DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.027
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)08-0727-03

论著

IRS-PCR对重症监护病房患者标本分离鲍曼不动杆菌的分型研究

张庆玲[1],刘玉馥[2],刘明华[3],王仙园[4],府伟灵[3] (第三军医大学:[1]新桥医院神经内科,[2]新桥医院护理部,重庆 400037,[3]西南医院检验科,重庆 400038;[4]总后卫生部医疗局,北京 100842)

提 要:目的 运用稀有限制区多聚酶链式反应(infrequent-restriction-site polymerase chain reaction,IRS-PCR)对鲍曼不动杆菌进行基因分型。方法 通过PCR扩增稀有限制区旁的DNA序列,对15株鲍曼不动杆菌进行分型,并与药敏结果和生物学分型进行比较。结果 用IRS-PCR方法将鲍曼不动杆菌分为5种基因型,生物学分型有3种,抗生素表型有4种。结论 IRS-PCR分型方法敏感性强,分辨力高,重复性好,易操作,值得推广。

关键词:生物学分型;基因分型;鲍曼不动杆菌;聚合酶链反应
中图法分类号:R378;R446.9 文献标识码:A

Typing of Acinetobacter baumannii isolated from patients in intensive care unit with IRS-PCR

ZHANG Qing-ling[1], LIU Yu-fu[2], LIU Ming-hua[3], WANG Xian-yuan[4], FU Wei-ling[3] ([1]Department of Neurology; [2]Department of Nursing, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [3]Department of Medical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [4]Health Bureau, Health Department, General Logistics Department of PLA, Beijing 100842, China)

Abstract: Objective To type *Acinetobacter baumannii* using infrequent-restriction-site PCR (IRS-PCR). Methods Strain-specific electrophoretic patterns from PCR products by amplifying DNA sequences flanking infrequent restriction sites of 15 strains of *Acinetobacter baumannii* were compared with the results of biotyping and antimicrobial susceptibility. Results The 15 bacteria were divided into 5 gene types with IRS-PCR, but 3 with biotyping, and 4 with antimicrobial susceptibility. Conclusion IRS-PCR method for typing *Acinetobacter baumannii* is of strong sensitivity, high recognition, good repeatability, convenient operation, and wide range of application.

Key words: biotyping; genotype; *Acinetobacter baumannii*; polymerase chain reaction

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*,A.b)是常见的院内感染菌株,在ICU尤其常见,常引起医源性的伤口、泌尿道、呼吸道等感染[1,2]。近年来,大量抗生素的应用,使其耐药性不断增加,特别是对广谱β-内酰胺类抗生素耐药率已达60%以上。因此对鲍曼不动杆菌进行分子流行病学研究具有重要意义。目前运用较多的方法是随机扩增DNA多态性分型,脉冲场凝胶电泳,重复片断引物PCR等,但均具有一定的局限性。为此,我们采用了IRS-PCR进行鲍曼不动杆菌分型研究,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 收集2002年3月至10月从西南医院重症监护病房(intensive care unit, ICU)患者痰液、尿液、分泌物中分离的15株鲍曼不动杆菌。

1.1.2 主要试剂 根据文献由上海生物工程有限公司合成寡聚核苷酸,序列1:22碱基AH1 5′-AGAACTGACCTCGACTCG-CACG-3′;序列2:7碱基AH2 5′-TGCGAGT-3′;序列3:5′端磷酸化的18碱基AX1 5′-PO4CTAGTACTGGCAGACTCT-3′;序列4:7碱基AX2 5′-GCCAGTA-3′;序列15:20碱基PX-G 5′-AGAGTCTGCCAGTACTAGAG-3′限制性内切酶*Hha*Ⅰ和*Xba*Ⅰ及酶切反应缓冲液、T4 DNA连接酶及连接缓冲液、dNTP、*Taq* DNA聚合酶、PCR反应配套试剂均由上海生物工程有限公司提供,DNA Marker由申能博采生物技术有限公司提供。

1.1.3 主要仪器 梯度PCR循环仪(美国Bio Rad)、凝胶成像系统(美国Bio Rad)垂直电泳槽、电泳仪、离心机、恒温水浴锅。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定和药敏 经常规方法和MicroScan WalkAway 40仪器进行鉴定和药敏实验。药敏实验用了亚胺配南、阿米卡星、头孢吡肟、头孢他啶等11种抗生素。

