

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.014

膜孔蛋白基因表达与耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药性关系的研究^{*}

许光辉, 俞柳敏, 陈淑娟, 涂海健

(莆田学院附属医院检验科, 福建莆田 351100)

摘要:目的 通过检测耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌膜孔蛋白基因表达, 分析膜孔蛋白基因与耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药相关性。**方法** 采用菌株分离鉴定与改良 Hodge、乙二胺四乙酸纸片协同试验药敏试验筛选 33 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌, 利用 DNA 提取, 聚合酶链反应扩增及产物电泳分析其膜孔蛋白基因序列, 再利用荧光染料 SYBR Green 法进行实时定量膜孔蛋白基因表达高低。**结果** 大部分耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 OMPK35、OMPK36 表达有上升的趋势。通过基因序列比对分析 35 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌膜孔蛋白 OMPK35、OMPK36 序列没有异常。**结论** 膜孔蛋白 OMPK35、OMPK36 序列对敏感或多耐药的肺炎克雷伯菌无影响。膜孔蛋白 OMPK35、OMPK36 表达量水平与产 KPC 和 IMP 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌对亚胺培南、厄他培南、美罗培南耐药性无相关性。

关键词: 膜孔蛋白; 基因表达; 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯类**中图分类号:** R446.5**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2018)16-2405-05Correlation between expression of membrane porin gene and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*^{*}

XU Guanghui, YU Liumin, CHEN Shujuan, TU Haijian

(Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Putian University, Putian, Fujian 351100, China)

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between the membrane porin gene and resistance to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by the expression of the membrane pore protein gene of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** Totally 33 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* resistant strains were screened by strain isolation and identification, improved Hodge, EDTA paper synergistic drug sensitivity test, DNA extraction, PCR amplification and product electrophoresis were used to analyze the sequence of membrane pore protein gene, subsequently, the SYBR Green method was used to quantify the expression of the porins gene in real time. **Results** Most of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with the OMPK35, OMPK36 expression had an upward trend. The gene sequences of 35 strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* membrane pore proteins OMPK35 and OMPK36 was not abnormal by gene sequence alignment. **Conclusion** Membrane pore protein OMPK35 and OMPK36 sequence have no effect on sensitive or resistant *Klebsiella pneumoniae*. The expression levels of membrane pore proteins OMPK35 and OMPK36 were not correlated with KPC and IMP-type drug resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* for imipenem, ertapenem and meropenem.

Key words: porin; gene expression; *Klebsiella pneumoniae*; carbapenem

肺炎克雷伯菌是院内感染重要病原菌之一, 近 3 年来, 莆田学院附属医院微生物实验室检出多重耐药肺炎克雷伯菌增多, 且耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌增多较为显著, 给临床治疗和医院感染带来严峻挑战。KPC 型碳青霉烯酶是 2001 年发现的一类具有碳青霉烯水解活性的 A 类丝氨酸 β -内酰胺酶, 主要存在于肺炎克雷伯菌中, 能引起对碳青霉烯类药物耐药^[1]。本研究从本院临床送检标本中分离并确认了耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌, 考虑到膜孔蛋白对碳青霉烯类抗

菌药物耐药性的影响, 对这些菌株膜孔蛋白基因 OMPK35 和 OMPK36 进行测序, 分析膜孔蛋白基因表达与耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药性的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 7 月至 2016 年 12 月本院临床标本, 送检微生物实验室分离得到的碳青霉烯类肺炎克雷伯菌菌株 36 株, 经测序筛选 3 株不纯菌株, 另有 2 株敏感菌株。

1.2 标准菌株 质控菌株大肠埃希菌(ATCC

^{*} 基金项目: 莆田学院内科科研资助项目(2014032)。

作者简介: 许光辉, 男, 副主任技师, 主要从事医学检验方面的研究。

25922)、肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)、产碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(ATCCBAA-1705)、非产碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(ATCCBAA-1706)购于原卫生部临床检验中心。

