

• 基础实验研究论著 •

运用变性高效液相色谱快速检测 TEM 型产超广谱 β -内酰胺酶菌株刘彩林, 孙自镛[△], 汪 峰, 汪 玥, 欧国平, 廖亚龙, 徐令清, 孙明月, 朱旭慧

(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 武汉 430030)

摘 要:目的 建立一种快速检测 TEM 型产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)临床分离菌及其流行病学监测的新方法。方法 采用 PCR 技术从临床分离株中扩增出 TEM 型质粒的编码序列, 扩增产物用变性高效液相色谱(DHPLC)技术进行分析并进行 DNA 测序, 确定其基因突变的类型, 最后通过比对确定其基因型。结果 共检测 66 株临床分离菌, 其中 42 株扩增出 TEM 型基因。经过 DHPLC 分析, 35 株表现为单一的洗脱峰, 其形态与 TEM-1 标准菌株的峰型相一致, 测序确定它们的碱基序列亦相一致, 不存在变异, 为 TEM-1 型; 5 株表现为一种异常的洗脱峰, 它们均为双峰, 形态一致, 测序结果表明它们均存在两种相同的基因突变, 经比对后确定为 TEM-10 型; 另外 2 株表现为另一种异常的洗脱峰, 测序结果显示为 TEM-116 型。结论 DHPLC 技术可用于细菌耐药基因的分型检测, 不但灵敏度和特异度高, 而且具有经济、快捷、高通量等特点, 具有很大的潜在临床应用价值。

关键词: 变性高效液相色谱; 超广谱 β -内酰胺酶; TEM 型; 基因分型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1283-03

Rapid detection of TEM-type extended-spectrum β -lactamase by denaturing high performance liquid chromatographyLiu Cailin, Sun Ziyong[△], Wang Feng, Wang Yue, Ou Guoping, Liao Yalong, Xu Lingqing, Sun Mingyue, Zhu Xuhui

(Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: **Objective** To establish a new method to rapidly detect TEM-type ESBLs and epidemiological surveillance. **Methods** Genotype determination of TEM-type ESBLs was performed by polymerase chain reaction(PCR) amplification from clinical isolates, followed by DHPLC technology and DNA sequencing. **Results** A total of 66 isolates were analyzed, including 42 specimens of TEM-type gene were amplified. Through DHPLC, 35 isolates showed a single elution peak, shape of which was consistent with that of TEM-1 standard strain, and sequence of them were also consistent with TEM-1 type. 5 isolates showed an abnormal bimodal elution peaks, and shape and sequencing results showed that there were the same mutations in the NCBI web site, identified as TEM-10. 2 isolates showed another abnormal elution peak and sequencing results same with TEM-116. **Conclusion** DHPLC technology could be used for typing of bacterial resistance gene detection, might be economic, efficient, high-throughput and with great potential clinical value.

Key words: denaturing high performance liquid chromatography; extended-spectrum β -lactamase; TEM type; genotyping

近年来,随着第 3 代头孢菌素在临床的大量使用,产耐药酶的革兰阴性杆菌日渐增多,其中超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)最常见,给临床治疗带来极大困难。由于编码 ESBLs 的质粒具有转移性,因此对 ESBLs 进行早期检测和基因分型对于临床合理使用抗生素,控制院内感染,具有重要意义。变性高效液相色谱(DHPLC)是基于变性原理实现对核苷酸片段分离分析的技术,该技术在已知和未知基因突变的检测和筛选、基因分型、基因定量和长度多态性分析等领域已经得到广泛应用^[1-3],而将其应用于细菌的耐药基因分型或耐药性监测,国内报道尚不多。本研究运用该技术检测 TEM 型 ESBLs 基因,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 收集同济医院 2010 年 5~6 月分离自临床各类标本中的病原菌 66 株,其中包括大肠埃希菌 54 株、肺炎克雷伯菌 9 株、产酸克雷伯菌 2 株、奇异变形杆菌 1 株,剔除同一患者相同部位的重复分离株,并经美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)表型确证实验确证为 ESBLs 阳性菌株^[4]。以产 TEM-1 型 ESBLs 的标准菌株大肠埃希菌 J53R1 作为本研究

的阳性对照和 DHPLC 分析的标准参考模板,大肠埃希菌 ATCC25922 为阴性对照。

1.2 仪器与试剂 WAVE 2100 型变性高效液相色谱仪(Transgenomic 公司,美国),PCR 扩增仪、电泳仪及 GelDoc XR 凝胶成像分析系统均购自美国 BIO-RAD 公司。PCR 引物由上海英骏生物技术工程有限公司合成, TaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTP(10 mmol/L)、MgCl₂(25 mmol/L)及 10×Buffer 均购自 Fermentas(深圳)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒 DNA 的提取 采用煮沸裂解法提取模板 DNA,设阳性及阴性对照。

