

· 论 著 ·

应用多重 PCR 在肠杆菌科细菌中检测 *bla*TEM、*bla*SHV、*bla*OXA-1 基因李虹玲<sup>1</sup>, 刘文恩<sup>1</sup>, 张运丽<sup>1</sup>, 陈腊梅<sup>2</sup>, 梁湘辉<sup>1</sup>, 吴清阳<sup>1</sup>

(1 中南大学湘雅医院, 湖南长沙 410008; 2 上海市第一人民医院, 上海 201620)

**[摘要]** **目的** 应用多重聚合酶链反应(PCR)法在肠杆菌科细菌中检测 *bla*TEM、*bla*SHV、*bla*OXA-1 基因。**方法** 收集 2004 年 10 月—2005 年 7 月湖南地区中南大学 3 所附属医院临床标本分离的多重耐药肠杆菌科细菌 171 株,以美国临床实验室标准化研究所(CLSI)规定的方法进行超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)表型确证试验,多重 PCR 进一步进行 *bla*TEM、*bla*SHV、*bla*OXA-1 三种耐药基因的检测。**结果** 171 株多重耐药的肠杆菌科细菌中,142 株(83.04%)ESBLs 表型检测阳性,经多重 PCR 扩增,105 株获得阳性结果。根据扩增片段大小判断:检出携带 *bla*TEM 菌株 85 株,携带 *bla*SHV 菌株 26 株,携带 *bla*OXA-1 菌株 10 株,其中 15 株菌同时携带多种耐药基因。**结论** 多重 PCR 可以快速、准确地检测出 ESBLs 表型阳性肠杆菌科细菌是否携带 *bla*TEM、*bla*SHV、*bla*OXA-1 基因。

**[关键词]** 多重聚合酶链反应;肠杆菌科;*bla*TEM;*bla*SHV;*bla*OXA-1;耐药基因;抗药性;微生物

**[中图分类号]** R378.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2008)06-0377-04

## Multiplex PCR detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*OXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*

LI Hong-ling<sup>1</sup>, LIU Wen-en<sup>1</sup>, ZHANG Yun-li<sup>1</sup>, CHEN La-mei<sup>2</sup>, LIANG Xiang-hui<sup>1</sup>, WU Qing-yang<sup>1</sup> (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 Shanghai First People's Hospital, Shanghai 201620, China)

**[Abstract]** **Objective** To apply a rapid and simple multiplex polymerase chain reaction(PCR) for detecting *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*OXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. **Methods** From October 2004 to July 2005, 171 clinical strains of multiply drug-resistant *Enterobacteriaceae* isolates were collected from three affiliated hospitals of Central South University in Hunan province. Extended-spectrum β-lactamases (ESBLs)-producing isolates were confirmed by means of phenotypic confirmatory tests as recommended by CLSI/NCCLS, multiplex PCR was used to determine *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*OXA-1 genes. **Results** Among 171 strains of multiply drug-resistant *Enterobacteriaceae*, 142 (83.04%) were ESBLs positive by phenotypic detection, 105 of 142 ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolates were confirmed to obtain positive results by multiplex PCR amplification. *bla*TEM DNA were detected in 85 isolates, *bla*SHV DNA in 26 isolates, *bla*OXA-1 DNA in 10 isolates, and 15 isolates carried 2 or more drug-resistant genes. **Conclusion** Multiplex PCR is a suitable tool which allows the rapid genotypic detection of *bla*TEM, *bla*SHV or *bla*OXA-1-carrying bacteria from phenotypic ESBLs-producing *Enterobacteriaceae*.

