, 见表 2。

表 1 MLST 7 个管家基因及其对应的引物

目的基因	引物名称	引物序列 (5'~3')	扩增长度 (bp)	参考依据
gltA	gltA-F	GAA GCA ACT GGC AAA AAA G	790	本研究
	gltA-R	GAC CCC AAA GAG CAG AGA		
gryB	gryB-F	GGC GGC TTA TCT GAG TTT	662	本研究
	gryB-R	ATT TTA CGG TTA CGG CCT T		
recA	recA-F	ATT GGG GAT TGG TGG TTT	613	本研究
	recA-R	CGG AGG AGC CAT TTT GTT		
gdhB	gdhB-F	TAT ACC TCT GAC ACC TGC T	662	本研究
	gdhB-R	TAT GAC TCA CTA CCC CGT T		
cpn60	cpn60-F	ACG GTA CAA CAA CTG CAA	703	本研究
	cpn60-R	TGC GCT GTA CCT AAA TCT		
gpi	gpi-F	CGC TTA TTT TCC CAA GAC A	532	本研究
	gpi-R	CAA TAC CCC ACT CAG TCA		
rpoD	rpoD-F	TGT TGA AAA TGA GCC TGG A	787	本研究
	rpoD-R	TAA AAC ATC AGG ACG CAC		
gdhB	gdhB-F-amp	GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C	775	官方
	gdhB-R-amp	GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C		
gpi	gdhB-F-seq	ACC ACA TGC TTT GTT ATG	775	官方
	gdhB-R-seq	GTT GGC GTA TGT TGT GC		
gpi	gpi-F-amp/seq	AAT ACC GTG GTG CTA CGG G	508	官方
	gpi-R-amp/seq	AAC TTG ATT TTC AGG AGC		
rpoD	rpoD-F-amp	ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TAY ATG MGN GAR ATG GGN ACN GT	492	官方
	rpoD-R-amp	ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TTN GCY TCN ACC ATY TCY TTY TT		
rpoD	rpoD-F-seq	ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TT	492	官方
	rpoD-R-seq	ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TA		

表 2 亲代敏感菌株和耐药突变菌株 ARDRA 分子鉴定结果及亚胺培南和美罗培南的 MIC

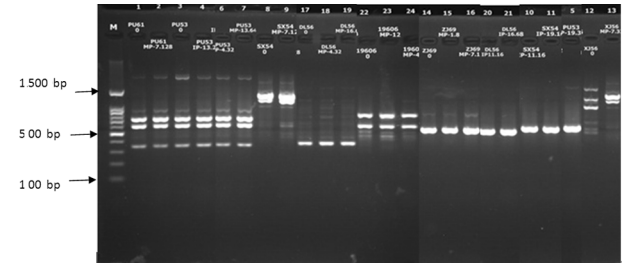
编号	菌株号	ARDRA 鉴定结果					E-test 试验结果		
		CfoI	AluI	MobI	RsaI	MspI	菌名	IP(μ g/mL)	MP(μ g/mL)
1	pu61-0	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	2	1.5
2	pu61MP-7.128	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	>32	>32
3	pu53-0	1	1	1	2	3	2 型 aba ATCC17904	1	0.75
4	pu53IP-13.2	1	1	1	2	3	2 型 aba ATCC17904	3	>32
6	pu53MP-4.32	1	1	1	2	3	2 型 aba ATCC17904	2	4
7	pu53MP-13.64	1	1	1	2	3	2 型 aba ATCC17904	1.5	>32

