

• 论 著 •

多重耐药铜绿假单胞菌分子流行病学的研究*

陈 茶¹, 林冬玲¹, 李有强¹, 张 妮¹, 袁 慧¹, 曾建明¹, 张伟铮¹, 黄 彬^{2△}

(1. 广东省中医院检验医学部, 广州 510120; 2. 中山大学附属第一医院检验医学部, 广州 510080)

摘要:目的 探讨广东省中医院 72 株多重耐药铜绿假单胞菌分子流行病学情况。方法 采用纸片扩散法检测 72 株多重耐药铜绿假单胞菌对 12 种抗菌药物的敏感性,并用脉冲场凝胶电泳进行分子分型和同源性分析。结果 72 株多重耐药铜绿假单胞菌均对 3 类或 3 类以上抗菌药物同时耐药,脉冲场凝胶电泳图谱可分成 17 基因型(A~Q),其中 A 型 40 株。结论 本地区虽未发生暴发流行,但仍存在流行优势克隆株,应积极配合医院感染管理部门进行耐药性监测,防止医院感染和暴发流行。

关键词:假单胞菌,铜绿; 抗药性,多药; 流行病学,分子; 电泳,凝胶,脉冲场

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.21.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)21-2427-02

The study of molecular epidemiology of multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa clinical strains*

Chen Cha¹, Lin Dongling¹, Li Youqiang¹, Zhang Ni¹, Yuan Hui¹, Zeng Jianming¹, Zhang Weizheng¹, Huang Bin^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, The Traditional Chinese Hospital of Guang Dong Province, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **Objective** To understand the molecular epidemiology of 72 multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa isolates. **Methods** The sensitivity of 12 antibiotics were performed in 72 multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa isolates by Kindy-Bauer method. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed to understand the molecular typing and homology analysis. **Results** 72 multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa isolates were resistant to three or more than three types of antibiotics. Seventeen different PFGE types, designated from A to Q, were distinguished among these 72 isolates, 40 clustered as the same type, designated type A. **Conclusion** The outbreak has not yet occurred in this region, but there are popular advantage clones. Therefore it required to monitor drug resistance actively cooperating with hospital infection control department, to prevent hospital infection and outbreak.

Key words: pseudomonas aeruginosa; drug resistance, multiple; epidemiology, molecular; electrophoresis, gel, pulsed-field

铜绿假单胞菌(pseudomonas aeruginosa, PA)是临床常见的条件致病菌,广泛分布于自然界及健康人的皮肤、肠道和呼吸道,常感染免疫力低下患者,由它引起的院内感染高达 30% 以上。多重耐药铜绿假单胞菌(multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa, MDRPA)的分离率日益增加,使得 PA 感染的治疗越来越困难。为提高医院感染监测的水平,及时发现医院感染情况,指导临床合理用药,不断改进医疗工作中的不足,控制和降低医院感染,本研究采用纸片扩散法(Kindy-Bauer, KB)检测 72 株 MDRPA 对 12 种抗菌药物的敏感性,并用脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)进行分子分型和同源性分析,为监控 PA 的分子流行病学情况提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 72 株非重复的 MDRPA 来源于广东省中医院四家分院 2008 年 1 月至 2009 年 1 月住院患者临床标本。沙门氏菌 H9812 由广州医学院第一附属医院海印分院呼吸疾病国家重点实验室微生物课题组惠赠。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.1.2 仪器与试剂 VITEK2 全自动细菌鉴定仪为法国 Bio-Merieux 公司产品;营养琼脂购自江门市凯林贸易有限公司;药敏纸片购自 Oxoid 公司;Pulsed Field Certified Agarose 为

Bio-Rad 公司产品;Agarose For pulsed field electrophoresis sample preparation 为 Sigma 公司产品;GS710 凝胶图像分析仪、CHEF-DR III System 和 BioNumerics software 均为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 菌株鉴定及药物敏感试验 所有菌株经法国梅里埃 VITEK2 全自动细菌鉴定仪鉴定。采用纸片扩散法测定亚胺培南、美罗培南、氨曲南、头孢他啶、头孢吡肟、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、环丙沙星、阿米卡星、替卡西林、庆大霉素、妥布霉素等 12 种抗菌药物的敏感性,并根据 2010 年版 CLSI M100-S20 规定进行抗菌药物敏感性判断^[1]。