**[Key words]** multiplex polymerase chain reaction; *Enterobacteriaceae*; *bla*TEM; *bla*SHV; *bla*OXA-1; drug-resistant gene; drug-resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2008, 7(6): 377-380]

肠杆菌科细菌是当今社区及医院感染的重要病原菌,其对 β-内酰胺类抗生素的耐药问题已经非常严峻。产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)是肠杆

菌科细菌对第三代头孢菌素耐药的主要原因之一,而通常由质粒介导的 TEM 型与 OXA-1 型 β-内酰胺酶将引起大肠埃希菌对阿莫西林/克拉维

[收稿日期] 2007-12-04

[作者简介] 李虹玲(1981-),女(汉族),湖南省永州市人,技师,主要从事临床微生物耐药机制研究。

[通讯作者] 刘文恩 E-mail:liuwenen@hotmail.com

酸产生耐药,并且这些酶通过点突变产生新的衍生酶来增宽其所能作用的底物范围。因此,应用快速可靠的分子生物学方法来鉴定  $\beta$ -内酰胺酶及其基因型,并监测这些酶的流行病学情况已成为必要。多重聚合酶链反应(PCR)可以用特定的引物在一个反应管内同时扩增 3 组  $\beta$ -内酰胺酶基因:*blaTEM*、*blaSHV*、*blaOXA-1*,为快速检测耐药基因及流行病学分析提供依据。

## 1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2004 年 10 月—2005 年 7 月湖南地区中南大学 3 所附属医院住院患者临床标本分离的多重耐药肠杆菌科细菌 171 株,其中包括大肠埃希菌 57 株,肺炎克雷伯菌 54 株,阴沟肠杆菌 44 株,其他菌株(弗劳地柠檬酸杆菌 8 株,产气肠杆菌 3 株,居泉沙雷菌 2 株,奇异变形杆菌 2 株,斯氏普罗威登菌 1 株)16 株。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。标准对照菌株为已知携带 *blaTEM*、*blaSHV*、*blaOXA-1* 的菌株,包括产 *SHV-3* 的肺炎克雷伯菌 1 株,产 *TEM-12*、*OXA-1* 的大肠埃希菌各 1 株。

1.2 抗菌药物 药敏纸片头孢他啶(CAZ,30  $\mu$ g)、头孢噻肟(CTX,30  $\mu$ g)、头孢他啶/克拉维酸(CD02,30/10  $\mu$ g)、头孢噻肟/克拉维酸(CD03,30/10  $\mu$ g)均购自英国 Oxoid 公司。

1.3 试剂与仪器 Premix Taq 酶与 100 bp DNA Marker,购自大连宝生物工程有限公司;Applied Biosystems 2720 PCR 扩增仪;美国 UVP 公司 GDS-8000 凝胶成像系统。

1.4 ESBLs 检测 按美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2006 年标准,采用双纸片协同法进行 ESBLs 表型的确证试验。采用 CAZ、CTX 以及 CD02、CD03 两对纸片进行检测,对两种药物中的任意一种,加克拉维酸后的抑菌环直径比不加克拉维酸的抑菌环直径  $\geq 5$  mm 即判定为 ESBLs 表型阳性。以大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 为标准质控菌株。

1.5 PCR 法检测 *blaTEM*、*blaSHV*、*blaOXA-1*

1.5.1 引物选择 参考文献[1-2]设计 3 组引物,见表 1。所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成。

1.5.2 PCR 反应 采用溶解方法制备细菌 DNA:将细菌接种于 M-H 琼脂平板,37 $^{\circ}$ C 培养 12~18 h,

挑取 1 个菌落于 50  $\mu$ L 的蒸馏水中,95 $^{\circ}$ C 5 min 即可获得。PCR 反应体系共 25  $\mu$ L,包括 15  $\mu$ L Premix Taq 酶,3.1  $\mu$ L 引物(其中 TEM-C、TEM-H 各 0.75  $\mu$ L,SHV-F、SHV-R 各 0.5  $\mu$ L,OXA-F、OXA-R 各 0.3  $\mu$ L),2  $\mu$ L DNA 模板,4.9  $\mu$ L 无菌双蒸水。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,复性 56 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,共 32 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用含 0.5  $\mu$ g/mL 溴乙锭的 1.2%琼脂糖凝胶进行电泳。

