

用 DNA 杂交技术检测临床分离株的四种耐四环素基因

张亚梅 陈民钧

(中国医学科学院北京协和医院检验科,北京)

采用 DNA 杂交技术对来自我国几个省的 306 株革兰氏阴性杆菌携带的耐四环素基因 (Tet) 的分布进行了研究。所有菌株均用 15 种生化反应数码分析法判定,绿脓杆菌用双歧法鉴定。用四种 Tet 探针检测结果如下: TetB 占 31.4%, TetD 占 25.2% TetA 占 12.5%, TetC 占 10.5%。与四种探针均不杂交者占 36.6%。含 1 种基因的菌株占 51.3%, 含 2 种的占 7.5%, 含 3 种的占 2.9%, 含 4 种的占 1.6%。不同地区的菌株的 Tet 种类不完全相同。还发现在严格控制的条件下杂交, TetA 和 TetC 有交叉反应。

关键词 原位菌落杂交; DNA 探针; 多重耐药菌株

自抗菌素应用于临床以来,具有多重耐药性的细菌已成为医院性感染的主要病原菌^[1,2,3,4]。四环素类抗菌素始用于 40 年代末期,以后它不仅用于临床治疗与预防,还广泛用于畜牧促肥,造成四环素类耐药株广泛传播^[5]。对四环素的耐性通常是由质粒介导的,广泛存在于各种细菌,在不同的耐药水平上表达。如用亚抑菌浓度的四环素诱导,可产生高水平耐药性^[6]。随着分子遗传学技术的发展,临床微生物学家与分子遗传学家用 DNA 杂交技术对耐四环素的菌株用各种四环素抗性基因 (Tet) 测试而分类。目前已发现在革兰氏阴性细菌中有 5 种 Tet^[6]。本文用其中四种 Tet: TetA、TetB、TetC、TetD 基因探针监测我国部份省市及协和医院的临床多重耐药株的四种基因分布及比较。

材料和方法

(一) 菌株

108 株为 1981 年—1986 年选自北京协和医院从血、痰、脓汁、体液及胆汁等分离的多重耐药菌株。另 198 株选自北京、天津、上海、南京、广西、广东、湖南、贵州及

四川等地医院分离株。这些菌株收集后,在本实验室用微量 15 种生化反应鉴定,用 5 位数码分析法判定。用微量稀释法检测了这些菌株对四环素 (Tc) 的最小抑菌浓度。用纸片扩散的 Kirby-Bauer 法检测了菌株对氨苄青霉素、庆大霉素、氯霉素、头孢唑啉、红霉素及复方新诺明的耐药性。

(二) DNA 探针的制备

所有载有探针质粒的菌株均为美国 Tufts 大学 Stuart B. Levy 博士赠送。现将此四株名称、耐药表型、所携质粒、此质粒的原质粒名称、整合了何基因、用什么酶可切下供制备探针用片段、原质粒来自何菌株等等列于表 1。

含 Tet 探针的菌株,用碱变性法大量提取质粒 DNA, 用氯化铯密度梯度离心法纯化质粒 DNA, 将 5 μ g 纯化的质粒 DNA, 用表 1 中相应内切酶切割, 在 1.0% 琼脂糖中电泳 3 小时, 电压 7.5V/cm, 电泳液为 pH8.0 的 Tris 醋酸盐缓冲液。将琼脂糖内所需 DNA 片段电泳洗脱至透析袋中, 用酚、氯仿酚、氯仿依次抽提, 最后用无

本文于 1989 年 1 月 3 日收到。

本文系国家自然科学基金资助项目。

表 1 四环素耐药决定子
Table 1 Tetracycline resistance determinants

类型 Tet class	菌名 Strain name	宿主菌 Host strain	质粒 Plasmid	载体 Cloning vector	探针片段 Probe fragment	质粒来源 Plasmid source	表型 Phenotype
A	D20-15	JM33	pSL18	pUC18 ⁺	750bp SmaI	RP1	(SM)*Tc ^S Ap ^R
B	D20-16	HB101	pRT11	pRT11 ⁺	1.275kb HincII	R222	(SM)*Tc ^R
C	D20-5	DO-7	pBR322	pBR322 ⁺	929bp BstNI	PSC101	(NaI)*Tc ^R Ap ^R
D	D20-2	C600	pSL106	pACYC177	3.05kb HindIII-PstI	RA1	(NaI)*Tc ^R