1.2.2 PFGE PA 菌株经细胞裂解液和蛋白酶裂解后,用 SpeI 内切酶过夜消化凝胶栓中的基因组 DNA,然后凝胶栓嵌入 1% 琼脂糖凝胶,将琼脂糖凝胶放入电泳槽中(CHEF-DR III System, Bio-Rad 公司)电泳。电泳参数:脉冲时间:0.47~35.0 s;电泳时间:20 h;温度:14℃;电场夹角:120°;电场强度:6 V/cm。沙门氏菌 H9812 作为电泳分子量标记 Marker。而后在 EB 溶液中染色 10 min,纯水脱色 10 min,在凝胶成像系统观察并照相。所获得的图像用 BioNumerics software 分析并制成树状图。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 72 株 MDRPA 均对 3 类或 3 类以上抗

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071397);广东省科技计划项目(2011B031800037);广东省医学科研基金资助项目(A2011168)。△ 通讯作者,E-mail:hb906@163.com。

菌药物同时耐药,耐药率均大于 50%。见表 1。

表 1 72 株 MDRPA 对 12 种抗菌药物的药敏情况[n(%)]

抗菌药物	耐药率(R)	中敏率(I)	敏感率(S)
亚胺培南	72(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
美罗培南	71(98.6)	0(0.0)	1(1.4)
氨曲南	72(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢他啶	65(90.3)	3(4.2)	4(5.5)
头孢吡肟	60(83.3)	11(15.3)	1(1.4)
哌拉西林/他唑巴坦	52(72.2)	0(0.0)	20(27.8)
头孢哌酮/舒巴坦	36(50.0)	32(44.5)	4(5.5)
环丙沙星	71(98.6)	0(0.0)	1(1.4)
阿米卡星	51(70.8)	3(4.2)	18(25.0)
替卡西林	71(98.6)	0(0.0)	1(1.4)
庆大霉素	70(97.2)	1(1.4)	1(1.4)
妥布霉素	67(93.0)	3(4.2)	2(2.8)

2.2 PFGE 结果 Tenover 等^[2]提出了两种有关测定菌株相关性与 PFGE 图谱的判断标准:判断标准一,PFGE 图谱无条带差异,说明为相同菌株;有 1~3 条带的差异说明菌株间紧密相关,可以视为同一基因型;4~6 条带的差异说明菌株间可能相关;菌株间有 7 条或更多条带差异,菌株被视为不同的基因型,无相关性。判断标准二,Dice 相关系数大于或等于 80% (相当于有少于或等于 6 条条带不同)可认为是相关的基因型,即提示它们为同源菌株。72 株 MDRPA 的 PFGE 图谱可分成 17 个基因型(A~Q),其中 A 型 40 株、B 型 6 株、C 型 6 株、D 型 5 株、E 型 2 株、F 型 2 株、G 型至 Q 型分别各有 1 株;经过对 A 型至 F 型各型中的菌株来源进行查证,发现各型中的菌株来源于不同医院的不同时期,并未构成暴发流行。见图 1。

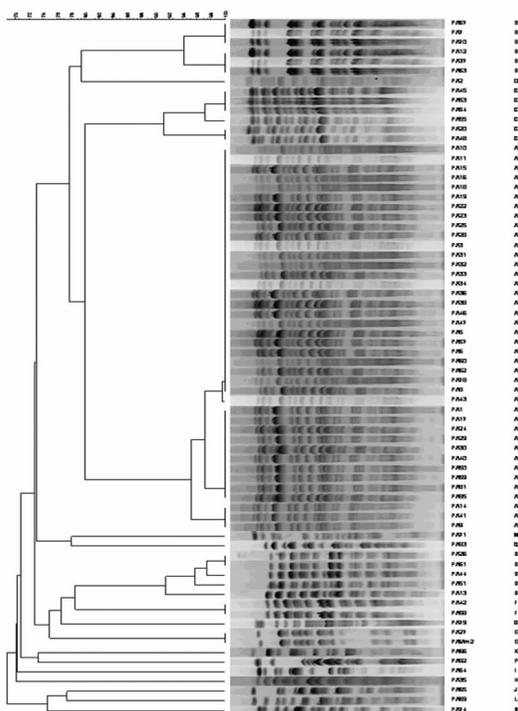


图 1 72 株 MDRPA 的 PFGE 树状图

3 讨论

随着广谱抗菌药物等药物的广泛使用,各种侵入性诊疗措施的不断增多,由多重耐药菌株引起的医院感染暴发流行时有发生,有学者估计可能为 5%~10%^[3]。医院感染的日益增多,已成为一个重要的公共卫生问题。医院感染造成住院时间延长、病死率上升、医疗费用增多,给患者、医院和社会都带来严重的损失。上世纪 90 年代初,美国疾病预防控制中心在医院感染计划中进行了 46 次医院感染流行病学调查,其中 31 次由细菌引起。鉴于细菌感染是医院感染暴发中最为重要的致病因素,因此许多国家将控制细菌感染作为预防医院感染控制工作的一个主要内容。