表 1 3 种目的基因的引物序列及其产物片段大小

Table 1 Primer sequences of 3 target genes and size of product fragments

目的基因	引物		产物片段(bp)
	编号	序列	
<i>blaTEM</i>	TEM-C	5'-ATCAGCAATAAACCCAGC-3'	516
	TEM-H	5'-CCCCGAAGAACGTTTTTC-3'	
<i>blaSHV</i>	SHV-F	5'-AGGATTGACTGCCTTTTTTG-3'	392
	SHV-R	5'-ATTTGCTGATTTTCGCTCGG-3'	
<i>blaOXA-1</i>	OXA-F	5'-ATACTCTACTGTTGCATCTCC-3'	619
	OXA-R	5'-AAACCCCTCAAACCATCC-3'	

## 2 结果

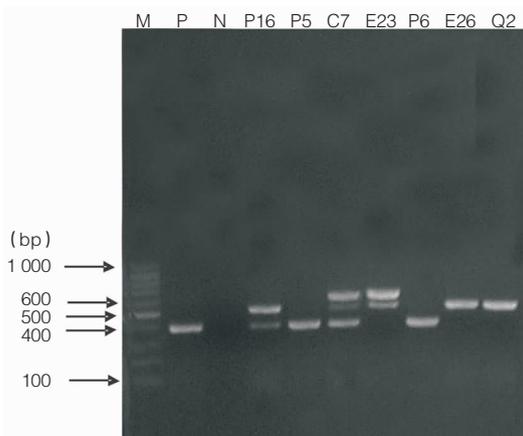
2.1 ESBLs 表型检测 171 株多重耐药肠杆菌科细菌中,共检出 ESBLs 表型阳性菌 142 株。其中,大肠埃希菌 52 株,肺炎克雷伯菌 47 株,阴沟肠杆菌 30 株,弗劳地柠檬酸杆菌 6 株,产气肠杆菌 3 株,臭鼻克雷伯菌 2 株,奇异变形杆菌 1 株,斯氏普罗威登菌 1 株。

2.2 多重 PCR 扩增 3 个标准菌株均获得目的 PCR 产物,经反复实验,结果具有很好的重复性。对 142 株 ESBLs 阳性肠杆菌科细菌应用多重 PCR 法进行 3 种耐药基因的扩增,有 105 株获得阳性结果,检出率为 73.94%。其中,大肠埃希菌 44 株,肺炎克雷伯菌 31 株,阴沟肠杆菌 20 株,弗劳地柠檬酸杆菌 6 株,产气肠杆菌 2 株,臭鼻克雷伯菌及斯氏普罗威登菌各 1 株。根据产物片段大小判断基因型:*blaTEM* 的片段大小为 516 bp,*blaSHV* 为 392 bp,*blaOXA-1* 为 619 bp;结果有 70 株菌携带 *blaTEM*,17 株菌携带 *blaSHV*,3 株菌携带 *blaOXA-1*,另外有 8 株菌同时携带 *blaTEM* 与 *blaSHV*,6 株菌同时携带 *blaTEM* 与 *blaOXA-1*,1 株阴沟肠杆菌(编号为 C7)同时携带上述 3 种耐药基因。见表 2 及图 1。

表 2 105 株多重 PCR 阳性菌株耐药基因检测情况(株)

Table 2 Detection of drug-resistant genes of 105 bacterial strains with positive multiplex PCR(strain)

细菌	TEM	SHV	OXA-1	TEM+SHV	TEM+OXA-1	TEM+SHV+OXA-1	合计
大肠埃希菌	40	-	1	-	3	-	44
肺炎克雷伯菌	12	14	-	5	-	-	31
阴沟肠杆菌	11	1	2	3	2	1	20
其他	7	2	-	-	1	-	10
合计	70	17	3	8	6	1	105



M: 100 bp DNA Marker(100~1 000); P: 携带 *blaSHV* 的标准菌株; N: 阴性对照; P16、P5、C7、E23、P6、E26、Q2: 临床分离菌株; P16 同时携带 *blaTEM*、*blaSHV* 两种基因; C7 同时携带 *blaTEM*、*blaSHV*、*blaOXA-1* 三种基因; E23 同时携带 *blaTEM*、*blaOXA-1* 两种基因

