

## ICU 铜绿假单胞菌感染暴发的随机扩增多态性 DNA 分子分型

庞杏林<sup>1</sup>, 李孝权<sup>1</sup>, 张欣强<sup>1</sup>, 胡玉山<sup>1</sup>, 刘俊华<sup>1</sup>, 邓志爱<sup>1</sup>, 陈守义<sup>1</sup>, 莫自耀<sup>2</sup>

(1 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510080; 2 广州呼吸疾病研究所, 广东 广州 510230)

**[摘要]** 目的 对铜绿假单胞菌(PA)进行随机扩增多态性 DNA(RAPD)分子分型,探讨重症监护室(ICU)中 PA 医院感染的流行规律。方法 采用 RAPD 技术对 13 株分离自某院 ICU 临床诊断为医院感染肺炎患者下呼吸道标本的 PA 进行分型,并与抗菌药物耐药谱分型比较。结果 13 株 PA 产生 A 型(12 株,92.31%)和 B 型(1 株,7.69%)2 种耐药表型,优势耐药表型为 A 型;RAPD 分型可分 2 型,分别为 I 型(6 株,46.15%)和 II 型(7 株,53.85%)。7 株分子 II 型和 5 株分子 I 型的耐药 A 型 PA 是优势菌株,可判断为引起 ICU 中 PA 医院感染暴发的病原菌。结论 ICU 存在 PA 暴发流行,流行株为耐药 A 型/分子 II 型、耐药 A 型/分子 I 型。PA 产生多重耐药性,RAPD 分型是目前比较理想的分子流行病学溯源手段。

**[关键词]** 铜绿假单胞菌;重症监护室;医院感染;暴发流行;流行病学;随机扩增多态性 DNA;抗药性;微生物

**[中图分类号]** R378.99<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)05-0315-04

## Molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* from ICU by random amplification polymorphism DNA

PANG Xing-lin<sup>1</sup>, LI Xiao-quan<sup>1</sup>, ZHANG Xin-qiang<sup>1</sup>, HU Yu-shan<sup>1</sup>, LIU Jun-hua<sup>1</sup>, DENG Zhi-ai<sup>1</sup>, CHEN Shou-yi<sup>1</sup>, MO Zi-yao<sup>2</sup> (1 Guangzhou Center for Disease Prevention and Control, Guangzhou 510080, China; 2 Guangzhou Institute of Respiratory Diseases, Guangzhou 510230, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the epidemic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infection in patients in ICU through typing of PA by random amplification polymorphism DNA (RAPD). **Methods** Thirteen strains of PA from lower respiratory tract in patients with nosocomial-acquired pneumonia were typed by RAPD method, and were compared with antimicrobial drug-resistance spectrum typing. **Results** Thirteen strains of PA were divided into two drug-resistance phenotypes, type A (12 strains, 92.31%) and type B (1 strain, 7.69%), the dominant strain was type A; these strains were divided into two genotypes with RAPD typing, type I (6 strains, 46.15%) and type II (7 strains, 53.85%). The dominant strains were 7 strains with both drug-resistance type A and molecular type II as well as 5 strains with both drug-resistance type A and molecular type I, these dominant strains were the pathogens causing PA nosocomial infection in ICU. **Conclusion** PA can cause outbreak and epidemic of infection in ICU, the epidemic strains were drug-resistance type A/molecular type II as well as drug-resistance type A/molecular type I. PA can cause multi-drug resistance, RAPD typing is the ideal molecular epidemiological method for tracing source of infection.

