

• 论 著 •

基因扩增法快速检测阴沟肠杆菌 Amp C β -内酰胺酶

赵 虎¹, 何铭君¹, 张时良²

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 江苏大学医学技术学院, 镇江 212001)

[摘要] **目的:**建立检测阴沟肠杆菌 Amp C β -内酰胺酶(简称 Amp C 酶),尤其是持续高产 Amp C 酶的快速方法。**方法:**合成阴沟肠杆菌 amp C 和 amp D 引物,扩增标准及临床分离的阴沟肠杆菌中 amp C 和 amp D 的基因片段,判断待检阴沟肠杆菌是否产 Amp C 酶,尤其是否产持续高产 Amp C 酶,并用头孢西丁三维试验加以证实。**结果:**临床分离的 214 株阴沟肠杆菌中 193 株 amp C 基因扩增阳性,其中 amp D 扩增阴性者为 16 株;头孢西丁三维试验阳性 18 株,其中 16 株 amp C 基因扩增阳性而 amp D 扩增阴性,另有 2 株 amp C 和 amp D 均阳性。去阻遏持续高产型标准菌株 amp C 扩增阳性、amp D 扩增阴性,野生型标准菌株 amp C 和 amp D 均扩增阴性。**结论:**用 amp C 和 amp D 引物扩增法可检出 18 株持续高产 Amp C 酶的阴沟肠杆菌中的 16 株,阳性率为 88.89%。该方法可用于检测阴沟肠杆菌是否产持续高产 Amp C 酶。

[关键词] Amp C β -内酰胺酶;PCR;阴沟肠杆菌

[中图分类号] R 978.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1329-03

Rapid detection of Amp C β -lactamase in *Enterobacter cloacae* by PCR

ZHAO Hu¹, HE Ming-Jun¹, ZHANG Shi-Liang² (Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a new method to detect Amp C β -lactamase by PCR. **Methods:** The amp C and amp D gene fragments of *E. cloacae* were amplified by the amp C and amp D primers to detect Amp C β -lactamase, especially the enduring and highly productive enzymes. **Results:** Totally 193 of 214 strains of *E. cloacae* were positive for amp C gene, implicating most strains of *E. cloacae* had the ability to produce the enzyme. Sixteen of the 193 strains (amp C positive) were negative for amp D genes, implicating these 16 strains could produce the enduring and highly productive enzymes. The results were confirmed by cefoxitin three-dimensional test. **Conclusion:** The new method to detect Amp C β -lactamase, especially the enduring and highly productive enzymes, by amp C and amp D primers is a rapid and accurate method.

[KEY WORDS] Amp C β -lactamase; PCR; *E. cloacae*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12): 1329-1331]

近年来,随着头孢菌素类抗生素的广泛应用,产 Amp C β -内酰胺酶(简称 Amp C 酶)的革兰阴性细菌越来越多见,尤其是近年来出现了质粒介导的 Amp C 酶,导致耐药菌株广泛传播,引起对青霉素类和头孢菌素类抗生素耐药的现象,导致产酶细菌引发的感染不易被及时控制,甚至造成感染扩散,已引起临床的高度重视^[1~3]。本室采用分子生物学方法合成 amp C 和 amp D 基因引物,对临床分离的阴沟肠杆菌进行 Amp C 酶检测,同时用头孢西丁三维试验进行复检。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌株 待检菌株:临床分离的阴沟肠杆菌 214 株。标准菌株:去阻遏持续高产型 *E. cloacae* 029M,野生型 *E. cloacae* 029,均由北京协和医院检验科细菌室陈民钧教授惠赠。

1.2 引物合成 amp C 基因引物^[1]: Prime A 5'-CTG ATG AAA GCC CAG TCT GT-3', Prime B

5'-TTC GCG AGC ATC ACA ATA CC-3'; amp D 基因引物^[2,3]: Prime C 5'-TTA TAC GTT CCA GAA GCG CGT CA-3', Prime D 5'-TAC TGT TAT CTC CTT ATC TGA CGA-3'。