续表 2 亲代敏感菌株和耐药突变菌株 ARDRA 分子鉴定结果及亚胺培南和美罗培南的 MIC

编号	菌株号	ARDRA 鉴定结果					菌名	E-test 试验结果	
		CfoI	AluI	MobI	RsaI	MspI		IP(μg/mL)	MP(μg/mL)
8	sx54-0	2	1	3	1	3	3 型 ATCC19004	0.25	0.38
9	SX54MP-7.128	2	1	3	1	3	3 型 ATCC19004	0.5	>32
12	xj56-0	2	1	3	1	3	3 型 ATCC19004	0.25	0.75
13	MPxj56-7.32	2	1	3	1	3	3 型 ATCC19004	0.5	>32
17	dl56-0	2	1	1	1	1	13TU(ATCC17903)	0.19	0.25
18	dl56-MP4.32	2	1	1	1	1	13TU(ATCC17903)	0.5	6
19	dl56MP-16.64	2	1	1	1	1	13TU(ATCC17903)	0.5	12
14	zj69-0	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	0.5	0.5
15	zj69MP-1.8	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	0.5	6
16	zj69MP-7.128	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	0.5	>32
10	zj69IP-11.16	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	—	—
20	zj69IP-13.16	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	8	32
11	zj69IP-18.16	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	16	16
21	zj69IP-19.32	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	>32	>32
5	zj69IP-21.64	1	1	1	2	1+3	2 型 aba LMD82.54	>32	>32
22	ATCC19606-0	1	1	1	2	1	2 型 aba ATCC19606	1	1.5
23	19606MP-3.6	1	1	1	2	1	2 型 aba ATCC19606	1.5	12
24	19606MP-7.48	1	1	1	2	1	2 型 aba ATCC19606	8	>32

注：“* IP-X. Y”表示 * 菌株在亚胺培南的筛选下,第 X 代时在含亲代 Y 倍 MIC 浓度的 MH 琼脂板上生长;“* MP-X. Y”表示 * 该菌株在美罗培南的筛选下,第 X 代时在含亲代 Y 倍 MIC 浓度的 MH 琼脂板上生长;“—”表示未进行药敏试验

2.2 RAPD 电泳结果 xj56 敏感和耐药突变菌株 xj56-0 和 xj56-MP7.128,RAPD 分型条带相差在 2 个条带以上,不具有亲缘关系,其他菌株菌亲代敏感和其耐药突变株同源性密切相关,同时 pu61 和 pu53 亲代敏感菌株和耐药突变菌显示亲缘关系相近。见图 1。

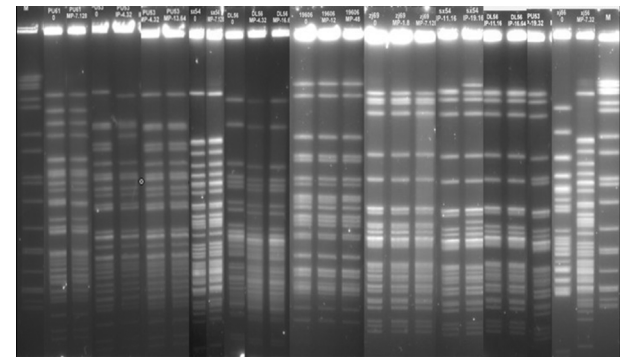


注:以上实验菌株顺序从左到右为 DNA 标志物、pu61-0、pu61MP-7.128、pu53-0、pu53-IP13.2、pu53MP-4.32、pu53MP-13.64、sx54-0、sx54MP-7.128、dl56-0、dl56MP-4.32、dl56MP-16.64、ATCC19606-0、19606MP-3.6、19606MP-7.48、zj69-0、zj69MP-1.8、zj69MP-7.128、zj69IP-11.16、zj69IP-13.16、zj69IP-18.16、zj69IP-19.32、zj69IP-21.64、xj56-0、xj56-MP7.128

图 1 亲代敏感菌株及耐药突变菌株的 RAPD 分型结果

2.3 PFGE 电泳结果 xj56 敏感和耐药突变菌株 xj56-0 和 xj56-MP7.128,PFGE 分型相差 7 个条带以上,认为无亲缘关系,其他菌株菌亲代敏感和其耐药突变株同源性密切相关。pu61 和 pu53 亲代敏感菌株和耐药突变菌株 PFGE 显示相差 7 个条带以上,认

为无亲缘关系。见图 2。



注:本图实验菌株顺序与图 1 相同,从左到右为 DNA 标志物、pu61-0、pu61MP-7.128、pu53-0、pu53-IP13.2、pu53MP-4.32、pu53MP-13.64、sx54-0、sx54MP-7.128、dl56-0、dl56MP-4.32、dl56MP-16.64、ATCC19606-0、19606MP-3.6、19606MP-7.48、zj69-0、zj69MP-1.8、zj69MP-7.128、zj69IP-11.16、zj69IP-13.16、zj69IP-18.16、zj69IP-19.32、zj69IP-21.64、xj56-0、xj56-MP7.128