1.3.2 TEM 型基因的 PCR 扩增 参照文献[5]合成引物,上游引物:5'-CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C-3';下游引物:5'-CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C-3'。反应体系(25 μ L):10×Buffer 3 μ L, MgCl₂ 1.8 μ L, dNTP 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L, 双蒸水 20.5 μ L, 引物各 1.5 μ L, 模板 DNA 2 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min, 以 94 $^{\circ}$ C 45 s, 54 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 扩增片段长度为 800 bp。

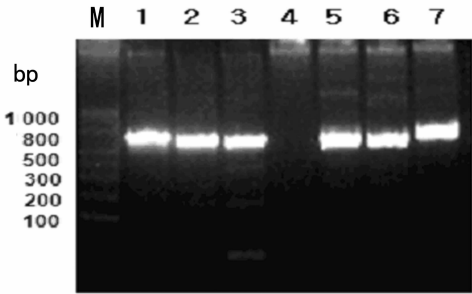
[△] 通讯作者, E-mail: ziyongsun@hotmail.com。

1.3.3 DHPLC 分析 本研究以大肠埃希菌 J53R1 作为 DH-PLC 分析的标准参考模板。制备样本异源双链时,取 5 μ L 标准株 PCR 扩增产物与等量待测样本 PCR 扩增产物相混合,置 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,然后以 0.03 $^{\circ}$ C/s 速率缓慢复性至 65 $^{\circ}$ C,这时混合样品中就会形成同源和异源的双链。在 WAVETM2100 型分析仪分析软件推荐的部分变性温度内摸索出最佳的温度(60.0 $^{\circ}$ C)条件下检测所有待测样本,数据的采集和分析采用随机分析软件 WAVE Maker。

1.3.4 核苷酸序列测定与分析 应用双脱氧链末端终止法,对 PCR 产物直接进行测序,然后在 NCBI 网站上进行序列比对,以确定其基因亚型。

2 结 果

2.1 TEM 型基因 PCR 扩增结果 66 株 ESBLs 阳性分离菌中有 42 株扩增出特异性条带,其中包括 32 株大肠埃希菌、8 株肺炎克雷伯菌、2 株产酸克雷伯菌,TEM 型基因检出率为 63.6%。扩增产物电泳结果见图 1。



M: 标记物;1~3、5、6:TEM 型基因阳性标本;4:TEM 型基因阴性标本;7:阳性对照。

图 1 TEM 型基因 PCR 扩增产物电泳结果

2.2 DHPLC 结果 首先在 50 $^{\circ}$ C 非变性条件下抽样检验了扩增产物的质量,受检样本在此条件下均表现为单一洗脱峰,基线平整,保留时间一致。检验扩增产物的质量后,对分析时样本的部分变性温度进行优化,结果产物的异源双链在 60.0 $^{\circ}$ C 条件下分离效果最佳,即选用此温度对所有标本进行分析。42 株 TEM 型基因阳性标本中,35 株出现单一洗脱峰,峰的形态与 TEM-1 标准参考模板峰型一致,7 株表现为异常洗脱峰,其中 5 株为一种异常洗脱峰,2 株为另一种异常洗脱峰,异常峰型比单一峰型保留时间提前 0.15~0.30 min,见图 2~3。

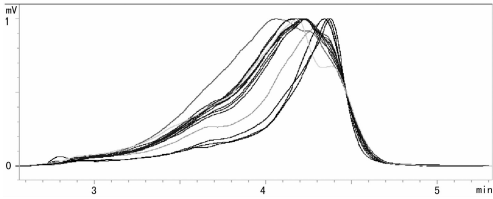
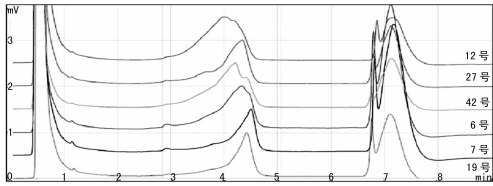


图 2 标准参考模板及样本 DHPLC 聚类分析图

2.3 PCR 产物的测序结果 42 株 TEM 基因阳性标本测序结果显示,35 株 DHPLC 显示单一峰型标本均为 TEM-1 型,测序确定它们的碱基序列亦相同,不存在变异;5 株 DHPLC 显示为一种异常洗脱峰型的标本为 TEM-10 型,存在第 425 位碱基 T→C、第 335 位碱基 G→A 两种突变;2 株 DHPLC 显示为另一种异常洗脱峰型的标本测序结果为 TEM-116 型,存在第 228 位碱基 T→C、第 396 位碱基 T→G 两种突变。本研究