1.3 主要试剂和仪器 M-H 琼脂平皿(上海科华生物制品有限公司),头孢西丁纸片(英国 Oxide 公司)。PCR 扩增仪和电泳仪。

1.4 方法

1.4.1 模板 DNA 的制备 取 1.5 ml 细菌培养液离心(12 000 $\times g$, 5 min, 4 $^{\circ}C$),弃上清,加入 100 μl 无菌双蒸水,混匀,100 $^{\circ}C$ 煮沸 10 min,离心(同上),上清即可作为 PCR 反应的模板。

1.4.2 PCR 扩增 PCR 反应体系为 50 μl ,其中

[基金项目] 上海市启明星计划(QMX01423)。

[作者简介] 赵 虎(1962-),男(汉族),博士,副研究员,硕士生导师。

*Corresponding author. E-mail: hubertzhao@163.com

10×buffer 5 μ l, 每对(2 种)引物各 1 μ l, 模板 DNA 10 μ l, 25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μ l, 10 mmol/L dNTP 4 μ l, ddH₂O 26 μ l, 引物的终浓度为 1 μ mol/L。混匀后置 PCR 扩增仪中, 扩增条件为: 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 3 min, 30 个循环。循环结束后, 72℃ 延伸 10 min, 缓慢冷却至 4℃。

1.4.3 PCR 产物的分析 取 8 μ l 的 PCR 产物加 1 μ l 的 DNA 上样缓冲液, 上 1.0% 的琼脂糖凝胶(含溴乙啶)进行电泳(80 V, 60 min), 用紫外检测仪检查电泳结果。出现明显亮带者为检测基因阳性。

1.4.4 产酶菌株的核实 用头孢西丁三维试验^[3,4]核实产 Amp C 酶的临床菌株。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 214 株临床分离的阴沟肠杆菌, amp C 基因扩增阳性者为 193 株, 21 株阴性; amp D 基因扩增阳性者为 177 株, 37 株阴性。193 株 amp C 阳性的菌株中 amp D 基因扩增阴性者为 16 株。21 株 amp C 阴性的菌株中 amp D 基因扩增均阴性。

标准菌株中的去阻遏持续高产型 *E. cloacae* 029M amp C 基因扩增阳性, 而 amp D 基因扩增阴性; 野生型 *E. cloacae* 029 amp C 基因和 amp D 基因扩增均为阴性。

2.2 三维试验结果 214 株临床分离的阴沟肠杆菌, 三维试验阳性者为 18 株, 其中 amp C 扩增阳性而 amp D 基因扩增阴性者(16 株)三维试验均阳性, 另 2 株 amp C 和 amp D 基因扩增均阳性。

3 讨论

Amp C 酶是由肠杆菌科细菌和(或)铜绿假单胞菌产生的一类主要作用于头孢菌素类抗生素, 且不被克拉维酸所抑制的 β -内酰胺酶。Amp C 酶大部分由染色质介导, 部分由质粒介导^[5~7]。

Amp C 酶是一种诱导酶, 产酶菌株在 β -内酰胺类抗生素的诱导下可产生诱导性 Amp C 酶, 故常规的细菌体外药敏试验无法准确地检测待检细菌产酶的性状和产酶的能力。而作为目前检测 Amp C 酶、尤其是质粒介导的 Amp C 酶的经典方法——头孢西丁三维试验, 因需事先将细菌裂解, 费时费力, 很难用于临床常规检测^[8,9]。故目前尚无简便的 Amp C 酶检测方法。

Amp C 酶的产生由产 Amp C 酶的基因所控制。Amp C 酶的基因组由结构基因 amp C 和多种调控基因 amp R、amp D 和 amp G 组成^[5~7]。染色体介

导的 Amp C 酶的合成是在各种调控基因产物(Amp R 蛋白、Amp D 酰胺酶和 Amp G 蛋白)的调控下, 由 amp C 基因转录合成的^[5~7]。但具体的合成和调控机制目前尚未完全明了。目前较为认可的是 Jacobes 于 1997 年提出的“胞质介质学说”, 即肽聚糖合成、分解的中间代谢产物参与 Amp C 酶的合成与调节^[4]。当有 β -内酰胺类抗生素存在时, 因 β -内酰胺类抗生素可破坏细菌细胞壁黏肽的合成, 使细菌胞质内 N-乙酰胞壁酰酐三肽的含量升高, 当超过 Amp D 酰胺酶的分解能力时, 即可通过竞争抑制作用, 解除抑制性配体对 Amp R 的抑制作用, 激活 amp C 转录, 产生 Amp C 酶(诱导酶)。当 amp D 基因发生突变, 不能编码产生 Amp D 酰胺酶或仅产生无正常功能的 Amp D 酰胺酶, 不能分解 N-乙酰胞壁酰酐三肽, 使其在胞体内大量积聚, 通过上述的竞争抑制作用, 激活 amp C 转录, 持续、大量地产生 Amp C 酶(非诱导酶)^[5~7]。