图 2 亲代敏感菌株及耐药突变菌株的 PFGE 分型结果

2.4 亲代敏感菌株及耐药突变菌株 Diversilab(Rep-PCR)分型结果 DNA 提取试剂盒的 DNA A260/A280 在 1.8~2.0 之间,浓度均在 25~50 ng/μL,说明 DNA 的质量很好。xj56 敏感和耐药突变菌株因 RAPD 和 PFGE 显示无亲缘关系,故未进行 Diversilab 分型。pu61 和 pu53 亲代敏感菌株和耐药突变菌 Diversilab 分型显示亲缘关系相近。Diversilab 分型

结果的树状图和相似度矩阵图分别见图 3、4。

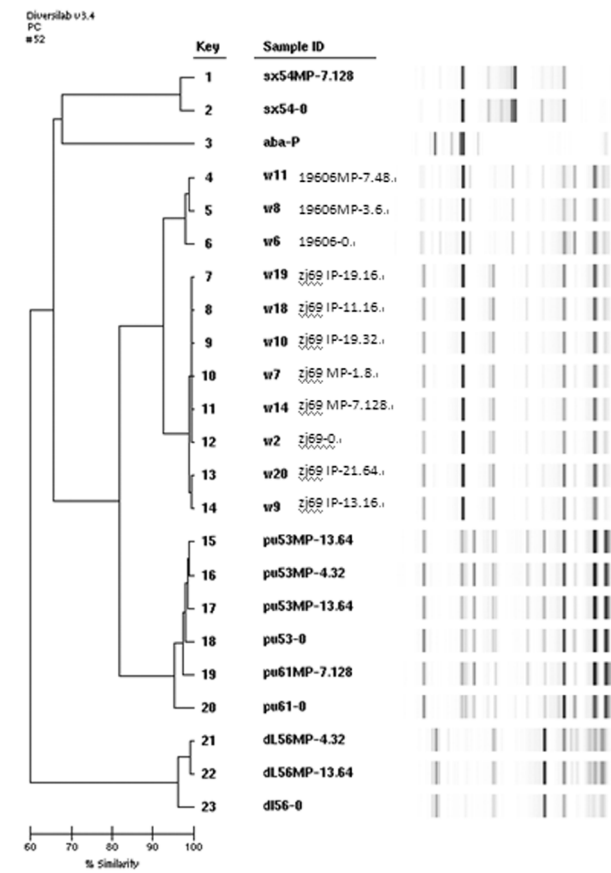


图 3 树状图(Dendrogram)

2.5 亲代敏感菌株及耐药突变菌株 MLST 分型结果
xj56 敏感和耐药突变菌株因 RAPD 和 PFGE 显示无亲缘关系,故未进行 MLST 分型。本研究设计的引物(不含有简并碱基)针对 *gpi*、*gdhB* 和 *rpoD* 3 个管家基因。对基因组 13TU 型不动杆菌、基因组 3 型不动杆菌 PCR 扩增均无条带,于是换用官方引物(为简并引物)。换用官方引物后,基因组 13TU 型不动杆菌 PCR 扩增成功并获得相应的 DNA 序列,但基因组 3 型不动杆 *gpi* 和菌 *gdhB* 的 PCR 依然失败。本研究

将发现的一些新的 ST 型和等位基因位点数据提交给 MLST 官方网站,回复结果为 ATCC19606-0、19606MP-3.6、19606MP-7.48 *gdhB* 和 *gpi* 的等位基因数值分别为 46、110;基因组 3 型不动杆菌 *sx54-0*、*sx54MP-7.128* *gltA*、*gryB*、*recA*、*cpn60*、*rpoD* 等位基因数值分别为 30、39、52、39、56;13TU 型不动杆菌 *dl56-0*、*dl56MP-4.32*、*dl56MP-16.64* *gdhB* 和 *rpoD* 的等位基因数值分别为 55、55。与其他分型方法相比,表现为相同表型的菌株具有相同的特点,尽管 MLST 有的菌株 PCR 扩增或测序失败。见表 3。综合以上 4 种分型方法结果可得: *xj56* 敏感和耐药突变菌株 *xj56-0* 和 *xj56-MP7.128*,RAPD 分型条带相差在 2 个条带以上,PFGE 分型相差 7 个条带以上,认为无亲缘关系,未进一步进行 *Diversilab* 和 MLST 分析。除此之外,其他菌株菌亲代敏感和其耐药突变株同源性密切相关。*pu53* 和 *pu61* 耐药突变菌株和亲代敏感菌株 *Diversilab* DNA 和 RAPD 指纹图谱显示亲缘关系相近,但 PFGE 显示相差 7 个条带以上,无亲缘关系。