**[Key words]** *Pseudomonas aeruginosa*; intensive care unit; nosocomial infection; outbreak; epidemiology; random amplification polymorphism DNA; drug-resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2009, 8(5): 315-317, 345]

重症监护室(ICU)中的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)感染是常见的医院感染之

[收稿日期] 2008-12-12

[基金项目] 广州市医药卫生科技项目(2006YB131)

[作者简介] 庞杏林(1974-),女(汉族),广东省广州市人,副主任技师,主要从事细菌耐药监测研究。

[通讯作者] 庞杏林 E-mail: Pangxinglin1225@163.com

一。在感染过程中,PA 产生多种毒素和酶,可引起慢性疾病患者的呼吸道感染,甚至败血症。由于 PA 复杂的耐药机制,使治疗变得越来越困难,病死率高,因此受到医学界的高度重视<sup>[1]</sup>。建立一种简单、快速、可靠的细菌分型方法对医院感染的流行病学研究具有重要意义。本研究采用随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术,调查了某医院 ICU 中呼吸道感染铜绿假单胞菌的流行情况,并将 RAPD 分型与抗菌药物耐药分型进行了比较,现报告如下。

### 1 材料与方 法

1.1 菌株来源 13 株铜绿假单胞菌分离自 2007 年 8—9 月间某院 ICU 临床诊断为医院感染肺炎患者的下呼吸道标本<sup>[2]</sup>,标准菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 试剂与仪器 采用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪、VITEK GPS 细菌鉴定卡、药敏检测卡和英国 OXOID 公司 15 种药敏纸片进行细菌鉴定及药敏试验。RAPD 使用的 Premix Taq 成套试剂购自 Takara 宝生物工程(大连)有限公司;超纯琼脂糖和 10×TBE 缓冲液购自 invitrogen 公司。随机引物参考文献<sup>[3]</sup>设计,序列为:5'-GTTGGTGGCT-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;PTC-220 型基因扩增仪购自 MJ Reseach 公司;Gel Dos 2000 成像系统为美国伯乐公司产品。

1.3 细菌鉴定与药敏试验 细菌分离、培养、鉴定和药敏试验均严格按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)进行。采用 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪鉴定细菌;15 种抗菌药物药敏试验采用稀释法和纸片扩散法;以铜绿假单胞菌 ATCC 27853 作质控株。以美国临床实验室标准化研究所 M100-S15 版的标准判读药敏结果。

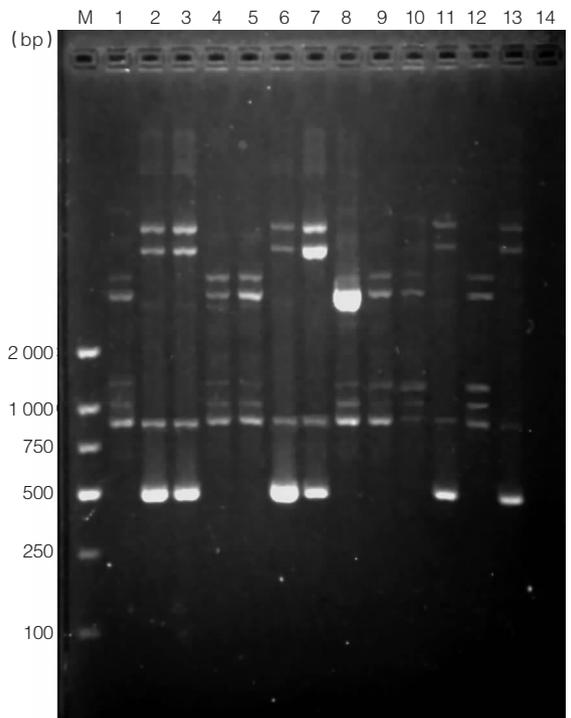
1.4 RAPD 反应总体积为 50 μL,体系含 10×buffer 5.0 μL (MgCl<sub>2</sub> 3.5 mmol/L, dNTP 200 μmol/L),引物 1.0 μL(10 μmol/L),rTaq 酶 0.3 μL(5 U/μL),模板 2.0 μL(25 ng/μL),补足双蒸水至 50 μL。PCR 循环参数为 94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 1 min,36℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,循环 40 次;72℃ 延伸 5 min。取扩增产物 5 μL 在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,电压 80 V,电泳时间 2 h。电泳完毕用 Gel Dos2000 凝胶成像系统拍照。

