

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.10.004

· 论 著 ·

多重降落 PCR 检测血流感染产 ESBLs 肠杆菌科细菌与 MRSA 方法的建立和应用

毕艳妮, 隋振耿, 宋宇, 曲业敏, 马淑青, 孙梅, 刘海珠

(大连医科大学附属威海市立医院, 山东 威海 264200)

[摘要] **目的** 探索一种可同时检测产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的肠杆菌科细菌与耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的多重降落 PCR 方法。**方法** 收集某院 2013 年 3 月—2014 年 9 月 102 份住院患者血培养阳性标本, 针对产 ESBLs 肠杆菌科细菌的 *SHV*、*TEM*、*OXA* 基因和 MRSA 的 *MecA* 基因设计 4 对特异性引物, 分别采用单一降落 PCR 和多重降落 PCR 对各耐药基因进行扩增, 并将结果与药敏纸片法进行比较。**结果** 各单一 PCR 均可扩增出特异性条带, 并用多重降落 PCR 同时检测了 4 种耐药基因; 建立的多重降落 PCR 对 4 种耐药基因(*MecA*、*SHV*、*TEM*、*OXA*)DNA 的检测下限分别为 4.37、2.19、4.53 和 3.59 ng。与药敏纸片法相比, 多重降落 PCR 总灵敏度与特异性分别为 100.00%、88.24%, 检测 ESBLs 的灵敏度达 100.00%, 特异性为 87.23%, 检测 MRSA 的灵敏度和特异度均为 100.00%。**结论** 该实验建立的多重降落 PCR 具有高灵敏度与特异性, 可用于产 ESBLs 肠杆菌科细菌和 MRSA 所致血流感染的快速诊断与流行病学调查, 有利于指导临床使用抗菌药物。

[关键词] 超广谱 β -内酰胺酶; ESBLs; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; MRSA; *SHV*; *TEM*; *OXA*; *MecA*; 多重降落 PCR

[中图分类号] R446.5 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2015)10-0663-05

Establishment and application of multiplex touchdown PCR for detection of extended-spectrum β -lactamases-producing Enterobacteriaceae and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bloodstream infection

BI Yan-ni, SUI Zhen-geng, SONG Yu, QU Ye-min, MA Shu-qing, SUN Mei, LIU Hai-zhu
(Weihai Municipal Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Weihai 264200, China)

[Abstract] **Objective** To develop a multiplex touchdown PCR for simultaneous detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing Enterobacteriaceae and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** Blood culture positive specimens from 102 hospitalized patients were collected between March 2013 and September 2014, four pairs of specific primers were designed based on *SHV*, *TEM*, and *OXA* genes of ESBLs-producing Enterobacteriaceae and *MecA* gene of MRSA, drug-resistant genes were amplified with single touchdown PCR and multiplex touchdown PCR, the results were compared with Kirby-Bauer disk diffusion method. **Results** Each single PCR amplified a specific band, four drug-resistant genes were also detected by multiplex touchdown PCR; the lower detection limits of multiplex touchdown PCR for DNA of *MecA*, *SHV*, *TEM*, and *OXA* were 4.37 ng, 2.19 ng, 4.53 ng, and 3.59 ng, respectively. Compared with Kirby-Bauer disk diffusion method, the overall sensitivity and specificity of multiplex touchdown PCR were 100.00% and 88.24% respectively, for ESBLs were 100.00% and 87.23% respectively, for MRSA were both 100.00%. **Conclusion** A higher sensitivity and specificity multiple touchdown PCR assay has been developed, and it can be used in the rapid diagnosis and epidemiology investigation of bloodstream infection caused by ESBLs-producing Enterobacteriaceae and MRSA, and is helpful for guiding antimicrobial use in clinic.