图 1 多重 PCR 检测  $\beta$ -内酰胺酶基因产物电泳图Figure 1 The electrophoresis map of  $\beta$ -lactamase gene amplified by multiplex PCR

### 3 讨论

产 ESBLs 是以肠杆菌科细菌为代表的革兰阴性杆菌对第一、二、三代头孢菌素等  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的主要原因之一。自 1983 年首次报道了产 ESBLs 的肠杆菌科细菌以来, 到目前为止, ESBLs 至少包括 424 种基因型(其中 *TEM* 型 159 种、*SHV* 型 99 种、*OXA* 型 102 种, <http://www.lahey.org/studies>)。ESBLs 的迅速衍变以及在菌株间的转移和传播, 使其耐药性成为突出问题。本研究从临床分离的 171 株多重耐药肠杆菌科细菌中, 共检出 ESBLs 表型阳性菌 142 株, 占 83.04%, 远远高于有关文献报道的 33.28%<sup>[3]</sup>, 这主要是因为本次实验所收集的菌株至少对 2 类抗菌药物耐药, 使得 ESBLs 检出率高, 同时也反映出产 ESBLs 是肠杆菌科细菌耐药的主要机制。

本研究结果显示, 多重 PCR 扩增阳性的 44 株

大肠埃希菌中有 43 株携带 *blaTEM*, 而无一株携带 *blaSHV*。所以我们认为, 虽然有大量文献报道<sup>[4-5]</sup> 大肠埃希菌产 *SHV* 型 ESBLs, 但在临床产 ESBLs 的大肠埃希菌所分离出的 ESBLs 中, *SHV* 不是其主要型别。本研究发现 31 株多重 PCR 扩增阳性的肺炎克雷伯菌中有 19 株携带 *blaSHV*, 占 61.29%, 这与 Paterson 等<sup>[6]</sup> 曾在 7 个国家收集产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌进行研究, 结果证实 *SHV* 型 ESBLs 是最常见类型的报道一致。多重 PCR 结果显示, 携带 *blaOXA-1* 的菌株共 10 株, 检出率为 7.04%。另外值得注意的是, 近年来有关单一菌株同时产多种 ESBLs<sup>[7]</sup> 以及由产复合 ESBLs 菌株<sup>[8-9]</sup> 引起医院感染暴发流行的报道屡有出现。在本研究中有 15 株菌检出  $\geq 2$  种的耐药基因, 显示出多重耐药的趋势。

耐药问题的两大主要对策是开发新的抗菌药物以及联合应用  $\beta$ -内酰胺类抗生素与  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂, 然而早在 20 世纪 90 年代就出现了有关对酶抑制剂耐药的 *TEM* 型、*OXA-1* 型以及 *SHV* 型  $\beta$ -内酰胺酶的报道<sup>[10-12]</sup>, 给临床的抗感染治疗带来极大困难。因此, 准确、快速地分离出产酶菌株, 进行  $\beta$ -内酰胺酶(BLA)分型以及对亚型的确认和对耐药状况的进一步明确极为重要。然而, 如果对每一株待测菌都用 *blaTEM*、*blaSHV* 和 *blaOXA-1* 的特异性引物分别进行扩增, 那么对于众多的临床与研究标本, 则需要大量的单一 PCR 反应。本研究应用 3 组引物在一个 PCR 反应管内同时扩增 3 组  $\beta$ -内酰胺酶基因, 并根据产物片段大小来确定其为哪种基因型。对 3 株标准菌进行重复实验, 均获得预期结果; 对 142 株 ESBLs 表型阳性菌进行检测, 105 株获得阳性结果, 并鉴定到基因型。本研究结果显示, 多重 PCR 不失为在肠杆菌科耐药菌中检测 *blaTEM*、*blaSHV* 和 *blaOXA-1* 的快速、有效的方法。特别是在尚不知耐药基因流行病学情况的条件下, 应用多重 PCR 方法可以快速筛查出肠杆菌科细菌的耐药基因型, 大致了

解其主要流行型别,为进一步研究提供依据。然而,本研究应用的多重 PCR 方法只是鉴定到基因型而并未鉴定到亚型,还需应用更多特异性的方法(如特异性引物的单一扩增、单链构象多态性 PCR 等技术)进行亚型鉴定。