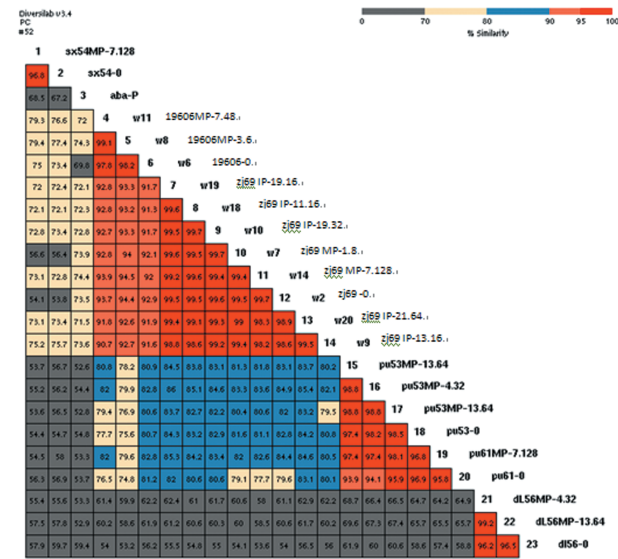


图 4 相似度矩阵图(Similarity Matrix)

表 3 亲代敏感菌株及耐药突变菌株 MLST 分型结果

菌株编号	ARDRA 鉴定结果	<i>gltA</i>	<i>gryB</i>	<i>gdhB</i>	<i>recA</i>	<i>cpn60</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoD</i>	ST 型	Clonal Complex
pu61-0、pu61MP-7.128	2 型 aba LMD82.54	1	12	61	2	2	102	3	NEW	/
pu53-0、pu53-IP13.2、pu53MP-4.32、pu53MP-13.64	2 型 aba ATCC17904	1	3	—	2	2	97	3	/	/
zj69-0、zj69MP-1.8、zj69MP-7.128、zj69IP-11.16、zj69IP-13.16、zj69IP-18.16、zj69IP-19.32、zj69IP-21.64	2 型 aba LMD82.54	1	34	56	1	1	66	26	NEW	/
ATCC19606-0、19606MP-3.6、19606MP-7.48	2 型 aba ATCC19606	1	10	46	6	1	110	14	NEW	/
sx54-0、sx54MP-7.128	3 型 ATCC19004	30	39	—	52	39	—	56	/	/
dl56-0、dl56MP-4.32、dl56MP-16.64	13TU(ATCC17903)	25	37	55	20	25	23	55	NEW	/

注: / 表示无相应结果; — 表示 PCR 扩增无条带

3 讨 论

不动杆菌包括密切相关的基因组 13 型、3 型、2 型(鲍曼不动杆菌)和 1 型(乙酰钙不动杆菌),对不动杆菌不同菌种耐药机制、同源性分析及临床致病性等研究具

有重要意义。ARDRA 是一种可以快速可靠地鉴定大多数不动杆菌基因型的方法。故本研究采用此方法进行鉴定并纳入了几种不同型的不动杆菌。

PFGE 电泳图谱比用高频切割限制性内切酶

RFLP 产生的图谱更为简单清晰,可用于细菌较大片段(10~800 kb)的染色体 DNA 限制性片段长度多态性分析,多用于区分亲缘相近菌株。结果具有极高的分辨率和再现性,缺点是所需设备昂贵且费时,不适合一般实验室开展,但却是用于评价其他方法的金标准。另外,使用不同的凝胶进行电泳得到的结果也比较复杂,很小电泳条件的不同就可以改变条带间距离,这为不同实验室间的结果比较带来一定麻烦^[6]。

PCR 近年来在病原微生物分型研究上也得到了广泛应用,是一种高灵敏度的体外扩增 DNA 片段的技术。本研究对不动杆菌进行了分型研究,利用了 Rep-PCR 和 RAPD 两种基于 PCR 的 DNA 指纹图谱分析技术。RAPD 技术利用一系列任意的核苷酸序列(9~10 bp)作为引物,通过引物与模板 DNA 序列随机配对进行 PCR 扩增,最早于 1990 年被报道^[7]。由于退火温度要求较低,引物较短,扩增时只有方向相反、距离最近的 2 个引物之间的模板 DNA 区段才能被扩增。通过电泳对扩增产物 DNA 片段的多态性进行分析。缺乏重复性和标准化是报道最多的问题,简便、快捷是 RAPD 的优点。在疾病暴发流行时,RAPD 仍是一种排除不相关菌株和分析相关菌株的优良分型技术^[8]。