显示 DHPLC 技术对 TEM 型基因检测的特异度达 100%。



12 号标本:为一种异常峰型;42 号标本:为另一种异常洗脱峰型;7、19 号标本:为单一峰型。

图 3 TEM 型 ESBLs 的特征性 DHPLC 洗脱峰

3 讨 论

TEM 型是产 ESBLs 菌株中最为常见的基因型别,目前 TEM 型 ESBLs 的衍生物已经超过了 100 余种,基因型种类及其检出率在不同国家和地区,乃至不同的医疗单位之间均存在着差异^[6-8]。随着抗菌药物的广泛使用,新型耐药基因的出现,必须加强对 ESBLs 阳性菌株的分子流行病学监测,从而更好地把握其流行规律,指导临床合理使用抗菌药物。

DHPLC 利用杂合双链和纯合双链部分变性温度的不同来检测基因变异,是一种新的高通量筛选 DNA 序列多态性的技术。从它最早成功地筛选出乳腺癌、卵巢癌相关基因的突变后,又应用于肿瘤、先天性长 QT 综合征、血友病等 50 多种疾病候选基因的变异筛选中。目前已被应用于 DNA 微卫星鉴定、肿瘤杂合性缺失检测、CpG 岛甲基化分析、DNA 片段大小测定及寡核苷酸的分析 and 纯化等许多基因组研究领域^[9-10]。近年来 DHPLC 技术有了很大发展,特别是在微生物学领域中开展了细菌耐药基因的研究^[11-12]。

本研究使用 DHPLC 技术检测 TEM 型 ESBLs 基因亚型,笔者根据 WAVETM2100 型仪器分析软件推荐的部分变性温度,在其上下 1~2 $^{\circ}$ C 范围内摸索出最适温度(60.0 $^{\circ}$ C)后,分析所有待测样本。主要观察异源双链洗脱峰出现与否及其形态特征,出现异源双链峰或峰型异常,表示样本核苷酸序列中存在与标准参考模板不一致的地方,即基因变异,而对于某一特定的基因变异,其异源双链洗脱峰是特异的。结果表明,在最适温度下 DHPLC 分析样本的阳性率为 100%,42 株 TEM 型基因阳性标本中,35 株出现单一洗脱峰,峰的形态与 TEM-1 标准参考模板峰型一致,7 株表现为异常洗脱峰,其中 5 株为一种异常洗脱峰,另外 2 株为另一种异常洗脱峰,异常峰型比单一峰型保留时间提前 0.15~0.30 min。与测序结果对比显示 35 株单一峰型标本均为 TEM-1 型;5 株 DHPLC 显示为一种异常洗脱峰型的标本为 TEM-10 型,存在第 425 位碱基 T→C、第 335 位碱基 G→A 两种突变;2 株 DHPLC 显示为另一种异常洗脱峰型的标本测序结果为 TEM-116 型,存在第 228 位碱基 T→C、第 396 位碱基 T→G 两种突变。可见 DHPLC 技术对 TEM 型基因检测的特异度达 100%^[12]。另外,TEM-10 型和 TEM-116 型 ESBLs 基因均为首次在本院发现,应引起临床高度重视,避免引起院内感染。

本研究发现一些基因亚型的洗脱峰型之间差异性不是特别明显,如 TEM-10 基因亚型的峰型,这可能与 DHPLC 的影响因素(如洗脱温度、PCR 产物长度、DNA 聚合酶的类型、PCR 引物的设计、异源双链是否形成等)有关。本研究方法为 PCR-DHPLC 的联合,所以对 PCR 产物的质量要求较高,据文献报

道, DHPLC 检测的 PCR 产物长度最好在 200~500 bp 范围内^[13], 而本次实验的 PCR 产物长度为 800 bp, 这可能是导致其敏感度降低的主要原因。另外引物的设计亦极为重要, 扩增的片段应涵盖所有可能的突变位点, 且片段长度不宜过长。

研究表明, DHPLC 技术应用于 TEM 型 ESBLs 基因检测具有经济、快捷、高通量和自动化的特点, 能快速识别 PCR 产物中的突变位点, 产生与基因型相对应的特异的洗脱峰型, 不需要进行测序, 使诊断成本明显降低, 可作为一种筛查方法用于产 ESBLs 菌的分子诊断及流行病学监测。

参考文献

[1] Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, et al. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. J Microbiol Methods, 2005, 61(3): 399-412.

[2] Xu L, Shabir S, Bodah T, et al. Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(3): 505-511.

[3] Lu T, Stroot PG, Oerther DB. Reverse transcription of 16S rRNA to monitor ribosome-synthesizing bacterial populations in the environment[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(13): 4589-4598.