1.5 分型标准 RAPD 分型标准<sup>[4]</sup>:以所有可见条带具有相同的移动距离定为一型;带的形状和移动的距离不同,或所有可见条带的移动距离相同但缺少其他 2 条带以上者定为另一型。耐药分型以 PA 对 2 种及以上的药物有差异者归为非同型的耐药表型。

### 2 结果

2.1 PA 的耐药分型 所检测的 13 株 PA 产生 A 型和 B 型 2 种耐药表型,优势耐药表型为 A 型,共有 12 株(92.31%),B 型 1 株(7.69%)。耐药株 A 型对 10~11 种抗菌药物耐药,对奈替米星、替卡西林、第三代头孢菌素均耐药,仅对亚胺培南全部敏感,对庆大霉素及四环素部分敏感。耐药株 B 型对 13 种抗菌药物耐药,包括对亚胺培南全耐药。

2.2 RAPD 分型 PA 的 RAPD 电泳结果见图 1。13 株 PA 均能产生指纹图谱,分型率为 100%;扩增 DNA 片段数目为 4~7 条,片段大小为 500~>2 000 bp。根据所得 DNA 片段数目及移动距离大小,对 PA 菌株进行相似度比较,分为 2 型,分别命名为 I 型和 II 型,其中 I 型 PA 6 株(46.15%),II 型 PA 7 株(53.85%)。



M:分子量标准;1~13:PA 菌株 2、3、6、7、11、13 号为 I 型,1、4、5、8、9、10、12 号为 II 型;14:空白对照

图 1 PA 的 RAPD 分型指纹图

Figure 1 Fingerprint of RAPD typing of PA

2.3 2 种分型方法结果 13 株 PA 的 2 种分型方法结果见表 1。耐药分型 A 型的 12 株 PA 可分为 2 种不同的 RAPD 分子分型,其中菌株编号 1、4、5、8、9、10 和 12 号属于分子 II 型,菌株编号 3、6、7、11 和 13 号属于分子 I 型;耐药分型 B 型的 2 号 PA 菌株属于分子 I 型。结果显示,7 株(53.85%)分子 II 型和 5 株(38.46%)分子 I 型的耐药 A 型 PA 是优势菌株(92.31%),可判断 ICU 发生 PA 医院感染暴发,流行株为 II/A、I/A 2 个型别。

表 1 13 株 PA 的 2 种分型结果

Table 1 Results of two kinds of typing methods of 13 strains of PA

分型方法	菌株编号												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
耐药	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RAPD	II	I	I	II	II	I	I	II	II	II	I	II	I

### 3 讨论

PA 对多数抗菌药物耐药率不断上升,特别是近期已经出现了对亚胺培南和全部第三代头孢菌素及其他抗假单胞菌药物耐药的泛耐药 PA,这为临床有效控制感染带来了严重威胁<sup>[5]</sup>。本研究中 13 株 PA 可以分为 2 种耐药表型,A 型耐药株只对亚胺培南敏感,对庆大霉素和四环素部分敏感,耐药模式与相关报道相似<sup>[6]</sup>。仅 1 株 PA 对 13 种抗菌药物产生全耐药,为 B 型。PA 的耐药机制几乎包括了现今已知的所有耐药机制,如:产生抗菌药物灭活酶和水解药物;改变抗菌药物作用靶位,从而逃避抗菌药物的抗菌作用;膜蛋白的改变与主动外排系统的过度表达,限制药物到达其作用靶位;形成生物膜等。近年来,国内外研究主要集中在细菌产  $\beta$ -内酰胺酶的耐药机制上<sup>[7]</sup>。以往 PA 的分型方法主要依赖于血清学分型、噬菌体分型和菌素绿脓素分型<sup>[8]</sup>等生物学方法,但这些方法往往由于操作过于繁琐、分辨率低、重复性不佳而影响了流行病学的研究<sup>[9]</sup>。而且这些分型方法是建立在细菌表面受体的基础上,当囊性纤维变性患者发生 PA 肺部感染时,这些受体大都暴露,易发生表型改变,因而有时可能导致错误的分型结果,尤其是单独使用时<sup>[10]</sup>。近年来,分子生物学技术已应用于细菌、病毒基因水平的研究,而 RAPD 技术是当中一种比较快捷、简便和易行的分子分型技术。RAPD 技术是在 20 世纪 90 年代由 Williams 等<sup>[11]</sup>提出的一种克隆识别分子新技