1.3 仪器与试剂 VITEK2 COMPACT 微生物鉴定系统(法国梅里埃生物公司)、QT-1 漩涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司)、凝胶成像仪(上海培清科技有限公司)、FR-110 紫外分析装置(上海复日科技有限公司)、FR-250 电泳仪(上海复日科技有限公司)、水平电泳槽(北京百晶生物科技有限公司)、7900HT 聚合酶链反应(PCR)扩增仪(ABI)、2720 Thermal Cycler PCR 仪(ABI)、3130XL Genetic Analyzers 基因分析仪(ABI)、Centrifuge 5810R 离心机(Eppendorf 公司)、BG-Power 300 电泳仪(北京百晶生物科技有限公司)、BG-Submix cel 电泳槽(北京百晶生物科技有限公司)、Milli-Q Academic 超纯水器(密理博中国有限公司)。配套 GN 鉴定卡和药敏卡(法国梅里埃生物公司)、M-H 琼脂、血琼脂与巧克力培养基(山东百博生物公司)、药敏纸片(英国 OXOID 公司)、革兰染液(法国 BASO 公司)、氧化酶试剂(英国 OXOID 公司)、引物(上海生工生物工程股份有限公司合成)、Hotstar Taq PCR Master Mix Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司)、琼脂糖(BIOWEST)、溴化乙啶和溴酚蓝(上海生工生物工程有限公司)、BigDye3. 1、HI-DI、5X Sequencing Buffer 试剂盒(ABI 公司)、虾剪酶(SAP, Promega 公司)、外切酶 I (EXO I , Epicentre 公司)、Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)、cDNA 第一链合成试剂盒(Fermentas)、SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂(大连宝生物工程有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 菌株分离与药敏试验 采用分区划线法接种于血琼脂与巧克力培养基 35℃培养 18~24 h 后,分离疑似菌落,经革兰染色后镜检呈革兰阴性(G⁻)杆菌,氧化酶试验呈阴性;再经 VITEK2 COMPACT 微生物鉴定系统进行鉴定。米诺环素、多黏菌素 B、舒普深采用 K-B 法。抗菌药物结果分析参照 2015 年版本美国临床和实验室标准化协会(CLSI)判断标准^[2]。

1.4.2 改良 Hodge 试验 配制 0.5 麦氏单位大肠埃希菌(ATCC25922)悬液,用灭菌生理盐水按 1:10 将悬液再稀释。用无菌棉签将稀释好的菌悬液在 M-H 琼脂平板上均匀涂布后待干燥 3~5 min,将美罗培南纸片(每片 30 g)置于平板中央处,用无菌接种环挑取待测菌落从垂直于美罗培南纸片边缘画线约 20~25 mm,35℃培养 16~20 h。结果分析参照 2015 年版本 CLSI 标准^[3]。

1.4.3 乙二胺四乙酸(EDTA)纸片协同试验 配制 0.5 麦氏单位待测菌株悬液并均匀涂布于 M-H 琼脂平板上,按 K-B 法贴亚胺培南纸片(每片 30 g),并在其边缘约 10~15 mm 处贴无菌空白纸片,再滴加 0.5

mol/L 的 EDTA 溶液 10 μL,置 35℃培养 16~20 h。
1.4.4 菌株 DNA 提取 挑取分离纯化培养耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的新鲜菌落,置入 0.5 mL 离心管内(内预置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200 μL)。采用硅胶膜-离心柱法进行 DNA 提取。上清液即基因检测的模板液,-20℃冰箱保存备用。

1.4.5 荧光 PCR 扩增 DNA 样本取 1 μL 的 1% Agarose 电泳,对其样本进行质量检查及浓度估计,然后根据估计的浓度将样本稀释到工作浓度 5~10 ng/μL,对于没有明显 DNA 条带的样本则不稀释。针对已知的碳青霉烯酶基因设计 11 对引物并进行 PCR 扩增检测。阳性产物经纯化回收后送上海天昊生物科技有限公司进行基因测序,测序结果在 NCBI 网上进行 Blast 比对分析。见表 1。PCR 反应条件如下:反应混合物(20 μL)包括 1×GC 缓冲液,2.5 mmol/L Mg²⁺,0.2 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸、0.2 μmol/L 每个引物,1 U hotstartaq 聚合酶和 1 μL 模板 DNA。循环程序为 95℃、2 min;94℃、20 s,57℃、30 s,72℃、1 min,35 个循环;72℃、2 min;4℃保持。将 5 μL 的 SAP 和 4 μL 的 EXO I 加入 8 μL 的 PCR 产物。该混合物在 37℃孵育 60 min,随后在 75℃孵育 15 min。