Diversilab 系统基于 Rep-PCR 技术,它包含对真菌和细菌进行微生物基因型测定所需的软件、硬件以及耗材。基于网络的软件系统,它可以作为样品统计学资料的储存数据库,标准化处理用于比对的数据,储存样品的指纹图谱,分析指纹图谱间的相似度并为浏览数据提供多种报告选项。通过 DNA 指纹图谱快速准确地对种及亚种水平鉴别微生物分离株。

虽然试剂盒提供了可以和待测样品同时跑胶的 DNA 标准品来保证 DNA 的纯度和量,但进行 Diversilab 分型 Rep-PCR 反应时,推荐添加均一化浓度的基因组 DNA,所以笔者仍强烈建议使用分光光度计对 DNA 进行定量,保证浓度在 25~50 ng/ μ L。使用 LabChips 得到的结果具有一致性和可重复性,可用于进行实验室间结果的比对。一个 Diversilab LabChip 试剂盒包含检测 325 次所需的试剂及芯片,每张芯片可在不到 1 h 的时间内检测 13 个样品。另外,用户可在广泛的已知微生物范围内进行亚种水平的比对,多个经过充分鉴定的样品数据库及标准品随 Diversilab 产品一起提供,并且这些信息可定期更新,为快速稳定的指纹图谱鉴定提供了保证。鉴于以上优点,Diversilab 系统已开始被使用^[9-11],但由于价格比较昂贵,且需要配套的试剂、仪器和耗材,目前尚未广泛应用。

MLST 以 PCR 方法为基础,目的片段长度约 500 bp,从细菌染色体 DNA 中扩增 7 个分布均匀的管家基因。然后对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,切胶纯化后测序。通过等位基因谱(7 个管家基因等位基

因数值组成)确定菌株的 ST 型。选择管家基因是因为它们通常肯定存在于待测菌株中,并有足够的变异性,适合产生变异的等位基因在这些位点的存在。该方法克服了传统的分子流行病学方法的缺点:实验数据不能在各个实验室之间交流,可以用于全球性的流行病学调查。德国一家实验室先后研究指出 MLST 分型分辨力更高,与 PFGE、RAPD 具有很高的一致性。并且,在鲍曼不动杆菌跨越较长时间分型研究和种群结构研究方面更有优势,并且能在不动杆菌属其他菌种具有很好的分型效果,如 13TU 和醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合体^[12-13]。但本研究表明 rpoD 非简并引物对基因组 13TU 型不动杆菌和基因组 3 型不动杆菌扩增效果不好,gpi 和 gdhB 管家基因对基因组 3 型不动杆菌扩增效果不好,说明不动杆菌基因组的多态性,尚需进一步扩展其 MLST 的数据库。

4 结 论

不动杆菌可以引起多系统的感染,且多重耐药菌株越来越多地引起医疗人员的关注,对其感染进行同源性分析非常重要^[14-15]。每种分型方法都有其优缺点^[16],RAPD 和 Diversilab 操作简单,成本较低,适用于实验室不动杆菌快速同源性分析,对于亲缘关系密切,需要进一步区分的,需要选用 PFGE 或 MLST。PFGE 操作相对复杂,不适用实验室间的分析,MLST 成本较高,但更利于不同区域间菌株的流行病学调查研究。

参考文献

- [1] 王辉,郭萍,孙宏莉,等.碳青霉烯类耐药的不动杆菌分子流行病学及其泛耐药的分子机制[J].中华检验医学杂志,2006,29(12):1066-1073.
- [2] VANECHOUTTE M,DIJKSHOORN L,TJERNBERG I,et al. Identification of acinetobacter genomic species by amplified ribosomal dna restriction analysis[J]. J Clin Microbiol,1995,33(1):11-15.
- [3] PLOY M C,DENIS F,COURVALIN P,et al. Molecular characterization of integrons in Acinetobacter baumannii: description of a hybrid class 2 integron[J]. Antimicrob Agents Chemother,2000,44(10):2684-2688.
- [4] SEIFERT H,DOLZANI L,BRESSAN R,et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of Acinetobacter baumannii[J]. J Clin Microbiol,2005,43(9):4328-4335.
- [5] TENOVER F C,ARBEIT R D,GOERING R V,et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol,1995,33(9):2233-2239.
- [6] LUKACSI G,TAKO M,NYILASI I. Pulsed-field gel electrophoresis: a versatile tool for analysis of fungal genomes. A review[J]. Acta Microbiol Immunol(下转第 3018 页)

参考文献

[1] ZHANG W, DAI S M. Mechanisms involved in the therapeutic effects of *Paeonia lactiflora* Pallas in rheumatoid arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(1): 27-31.