[收稿日期] 2015-03-02

[作者简介] 毕艳妮(1973-), 女(汉族), 山东省威海市人, 主管技师, 主要从事医学检验研究。

[通信作者] 宋宇 E-mail: songyu84417@163.com

[Key words] extended-spectrum β -lactamase; ESBLs; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA; SHV; TEM; OXA; MecA; multiplex touchdown PCR

[Chin Infect Control, 2015, 14(10):663-667]

血流感染 (bloodstream infection, BSI) 是指各种病原微生物侵入血液循环引起的一种严重全身感染性疾病, 可通过释放毒素和代谢产物等引起全身感染、中毒和炎性反应, 甚至引起全身多器官功能障碍综合征^[1]。肠杆菌科细菌和金黄色葡萄球菌是常见的 BSI 病原菌, 与 BSI 的发病率和病死率密切相关。近年来, 产超广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum β -lactamases, ESBLs) 的肠杆菌科细菌检出率不断上升^[2], 其可以抵抗多种抗菌药物, 故多重耐药的肠杆菌科细菌在临床 BSI 中越来越常见; 随着抗菌药物的不断使用, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 已成为医院感染和社区感染的重要病原菌之一。本研究尝试建立一种可同时检测产 ESBLs 的肠杆菌科细菌与 MRSA 的灵敏度高、特异性强的多重降落 PCR 方法, 用于临床血液标本的检测。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 标本收集 收集本院 2013 年 3 月—2014 年 9 月的 102 份住院患者血培养阳性标本, 其中培养出大肠埃希菌 40 株, 肺炎克雷伯菌 12 株, 铜绿假单胞菌 32 株, 嗜麦芽窄食单胞菌 7 株, 金黄色葡萄球菌 11 株。阳性报警时间 < 48 h。

1.1.2 阳性对照菌株 SHV、TEM、OXA 基因阳性的 大肠埃希菌各 1 株, OXA 基因阳性的嗜麦芽窄食单胞菌 1 株, SHV + TEM 基因阳性的肺炎克雷伯菌 1 株, TEM + OXA 基因阳性的铜绿假单胞菌 1 株, MecA 基因阳性的金黄色葡萄球菌 1 株。阳性对照菌株所含基因型已经测序确定, 均来自山东大学(威海)海洋学院。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 应用 Plex2 (Premier Biosoft, 美国) 软件针对 SHV、TEM、OXA、MecA 基因设计特异性引物, 应用 Primer-BLAST 检测所设计引物的特异性。引物序列见表 1。

1.2.2 标本处理 从血培养系统中取出阳性培养瓶, 再从培养瓶中无菌操作抽取 1 mL 培养物于 1.5 mL EP 管中, 1 500 r/min 离心 3 min, 将上层液

体转移至新 EP 管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 所得沉淀即为菌体, 进行实验操作。阳性对照菌株接种于血平板, 37℃、5% CO₂ 培养 24~48 h, 挑取单个菌落进行操作。

1.2.3 细菌 DNA 的提取 革兰阳性菌的处理: 向沉淀中加入 4% 溶菌酶 500 μ L, 37℃ 消化 40 min, 离心收集沉淀后加入 10% 蛋白酶 K, 于 55℃ 裂解 10 min, 离心收集沉淀后操作同革兰阴性菌。按 TaKaRa minibest 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (TaKaRa, 大连) 说明书提取 DNA, -20℃ 保存备用。

表 1 多重降落 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences of multiplex touchdown PCR

目的基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
TEM	F: CCGCATACTACTATTCTCAGAATG R: CTCACCGGCTCCAGATTTATC	440
SHV	F: TGTATTATCTCCCTGTTAGCCACC R: CTCACCGGCTCCAGATTTATC	767
OXA	F: GGCACCAGATTCAACTTTCAAG R: ATCTCCAGAGAAGTCTTGATTTC	256
MecA	F: GGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTC R: GTAACGTTGTAACCAACCCAAG	1 160

1.2.4 单一降落 PCR PCR 扩增总体系 25 μ L, 含 (10 \times PCR) 缓冲液 2.50 μ L, MgCl₂ (25 mol/mL) 3 μ L, dNTP (10 mol/mL) 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5U/ μ L) 0.20 μ L, 提取的 DNA 1 μ L, 各体系中引物量 (引物浓度均为 10 μ mol/L) 分别为 TEM 上下游引物各 0.05 μ L, SHV 上下游引物各 0.08 μ L, OXA 上下游引物各 0.15 μ L, MecA 上下游引物各 0.20 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L, 同时设阳性对照与阴性对照 (双蒸水作为模板)。反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 65℃ (每循环降低 0.5℃) 30 s, 72℃ 1 min (20 个循环); 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min (20 个循环); 72℃ 7 min。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶 6 V/cm 恒压电泳, 0.50 mg/L 溴化乙锭溶液染色, 在凝胶成像仪下分析电泳结果。