表 1 荧光 PCR 引物设计

引物	引物序列(5'→3')	片段长度 (bp)	退火温度 (℃)
KPC	F1:CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG	798	55
	R1:CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG		
GES	F1:ATG CGC TTC ATT CAC GCA C	864	56
	R1:CTA TTT GTC CGT GCT CAG G		
IMP	F1:CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG	587	50
	R1:AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT		
VNDM-1	F1:CTC GCA CCG AAT GTC TGG C	1 340	56
	R1:CAT TGG CGG CGA AAG TCA		
VIM-1	F1:TTA TGG AGC AGC AAC CGA TGT	920	60
	R1:CAA AAG TCC CGC TCC AAC GA		
VIM-2	F1:AAA GTT ATG CCG CAC TCA CC	865	60
	R1:TGC AAC TTC ATG TTA TGC CG		
GIM	F1:AGA ACC TTG ACC GAA CGC AG	753	56
	R1:ACT CAT GAC TCC TCA CGA GG		
OXA-48	F1:TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG	743	60
	R1:GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC		
SHV	F1:AGG ATT GAC TGC CTT TTT G	394	50
	R1:ATTT GCT GAT TTC GCT CG		
OMPK35	F1:ATG ATG AAG CGC AAT ATT CTG	684	56
	GCA GTG G		
OMPK36	R1:TCG GCT TTG TCG CCA TTG CCG	1 115	60
	TCA		
OMPK36	F1:CAG CAC AAT GAA TAT AGC CGA C	1 115	60
	R1:GCT GTT GTC GTC CAG CAG GTT G		

1.5 基因序列测定与分析 DNA 测序序列反应及引物序列和相关模板基因见表 2、3。

表 2 DNA 测序序列反应

测序引物	引物序列(5'→3')	片段长度(bp)
KPC	F1:CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG	798
NDM-1	F1:CTC GCA CCG AAT GTC TGG C	1 340
SHV	F1:AGG ATT GAC TGC CTT TTT G	394
OMPK3	F1:ATG ATG AAG CGC AAT ATT CTG GCA GTG G	684
OMPK36	F1:CAG CAC AAT GAA TAT AGC CGA C	1 115

表 3 引物序列和相关模板基因

检测基因	引物名称	相关模板基因
OMPK35	k35-F1	ATG ATG AAG CGC AAT ATT CTG GCA GTG G
	k35-R1	TCG GCT TTG TCG CCA TTG CCG TCA
OMPK36	k36-F1	CAG CAC AAT GAA TAT AGC CGA C
	k36-R1	GCT GTT GTC GTC CAG CAG GTT G

1.6 Q-PCR

1.6.1 RNA 提取 取 50~100 mg 组织,加入 1 mL 的 Trizol 中充分匀浆,室温静置 5 min。加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,静置 3 min。4 ℃离心,12 000 r/mim,离心 10 min,取上清。加入 0.5 mL 异丙醇,混匀,冰上静置 20~30 min。4 ℃离心,12 000 r/min,离心 10 min,弃上清。加入 1 mL 的 75%乙醇,洗涤沉淀。4 ℃,7 500 r/min,离心 5 min,弃上清。室温干燥 5 min 左右,加入适量的 Rnase-free H₂O 溶解。

1.6.2 RNA 电泳检测及浓度测定 RNA 反转录及 cDNA 验证:取 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA,步骤和体系按照说明书进行。以 cDNA 为模板,用 Real-Time PCR 内参基因 16s rRNA 引物做 Q-PCR 扩增,检测基因的表达水平。引物 PCR 的设计合成:Gen-Bank 上查找目的基因序列信息,采用 Primer express5.0 软件设计各基因特异性扩增引物,内参基因选用 16S rRNA,引物合成由中山达安基因公司通过 ABI3900 台式高通量 DNA 合成仪合成,见表 4。

表 4 Q-PCR 引物设计

引物名称	序列(5'→3')
OMPK35 F2	CAA AAA CGG CAA CAA ACT GGA CTT CT
OMPK35 R2	TGG TCT GGG AAC CTT CAA CAT TGG AC
OMPK36 F2	AGG CGT GAA AGG CGA AAC CCA G
OMPK36 R2	AGG AAG TTG TCA GAA CCG TAG G
细菌 16S F	CCT AYG GGR BGC ASC AG
细菌 16S R	GGA CTA CNN GGG TAT CTA AT

1.6.3 Real-Time PCR 体系及反应条件 SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 ×), 25 μL; PCR Forward

Primer(10 μmol/L), 2 μL; PCR Reverse Primer(10 μmol/L), 2 μL; ROX Reference Dye (50 ×), 1 μL; DNA 模板, 4 μL; 灭菌蒸馏水, 16 μL。反应条件: 95 ℃, 30 s, 1 个循环; 95 ℃, 5 s, 60 ℃, 30 s, 40 个循环。最后结果以 2^{-△△C_t} 分析。

