维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0078-03

应用重复序列 PCR 技术对嗜麦芽窄食单胞菌进行基因分型

夏 云[1],李明爽[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016;2. 重庆合川市人民医院,重庆 401520)

【摘 要】目的:建立一种快速、简便、准确的基因分型方法,对嗜麦芽窄食单胞菌的感染进行流行病学调查,确定基因型与耐药模式之间的相关性。方法:选用肠杆菌科基因重复序列(ERIC)为引物进行 PCR 扩增,对 14 株嗜麦芽窄食单胞菌进行基因分型研究,并与其抗生素耐药结果进行比较。结果:14 株嗜麦芽窄食单胞菌呈现 9 种耐药模式,其中 13 株菌表现为 5 种基因型。表明嗜麦芽窄食单胞菌的耐药模式和基因型之间无明确的相关性。结论:ERIC-PCR 应用简便易行,重复性好,适合于临床分离的病原菌的分型及医院感染的分子流行病学研究。

【关键词】嗜麦芽窄食单胞菌;聚合酶链反应;基因分型

【中国图书分类法分类号】R372 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-08-29

Genotyping of Stenotrophomonas maltophilia by using repeat sequence PCR

XIA Yun, et al

(*Department of Clinical Laboratory, the First Affilated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a rapid, simple and accurate genotyping method for the epidermical investigation of nosocomial infection caused by Stenotrophomonas maltophilia, and to explore the relationship between the genotyping and the drug-resistant profiles.*Methods*: Fourteen strains of Stenotrophomonas maltophilia isolated from clinic were genotyped by the techenic of Rep-PCR with the primer of enterobacterial repetitive intergenic consensus(ERIC), and the results of Rep-PCR were analyzed and compared with the patterns of antibiotic susceptibility. *Results*: All 14 strains involved in this study exhibited nine antibiotic susceptibility patterns. Of which 13 strains exhibited 5 different genotypes.There were no defined relationship between the results of the genotyping and the drug-resistant profiles. *Conclusion*: The Rep-PCR techenic used in this study is simple and repreducible for genotyping of Stenotrophomonas maltophilia.It is valuable in the molecular epidemiological investigation of nosocomial infection.

【Key words】 Stenotrophomonas maltophilia; Polymerase chain reaction; Genotyping.

嗜麦芽窄食单胞菌(Stenotrophomonas maltophilia)广泛存在于土壤、植物、农副产品、人体和动物体表面,属于条件致病菌。当机体免疫受损、免疫功能低下、长期接受广谱抗菌药物(尤其是碳青霉烯类抗生素)治疗时,可致严重感染[1]。由于该菌常对临床大部分抗菌药物耐药,给临床治疗带来极大困难[2]。近年来由该菌引起的医院感染明显上升,因此应当及早诊断和进行流行病学调查,以便调整治疗方案和采取相应的措施控制感染的流行。本文采用肠杆菌科细菌基因间重复一致序列设计引物的聚合酶链反应(ERIC-PCR)对嗜麦芽窄食单胞菌进行分子流行病学调查,取得满意效果,现报道如下。

作者介绍:夏 云(1966-),男,副主任技师,博士,主要研究方向:医院感染与细菌耐药。

1 材料和方法

1.1 菌株收集和鉴定

所有菌株均分离自 2004 年 8 月~2005 年 5 月我院的住院患者送检的标本,种类包括痰液、纤支镜抽吸物、脓液、导管等。标本按常规方法接种血平板,初筛试验为黄色湿润、中大菌落、革兰阴性杆菌,O/F 试验为非发酵型,氧化酶试验阴性。最后用 ATB Express 细菌鉴定系统(法国生物梅里埃)鉴定为嗜麦芽窄食单胞菌(ID>90%)。