1.2.2 生物学分型 参照Bouvet和Grimont提供的方法进行

作者简介:张庆玲(1971—),女,重庆市南岸区人,硕士研究生,主管护师,主要从事医院感染方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754606

收稿日期:2003-05-08;修回日期:2003-09-02

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生物学分型[3]。其分型依据是根据鲍曼不动杆菌对乙酰丙酸、柠檬酸、L-苯丙氨酸、L-酒石酸、4-对羟苯甲酸 5 种碳水化合物同化作用结果，将鲍曼不动杆菌分为 19 种生物型。

1.2.3 模板 DNA 的制备 参照 Mazurek 等[4]提供的方法略加修改。将培养至饱和状态的细菌用 K252 抽提试剂盒提取基因组 DNA。适配子(adaptor)构建：用无菌双蒸水 200 μl 分别稀释寡聚核苷酸 AH1 和 AH2，取 AH1 62.6 μl 和 AH2 20 μl(以保证 AH1 和 AH2 物质的量相等)混和于 PCR 缓冲液，使 PCR 缓冲液终浓度为 1×，混和溶液总体积为 200 μl。将装有混和溶液的 EP 管置于 90 ℃恒温器孔内 2 min，然后将恒温器调到 25 ℃，使 EP 管逐渐冷却。取出混和溶液(7.75 mol/L)置于－20 ℃冰箱备用。同法可构建 AX(7.865 mol/L)适配子。取 10 μl 基因组 DNA 用 5 U *Hha* Ⅰ 和 5 U *Xba* Ⅰ 在 37 ℃水浴中消化 1 h；T4 DNA 连接酶 50 U，10× 连接酶缓冲液 2 μl，AX、AH 适配子及酶消化后产物共 20 μl 在 16 ℃孵育 1 h 以将适配子连接到被消化的 DNA 上；再将连接产物用 5 U *Hha* Ⅰ 和 5 U *Xba* Ⅰ 在 37 ℃水浴中消化 15 min。

1.2.4 反应体系 总体积 50 μl，其中 10× PCR 缓冲液 5 μl，引物 PX-G 2 μl，引物 AH1 2 μl，模板 DNA 20 μl，dNTP 200 μmol/L，氯化镁 1.5 mmol/L，*Taq* 酶 2.5 U。

1.2.5 扩增条件 94 ℃预变性 5 min 然后变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1.5 min，进行 30 个循环，72 ℃延伸 5 min 后反应结束。

1.2.6 产物检测 PCR 产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶中，电压 3.5 V/cm，电泳 12 h 后用 EB 染色并用凝胶成像仪观察 DNA 条带的分布并参照 PFGE 基因图谱分型方法[5]进行分析。

2 结果

2.1 15 株鲍曼不动杆菌抗生素敏感实验结果和分型结果(表 1)

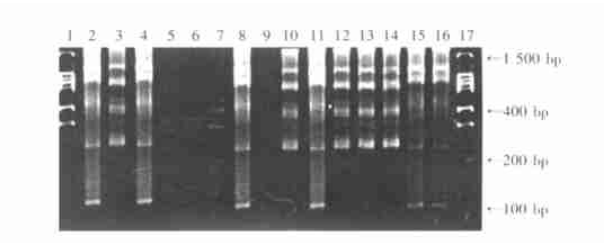
表 1 鲍曼不动杆菌分型和抗生素敏感性

Tab 1 Typing and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*

No. of bacteria	Body sites of culture for A.b	Antimicrobial susceptibility	Biotyping	IRS-PCR pattern
1	Tracheal aspirate	IMI; AMK	1	A
2	Sputum	IMI; AMK; TOB	6	B
3	Sputum	IMI; AMK	1	A
4	Urine	IMI; GEN	1	C
5	Tracheal aspirate	IMI; AMK	1	C
6	Sputum	IMI; AMK; TOB	6	D
7	Sputum	IMI; AMK	1	A
8	Wound	TOB	9	E
9	Sputum	IMI; AMK	6	B
10	Tracheal aspirate	IMI; AMK	1	A
11	Tracheal aspirate	IMI; AMK; TOB	6	B
12	Tracheal aspirate	IMI; AMK; TOB	6	B
13	Sputum	IMI; AMK; TOB	6	B
14	Sputum	IMI; AMK	1	A
15	Tracheal aspirate	IMI; AMK	1	A