### [参考文献]

- [1] Mabilat C, Courvaïn P D. Development of oligotyping for characterization and molecular epidemiology of TEM  $\beta$ -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1990, 34: 2210 - 2216.
- [2] Colom K, Perez J, Alonso R, et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV and blaOXA-1 genes in Enterobacteriaceae [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223: 147 - 151.
- [3] 曹月升, 陆春雨, 冯志山, 等. 临床分离的 191 株产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶细菌耐药性研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14 (9): 1067 - 1071.
- [4] Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, et al. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases [J]. Clin Microbiol and Infect, 2005, 11(8): 625 - 631.
- [5] Subramaniam G, Palasubramaniam S, Navaratnam P. SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* in Malaysia [J]. Indian J Med Microbiol, 2006, 24 (3): 205 - 207.
- [6] Paterson D L, Hujer K M, Hujer A M, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries; dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type-lactamases [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(11): 3554 - 3560.
- [7] Szabo D, Melan M A, Hujer A M, et al. Molecular analysis of the simultaneous production of two SHV-type extended-spectrum beta-lactamases in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* by using single-nucleotide polymorphism genotyping [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (11): 4716 - 4720.
- [8] Rodríguez-Baño J, Navarro M D, Romero L, et al. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control [J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(1): 37 - 45.
- [9] Espinal P A, Mantilla J R, Saavedra CH, et al. Molecular epidemiology of nosocomial infection by extended-spectrum beta-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Biomedica, 2004, 24(3): 252 - 261.
- [10] Chaibi E B, Sirot D, Paul G, et al. Inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics [J]. J Antimicrob Chemother, 1999, 43: 447 - 458.
- [11] Zhou X Y, Bordon F, Sirot D, et al. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1  $\beta$ -lactamase conferring resistance to  $\beta$ -lactamase inhibitors [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38: 1085 - 1089.
- [12] Prinarakis E E, Miriagou V, Tzelepi E, et al. Emergence of an inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant [J]. Antimicrob Agents and Chemother, 1997, 41: 943 - 949.

(上接第 384 页)

- [2] CDC. Trends in Diagnoses HIV/AIDS 33 States, 2001 ~ 2004 [J]. MMWR, 2005, 54(45): 1149 - 1153.
- [3] 钟柳清, 吕繁. 我国男男性接触人群的特征及艾滋病流行状况 [J]. 中国艾滋病性病, 2006, 12(5): 484 - 486.
- [4] UNAIDS - World AIDS campaign. 2001; Men who have sex with men and HIV/AIDS [R].
- [5] 李银河. 性文化研究报告 [M]. 2 版. 南京: 江苏人民出版社, 2003: 225 - 228.
- [6] 张北川, 李秀芳, 史同新, 等. 对中国男同/双性爱人口数量与艾滋病毒感染率的初步估测 [J]. 中国性病艾滋病防治, 2002, 8 (4): 197 - 199.
- [7] 中国国务院艾滋病防治工作委员会办公室, 联合国艾滋病中国专题组. 中国艾滋病防治联合评估报告 (2004) [R]. 北京, 2004: 11 - 14.
- [8] 国务院防治艾滋病工作委员会办公室, 联合国艾滋病中国专题组. 中国艾滋病防治联合评估报告 (2007) [R]. 北京, 2007: 12 - 15.
- [9] 王治伦, 晏治碧, 陈思源, 等. 建立重庆市艾滋病关爱之家体会 [J]. 中国感染控制杂志, 2004, 3(3): 275 - 276.
- [10] 朱明泉, 张北川, 李秀芳, 等. 中国男男性接触者年龄与艾滋病高危性行为关系的研究 [J]. 中华皮肤病学杂志, 2004, 37 (11): 635 - 637.
- [11] 汪雁鹤, 汪宁, 张北川, 等. 5 市男男性接触者状况及影响其高危行为的因素 [J]. 医学与社会, 2005, 18(9): 1 - 11.