

• 临床检验研究论著 •

ICU 患者多重耐药定植菌与感染菌基因同源性研究*

常洪美¹, 凌冬², 张丕³, 陈开全^{1△}, 戴忠红³, 柴建华¹

(崇州市人民医院: 1. 院感科; 2. 检验科; 3. ICU, 四川崇州 611230)

摘要:目的 研究 ICU 患者肠道定植菌与感染菌基因的同源性, 为制定控制多重耐药菌医院感染措施提供流行病学和分子生物学依据。方法 对 ICU 患者肛拭子分离出的多重耐药定植菌与同一患者临床标本分离出的相同多重耐药菌进行配对, 采用 Diversilab 自动化重复序列-PCR 分型系统, 分析肠道多重耐药定植菌与感染菌基因的同源性。结果 选取 4 对多重耐药定植菌与患者入院时临床标本分离出的相同多重耐药菌进行同源性检测, 2 对有同源性, 2 对无同源性; 选取 4 对多重耐药定植菌与患者医院感染临床标本分离出的相同多重耐药菌进行同源性检测, 4 对均有同源性。结论 ICU 患者多重耐药定植菌与感染菌基因具有同源性, 多重耐药定植菌可以引起医院感染的发生, 临床上应加强多重耐药定植菌患者的管理。

关键词: 多重耐药菌; 医院感染; 基因

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 16. 007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)16-2137-02

Study on gene homology of multi-drug resistant colonized bacteria and infectious bacteria in ICU patients*

Chang Hongmei¹, Ling Dong², Zhang Pei³, Chen Kaiquan^{1△}, Dai Zhonghong³, Chai Jianhua¹

(1. Department of Hospital Infection Control; 2. Department of Laboratory; 3. ICU, Chongzhou Municipal People's Hospital, Chongzhou, Sichuan 611230, China)

Abstract: **Objective** To study the gene homology of intestinal colonized and infectious bacteria in ICU patients to provide the epidemiological and molecular biological basis for formulating the control measures of multi resistant bacterial hospital infection. **Methods** The multi-drug resistant colonized bacteria isolated from the anal swabs and the same multi-drug resistant bacteria isolated from the clinical samples in the same patients were matched. The Diversilab automatic repetitive extragenic palindromic (REP)-PCR typing system was adopted to analyze the gene homology of multi-drug resistant colonized bacteria and infectious bacteria in the intestinal tract. **Results** 4 pairs of multi-drug resistant colonized bacteria and the same multi-drug resistant bacteria isolated from the clinical samples on admission in the same patients were selected and performed the homology detection, 2 pairs had the homology and 2 pairs had no homology; 4 pairs of multi-drug resistant colonized bacteria and the same multi-drug resistant bacteria isolated from the clinical samples in the patients with hospital infection were performed the homology detection, 4 pairs all showed the homology. **Conclusion** The multi-drug resistant colonized bacteria and the infectious bacteria in ICU patients have the homology. The multi-drug resistant colonized bacteria can cause the occurrence of hospital infection, so their management should be strengthened in clinic.

Key words: multidrug resistant bacteria; hospital infection; genes

近年来, 由于抗菌药物的使用广泛, 细菌的耐药程度越来越严重, 细菌的耐药率比欧美等发达国家高, 并呈逐年上升趋势^[1], 如何有效预防和控制多重耐药菌医院感染成为了重大公共卫生问题。国内关于多重耐药菌医院感染的预防和控制的研究大都处于现状调查阶段, 缺少干预性研究来证明何种预防、控制方法有效。本课题研究从源头上开展研究, 从多重耐药菌定植情况, 多重耐药定植菌与感染菌的关系, 以及去定植方法的研究, 探索预防和控制多重耐药的前瞻性措施。现将研究方法和结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 定植菌与感染菌菌株来源 定植菌菌株是从 ICU 患者入院时肛拭子分离出的多重耐药鲍曼不动杆菌、产 ESBLs 大肠埃希菌、产 ESBLs 肺炎克雷伯菌。社区感染细菌是从 ICU 同一患者入院时采集的标本分离出的相同细菌且药敏结果完全相同的菌株。医院感染细菌是从 ICU 同一患者发生医院感染时采集的标本分离出的相同细菌且药敏结果完全相同的

菌株。

1.2 仪器与试剂 VETIK32 微生物鉴定仪, Agilent 生物分析仪, Diversilab 分析软件; 凝固酶试剂、DNA 提取试剂盒、PEP-PCR 试剂盒、微流芯片, 试剂批号: 270633。以上仪器、试剂均为法国生物梅里埃公司提供。

1.3 REP-PCR 操作方法 按照 Diversilab 自动化分型系统要求操作, 细菌在肉汤琼脂平皿上培养过夜, 取细菌 1 环 (10 μ L 接种环), 用 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, DNA 浓度使用琼脂糖电泳法定量, 模板浓度要求在 25~50 ng/ μ L, 提取的 DNA 置 -20 $^{\circ}$ C 备用。REP-PCR 体系为 25 μ L: REP-PCRMM₁ 18.00 μ L, primerMix 2.00 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 和 AmpliTag DNA Polymerase 分别为 2.5、0.5 μ L, 基因组 DNA 模板 2 μ L。REP-PCR 参数为: 预变性 94 $^{\circ}$ C, 2 min, 变性 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 退火 45 $^{\circ}$ C, 30 s, 延伸 70 $^{\circ}$ C, 1.5 min, 共 35 个循环。最后延伸延伸 70 $^{\circ}$ C, 3 min。将 PCR 产物加载到微流芯片, 通过 Agilent 生物分析仪进行电泳, 探测产物的荧光强度, 绘制