IMI: imipenem; AMK: amikacin; GEN: gentamicin; TOB: tobramycin

2.2 IRS-PCR 基因分型图谱(图 1)



1, 17: 100 bp ladder; 2, 4, 8, 11, 15, 16: genotype A; 3, 10, 12, 13, 14: genotype B; 5, 6: genotype C; 7: genotype D; 9: genotype E

图 1 IRS-PCR 产物电泳结果

Fig 1 Electrophoretic results of IRS-PCR products

3 讨论

从表 1 中可以看出，细菌的生物学分型有 3 种，1、6 和 9；基因型有 5 种，主要的两种基因型是 A 和 B；抗生素敏感性表型有四种，即对泰能、阿米卡星敏感型，对泰能、阿米卡星、妥布霉素敏感型，对泰能、庆大霉素敏感型和仅对妥布霉素敏感型。另外，生物学分型相同者，IRS-PCR 分型不一定相同；而 IRS-PCR 分型相同者，生物学分型一定相同。抗生素敏感表型与 IRS-PCR 分型的关系则较为复杂，药敏表型相同的基因型可不同；基因型相同者，药敏表型也可不同。这可能与对抗生素的选择压力、转座子和耐药质粒的丢失与获得有关[6]。从上述结果可知：IRS-PCR 分辨率高于生物学分型和菌株药敏表型。

对临床分离的同种菌株进行分型对于流行病学调查、追踪传染源和传播途径具有重要意义。目前，用于鲍曼不动杆菌分型的方法很多，有药敏表型、生物学分型、基因分型等。大量研究表明，基因分型优于其它分型方法。基因分型的方法也很多，有脉冲场凝胶电泳(PFGE)、限制性片断长度多态性分析(RFLP)、随机扩增多态 DNA(RAPD)、AP-PCR、重复片断 PCR(Rep-PCR)等，但都有着这样那样的局限性。PFGE 分辨力高，是目前细菌分型的金标准，但此设备价格极为昂贵，一般实验室不具备，且此方法费时费力，故不易推广[4,7,8]。上述以扩增 DNA 为基础的方法，要么在设计引物时需要目的 DNA 的信息，要么使用任意引物，它们的结果极易受实验条件的影响。因此迫切需要寻找一种分辨力强、易操作、重复性好、耗时短的基因分型方法。IRS-PCR 就具备这样的优点，其原理为：以限制性内切酶 *Xba* Ⅰ 和 *Hha* Ⅰ 的作用位点为基础构建适配子和设计引物，通过 PCR 选择性扩增细菌染色体基因组稀有酶切位点 *Xba* Ⅰ 和非稀有酶切位点 *Hha* Ⅰ 之间

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的片断,然后将扩增产物进行聚丙烯酰胺电泳并观察结果。且 IRS-PCR 所需仪器设备简单常见,一般的临床实验室均可以满足。更重要的是,这种 DNA 指纹图谱法具有广泛的适用性,它几乎适合于任意细菌的分型。也就是说用相同的酶、相同的适配子、相同的引物和 PCR 条件可以用来鉴别各种不同的细菌。而且,这种方法与 PFGE 具有很好的一致性[6,7],适合在临床细菌分型中推广应用。

重症监护病房患者存在很多细菌感染的危险因素,如基础疾病严重、免疫力差、接受广谱抗生素治疗等。另外,这些患者往往需要频繁的医疗护理操作,如医护人员未严格遵守感染控制措施,极易引起患者之间的交叉感染而引起某种菌株感染暴发。用 IRS-PCR 对细菌进行基因分型有利于判断是否发生某种细菌感染的暴发,从而及时采取相应措施阻止耐药菌株进一步扩散。

参考文献:

[1] 张庆玲, 刘明华, 王仙园, 等. 泰能和氨苄西林/舒巴坦治疗鲍曼不动杆菌感染的临床研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(7): 632-634.