术,该技术能对各种生物体的 DNA 或 RNA 进行多态性分析。利用随机的单一寡核苷酸为引物,以生物基因组 DNA 或 RNA 为模板,扩增出多态性的 DNA 指纹图谱,且不同生物与同一生物不同种属,其 DNA 指纹图谱各异。由于 RAPD 技术建立在聚合酶链反应(PCR)技术的基础上,因此具有效率高、样品用量少、灵敏度高、特异性强和易检测等优点<sup>[12]</sup>。RAPD 技术的优点还在于对所研究的物种,在无任何分子生物学资料的情况下分析其 DNA 多态性;同时,研究物种不受组织发育时期的限制即可构建其 DNA 指纹图谱,并通过统计学分析为遗传研究和分类研究提供分子水平的实验证据。RAPD 技术还具有操作性强,所需设备简单、经济,应用范围广泛等优点。本研究中,发现 RAPD 技术存在的最大缺点是实验的不稳定性。通过重复实验,我们发现影响 RAPD 的因素较多,主要包括 DNA 模板的质量与浓度,引物设计及引物浓度,缓冲体系、MgCl<sub>2</sub>、dNTP 浓度,琼脂糖凝胶质量与浓度,电泳缓冲液浓度等,另外还与实验技术人员操作稳定性有关,要在实验中不断地优化实验体系与条件才可得出可重复的结果。

实验结果表明,不同分子型别的 PA 可有相同的耐药谱型。由于细菌的耐药性受多种遗传因子的综合影响,不稳定,分型粗糙,耐药谱分型只为临床使用提供参考性信息;而 RAPD 分型对种和株的分辨率高,可在分子水平上对 PA 呼吸道感染提供病原学及流行病学依据,是 PA 分型的有效手段。通过实验结果可以认为,某医院的 ICU 中存在 2 种型别 PA 的医院感染暴发流行<sup>[13]</sup>,2 种型别 PA 均存在严重的多重耐药性。通过分型,分析 PA 感染来源与传播途径,有利于控制 PA 感染的暴发流行。RAPD 技术作为目前较有效易行的流行病学分型溯源手段,可以在基层疾病控制单位和各级医院防控医院感染中推广应用。

### [参考文献]

- [1] 贾辅忠. 绿脓杆菌的感染和预防[J]. 中国实用内科杂志, 1999, 19(2): 75-76.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(4): 201-203.
- [3] 温翠玲, 张志华, 张绣珑. 呼吸道感染铜绿假单胞菌 RAPD 分型与抗生素耐药谱比较研究[J]. 河北北方学院学报, 2006, 23(6): 18-20.

表 3 管理前后医院感染率和手术切口感染率比较

Table 3 Nosocomial infection rates and surgical wound infection rates before and after management

	出院人数	医院感染(例)	医院感染率(%)	手术人数	切口感染(例)	切口感染率*(%)
管理前(2005 年)	26 707	1 103	4.13	5 658	174	3.08
管理后(2007 年)	31 035	1 147	3.70	7 135	167	2.34

\* 管理前后比较,差异有显著性( $\chi^2 = 6.56, P < 0.05$ )