1.2.5 多重降落 PCR 多重降落 PCR 同一体系中同时含有 4 种特异性引物, 反应体系和反应条件与单一降落 PCR 体系相同。

1.2.6 检测下限的确定 使用无菌水稀释阳性对照菌株的 DNA, SHV、TEM、OXA 基因的稀释度分

别为： 2^{-1} 、 2^{-2} 、 2^{-4} 、 2^{-6} 、 2^{-8} 、 2^{-10} ，*MecA* 基因的稀释度分别为： 2^{-2} 、 2^{-4} 、 2^{-6} 、 2^{-8} 、 2^{-10} 、 2^{-12} ；以此稀释模板进行 PCR 扩增，将产生特异可见条带的最低 DNA 浓度定义为该多重降落 PCR 的检测下限。

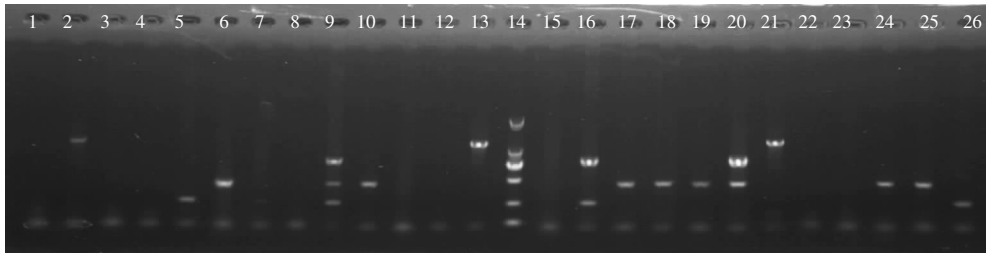
1.2.7 临床标本验证 药敏纸片法(K-B法)作为参考方法,通过纸片扩散初筛法、纸片扩散确证法确认耐药菌株。多重降落 PCR 在临床检测时的特异性与灵敏度计算方法:灵敏度 = $a/(a+c) \times 100\%$, a 为真阳性例数, c 为假阴性例数;特异性 = $d/(b+d) \times 100\%$, b 为假阳性例数, d 为真阴性例数。

1.2.8 扩增产物测序 PCR 结果与细菌培养结果不一致时,将 PCR 扩增产物送上海英骏公司测序,结果进行 BLAST 比对(<http://www.ncbi.nih.gov>)。

2 结果

2.1 多重降落 PCR 特异性检测 各单一 PCR 均可扩增出特异性条带,并用多重降落 PCR 同时检测了 4 种耐药基因,携带相应耐药基因的菌株于 1 160、767、440 和 256 bp 处出现对应大小的条带,见图 1 和表 2。

2.2 检测下限的确定 利用建立的多重降落 PCR 对 4 种耐药基因(*MecA*、*SHV*、*TEM*、*OXA*) DNA 进行检测限测定, DNA 原液的质量分别为 0.28、0.14、0.29、0.23 μg , 检测下限分别为 4.37、2.19、4.53 和 3.59 ng。见图 2。



1 为阴性对照菌株;14 为 DNA Marker DL2000;2、13、21 为 *MecA* 基因阳性菌株;6、10、17—19、24 和 25 为 *TEM* 基因阳性菌株;5 和 26 为 *OXA* 基因阳性菌株;16 为 *SHV*+*OXA* 基因阳性菌株;20 为基因 *SHV*+*TEM* 阳性菌株;9 为 *SHV*+*TEM*+*OXA* 基因阳性菌株

图 1 血培养菌株多重降落 PCR 产物的特异性检测结果

Figure 1 Specificity of multiplex touchdown PCR product for blood culture strains

表 2 血培养阳性菌株 ESBLs 基因检出情况

Table 2 Detection results of ESBL genes in bacterial strains from blood culture

基因名称	大肠埃希菌(n=40)	肺炎克雷伯菌(n=12)	铜绿假单胞菌(n=32)	嗜麦芽窄食单胞菌(n=7)
<i>SHV</i>	3	0	1	1
<i>TEM</i>	7	2	6	1
<i>OXA</i>	5	1	4	1
<i>SHV</i> + <i>TEM</i>	2	0	1	0
<i>TEM</i> + <i>OXA</i>	0	1	2	0
<i>SHV</i> + <i>OXA</i>	3	0	3	1
<i>SHV</i> + <i>TEM</i> + <i>OXA</i>	2	0	2	1
合计	22	4	19	5