2 结 果

2.1 改良 Hodge 试验结果 使用改良 Hodge 试验筛选碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌株,结果全部为阳性。

2.2 EDTA 纸片协同试验结果 依据碳青霉烯酶可被 EDTA 抑制的特性,通过 EDTA 纸片协同试验,2 张纸片间有协同作用可视为该菌产生碳青霉烯酶阳性。碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌 35 株仅筛选产金属酶 1 株。

2.3 KPC 基因菌株 A1~A10、A11~B11 为含 798 bp 的 KPC 基因菌株,B10 不含 KPC 基因菌株,M 为 DNA 的标志物。

2.4 膜孔蛋白基因表达高低 F2、F4、F5、F6、F8 分别对应 26 号、27 号、28 号、29 号、32 号菌株,膜孔蛋白 OMPK36 缺失。

2.5 基因检测结果 结果显示,27 号菌是敏感菌,其他均是耐药菌。RT-PCR 检测不同菌 OMPK35、OMPK36 的表达情况,结果显示耐药菌 OMPK35、OMPK36 表达有上升的趋势。

2.6 膜孔蛋白 OMPK35、OMPK36 基因测序结果分析 OMPK35 基因(野生型:OMPK35 protein, Gene ID:11846853)。第 6、10、26 号、X31 样本与野生型该基因片段比对相似率为 98%,其余样本达 99%。第 27 号样本与野生型该基因片段比对相似率仅为 95%。OMPK36 基因(野生型:OMPK36 porin, Gene ID:11848733)。第 27 号样本与野生型该基因片段比对相似率高达 94%,其余样本仅为 90%~92%。27 号样本与其他样本的相似度为 91%,其余样本两两比较相似率为 97%~99%。7 号样本与野生型该基因片段比对相似率仅为 90%。X31 号样本与野生型的相似度为 99%,与其他样本的相似度仅为 92%。

3 讨 论

肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药的主要机制包括产 A 类的 KPC 型碳青霉烯酶、B 类的金属酶,常见有 VIM、IMP 及 NDM-1 型^[3];膜孔蛋白的缺失或表达量下降及外排泵的参与引起通透性下降;碳青霉烯类药物作用的靶位改变;高产 β-内酰胺酶,尤其是染色体编码的 AMPC 酶与膜孔蛋白缺失造成通透性下降的协同作用。

近 3 年来,本院送检微生物实验室标本检出肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药率逐年增高。2007 年由浙江大学 WEI 等^[4]最早报道了浙江产 KPC-2 亚型。随后我国多个地方也报道了产 KPC-2 的肺炎克雷伯菌的暴发流行^[5]。据涂海健等^[6]2012 年报道碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌占该院检出的

多重耐药的肺炎克雷伯菌的比例可高达 11.81%。

本研究利用菌株分离与药敏试验、改良 Hodge 试验初筛获得 36 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌表型确认。但 PASTERAN 等^[7]认为改良 Hodge 试验可出现假阳性,原因是其产生了较多的超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)或 AmpC β 内酰胺酶(AmpC 酶)。而本研究经测序筛选,共筛选出 3 株不纯菌株,另有 2 株敏感菌株。

本研究对 33 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 DNA 的 11 个基因进行了测序,总共设计了 11 对引物。PCR 产物经 SAP 和 EXO I 纯化后用 ABI 公司的 BigDye3.1 试剂盒测序。测序反应经乙醇纯化后在 ABI3730 上样。PCR 和测序鉴定耐药肺炎克雷伯菌是否带有 KPC 基因。也通过 GenBank 的比对确定其基因为 KPC-2 型。

细菌细胞外膜上存在一些特殊的膜蛋白,即膜孔蛋白,这是一种具有非特异性的贯穿整个细胞膜的水溶性通道,抗菌药物通过膜孔蛋白进入菌体将细菌杀死^[8]。本实验确认临床分离 33 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌携带 KPC 基因,通过对膜孔蛋白 OMPK36 的测序,推测这些菌株对碳青霉烯类药物差异可能是与膜孔蛋白的基因相关,膜孔蛋白的缺失或者表达降低是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物产生耐药的一个重要原因。本研究 SDS-PAGE 分析显示有 3 株膜孔蛋白 OMPK36 缺失,可能是其耐药原因之一。