[2] ZHOU Y B, JIN L, KONG F F, et al. Clinical and immunological Consequences of total glucosides of paeony treatment in Sjögren's syndrome: a randomized controlled pilot trial[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 39(39): 314-319.

[3] ZHAO Z F, HAN Y, ZHANG Z H, et al. Total glucosides of paeony improves the immunomodulatory capacity of MSCs partially via the miR-124/STAT3 pathway in oral lichen planus[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105(105): 151-158.

[4] HE D Y, DAI S M. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *paeonia lactiflora* pall., a traditional Chinese herbal medicine[J]. *Front Pharmacol*, 2011, 2: 10.

[5] WANG C, YUAN J, WU H X, et al. Paeoniflorin inhibits inflammatory responses in mice with allergic contact dermatitis by regulating the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines[J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(12): 1035-1044.

[6] NAM K N, YAE C G, HONG J W, et al. Paeoniflorin, a monoterpene glycoside, attenuates lipopolysaccharide-induced neuronal injury and brain microglial inflammatory response[J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(8): 1183-1189.

[7] MACAGNO A, NAPOLITANI G, LANZAVECCHIA A, et al. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation[J]. *Trends Immunol*, 2007, 28(5): 227-233.

[8] 罗道升, 戴宇平. 树突状细胞相关基础研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2005, 28(1): 51-55.

[9] 袁欣然, 王丹丹, 孙凌云. 树突状细胞与自身免疫病研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2017, 21(11): 766-770.

[10] TAI Y, WANG Q T, KORNER H, et al. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(9): 642.

[11] PERONA-WRIGHT G, JENKINS S J, O'CONNOR R A, et al. A pivotal role for CD40-mediated IL-6 production by dendritic cells during IL-17 induction in vivo[J]. *J Immunol*, 2009, 182(5): 2808-2815.

[12] IEZZI G, SONDEREGGER I, AMPENBERGER F A, et al. CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4(+) T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(3): 876-881.

[13] BARTHELS C, OGRINC A, STEYER V, et al. CD40-signalling abrogates induction of ROR γ ⁺ Treg cells by intestinal CD103⁺ DCs and causes fatal colitis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15439.

[14] 李玲霞, 吴锦艳, 杜国玉, 等. 小反刍兽疫病毒对鼠源树突状细胞成熟分化的影响[J]. *免疫学杂志*, 2018(5): 369-377.

[15] 刘天明, 刘英博, 付越, 等. 淫羊藿苷对小鼠骨髓树突状细胞分化及成熟的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2015, 47(7): 75-79.

(收稿日期: 2018-05-16 修回日期: 2018-07-28)

(上接第 3014 页)

Hung, 2006, 53(1): 95-104.

[7] OLIVE D M, BEAN P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6): 1661-1669.

[8] BOU G, CERVERO G, DOMINGUEZ M A, et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem-and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2000, 6(12): 635-643.

[9] GRISOLD A J, ZARFEL G, STRENGER V, et al. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks[J]. *J Infect*, 2010, 60(1): 44-51.

[10] Fontana C, Favaro M, Minelli S, et al. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates [J]. *BMC Infect Dis*, 2008, 8: 79.

[11] FLUIT A C, TERLINGEN A M, ANDRIESEN L, et al. Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(11): 3979-3989.

[12] BARTUAL S G, SEIFERT H, HIPPLER C, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(9): 4382-4390.

[13] WISPLINGHOFF H, HIPPLER C, BARTUAL S G, et al. Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomic species* 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(7): 708-715.

[14] MITTAL S, SHARMA M, YADAV A, et al. *Acinetobacter lwoffii* an emerging pathogen in neonatal ICU infect disord drug targets[J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2015, 15(3): 184-188.

[15] ANTUNES L, VISCA P, TOWNER K J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen [J]. *Pathog Dis*, 2014, 71(3): 292-301.

[16] RAFEI R, KEMPF M, EVEILLARD M, et al. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(10): 1179-1194.

(收稿日期: 2018-06-11 修回日期: 2018-08-28)