DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.027
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0437-02

论著

重复片段引物PCR用于鲍曼不动杆菌分型研究

练向群[1],林亚蕾[2],刘 丁[2],俞志海[2],陈 伟[2] ([1]解放军202医院麻醉科,沈阳 110003;[2]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究检验科,重庆 400042)

提 要:目的 运用重复片段引物PCR的分析方法对鲍曼不动杆菌进行分子分型研究。方法 选用肠杆菌科基因间的的重复序列(ERIC)为引物进行PCR扩增,对22株鲍曼不动杆菌进行分型研究,并与生物学分型及抗生素耐药结果进行比较。结果 经重复片段引物PCR的方法,分离出6种不同基因型的鲍曼不动杆菌,而生物学分型只有2种,且与抗生素谱较为相关。结论 该方法简便易行,且重复性好,适合于医院感染流行病学研究。

关键词:聚合酶链反应;重复片段;鲍曼不动杆菌;医院感染;基因分型
中图法分类号:R378;R394-3 文献标识码:A

Typing of Acinetobacter baumannii with enterbacterial repetitive intergenic consensus PCR

LIAN Xiang-qun, LIN Ya-lei, LIU Ding, YU Zhi-hai, CHEN Wei (Department of Anesthesia, The 202nd Military Hospital, Shenyang 110003, China)

Abstract: Objective To type bacteria Acinetobacter baumannii by enterbacter repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) and apply the results in the clinical strain identification and epidemiology investigation. Methods With ERIC sequence as a primer, DNA products clinically isolated from 22 strains of Acinetobacter baumannii by Rep-PCR was analyzed, and compared with the antibiotic susceptibility spectrums and the results of conventional biotyping. Results With aid of ERIC-PCR, the 22 strains of the bacterium were divided into 6 profiles, which were correlated to the antibiotic susceptibility spectrums. But biotyping methods only got 2 profiles. Conclusion The method is practical and repetitive for molecular epidemology research in nosocomial infection.

Key words: polymerase chain reaction; repetitive fragment; Acinetobacter baumannii; epiodemiology, molecular

鲍曼不动杆菌是常见的院内感染菌株,常引起医源性的伤口、泌尿道、呼吸道等感染[1,2]。特别是近年来大量抗生素的使用,使其耐药性不断增加。由于这些菌株大多呈多重耐药,给临床治疗带来很大困难。同时,也易引起医院感染的爆发。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进行随机扩增DNA多态性(RAPD)分型,但该方法重复性较差,结果常不理想[3]。为此,我们选择了肠杆菌科基因间的重复序列(ERIC)为引物进行PCR扩增,并对鲍曼不动杆菌进行了分型研究,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 收集2000年1月—2001年6月从本院临床患者痰液、尿液、分泌物等中分离的鲍曼不动杆菌。质控参考菌株:大肠埃希菌ATCC25922、铜绿假单胞菌ATCC27853。

1.1.2 药敏纸片 哌拉西林(PIP)、头孢他啶(CRO)、亚胺配能(IPM)、环丙沙星(CIP)、阿米卡星(AMK)北京天坛生物制品公司提供。

1.1.3 主要试剂 根据文献合成ERIC2引物[4],序列为:5′-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGG G-3′、dNTP、Taq DNA聚合酶、PCR反应配套试剂及DNA Marker(pUC Mix Marker 8)均由上海Sangon生物工程有限公司提供。

1.1.4 主要仪器 PCR扩增仪(美国PE2400)、凝胶成像系统(美国Bio Rad)。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定 按《全国临床检验操作规程》(第2版)进行。

1.2.2 药敏试验 按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)2000年版推荐标准,纸片扩散法。

1.2.3 生物学分型 参照Bouvet和Grimont提供的方法进行生物学分型。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[5]。

1.2.4 DNA制备 取少量菌落,悬于50 μl无菌水中,95 ℃水浴15 min,置冰浴,10 000 r/min离心20 s,取上清备用[6]。

1.2.5 反应体系 总体积50 μl,其中10× PCR缓冲液5.0 μl,$MgCl_2$ 2.5 mmol/L,dNTP200 μmol/L,引物2 mmol/L,DNA模板3 μl,Taq酶2.5U。

1.2.6 扩增条件 94 ℃预变性5 min,然后94 ℃变性1 min,40 ℃退火1 min,72 ℃延伸2 min,进行35个循环,72 ℃延伸8 min后结束反应。

1.2.7 产物检测 PCR产物在2.0%琼脂糖凝胶中,电压5 V/cm,电泳90 min后用凝胶成像仪观察结果。

2 结果

2.1 鲍曼不动杆菌生物学分型和抗生素敏感性

临床共分离22株鲍曼不动杆菌,其生物学分型和抗生素

基金项目:全军"十五"医药卫生科研基金资助项目(01Q096)
作者简介:练向群(1964—),女,江苏省南京市人,主管技师,主要从事医院感染与消毒方面的研究,发表论文7篇。电话:(024)23053546
收稿日期:2001-08-11;修回日期:2001-12-21

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

敏感性结果见表 1。

2.2 鲍曼不动杆菌的基因分型

重复片段引物 PCR(Rep-PCR) 将 22 株鲍曼不动杆菌分成 6 个基因型，见表 1，以 C 型和 F 型的菌株最多，从其条带数目来看分别为 6、3 条且位置均相同，分别属于同一基因型(C 型和 F 型)。而另 5 株菌其基因型各不相同，条带数为 2～5 条，见图 1。

表 1 22 株鲍曼不动杆菌分型及抗生素敏感性

Tab 1 Typing and antibiotic susceptibility spectrum of 22 strains of Acinetobacter baumannii