本研究显示,菌株的 OMPK35、OMPK36 基因编码序列完全相同,这种耐药性是否由于膜孔蛋白 OMPK35、OMPK36 的表达量差异导致。因此通过荧光实时定量 PCR 检测膜孔蛋白 OMPK35、OMPK36 的相对表达量。膜孔蛋白 OMPK35、OMPK36 的相对表达量高,药物进入细菌速率就高,理论上应该导致细菌对药物更加敏感。文献^[9]报道 KPC-1 型和 KPC-3 型相比有 2 个碱基的改变,这两个基因型都需要结合膜孔蛋白 OMPK35,其表达缺失可以造成对碳青霉烯类抗生素的耐药,而 KPC-2 型对碳青霉烯类抗生素的耐药不依赖于膜孔蛋白的存在。KPC-2 型基因常和 ESBLs 基因共同存在于同一菌体内或位于同一质粒上而表现多耐药。

本研究所检测到的 33 株耐碳青霉烯类的肺炎克雷伯菌中,KPC-2 型的有 32 株,占 96.97%;NDM-1 型的有 1 株,仅占 3.03%,这一结果也与文献报道的 KPC-2 型的肺炎克雷伯菌在我国广泛存在,但产金属酶的报导相对较少相一致^[10],也与杨莉等^[11]报道 IMP 基因不仅能水解青霉素类和头孢类抗菌药物,还能水解碳青霉烯类抗菌药物,并且常用的 β -内酰胺抑制剂对其没有任何抑制作用相吻合。

但是通过基因序列比对,第 6、10、26 号、X31 号样本与野生型该基因片段比对相似率为 98%,其余样本达 99%。第 27 号敏感对照菌株样本与野生型该基

因片段比对相似率仅有 95%,通过药敏结果比较,第 6、10 泛耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌,第 26 号、X31 号除对丁胺卡那霉素、复方磺胺甲噁唑敏感外也是耐碳青霉烯类抗的肺炎克雷伯菌,说明 OMPK35 序列对耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌的多重耐药无影响。OMPK35、OMPK36 序列没有异常,但发现其中 3 株序列与野生株具有高度相似性,但这 3 株药敏结果分析 27 号是产 ESBL 阳性菌,非耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌;37 号、X31 号都是耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌,也说明 OMPK35、OMPK36 序列对敏感或多耐的肺炎克雷伯菌的意义无影响。而 DOUMITH 等^[12]报道,OMPK35、OMPK36 蛋白的缺失与 ESBL 阳性肺炎克雷伯菌对厄他培南的耐药性有关。LANDMAN 等^[13]报道,OMPK36 蛋白低水平表达与 KPC 酶共同作用导致了肺炎克雷伯菌对来胺培南和美罗培南的 MIC 值升高。而本试验发现 3 株 OMPK35 膜孔蛋白基因缺失的菌株,说明这也是本院碳青霉烯类抗菌药物耐药的一个重要原因。在大多数情况下,膜孔蛋白缺失不是主要的耐药机制,但它可降低细菌对抗菌药物的敏感性,在其他耐药机制存在情况下,可明显提高耐药程度。

笔者团队下一步将开展产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌耐药性分析及其质粒介导的耐药性传播性研究,同时还有 OMPK35、OMPK36 基因转录表达水平与肺炎克雷伯菌多重耐药是否存在某种关联,以便更好地开展本院碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌耐药性同源性分析。

参考文献

- [1] MIRIAGOU V, TZOUVELEKIS L S, ROSSITER S, et al. Imipenem resistance in a Salmonella clinical strain due to plasmid-mediated class a carbapenemase KPC-2[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(4): 1297-1300.
- [2] GIAKKOUPIS P, VOURLIS S, POLENIS M, et al. Supplementation of growth media with Zn²⁺ facilitates detection of VIM-2-producing Pseudomonas aeruginosa[J]. Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1568-1569.
- [3] 黄支密, 糜家睿, 盛以泉, 等. 携带 blaKPC2 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌院内感染暴发的病原学分析[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(5): 559-562.
- [4] WEI Z Q, DU X X, YU Y S, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumonia isolate from China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 763-765.
- [5] LI H, ZHANG J, LIU Y, et al. Molecular characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in China from 2008 to 2011: predominance of KPC-2 enzyme[J]. Diagnostic Microbiol Infect Dis, 2014, 78(1): 63-65.
- [6] 涂海健, 林群英, 陈淑娟, 等. 莆田学院附属医院 1 917 株多重耐药菌检测分析[J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16(5): 387-390.