1.2 药敏试验

采用终点稀释法测定嗜麦芽窄食单胞菌对 TZ(头孢他啶);PTC(哌拉西林/他唑巴坦);CI(环丙沙星);PM(头孢吡肟);TLC(替卡西林/克拉维酸);TSU(复方新诺明);COL(多粘菌素);AKN(阿米卡星);IMI(亚胺培南)等 9 种抗生素的耐药性。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853,结

维普资讯 http://www.cqvip.com

果判断参照 NCCLS 标准（2004 版）。

1.3 引物合成

采用与肠杆菌科细菌基因间重复一致序列互补的寡核苷酸作 ERIC-PCR 扩增引物（ERIC2）[3]（由大连宝生物工程有限公司合成）。序列如下：

5′-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′

1.4 细菌 DNA 提取和 PCR 方法

嗜麦芽窄食单胞菌单个菌落转入 2ml LB 培养基 37℃培养 18~24h。离心后去掉上清，用生理盐水洗涤沉淀 1 次，加入蒸馏水 100μl，混匀，煮沸 10min，离心取上清液作为模板。30μl 反应体系中含 10×缓冲液 3.0 μl，$MgCl_2$ 2.5 mmol/L，dNTP 各 0.25mmol/L，引物 ERIC2 10pmol，Taq™ 酶（上海生工）2U，DNA 模板 4.0μl。PCR 反应条件为：预变性 94℃ 5min 后，设 94℃ 1min，50℃ 1min，72℃ 1.5min，共 35 个循环，最后 72℃延伸 5min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶在 1×TAE 电泳缓冲液中 100V 电泳 0.5h，溴化乙锭染色，凝胶成像。

1.5 结果判断

DNA 主条带数和位置完全相同者，为同一基因型；相差一条者，密切相关，亦划为同一基因型；DNA 条带相差 2 条或主条带位置不同者为不同基因型[2]。

2 结 果

2.1 14 株分离菌的来源和分布

该菌感染在临床各科均可出现，在本试验中，肺科 6 例（42.8%），脑外科 6 例（42.8%），胸外科 1 例（7.2%），外三科 1 例（7.2%）。其中 13 株均来源于痰液，仅胸外科 1 例来源于脓液。可见该菌主要引起呼吸道感染，从临床查阅的资料观察，绝大多数为下呼吸道感染且伴有较严重的基础疾病，全部病例均采用广谱或超广谱抗生素进行治疗，部分病例使用过两种或以上不同类别的抗生素治疗，符合医院感染诊断标准，说明该菌为典型的条件致病菌，在医院感染中占有重要地位。

2.2 药敏分型结果

嗜麦芽窄食单胞菌对所试 9 种抗生素的耐药率分别是：TZ 71.5%，PTC 85.8%，CI 71.5%，TLC 85.8%，TSU 7.2%，COL 42.9%，PM、AKN、IMI 均为 100%。由此可见，嗜麦芽窄食单胞菌对多种抗生素耐药，特别是对 β-内酰胺类抗生素敏感率极低，但该菌对磺胺敏感度相对较高。14 株嗜麦芽窄食单胞菌对 9 种抗菌药物表现出 9 种耐药模式，结果见表 1。

2.3 基因分型结果

14 株嗜麦芽窄食单胞菌中有 13 株菌根据扩增的 DNA 条带数和电泳位置可被分成 4 个基因型，分别描述为 A、B、C、D 型。第 11 株菌未能进行分型，可分型率为 93%（13/14）。其中第 1、2、3、5 株为 A 型，第 4、6、7、14 株为 B 型，第 10、12、13 株为 C