根据能否被 β -内酰胺类抗生素诱导, 将 Amp C 酶分为诱导酶和非诱导酶。诱导酶根据其诱导的程度, 可分为低诱导型(野生型)和高诱导型。非诱导酶根据产酶的程度, 又分为持续低产型和持续高产型^[10,11]。不同种属的细菌, 以及同一菌种的不同菌株, 其产酶的表型——产酶能力(是否产酶、产酶量的多少)、产酶类型(诱导酶或非诱导酶)各不相同。产酶表型的变化与产酶基因有关, 如染色体介导的 Amp C 酶, 当 amp D 基因发生去阻遏突变时, 可产生非诱导性的持续高产酶。而质粒介导的 Amp C 酶, 因质粒上仅含有 amp C 基因, 无调控基因的抑制作用, 故也表现为非诱导的持续高产酶。也就是说不论是染色体上 amp D 基因发生去阻遏突变、还是质粒介导的非诱导性 Amp C 酶, 均表现为持续高产状态^[12~15]。

Amp C 酶可水解三代头孢菌素为主的 β -内酰胺类抗生素, 导致临床抗感染治疗失败。尤其是持续高产 Amp C 酶, 耐药性强, 对临床危害大。而质粒介导的 Amp C 酶, 还可以通过质粒转导将耐药性传递给其他不产酶的细菌, 导致耐药菌株的广泛传播, 危害更大^[16~18]。控制产酶菌株感染的关键是及时发现产酶菌株并确认其产酶类型(诱导型或持续高产型), 以便临床选择敏感的抗菌药物, 迅速杀灭细菌。

本研究从 214 株阴沟肠杆菌中扩增出 193 株 amp C 阳性的菌株, 21 株阴性, 阳性率为 90.19%, 表明大多数阴沟肠杆菌都携带有 amp C 基因, 即提示大多数阴沟肠杆菌均有产 Amp C 酶的能力(包括诱导酶和持续高产酶); amp D 基因扩增阳性者为

179株,37株阴性。193株 amp C 阳性的菌株中(有产酶能力者)amp D 基因扩增阴性者为16株(8.29%),提示 amp D 发生突变(染色体介导)或 amp D 缺失(质粒介导),可能产持续高产 Amp C 酶。三维试验也证实了这16株阴沟肠杆菌为持续高产 Amp C 酶。但有2株三维试验阳性者(提示持续高产酶)amp D 和 amp C 均阳性,不符合原先的理论,可能是染色体上 amp D 突变的位点距引物合成部位较远,仍可正常扩增。

用 amp C 和 amp D 基因引物扩增法检测持续高产 Amp C 酶,阳性率很高(88.89%,16/18)、检测快速(1~2 h),若制成检测试剂盒,操作也不算繁琐,可望用于临床 Amp C 酶的检测。该方法尚不能区分染色体介导的持续高产酶还是质粒介导的持续高产酶,但对于指导临床合理选用抗生素已有实际意义。