注: *示染色体表型 Indicates chromosomal phenotype
+ ColEI 衍生物 ColEI derivatives

水乙醇沉淀, 用 TE 缓冲液溶解保存。应用缺口翻译法将各片段标记 α -³²P, 得到探针 α -³²P-TetA、 α -³²P-TetB、 α -³²P-TetC 及 α -³²P-TetD。其放射活性每微克 DNA 约在 $1-2 \times 10^5-10^6$ CPM^[7]。

(三) 原位菌落杂交膜的制备

按彭秀玲等^[7]报道的方法进行。待测株均在含四环素 (10 μ g/ml) 中国兰培养基上过夜培养, 将菌点种在处理好的硝酸纤维素膜上, 再置上述培养基上培养, 膜经一系列处理后于 -20℃ 保存备用。

(四) 杂交

将膜用脱脂奶粉预杂交液 (含 50% 甲酰胺), 42℃ 预杂交 5-7 小时; 取标记探针 1ml, 经处理后加入预杂交液中, 42℃ 杂交 16 小时。杂交后膜经系列处理步骤^[7], 干燥后, 复盖 X 光片, 放在增感屏暗盒中, -70℃, 曝光 24-72 小时, 显影。

(五) 材料

各种限制性内切酶 (见表 1) 均由华美生物工程公司提供; 缺口翻译试剂盒由福瑞联营公司提供; 硝酸纤维素膜由美国 Millipore 公司提供; 琼脂糖由丹麦 FMC 公司提供; 四环素粉剂由上海新亚制药厂提供; 庆大霉素由山西大同市利群制药厂提供; 氯霉素由上海市第四制药厂提供; 药敏纸片: 庆大霉素 (Gm, 10 μ g/片), 氯霉素 (Amp, 10 μ g/片), 氯霉素

(Cm, 30 μ g/片) 由本室自制。头孢唑啉 (Cz, 30 μ g/片), 红霉素 (Ery, 15 μ g/片), 复方新诺明 (TMP, 1.25 μ g/片; SMZ, 23.75 μ g/片) 均由卫生部药品生物制品检定所提供。

结 果

(一) 临床株耐药表现

肠杆菌科 288 株中大肠杆菌 90 株, 克氏菌属 57 株, 肠杆菌属 45 株, 志贺氏菌属 25 株, 鼠伤寒沙门氏菌 24 株, 枸橼酸杆菌 18 株, 变形杆菌属 20 株, 沙雷氏菌属 9 株, 此外绿脓杆菌 18 株。它们的耐药率结果如表 2。其中四环素耐药率为 100%, MIC 范围为 0.5 μ g/ml— ≥ 1000 μ g/ml。

(二) 菌株中 Tet 基因种类分布

用四种 Tet 基因探针对来自全国部分省市 306 株多重耐药株进行检测, 结果是携带 TetB 基因的占 31.4%, TetD 25.2%, TetA 12.4%, TetC 10.4% (表 3)。含 1 种 Tet 基因的菌株占 51.4%, 含 2 种 Tet 基因者 7.5%, 含 3 种 Tet 基因者 2.9%, 含 4 种基因者 1.6%。与 4 种 Tet 基因均不杂交者 36.6% (表 4)。

(三) Tet 基因在不同菌属中的分布

从表 3 中看出, TetA 在绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌中较多, TetB 及 TetD 则广泛分布于肠杆菌科及绿脓杆菌, TetC

表2 全国各地革兰氏阴性杆菌耐药情况

Table 2 Antibiotics resistance strains of gram negative bacteria in places in China