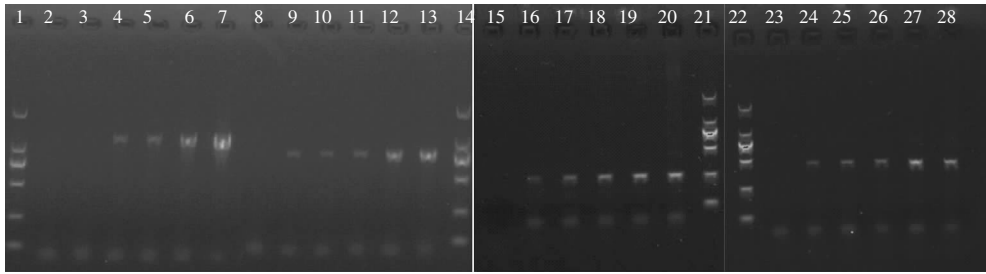
2.3 临床标本验证 102 份血培养阳性标本的菌株中,经纸片扩散法检测,确定产 ESBLs 的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌分别为 22、4、3、5 株,MRSA 7 株。以纸片扩散法为参考标准,多重降落 PCR 检测 ESBLs 的灵敏

度达 100.00%,检测特异性为 87.23%;检测 MRSA 的灵敏度达 100.00%,检测特异性达 100.00%,因此多重降落 PCR 的总灵敏度与特异性分别为 100.00%、88.24%,见表 3。

表 3 血培养菌株耐药类型多重降落 PCR 与培养法检测结果比较

Table 3 Comparison of drug resistance types between multiplex touchdown PCR and culture method for blood culture strains

耐药类型	多重降落 PCR	培养法		灵敏度 (%)	特异性 (%)
		阳性	阴性		
ESBLs	阳性	44	6	100.00	87.23
	阴性	0	41		
MRSA (<i>MecA</i>)	阳性	7	0	100.00	100.00
	阴性	0	4		



1、14、21、22 为 DNA Marker DL2000;2—7 为 *MecA* 阳性对照菌株 DNA 原液及各稀释浓度模板,4 泳道为 4.37 ng DNA(*MecA* 基因检出下限);8—13 为 *SHV* 基因阳性对照菌株 DNA 原液及各稀释浓度模板,9 泳道为 2.19 ng DNA(*SHV* 基因检出下限);15—20 为 *TEM* 基因阳性对照菌株 DNA 原液及各稀释浓度模板,16 泳道为 4.53 ng DNA(*TEM* 基因检出下限);23—28 为 *OXA* 基因阳性对照菌株 DNA 原液及各稀释浓度模板,24 泳道为 3.59 ng DNA(*OXA* 基因检出下限)

图 2 多重降落 PCR 的检测限检测结果

Figure 2 Detection limit results of multiplex touchdown 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 β -内酰胺类抗生素耐药的主要原因之一。1983 年首次报道了产 ESBLs 的肠杆菌科细菌,目前,ESBLs 至少包括 424 种基因型(其中 *TEM* 型 159 种、*SHV* 型 99 种、*OXA* 型 102 种)^[3]。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。近年来,有关单一菌株同时产多种 ESBLs,以及由产复合 ESBLs 菌株^[4-5]引起医院感染暴发流行的报道屡有出现。MRSA 除对甲氧西林耐药外,对其他所有与甲氧西林相同结构的 β -内酰胺类抗生素均耐药,MRSA 还可通过其他机制对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、利福平等产生不同程度的耐药。

细菌对抗菌药物耐药性的产生与传播本质上都是在细菌的基因水平上发生的,分析抗性基因序列,揭示基因结构与功能的关系,对阐明细菌耐药机理具有重要意义^[6]。产不同型别 ESBLs 细菌在世界各地的流行情况差异很大,国外主要以 *TEM* 基因型为主,亚洲流行 *CTX-M* 型,以 *CTX-M-14*、*CTX-M-3* 为主,我国也以 *CTX-M* 亚型为主,各地基因型略有差别^[7]。在本研究中未发现不同型别流行情况的差别,在以后的研究中可通过增加标本数量检测本地区的主要流行类型。

细菌多重耐药的常规检测方法为药敏纸片扩散法,其存在费时、繁琐、灵敏度低等弊端,且有些病原菌培养条件苛刻,不易检出,标本采集前患者使用抗

菌药物也会导致病原菌检出率低^[8],这些限制了及时正确的临床诊断与治疗。因此,建立一种快速检测耐药菌的方法尤为重要。近年分子生物学、尤其是 PCR 技术在临床微生物学中的应用,为病原生物的快速灵敏诊断提供了新的方法,有助于临床及时有效治疗。