[4] NCCLS. M100-S15 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Fifteen informational supplement[S]. Wayne PA: NCCLS, 2005: 39.

[5] Dallenne C, Da CA, Decre D, et al. Development of a set multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother,

2010, 65(3): 490-495.

[6] 李岷, 李克涓, 赵苏瑛, 等. 大肠埃希菌和克雷伯菌 ESBLs 及 AmpC 酶的检测[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1122-1123.

[7] Dhillon RH, Clark J. ESBLs: a clear and present danger? [J]. Crit Care Res Prac, 2012, 625170.

[8] 段辉丽, 刘文恩. 变性高效液相色谱对 ESBLs 基因分型的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1082-1083, 1085.

[9] Omaruddin RA, Chaudhry MA. Detection of genomic DNA methylation with denaturing high performance liquid chromatography[J]. Hum Cell, 2010, 3(2): 41-49.

[10] Battochio A, Mohammed S, Winthrop D, et al. Detection of c-KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumors: comparison of DHPLC and DNA sequencing methods using a single population-based cohort[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(1): 149-155.

[11] Wagner AO, Malin C, Illmeretal P. Application of denaturing high-performance liquid chromatography in microbial ecology: fermentor sludge, compost, and soil community profiling[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(4): 956-964.

[12] Xu L, Evans J, Ling T, et al. Rapid genotyping of CTX-M extended-spectrum β -lactamases by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. Antimicrob Agents Chemotherapy, 2007, 51(4): 1446-1454.

[13] 叶建伟, 丁洁. 变性高效液相色谱分析的技术特征及其应用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(2): 197-200.

(收稿日期: 2011-09-16)

(上接第 1282 页)

耐药性, 故本实验用较小浓度的倍丙酯分别与三种药物联用, 探讨倍丙酯是否可作为药物增效剂用于临床治疗鲍曼不动杆菌感染。实验结果显示倍丙酯与三种抗生素之间虽然没有协同作用, 添加倍丙酯后 9 株多重耐药菌株对头孢他啶、阿米卡星和环丙沙星仍然耐药, 但倍丙酯的抗菌浓度明显降低, 有的菌株(如 68439、68865、69122)其 MIC 值由联用前的 128 μ g/mL 降低到 8 μ g/mL, 提示倍丙酯与其他抗生素联用后其抗菌活性增加。说明倍丙酯是一种抗鲍曼不动杆菌的潜在新药, 其毒副作用和体内实验将在下一步工作中进行探讨。

(致谢: 由衷感谢川北医学院药物研究所凌保东老师和川北医学院附院检验科微生物室各位老师对本实验的支持和指导。)

参考文献

[1] Morovat T, Bahram F, Mohammad E. Distribution of different carbapenem resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals[J]. New Microbiol, 2009, 32(3): 265-271.

[2] Caricato A, Montini L, Bello G, et al. Risk factors and outcome of *Acinetobacter baumannii* infection in severe trauma patients[J]. Intensive Care Med, 2009, 35(11): 1964-1969.

[3] Ran YC, Ao XX, Liu L, et al. Distribution and drug resistance of pathogenic bacteria isolated from infected wounds of children after Wenchuan earthquake[J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2009, 47(5): 332-336.

[4] 杨丽梅, 蔡红, 班武娟, 等. 肺部疾病患者鲍曼不动杆菌的分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 161-162.

[5] 胡巧娟, 胡志东. 多重耐药鲍曼不动杆菌的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1121-1123.

[6] 蔡燕, 彭乙华, 凌保东, 等. 倍丙酯对多重耐药鲍曼不动杆菌生长的影响[J]. 中华临床医生杂志: 电子版, 2011, 5(6): 1647-1650.

[7] Nuryastuti T, van der Mei HC, Busscher HJ, et al. Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(21): 6850-6855.

[8] Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al. CNSE working group (2010): carbapenem-non-susceptible enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts[J]. Euro Surveill, 2010, 18, 15(46): 19711-19726.

[9] 赵敏. 细菌耐药现状及治疗——从超级细菌谈起[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(2): 104-108.

[10] 李耘, 吕媛. Mohnairn 2009 年度报告: 非发酵革兰阴性杆菌耐药监测[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(5): 348-351.

[11] 胡云建. Mohnarin 2006~2007 年度报告: 非发酵革兰阴性杆菌耐药性监测[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(10): 597-601.

[12] 蔡燕, 邢艳, 谢文光. 中药抗菌作用研究进展[J]. 中国医药导报, 2011, 8(6): 9-10.

[13] 蒋跃绒, 段惠军, 陈可翼, 赤芍 801 研究现状[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 760-763.

(收稿日期: 2011-09-07)