表 1 14 株嗜麦芽窄食单胞菌的耐药模式及基因型

编号	来源科室	标本	TZ	PTC	CI	PM	TLC	TSU	COL	AKN	IMI	耐药模式	基因型
1	脑外监护室	痰	R	R	R	R	S	S	S	R	R	Ⅰ	A
2	脑外监护室	痰	R	R	R	R	S	S	S	R	R	Ⅰ	A
3	脑外监护室	痰	R	R	S	R	R	S	R	R	R	Ⅱ	A
4	脑外监护室	痰	R	R	R	R	R	S	S	R	R	Ⅲ	B
5	脑外科	痰	R	R	R	R	R	S	R	R	R	Ⅳ	A
6	脑外科	痰	S	S	R	R	R	S	S	R	R	Ⅴ	B
7	肺 科	痰	R	R	R	R	R	S	R	R	R	Ⅳ	B
8	外三科	痰	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Ⅵ	E
9	胸外科	脓痰	R	R	R	R	R	S	S	R	R	Ⅶ	D
10	肺 科	痰	R	R	R	R	R	S	S	R	R	Ⅶ	C
11	肺 科	痰	S	R	S	R	R	S	R	R	R	Ⅷ	NT
12	肺 科	痰	S	R	S	R	R	S	S	R	R	Ⅸ	C
13	肺 科	痰	S	R	S	R	R	S	S	R	R	Ⅸ	C
14	肺 科	痰	R	R	R	R	R	S	R	R	R	Ⅳ	B

注：R 耐药； S 敏感； NT 未能分型

维普资讯 http://www.cqvip.com

型,第 9 株为 D 型,第 8 株为 E 型。

3 讨 论

由于广谱抗生素和免疫抑制剂的广泛应用,由嗜麦芽窄食单胞菌引起的医院感染近年来呈上升趋势,由于该菌的耐药机制复杂,对抗生素呈现多重耐药,在医院重症病房内定植和随后引起的感染往往导致严重的后果。据 Barbier 报道,在法国一家医院中,曾发现同一克隆株的嗜麦芽窄食单胞菌在 2 年内 5 次造成医院不同科室的感染流行[4],因此对该菌进行流行病学监控尤为重要。为了解嗜麦芽窄食单胞菌的来源及流行情况,本试验对我院的嗜麦芽窄食单胞菌进行分子流行病学调查。利用 ERIC-PCR 对其进行基因分型结果表明,13 株嗜麦芽窄食单胞菌表现为 4 种基因型,其中,脑外科监护室的流行株为 A 型,B 型为散发株,而肺科感染流行株为 B、C 两型,两个病房均为典型的医院内获得性感染。而胸外科和外 3 病房的菌株为独立的基因型 D 和 E,说明这两个科室的嗜麦芽窄食单胞菌为散发性感染株。

研究表明在大肠埃希菌、伤寒沙门菌等肠杆菌科细菌基因中存在一种间隔分布的重复 DNA 序列,称肠杆菌重复基因保守序列(enterobacterial repetitive intergenic consensus,ERIC),该序列大小约 126bp,位于染色体上非编码转录区,遗传性稳定,在不同种间仅有拷贝数和在染色体中的位置变化,以 ERIC 片段为靶来设计引物进行 PCR 扩增,能产生多种独特的扩增产物(50~3000bp),具有种特异性甚至株特异性。由此可根据扩增产物的电泳条带来区分细菌的株(型)。该技术称为重复 PCR 指纹,有研究表明该技术对嗜麦芽窄食单胞菌其分辨力较随机 DNA 扩增多态性(RAPD)、自动化核糖体分型等基因分型技术高,与脉冲场凝胶电泳(PFGE)相当。与 RAPD 比较由于 ERIC-PCR 退火温度较高,产生较少的误配,其重复性优于 RAPD,与 PFGE 相当[5]。在 ERIC-PCR 反应中,模板浓度、引物浓度、退火温度等因素都会影响实验结果,我们通过对这些因素进行优化、对比,最后确定了反应条件。我们应用该技术对嗜麦芽窄食单胞菌作基因分型研究,标本不需经溶菌酶,蛋白酶 k 消化,酚 - 氯仿抽提,只需将细菌煮沸裂解即可,一次 PCR 能产生特异性图谱,不同批次同一株菌株 PCR 图谱相同,14 株菌有 13 株能被分型,可分型率达 93%。表明该法具有简便、快速、重复性好、可分型率高等特点。