多重 PCR (multiplex PCR),又称多重引物 PCR 或复合 PCR,指在同一 PCR 反应体系中加 2 对或多对引物,同时扩增 2 个或多个基因的 PCR,具有快速、高效、经济的优点。在单一 PCR 的基础上,加入 1 对内参引物,同时扩增内参基因可检测模板的质量及整个 PCR 反应的质量。1988 年,Chamberlain 等^[9]首次报道了应用多重 PCR 筛查杜氏肌营养不良基因缺失,随后广泛应用于临床病原检测、耐药基因筛查、临床流行病学调查等领域。研究^[10-12]利用多重 PCR 鉴定细菌 β -内酰胺酶耐药基因,应用多重 PCR 检测金黄色葡萄球菌耐药基因及致病毒素基因^[13-15]。当前尚无同时针对产 ESBLs 肠杆菌科细菌 *SHV*、*TEM*、*OXA* 基因和 MRSA *MecA* 基因的多重 PCR 的报道。

在本研究中有 2 株菌检出 ≥ 2 种的耐药基因,显示出多重耐药性,在尚不知耐药基因流行病学情况时,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,了解其主要流行型别,为进一步研究提供依据,本研究只鉴定到基因型而并未鉴定到基因的亚型,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^[16]。研究中血培养阳性标本经初步鉴定后进行多重降落 PCR,为临床防治产 ESBLs 菌提供一定的理论依据,但是由于 ESBLs 基因型较

多,有些基因型在非 ESBLs 菌中也有检出,后续研究中可设计更多其他型甚至是更多 ESBLs 亚型的引物保证扩增的特异性,在血培养阳性报警后直接检测标本将会大大缩短临床标本的检测时间,更早指导临床用药。

本研究尝试建立的多重降落 PCR 方法操作简单,对实验室硬件要求不高,特异性与灵敏度高,可缩短报告时间等,结果可直接指导临床使用抗菌药物,可作为 BSI 中 ESBLs 与 MRSA 感染的快速诊断与流行病学研究的备选方法。

[参考文献]

[1] 魏泽庆,沈萍,陈云波,等. Mohnarin 2010 年报告:血流感染细菌构成及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(3):465-470.

[2] 曹月升,陆春雨,冯志山,等. 临床分离的 191 株产超广谱 β -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.

[3] Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, et al. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(8):2818-2824.

[4] Szabó D1, Melan MA, Hujer AM, 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.

[5] Rodríguez-Baño J, Navarro MD, 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.

[6] Tzanakaki G, Tsopanomalou M, Kesanopoulos K, et al.

Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* [J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(5):386-390.

[7] Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification [J]. Nat Protoc, 2008, 3(9):1452-1456.

[8] Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4):933-951.

[9] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(23):11141-11156.

[10] 贾建安,姚杰,陶勇,等. 多重 PCR 检测临床产 ESBLs 阴沟肠杆菌的耐药基因型研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(4):317-319.

[11] 王政,陈萍,刘丁. 多重 PCR 快速检测鲍氏不动杆菌 D 类碳青霉烯酶相关基因 [J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(21):2824-2825.

[12] 濮小英,潘劲草,汪皓秋,等. 用多重 PCR 方法进行志贺菌超广谱 β -内酰胺酶基因分型 [J]. 中华预防医学杂志,2009,43(3):201-205.

[13] 王凤玲,刘国华,侯英荣. 多重 PCR 法检测金黄色葡萄球菌耐药基因及致病毒素基因 [J]. 中国医药导报,2010,7(2):70-71.

[14] 黄革,周晓红,蒋文玲,等. 多重 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌中氨基糖苷类抗生素耐药基因及其临床应用 [J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(4):244-247.

[15] 杨玉军,黄韦唯,王志云,等. 多重 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌四型肠毒素基因的研究 [J]. 现代预防医学,2009,36(9):1713-1715.

[16] 李虹玲,刘文恩,张运丽,等. 应用多重 PCR 在肠杆菌科细菌中检测 *bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{OXA-1} 基因 [J]. 中国感染控制杂志,2008,7(6):377-380.

(本文编辑:豆清娅)