抗菌素 Antibiotics	待测菌数 No. of isolates	耐药菌数 No. of resistance (%)
四环素 Tetracycline	306	306(100)
氨苄青霉素 Ampicillin	306	249(81.4)
头孢唑啉 Cefazolin	306	87(28.4)
庆大霉素 Gentamycine	306	174(56.7)
氯霉素 Chloramphenicol	306	183(59.8)
复方新诺明 TMP-SMZ	306	175(57.2)
红霉素 Erythromycine	306	280(91.5)

表3 四环素耐药决定子分布情况

Table 3 Frequency of tetracycline resistance determinant classes

菌种 Stain	待测菌数 No. of isolates	四环素耐药决定子分类 No. of positive (% within group) in determinant class				
		A	B	C	D	other
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	90	9(10.0)	28(31.1)	6(6.7)	22(24.4)	35(38.9)
克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i>	57	2(3.5)	10(17.5)	3(5.3)	18(31.6)	29(50.9)
志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	25	4(16.0)	9(36.0)	3(12.0)	1(4.0)	8(32.0)
鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	24	5(20.8)	7(29.2)	1(4.2)	0(0)	10(41.7)
枸橼酸杆菌 <i>Citrobacter</i>	18	1(5.6)	6(33.3)	1(5.6)	7(38.9)	6(33.3)
肠杆菌 <i>Enterobacter</i>	45	6(13.3)	18(40.0)	10(22.2)	13(28.9)	8(17.8)
沙雷氏菌 <i>Serratia</i>	9	0(0)	4(44.4)	1(11.1)	2(22.2)	3(33.3)
变形杆菌 <i>Proteus</i>	20	3(15.0)	7(35.0)	1(5.0)	5(25.0)	9(45.0)
绿脓杆菌 <i>Ps. aeruginosa</i>	18	8(44.4)	7(38.8)	6(33.3)	9(47.4)	4(22.2)
总计 Total	306	38(12.4)	96(31.4)	32(10.5)	77(25.3)	112(36.6)

表4 含多个四环素耐药决定子情况

Table 4 Frequency of isolates harbored Tc resistance determinants

待测菌数 No. of isolates	四环素耐药决定子数 No. of positive (% within group) in Tc determinants				
	One	Two	Three	Four	Other
306	157(51.3)	23(7.5)	9(2.9)	5(1.6)	112(36.6)

多分布于绿脓杆菌及肠杆菌属。

(四) Tet 基因在各省市中的分布

四种 Tet 基因在各省市的分布结果见表 5。TetC 及 TetA 在各省市菌株中所占比例均较少,而 TetB 及 TetD 比例较高,具有相似性。

讨 论

Levy 博士^[9]等用 TetA、B、C、D 这四

种探针检测了 225 株菌,这些菌株来自美国 Tufts 大学和哈佛大学的学生及医务人员以及波士顿郊区的人和动物粪便,发现携带 TetB 基因的菌株占 73.3%,TetA 占 21.7%,TetC 占 8%,未发现 TetD。含两种以上基因的菌株只占 3.5%,仅有一株不与这四种探针杂交。由此可见我国耐药菌携带 Tet 基因的情况与美国分离菌株明显不同。

表 5 全国部分地区四环素耐药决定子分布

Table 5 Frequency of Tc resistance determinant classes in places in China

地区 Areas	待测菌数 No. of isolates	四环素耐药决定子分类 No. of positive (% within group) in determinant class			
		A	B	C	D
北京 天津 Beijing Tianjin	166	20(12.1)	53(31.3)	16(9.6)	26(15.6)
上海 南京 Shanghai Nanjing	80	8(10.0)	29(36.3)	6(7.5)	29(36.3)
贵州 四川 Guizhou Sichuan	22	4(18.2)	3(13.6)	4(18.2)	12(54.6)
广西 广东 湖南 Guangxi Guangdong Hunan	30	5(16.7)	7(23.3)	5(16.7)	7(23.3)
哈尔滨 Haerbin	8	1(12.5)	4(50.0)	1(12.5)	3(37.5)