在医院感染病原学检验诊断中,牵涉到菌种鉴定和分型。传统的细菌分型方法所依赖的表型表达常不稳定,敏感度不高,只能提供感染依据而无法明确是否为暴发流行。现代分子分型技术针对细菌全基因组和编码毒素基因,基于相同菌株具有相同的 DNA 指纹图谱,而不同菌株则具有不同的 DNA 指纹图谱的原理,具有良好的分辨力和稳定的重复性,因而愈来愈多被广泛应用,特别是在分子流行病学研究上发挥重要的作用。分子分型的方法是分辨各感染病例是否为同一菌株所致,追溯感染源,证实暴发流行的可靠方法,以便从根源上控制医院感染。

随着分子分型技术的快速发展,所衍生出的各种分子生物学实验方法就其重复性和分辨力而言,各有优、缺点,而不同学者对于他们的应用评价也不尽相同。目前,较常用的分子分型方法有随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增限制性片段长度多态性分析 (amplified restriction fragment length polymorphism, AFLP) 和 PFGE^[4]。RAPD 分型法操作简便、快速,得到的分型结果与 PFGE 分析得到结果具有较高的一致性,因而可以作为细菌分子分型的初筛方法。该分型方法主要缺陷是重复性受多种因素影响,不适宜建立大的分型模式数据库^[2]。由于目前尚未对 RAPD 进行标准化和统一化,因而难以对不同实验室的结果以及流行菌株进行比较。AFLP 以 PCR 为基础,不需要特殊的实验仪器,具有耗时短、简便和经济的优点,一般实验室条件即可完成,便于流行病学研究并及时诊断,采取措施进行感染控制。AFLP 在菌株分型中有较好的重复性,其分辨能力优于 PCR-核糖体技术,但不如 PFGE。PFGE 应用于分离纯化大小在 10~2 000 Kb 之间的 DNA 片段。PFGE 需要特殊而昂贵的设备,技术条件很高,操作繁琐、费时,每一次电泳至少要 2~4 d。但 PFGE 因其具有良好的分辨率、特异性、稳定性和易于观察结果,被誉为细菌分子分型技术的“金标准”,现已成为国际上普遍采用的细菌流行病学调查的参考方法^[5-9]。

本研究 PFGE 结果显示 72 株 PA 中有 42 株属于 A 型基因型, B 型 6 株、C 型 6 株、D 型 5 株、E 型 2 株、F 型 2 株。通过对 42 株 A 型菌株的来源分析发现,尽管他们分别来自不同分院的不同时期,并未构成大的暴发流行,但仍存在优势克隆株流行。42 株 A 型菌株主要来源于呼吸科和重症监护病房 (intensive care unit, ICU) 病房,这可能与呼吸科、ICU 病房感染性疾病患者相对集中、侵入性治疗和患者机体免疫力较差等方面有关^[10]。同时通过对这些病房的同期环境和物品的抽样检查,发现病房环境和物品表面中也存在 MDRPA。虽然本实验未能追踪到流行优势克隆株的最原始传染菌株,但因 PA 在医院内环境中广泛分布,可见于医院各个角落。通过医护人员的手、病床、病房空气或其他患者,各种医疗(下转第 2432 页)