本研究中 14 株嗜麦芽窄食单胞菌对 9 种抗菌药物呈现 9 种不同的耐药模式,其中 13 株对应 A、B、C、D、E 5 种不同的基因型。从表 1 可以看出同一种基因型的嗜麦芽窄食单胞菌可表现为不同的耐药模式,如基因型 A 对应的耐药模式为Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ;基因型 B 对应的耐药模式为Ⅲ、Ⅳ;相反,同一种耐药模式可表现为不同的基因型,如耐药模式Ⅳ呈现的基因型为 A、B;耐药模式Ⅶ呈现的基因型为 C、D 等,表明嗜麦芽窄食单胞菌的耐药模式和基因型之间无明确相关性。可能的原因有:1.耐药基因通过质粒或其它机制传播,使不同的基因型菌株获得耐药基因,产生相同的耐药模式。Avison 等[6]研究发现,嗜麦芽窄食单胞菌所携带的 L1 和 L2 酶编码基因可位于同一个约 200kb 的质粒上,并且有 3 株细菌质粒上的 L1 酶编码基因型亚型也完全相同,核苷酸同源性为 100%;2.同一种基因型的菌株在外界因素作用下(如抗生素选择性压力)发生基因突变,影响其耐药机制,而表现为不同的耐药模式。3.除产金属 β - 内酰胺酶外,可能尚合并有其它耐药机制。4.抗生素的应用的选择性压力。因此,仅靠耐药模式进行分型不能准确反映菌株之间的遗传相关性或流行病学特征,结合耐药模式和基因分型进行流行病学检测可起到互补的作用。

综上所述,采用重复 PCR 指纹技术对嗜麦芽窄食单胞菌进行基因分型操作简便,重复性好,DNA 模板制备较简单,不需要复杂的仪器设备,完全能够在临床实验室建立,且该方法还可应用于其他革兰阴性菌的基因分型,是医院感染分子流行病学调查中较理想的分析方法。

参 考 文 献

[1] Dentton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with Stenotropomonas maltophilia [J].Clin Microbiol Rev, 1998;11(1):57-80.

[2] 李 耘,李家泰,王 进,等.中国重症监护病房细菌耐药性监测研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004;27(7):733-738.

[3] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JK, et al. Distribution of repetitive DNA sequences in enterbacteria and application to fingerprinting of genomes[J]. Nucl Acids Res, 1991;19(24):6823-6831.

[4] Barbier FN, Boutiba BI, Nouvello M, et al. Molecular investi-

(下转第 84 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

AST、γ-GT、AST/ALT 均显著性升高，但各模型组间无统计学差异。这与各家报道乙醇可导致大鼠血清 ALT 升高不一致，本实验亦观察到各模型组 4w 末时 ALT 值较对照组升高，8w 末时测值有所下降，而 AST、γ-GT 则升高更为明显。考虑可能早期乙醇致肝脏损伤以破坏肝细胞膜，释放胞浆中 ALT 为主，稍后期则以损伤肝细胞线粒体，释放 AST 为主，并诱导微粒体生物转化系统使体内 γ-GT 增高。我们还观察到大剂量组 1 例虽血清 AST、γ-GT 明显升高，但病理形态未发现肝细胞明显空泡变，说明血清酶学改变可早于组织病理学改变，且个体间存在较大差异。进一步分析每只大鼠血清酶学升高程度与肝脏病理形态学改变程度不成正比，说明肝酶谱升高程度与病理学改变程度无明显正相关。

本实验模型组大鼠肝细胞脂滴空泡变与炎症浸润并存，这支持 ALD 各期病理改变可以并存的观点。Mallory 小体是 ALD 较为特征性的病理标志，它可能来源于中间丝蛋白合成与降解的异常，其出现率各家报道不一。本实验中部分大鼠病理切片中发现有 Mallory 小体，亦为肝脏脂肪变性的一个佐证。