表 6 标准菌与 Te 耐药决定子探针杂交

Table 6 Hybridization of standard strains and Tc determinant probes

标准菌 Standard strain	四环素耐药决定子探针 Tc resistance determinant probes				来源 Source
	A	B	C	D	
TetA*	+++	—	++	—	Levy, S. B. 博士送
TetB*	—	+++	—	—	Levy, S. B. 博士送
TetC*	++	—	+++	—	Levy, S. B. 博士送
TetD*	—	—	—	+++	Levy, S. B. 博士送
E. coli ATCC 25922 [#]	—	—	—	—	美国国家菌种库送
W4680 PCB 8*	—	++	—	—	Beck, C. F. 博士送
W4680 PCB 81*	—	++	—	—	Beck, C. F. 博士送
W4680 PCB 129*	—	+++	—	—	Beck, C. F. 博士送

注: * 质粒打点杂交

* 原位菌落杂交, 含 Tet B

Note: * plasmid dot hybridization

* colony hybridization, Containing Tet B

本文在严格的实验条件下,发现 TetA 与 TetC 之间有交叉杂交反应。而 TetA 与 TetC 与 TetB 及 TetD 均无交叉反应(表 6)。Levy 等^[9]发现 TetA 与 TetC, TetB 和 TetC 之间有同源性,认为 TetA、B、C 具有一定的同源性,而 TetD 与它们无同源性。

结果中有 36.6% 的菌株与四种探针

均不杂交,这说明它们耐四环素是由其他决定子所控制,决定耐四环素的基因除了本文所采用的 4 种以外,还有 TetE、TetL、TetN、TetM 等决定子可以参与在临床菌株中。

参 考 文 献

- [1] Courtney, M. A. et al.: *Antimicrob. Agents*

- Chemother.*, 18: 926—929, 1980.
- [2] John, J. F. et al.: *J. Infect. Dis.*, 143: 810—817, 1981.
- [3] McGowan, J. E.: *Rev. Infect. Dis.*, 5: 1033—1048, 1983.
- [4] Chopra, T. G. B. et al.: *J. Antimicrob. Chemother.*, 8: 5—21, 1981.
- [5] Levy, S. B. et al.: *Plasmid*, 3: 99—108, 1980.

- [6] Levy, S. B. et al.: *Gene*, 50: 111—117, 1986.
- [7] 彭秀玲等编著: 基因工程实验技术, 湖南科学技术出版社, 长沙, 第 119—143 页 1987 年。
- [8] 郭尧军等: 生物化学与生物物理进展, 2: 70—72, 1987。
- [9] Levy, S. B. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24: 835—840, 1983.

USE DNA TECHNIQUES TO DETECT TETRACYCLINE RESISTANCE GENES IN CLINICAL STRAINS

Zhang Yamei Chen Minjun

(Beijing Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Our purpose in the present report was to use DNA techniques to analyse the distribution of Tetracycline resistance determinants among Gram negative bacteria and different location in our country. 306 clinical isolates, 102 out of which were isolated from nosocomial infections in Beijing Union Medical College Hospital from 1981—1986, were identified by fifteen kinds of biochemical reaction. According to sensibility test results, the percentage of resistant to antibiotics was that: Tetracycline 100%, Ampicillin 81.4%, Cefazolin 28.4%, Gentamycin 56.9%, Chloramphenicol 59.8%, TMP-SMZ 57.2%, Erythromycin 91.5%. The result of colony hybridization was that TetB (on R222) occurred at 31.4%, followed by TetD (on RA1) at 25.2%, TetA (on RP1) at 12.4% and TetC (on pSC101)

at 10.5%. 36.6% of isolates failed to hybridize to any of the probes, while 51.3% harbored one determinant, 7.5% harbored two, 2.9% three and 1.6% four. Strains from some location contained TetB and TetD were slightly higher than TetC and TetA. At high stringency conditions of hybridization, we were able to show cross reaction of determinant C with TetA DNA, but no reaction with TetB and TetD DNA.

Key words

Colony hybridization; DNA techniques; Multiresistant strain

This project supported by National Natural Science Foundation of China.