### 3 讨论

预防用药是抗菌药物使用率高的主要因素之一,表现为预防用药的指征太宽,医生对预防用药指征掌握不严格,用药时间长,联合用药种类多,选用抗菌药物起点高等<sup>[2]</sup>。药品收入是医院主要经济来源之一,医院经济利益也是抗菌药物使用率高的原因之一。通过对抗菌药物的管理,将抗菌药物分为三线,同一线药物中则选择效果稳定、毒副作用小、价格适合的药物。外科预防用药和重症监护室(ICU)重症患者预防用药在抗菌药物应用中占有较大比例<sup>[3]</sup>。手术时间不长的清洁手术,主要注意手术技巧和无菌操作,本组围术期用药率的下降与 I 类手术控制术前用药有关。对于有免疫功能受损的基础疾病患者,手术损伤面大、手术持续时间长的 I 类手术,以及 II、III 类切口手术应进行围术期用药。围术期用药时机也很重要,本院实施抗菌药物管理后,手术切口感染率亦明显下降。

发达国家抗菌药物使用率为 28%~32%<sup>[1]</sup>;我国大多数医院抗菌药物使用率在 80%左右,少数医院甚至达到了 90%,与发达国家差别较大。主要原因是国外对抗菌药物管理起步早,对临床医生进行抗菌药物合理应用的培训是卓有成效的原因之一<sup>[4]</sup>;而我国感染性疾病相对较多,另外我国病原学

检测较少,给临床应用抗菌药物带来了盲目性。

本院制定的《抗菌药物临床应用实施细则》中“分级管理实施细则”是结合医院临床实际制定并首次在临床应用,它将抗菌药物按照药物特点、临床疗效、细菌耐药性、不良反应以及药品价格等因素进行了分级,对各级抗菌药物制定了使用原则,并为各级临床医生设置了使用抗菌药物的权限。通过对抗菌药物的预防使用进行严格管理,本院抗菌药物使用率由 2005 年的 83.34%下降至 2007 年的 52.69%;改变了过去外科手术前后长期用药预防切口感染的传统观念,并取得了较好效果。

### [参考文献]

- [1] Ozkurt Z, Erol S, Kadanali A, *et al.* Changes in antibiotic use, cost and consumption after an antibiotic restriction policy applied by infectious disease specialists[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2005, 58(6): 338-343.
- [2] 黄荣平, 陈文萍, 贺爱民, 等. 某医院围术期抗菌药物预防应用中的主要问题[J]. *中国感染控制杂志*, 2008, 7(6): 421-423.
- [3] Erbay A, Bodur H, Akinci E, *et al.* Evaluation of antibiotic use in intensive care units of a tertiary care hospital in Turkey [J]. *J Hosp Infect*, 2005, 59(1): 53-61.
- [4] Erbay A, Colpan A, Bodur H, *et al.* Evaluation of antibiotic use in a hospital with an antibiotic restriction policy[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 21(4): 308-312.

(上接第 317 页)

- [4] Yeh K S, Chen T H, Liao C W, *et al.* PCR amplification of the *Salmonella* type III fimbriae gene sequence to detect the *Salmonella* Species [J]. *Intemat J Food Microbial*, 2002, 78: 227-234.
- [5] 庄文平, 朱德全. 烧伤病房铜绿假单胞菌多重耐药流行病学调查[J]. *中华医院感染学杂志*, 2006, 16(12): 1413-1415.
- [6] 顾觉奋. 抗生素的合理应用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 55-67.
- [7] 王福党, 王亚强, 颜平. 70 例铜绿假单胞菌产酶与耐药性的检测[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(8): 1535-1537.
- [8] Ojeniyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey[J]. *APMIS Suppl*, 1994, 20: 46-49.
- [9] Sader H S, Hollis R J, Pfaller M A. The use of molecular

techniques in the epidemiology and control of infectious diseases [J]. *Clin Lab Med*, 1995, 15(2): 407.

- [10] Ojeniyi B, Petersen Us, Hoiby N. Comparison of genome fingerprinting with conventional typing methods used on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients[J]. *APMIS*, 1993, 101(2): 168.
- [11] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nuc Ac Res*, 1990, 18 (3): 6531-6535.
- [12] Lin K H, Lo H F, Lee S P, *et al.* RAPD markers for the identification of yield traits in tomatoes under heat stress via bulked segregant analysis [J]. *Hereditas*, 2006, 143 (4): 142-154.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行) [S]. 北京, 2001.