参考文献

- [1] 张永龙,李家泰,赵鸣武.阴沟肠杆菌 Amp C 酶的特性研究[J].中国抗生素杂志,2000,25(6):428-435.
Zhang YL, Li JT, Zhao MW. Study on Amp C enzyme in *Enterobacter cloacae* [J]. *Zhongguo Kangshengsu Zazhi (Chin J Antibiot)*, 2000, 25(6): 428-435.
- [2] Kopp U, Wiedemann B, Lindquist S, et al. Sequences of wild-type and mutant amp D genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(2): 224-228.
- [3] 张嵘,郑芳,金亚平,等.肠杆菌科细菌去阻遏持续高产 Amp C 酶的检测与 amp D 基因突变的研究[J].临床检验杂志,2003,21(4):199-202.
Detection of AmpC-derepressed enzyme-stable hyperproducer and analysis of amp D gene mutation of *Enterobacteriaceae* [J]. *Linchuang Jianshan Zazhi (Chin J Clin Lab Sci)*, 2003, 21(4): 199-202.
- [4] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of Amp C beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(5): 1791-1796.
- [5] 张磊. Amp C β -内酰胺酶:抗感染治疗面临的新挑战[J].国外医学·抗生素分册,2000,21(3):116-122.
- [6] 朱卫民,钱元恕. β -内酰胺酶分子生物学研究进展[J].国外医学·抗生素分册,2001,22(2):57-60.
- [7] 赵虎,孔宪涛. Amp C 酶及其耐药性[J].世界感染杂志,2002,2(4):201-205.
Zhao H, Kong XT. Amp C enzymes and the drug resistance [J]. *Shijie Ganran Zazhi (World J Inf)*, 2002, 2(4): 201-205.
- [8] 周志慧,李兰娟,俞云松,等.两种检测阴沟肠杆菌 Amp C 酶方法的比较[J].中华检验医学杂志,2002,25(2):88-90.
Zhou ZH, Li LJ, Yu YS, et al. Evaluation on the methods for detecting Amp C enzyme produced by *Enterobacter cloacae* [J]. *Zhonghua Jianshan Yixue Zazhi (Chin J Lab Med)*, 2002, 25(2): 88-90.
- [9] 赵虎,孔宪涛. Amp C β -内酰胺酶的检测[J].中华检验医学杂志,2003,26(6):390-392.
- [10] Jacobs C, Frere JM, Normark S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria [J]. *Cell*, 1997, 88(6): 823-832.
- [11] 张磊,李萍,冯萍.医院感染高产 Amp C β -内酰胺酶阴沟肠杆菌的分子流行病学研究[J].中华医院感染学杂志,2001,11(4):254-257.
Zhang L, Li P, Feng P. Molecular epidemiology study of *Enterobacter cloacae* hyperproducing Amp C (beta)-lactamase in nosocomial infection [J]. *Zhonghua Yiyuan Ganranxue Zazhi (Chin J Nosocomiol)*, 2001, 11(4): 254-257.
- [12] Naas T, Massuard S, Garnier F, et al. Amp D is required for regulation of expression of NmcA, a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase of *Enterobacter cloacae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(10): 2908-2915.
- [13] Uehara T, Park JT. Role of the muricin precursor UDP-N-acetylmuramyl-L-Ala-gamma-D-Glu-meso-diaminopimelic acid-D-Ala-D-Ala in repression of beta-lactamase induction in cell division mutants [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(15): 4233-4239.
- [14] Higgins CS, Avison MB, Jamieson L, et al. Characterization, cloning and sequence analysis of the inducible *Ochrobacterum anthropi* Amp C beta-lactamase [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47(6): 745-754.
- [15] Rottman M, Benzerara Y, Hanau-Bercot B, et al. Chromosomal amp C genes in *Enterobacter* species other than *Enterobacter cloacae*, and ancestral association of the ACT-1 plasmid-encoded cephalosporinase to *Enterobacter asburiae* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 210(1): 87-92.
- [16] Philippon A, Arlet G, Jacoby G A. Plasmid-determined Amp C-type beta-lactamases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(1): 1-11.
- [17] 蒋燕群,顾敏晔,倪语星.用头孢西丁三相试验检测质粒 AmpCs [J].上海医学检验杂志,2000,15(3):166-167.
Jiang YQ, Gu MY, Ni YX. Detection of the plasmid-mediated AmpCs by cefoxitin 3-Dimensional test [J]. *Shanghai Yixue Jianshan Zazhi (Shanghai J Med Lab Sci)*, 2000, 15(3): 166-167.
- [18] 张乐海,傅云霜,马丽霞,等.双抑制剂扩散协同试验检测两种超广谱 β -内酰胺酶 [J].中华检验医学杂志,2001,24(4):211-213.
Zhang LH, Fu YS, Ma LX, et al. Double inhibitors diffuse synergy test for two kinds of extended-spectrum (beta)-lactamases [J]. *Zhonghua Jianshan Yixue Zazhi (Chin J Lab Med)*, 2001, 24(4): 211-213.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-11-11

[本文编辑] 曹静