NO. Stains	Antimicrobial susceptibility testing					Botyping	Pep-PCR typing
	PIP	CRO	IPM	CIP	AMK		
1	S	S	S	R	S	1	A
2	S	S	S	R	R	1	A
3	S	S	S	S	S	1	B
4	R	R	S	R	R	1	C
5	R	R	S	R	R	1	C
6	R	R	S	R	R	1	C
7	R	S	S	R	R	1	C
8	R	R	S	R	R	1	C
9	R	R	S	R	R	1	C
10	R	R	S	R	R	1	C
11	S	S	S	R	S	1	C
12	R	R	S	R	S	1	D
13	S	S	S	S	S	9	E
14	R	R	S	S	R	9	F
15	R	R	S	S	S	9	F
16	R	R	S	S	S	9	F
17	R	R	S	S	S	9	F
18	R	R	S	S	S	9	F
19	R	R	S	S	R	9	F
20	R	R	S	R	R	9	F
21	R	R	S	S	R	9	F
22	R	S	S	S	S	9	F

R: resistance; S: susceptibility

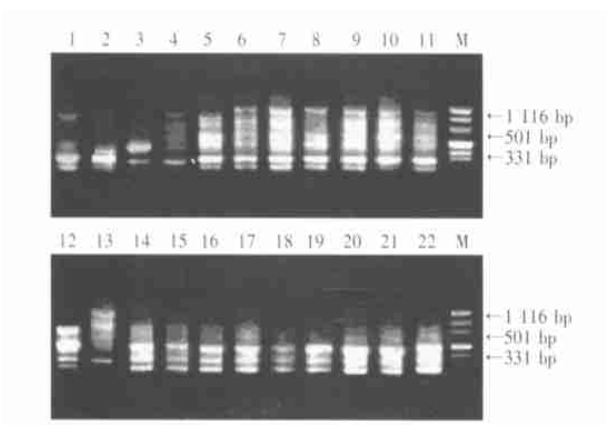


图 1 22 株鲍曼不动杆菌 Rep-PCR 电泳结果

Fig 1 Rep-PCR electrophoresis of 22 strains of Acinetobacter baumannii

3 讨论

鲍曼不动杆菌常用的分型方法较多，如药敏表型、生物学分型、基因分型技术等。从表 1 中可以看出 Rep-PCR 将 22 株鲍曼不动杆菌分成 6 个基因型，而生物学分型只有 2 种类型。基因型相同，生物学分型相同；而生物学分型相同，基因型却不同。另外，抗生素敏感性特征可知：Rep-PCR 分型率高于生物学分型和菌株表现型；菌株表现型相同，基因型可不同；基因型相同，表现型也可不同，但却有一定相关性，如基因 C 型菌株药敏表现为对亚胺配能的敏感和其它药物的耐受，而 F 型则表现以亚胺配能、环丙沙星、阿米卡星敏感为主。从基因图谱来看，C 型的条带多于 F 型，是否与其耐药基因成份如质粒、转座子等的获得有关尚需进一步证实。

目前，报道有关鲍曼不动杆菌的基因分型方法多以随机引物 PCR(RAPD) 为主[1]。但传统的 RAPD 一般都采用经过选择的短引物，在低退火温度下与模板进行随机扩增，由此产生的非特异性扩增带较多，影响了结果的分析；此外 RAPD 分析中缺乏重复性和标准化也是目前报道最多的问题[3]。Rep-PCR 是通过 PCR 扩增细菌基因重复 DNA 片段来获得菌株特异性图谱的方法，肠杆菌科基因间重复序列(ERIC)是其常用的一类引物，其长度为 126bp，位于染色体上非编码转录区，包含一段高度保守的中央倒置重复区和位于细菌基因外区域，由于不同细菌 ERIC 在基因中的位置不同，所以分型效果好，其分辨力较随机引物 PCR、核糖体分型等强，与 PFGE 具有高度相关性[3]。试验表明，该方法较为简便，重复性较好，无需特殊仪器和试剂，是医院感染分子流行病学中较理想的分析方法。鲍曼不动杆菌是一种常见的条件致病菌，它既可以为人体所携带，也可广泛存在于环境和物体表面，近年来其耐药现象越来越严重，特别是对 β-内酰胺类抗生素耐药率已达 60%以上。鲍曼不动杆菌是医院感染的主要病原菌之一，极易引起医院感染的爆发[7]。本研究发现在调查期内可能存在鲍曼不动杆菌爆发，爆发菌株为 C 型、F 型菌株其传染可能与病房环境、治疗器械、医护人员手部等有关，应加以重视。

参考文献：

[1] Koeleman J G, Parlevliet G A, Dijkshoorn L, *et al*. Nosocomial outbreak of multi-resistant Acinetbacter baumannii on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition[J]. Journal of Hospital Infection, 1997, 37(2): 113－123.

[2] Lortholary O, Fagon J Y, Hoi A B, *et al*. Nosocomial acquisition of multiresistant Acinetobacter baumannii: risk factors and prognosis[J]. Clinical Infectious Diseases, 1995, 20(4): 790－796.

[3] 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.

[4] Mathai E, Kaufmann M E, Richard V S, *et al*. Typing of Acinethacter baumannii isolated from hospital-acquired respiratory infections in a tertiary care centre in Southern India[J]. J Hosp Infection, 2001, 47(2): 159－162.

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

[6] Grundmann H J, Towner K J, Dijkshoorn L, *et al*. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility ofPCR-based fingprinting of Acinetobacter spp[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12): 3071－3077.

[7] Vila J, Marcos M A, Jimenez M T. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii complex[J]. J Med Microbiol, 1996, 44(6): 482－489.

(编辑 郭建秀)

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