- [25] Koga H, Eguchi K, Shinkai T, et al. Preliminary evaluation of the new tumor marker, CYFRA 21-1, in lung cancer patients[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 1994, 24(5):263-268.
- [26] Bitterlich N, Muley T, Schneider J. Centre-independent detection of non-small cell lung cancer (NSCLC) by means of classification with receiver operating characteristic (ROC)-based data transformation[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(5):1661-1665.
- [27] Ebert W, Dienemann H, Fateh-Moghadam A, et al. Cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 compared with carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen and neuron-specific enolase in lung cancer. Results of an international multicentre study[J]. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1994, 32(3):189-199.
- [28] Molina R, Auge JM, Escudero JM, et al. Mucins CA 125, CA 19.9, CA 15.3 and TAG-72.3 as tumor markers in patients with lung cancer: comparison with CYFRA 21-1, CEA, SCC and NSE[J]. *Tumour Biol*, 2008, 29(6):371-380.
- [29] Rastel D, Ramaoli A, Cornillie F, et al. CYFRA 21-1, a sensitive and specific new tumour marker for squamous cell lung cancer. Report of the first European multicentre evaluation. CYFRA 21-1 Multicentre Study Group[J]. *Eur J Cancer*, 1994, 30A(5):601-606.
- [30] Huang MS, Jong SB, Tsai MS, et al. Comparison of cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1), tissue polypeptide antigen (TPA) and carcinoembryonic antigen (CEA) as tumour markers in bronchogenic carcinoma[J]. *Respir Med*, 1997, 91(3):135-142.
- [31] Brechot JM, Chevret S, Nataf J, et al. Diagnostic and prognostic value of Cyfra 21-1 compared with other tumour markers in patients with non-small cell lung cancer: a prospective study of 116 patients[J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(3):385-391.
- [32] Maeda Y, Segawa Y, Takigawa N, et al. Clinical usefulness of serum cytokeratin 19 fragment as a tumor marker for lung cancer[J]. *Intern Med*, 1996, 35(10):764-771.
- [33] Nisman B, Lafair J, Heching N, et al. Evaluation of tissue polypeptide specific antigen, CYFRA 21-1, and carcinoembryonic antigen in nonsmall cell lung carcinoma: does the combined use of cytokeratin markers give any additional information? [J]. *Cancer*, 1998, 82(10):1850-1859.
- [34] Stieber P, Hasholzner U, Bodenmuller H, et al. CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer[J]. *Cancer*, 1993, 72(3):707-713.
- [35] Holdenrieder S, Von Pawel J, Duell T, et al. Clinical relevance of thymidine kinase for the diagnosis, therapy monitoring and prognosis of non-operable lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(5):1855-1862.
- [36] Nisman B, Biran H, Ramu N, et al. The diagnostic and prognostic value of ProGRP in lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(11):4827-4832.
- [37] Lai RS, Hsu HK, Lu JY, et al. CYFRA 21-1 enzyme-linked immunosorbent assay. Evaluation as a tumor marker in non-small cell lung cancer[J]. *Chest*, 1996, 109(4):995-1000.
- [38] Molina R, Auge JM, Bosch X, et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology[J]. *Tumour Biol*, 2009, 30(3):121-129.
- [39] Keller T, Bitterlich N, Hilfenhaus S, et al. Tumour markers in the diagnosis of bronchial carcinoma: new options using fuzzy logic-based tumour marker profiles[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1998, 124(10):565-574.
- [40] Niklinski J, Furman M, Chyczewska E, et al. Evaluation of CYFRA 21-1 as a new marker for non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer Prev*, 1994, 3(2):227-230.
- [41] Pastor A, Menendez R, Cremades MJ, et al. Diagnostic value of SCC, CEA and CYFRA 21.1 in lung cancer: a Bayesian analysis [J]. *Eur Respir J*, 1997, 10(3):603-609.
- [42] 邓晓芳, 曾波航. 肺癌肿瘤标志物的研究进展[J]. *现代临床医学生物工程学杂志*, 2003, 9(6):532-534.

(收稿日期:2011-07-09)

(上接第 2428 页)

器械如:吸痰管、吸氧管、胃管、湿化瓶、气管套管、呼吸机管道、尿管等共同媒介物的外源性传播,加上患者免疫功能低、体质弱,以及抗菌药物的不规范使用,导致发生院内感染的可能性增大,常可在不同科室的住院患者间暴发流行。因此加强医院感染的管理和监测,认真做好院感数据的采集和分析,加强病区(尤其是重点科室)的消毒、隔离和监控工作,阻断外源性传播媒介,是有效控制 PA 医院感染发生和流行的重要途径。

(志谢:感谢广州医学院第一附属医院海印分院呼吸疾病国家重点实验室微生物课题组的卓越和黎晓强老师,感谢广州市疾病预防控制中心的李孝全老师对本实验的帮助!)

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S20 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2010; 52-55.
- [2] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9):2233-2239.
- [3] 费春楠, 刘贺, 沈芑, 等. 细菌基因分型技术用于控制医院感染研究进展[J]. *中国消毒学杂志*, 2010, 27(1):211-215.
- [4] 邹义春, 汪宏良, 罗卓跃, 等. 多药耐药铜绿假单胞菌菌株亲缘性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(4):328-333.
- [5] Bertrand X, Thouvez M, Talon D, et al. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units[J]. *Intensive Care Med*, 2001, 27(8):1263-1268.
- [6] 庞杏林, 陈守义, 邓志爱, 等. 重症监护病房医院感染铜绿假单胞菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分型[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2010, 10(1):17-20.
- [7] Douglas MW, Mulholland K, Denyer V, et al. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burns unit-an infection control study[J]. *Burns*, 2001, 27(2):131-135.
- [8] 高巧营, 管卫, 孙兰菊, 等. 儿童医院住院患儿铜绿假单胞菌的同源性[J]. *中国感染控制杂志*, 2011, 10(3):161-165.
- [9] Spencker FB, Haupt S, Claros MC, et al. Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2000, 6(11):600-607.
- [10] 郭月珠, 韩兰芳, 方建平, 等. 重症监护病房病原菌分布及耐药特点分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(2):119-121.

(收稿日期:2011-08-19)