果的准确。ISO15189 和 CAP 认可体系明确要求实验室在开展新的检测项目前需进行方法学分析性能验证。因此,方法学性能验证是实验室开展 PCR 项目前必须要进行的工作^[7]。

有两类突变可引起 CYP2C19 基因多态性:一类是(如 CYP2C19 * 2、* 3、* 4、* 5、* 7、* 8 等)可降低酶活性位点的突变^[8-9];另一类是可以增强酶活性的突变,目前仅发现 CYP2C19 * 17 位点突变。黄杰等^[10]针对 CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 和 CYP2C19 * 17 多态性位点设计引物和探针,建立检测 CYP2C19 基因多态性的 PCR-荧光探针法,评价了准确性、灵敏度和特异度。刘秀卿等^[1]自建 CYP2C19 基因多态性荧光定量 PCR,主要评价了准确性、灵敏度和重复性。以往学者在研究检测 CYP2C19 基因多态性时,多为针对 CYP2C19 基因特定位点设计引物和探针,自建相应 PCR 检测 CYP2C19 基因分型并进行相关性评价。

本研究使用荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型使用的是商品化的试剂盒,评价了准确性、重复性、灵敏度和特异度,并且对试剂盒给出的临界值和检测限进行了验证,对于该方法的性能验证程序评价比较全面。准确性使用临床标本进行检测与测序法结果进行比较,评估符合率,两种方法检测结果的符合率为 100%。由于该项目尚未参加室间质评,也未与其他实验室进行结果比对,所以准确性可以进一步进行评价。本研究对荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型性能验证程序进行较全面评估,为使用荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型的实验室提供了一些参考。

参考文献

- [1] 刘秀卿,李卓成,李延武. CYP2C19 基因多态性荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2): 95-99.
- [7] PASTERAN F, MENDEX T, RAPOPORT M, et al. Controlling False-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of Enterobacteriaceae by incorporating boronic acid[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1323-1332.
- [8] DI PILATO V, ARENA F, TASCINI C, et al. mcr-1, 2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Strain of Sequence Type 512[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(9): 5612-5615.
- [9] ABDUL G K. An obituary-on the death of antibiotics[J]. J Assoc Physicians India, 2010, 58(2): 143-144.
- [10] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes

- [2] 夏长胜,刘畅,孙媛媛,等. 等位基因特异荧光 PCR 法检测 CYP2C19 基因型[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(3): 330-334.
- [3] BIN SAYEED M S, HASAN APU M N, MUNIR M T, et al. Prevalence of CYP2C19 alleles, pharmacokinetic and pharmacodynamic variation of clopidogrel and prasugrel in Bangladeshi population[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015, 42(5): 451-457.
- [4] AHN S G, JI H L, LEE J W, et al. Individualized antiplatelet treatment based on genotyping in patients with acute coronary syndromes[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(12): A108.
- [5] KIM H K, KANG H J, KO D H, et al. Comparison of the microarray based assay, the real-time PCR assay, and the bidirectional sequencing method for CYP2C19 genotyping[J]. Clin Lab, 2015, 61(8): 1109-1112.
- [6] DONG Y, XIAO H, WANG Q, et al. Analysis of genetic variation in CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 genes using oligonucleotide microarray[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10): 18917-18926.
- [7] 罗卉丽,袁杭,毛源,等. 分子诊断定量项目分析性能验证程序探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(16): 2360-2362.
- [8] LI Y, YANG H, ZOU X, et al. Analysis of the CYP2C19 genetic polymorphism in Han and Uyghur patients with cardiovascular and cerebrovascular diseases in the Kashi area of Xinjiang[J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 2213-2218.
- [9] LIN M, TODARO M, CHAN J, et al. Association between CYP2C19 polymorphisms and outcomes in cerebral endovascular therapy [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2016, 37(1): 108-113.
- [10] 黄杰,于婷,张喆,等. CYP2C19 基因多态性检测方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1562-1567.

(收稿日期:2017-12-14 修回日期:2018-02-08)

(上接第 2408 页)

- [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.
- [11] 杨莉,张红岩. 碳青霉烯酶基因型的研究进展[J]. 中国微生物生态学杂志, 2014, 26(3): 366-368.
- [12] DOUMITH M, ELLINGTON M J, LIVERMORE D M, et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant Klebsiella and Enterobacter spp. clinical isolates from the UK[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(4): 659-667.
- [13] LANDMAN D, BRATU S, QUALE J. Contribution of OMPK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing Klebsiella pneumonia [J]. J Med Microbiol, 2009, 58(10): 1303-1308.

(收稿日期:2017-12-26 修回日期:2018-02-20)