[2] 练向群, 林亚蕾, 刘 丁, 等. 重复片断引物 PCR 用于鲍曼不动杆菌分型研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(4): 437-438.

[3] Bouvet P J, Grimont P A. Identification and biotyping of clinical isolates of Acinetobacter [J]. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1987, 138(5): 569-578.

[4] Mazurek G H, Reddy V, Marston B J, *et al*. DNA fingerprinting by infrequent-restriction site amplification [J]. J Clin Microbiol, 1996 34(10): 2386-2390.

[5] Toner F C, Arbeit R D, Goering R V, *et al*. Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.

[6] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, *et al*. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for health care epidemiologists [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(6): 426-439.

[7] Yoo J H, Choi J H, Shin W S, *et al*. Application of infrequent-restriction site PCR to clinical isolates of Acinetobacter baumanni and Serratia marcescens[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3108-3112.

[8] Su L H, Leu H S, Chiu Y P, *et al*. Molecular investigation of two clusters of hospital-acquired bacteraemia caused by multi-resistant Klebsiella pneumoniae using pulsed-field gel electrophoresis and infrequent restriction site PCR[J]. J Hosp Infect, 2000, 46(9): 110-117.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2004)08-0729-01

个案与短篇

肾移植术后并发原发性肝癌 2 例

Two cases of hepatocellular carcinoma after renal transplantation

韩克强[1], 梁 平[1], 吴娅利[2] (第三军医大学: [1] 新桥医院肝胆外科, 重庆 400037, [2] 大坪医院野战外科研究所肿瘤血液科, 重庆 400042)

肾移植后长期应用免疫抑制剂,使发生恶性肿瘤的危险性明显增加[1]。我科 2003 年收治 2 例肾移植术后并发原发性肝癌患者,现报告如下。

1 临床资料

例 1: 男性, 33 岁, 肾移植术后 6 年, 术后长期服用环孢素 A (70 mg/d)、骁悉等免疫抑制剂药物。以皮肤黄染、纳差入院。肝脏 B 超、CT 及强化 CT 均示肝脏右后叶占位病变(4.75 cm×3.93 cm); 实验室检查示: ALT 92 IU/L, AST 282 IU/L, T-BIL 54.5 μmol/L, D-BIL 29.1 μmol/L, Crea 150.5 μmol/L, Urea 8.68 mmol/L, AFP 540 ng/L。患者既往有慢性乙型肝炎病史,后经 B 超引导肝穿刺活检明确为原发性肝癌,现患者仍在治疗中。

例 2: 男性, 51 岁, 肾移植术后 13 年, 术后长期服用环孢素 A(70 mg/d)、硫唑嘌呤(100 mg/d)及泼尼松(15 mg/d)。患者右上腹痛入院。腹部 B 超、CT 示肝右叶多发性占位,实验室检查示: ALT 33 IU/L, AST 60 IU/L, T-BIL 7.88 μmol/L, D-BIL 3.54 μmol/L, Crea 100 μmol/L, Urea 6.87 mmol/L, AFP 430 ng/L, 患者既往无肝炎病史。剖腹探查,见肝脏肿瘤广泛分布,腹膜后淋巴结肿大,无法切除。病理报告为原发性肝癌。

2 讨论

恶性肿瘤是肾移植术后的严重远期并发症之一,随着肾移植技术的日益提高,移植肾存活时间的延长及免疫抑制剂的长期应用,机体恶性肿瘤的发病率有逐年上升的趋势,其发生率国外报道 4% ~ 18%, 平均为 6%[1]; 国内报道为 0.78% ~ 1.67%[2], 可以看出我国肾移植术后恶性肿瘤发生率明显低于国外。从我国统计资料看,移植后恶性肿瘤以泌尿系肿瘤和肝癌较为常见[2], 台湾省资料也显示以泌尿系肿瘤与肝癌最常见[3]。

目前普遍认为肾移植术后肿瘤的发生与长期应用免疫抑制剂有密切关系。长期应用免疫抑制剂除可使机体的免疫系

作者简介: 韩克强(1975-), 男, 天津市人, 硕士, 医师, 主要从事肝癌转移等方面的研究。电话: (023)68774606

收稿日期: 2003-12-26; 修回日期: 2004-03-29

(下转 732 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net