B 超为本模型建立提供了一个值得探讨的观测指标，既简便又无创。本实验观察到病理改变与 B 超提示脂肪变的吻合率达到 79.17%（24 例病理有明显空泡变性大鼠中有 19 例 B 超呈阳性提示）。但本实验观察例数尚不够，B 超的经验亦不足，还需进一步扩大标本量加以研究。

本实验采用酒精分 2 次灌胃，配合普通饮食，8w 时小剂量组造模并不稳定，有部分大鼠肝脏病理未发现明显脂肪变，大剂量组则死亡率高，中剂量组死亡率低，造模较稳定，成功率高。这与许多文献报道的需 12w 形成中度脂肪肝模型相比，节约了时间，本方法造模时间缩短可能与乙醇起始浓度较大，并在 1 月后递增，每日两次灌胃，且间隔均为 10h 左右，保持了大鼠体内 24h 较稳定酒精浓度，又减少了死亡率，是一值得推广的造模方式。

参 考 文 献

[1] 欧 明. 汉英常用中医处方手册[M]. 广州：广东科学技术出版社, 1991；208.

[2] Lieber C S, DeCarli L M. The feeding of ethanol inliquid diets:1986 [J]. Alcohol Clin Exp Res,1986；10(5):550-553.

[3] Yokoyama H, Nagata S, Moriya S, et al. Hepatic fibrosis produced in guinea pigs by chronic tehanol administration and immunization with acetadehyde adducts[J]. Hepatology, 1995；21(5):1438-1442.

[4] Tsukamoto H, Reidelberger R D, French S W, et al. Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat[J]. Am J Physiol,1984；247(3Pt2):R595-R599.

[5] Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron[J]. J Clin Invest, 1995；96(1):620-630.

[6] 林 红，吕 森，张义侠，等. 酒精性肝病大鼠模型的建立[J]. 世界华人消化杂志，2001；9(1):24-28.

[7] 李东良，王玉玫. 大鼠酒精性肝损伤模型的建立与病理学观察[J]. 实用肝脏病杂志, 1998；3(4)：207-208.

[8] 范建高，曾民德，钟 岚，等.牛磺酸、金牡蛎对大鼠酒精性肝损伤的防治作用[J]. 肝脏, 1999；4(3)：154-156.

[9] 扈国杰，李佃贵，栗世方，等. 酒精性脂肪肝大鼠模型的建立及新清肝饮煎剂的防治作用[J]. 中西医结合学报, 2004；2(2)：123-137.

[10] Lindros KO, Stowell L, Vaanaoen H, et al. Uninterrupted prolonged ethanol oxidation as a main pathogenetic factor of alcoholic liver damage evidence from new liquid diet animal[J]. Liver, 1983；3(2):79-91.

[11] Rubin E, Lieber CS. Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates[J]. N Eng J Med, 1974；290(3):128-135.

[12] 李舒丹，历有名，虞朝辉，等.大鼠慢性酒精性肝损伤模型的建立[J].浙江医学，2002；24(9)：524-526.

[13] 张 宁，陈韶华，张幸国，等.茶多酚治疗慢性酒精性肝损伤的实验研究[J].中华肝脏病杂志，2005；13(2)：125-127.

[14] 林 红，吕 森，张义侠，等.酒精性肝病大鼠模型的建立[J].世界华人消化杂志，2001；9(1)：24-28.

（上接第 80 页）

gation of Stenotrophomonas maltophilia isolates exhibiting rapid emergence of ticarcillin-clavulanate resistance[J]. J Hosp Infect, 2000; 45(1):35-41.

[5] Sillber S, Pfaller MA, Hollis RJ, et al. Evalution of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli.Infect Control Hosp Epidemiol[J].2004;25(10):847-851.

[6] Avison MB, Higgins CS, von Heldrich CJ, et al. Plasmid location and molecular heterogenity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of Stenotrophomonas maltophilia[J]. Antimicrob Agents Chemother,2001; 45(2):413-419.