* 基金项目: 四川省成都市科技局基金资助项目 (12PPYB092SF-002)。 作者简介: 常洪美, 女, 副主任检验师, 主要从事医院感染管理研究。 Δ 通讯作者, E-mail: yuangankechm@163.com。

电泳片段峰式坐标图和模拟胶样指纹图。最后使用 Diversilab 分析软件进行结果的阅读和分析。

1.4 同源性的判定标准 将聚类结果的 Cut off 值选择在 95%^[2], 菌株间相似性大于 97% 且胶样图无条带差别认定为相同菌株; 相似性大于 95%, 有 1 条条带不同认定为相似; 相似性小于或等于 95%, 有 2 条及 2 条以上不同条带认定为不同菌株。

2 结 果

2.1 4 对定植菌与社区感染细菌 PEP-PCR 相似性比较 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。4 对菌株中 cz33、cz34 是一对鲍曼不动杆菌, 感染标本为痰标本, 相似性 94.9%, cz35、cz36 是一对肺炎克雷伯菌, 感染标本为尿标本, 相似性 90.6%, 两对基因相似性小于或等于 95%, 基因无同源性; cz37、cz38 是一对大肠埃希菌, 感染标本为痰标本, 相似性 98.1%; cz39、cz40 也是一对大肠埃希菌, 感染标本也为痰标本, 相似性 99%, 两对相似性大于 95%, 基因具有同源性。cz35、cz36 胶样图条带差异见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”); cz39、cz40 胶样图条带差异见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 4 对定植菌与医院感染细菌 PEP-PCR 相似性比较 见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。4 对菌株均为大肠埃希菌, cz40、cz42 相似性 99.7%, cz43、cz44 相似性 99.2%, cz45、cz46 相似性 99.1%, cz47、cz48 相似性 99.5%, 相似性大于 95%, 基因具有同源性。cz47、cz48 胶样图条带差异见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

3 讨 论

本研究 4 对菌株是从 72 例 ICU 患者中分离出来的, 入院时同时采集肛拭子和感染部位标本, 有 4 对病原微生物相同且药敏结果完全相同, 两对相似性大于 95%, 基因具有同源性, 说明肠道定植的多重耐药菌与感染性疾病有关系。4 对菌株中两对基因相似性小于或等于 95% 的菌株, 基因相似均大于 90% 且药敏表型完全相同的细菌分别是鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌, 基因相似性还是比较高, 是否在细菌生长、繁殖过程中部分基因发生了变异有待进一步研究^[3-4]; 而两对大肠埃希菌相似性 99%, 基因具有同源性, 是否说明大肠埃希菌在生长、繁殖过程中基因比较稳定, 不易发生变异, 这也有待进一步研究^[5]。

本研究 4 对菌株均为大肠埃希菌, 相似性大于 95%, 基因具有同源性。4 对菌株均是从科研对照组 101 例病例中分离出来的, 均为医院感染病例, 研究表明, 肠道产 ESBLs 大肠埃

希菌定植菌可以引起医院感染^[6-8]。在研究过程中还发现, 肠道多重耐药定植菌中产 ESBLs 大肠埃希菌定植菌占 95% 以上, 产 ESBLs 大肠埃希菌定植菌是主要的肠道多重耐药菌, 也是引起医院感染的主要病原菌, 应引起临床的高度重视; 而实验组 99 例肛拭子分离的多重耐药菌使用复方氯己定漱口水漱口, 口服金双歧每次 2 g、每日 3 次进行肠道内去定植, 结果未分离出定植菌与医院感染相同的细菌, 说明去定植措施有效^[9]。

此研究表明, ICU 患者多重耐药定植菌与感染菌基因具有同源性, 多重耐药定植菌可以引起医院感染的发生, 临床上应加强多重耐药定植菌患者的管理。ICU 的患者入院时肛拭子筛查到多重耐药定植菌时均应进行隔离, 同时做好手卫生、排泄物管理、做好去定植措施等, 预防多重耐药定植菌发生医院内交叉感染。

志谢: 四川省人民医院微生物检验室喻华主任检验师、刘华主任检验师及梅里埃生物有限公司郭露副主任检验师的指导。

参考文献

[1] 吕媛, 李耘, 郑波, 等. 国内外细菌耐药监测研究介绍[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 27(4): 311-317.

[2] 曹晶晶, 袁梁, 王利, 等. 医院感染 MRSA 的重复序列 PCR 分型研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(3): 200-204.

[3] 潘玫, 李稳, 陈山, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌耐药特征及基因分型[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(2): 132-135.

[4] 蔡芳芳, 许刚, 罗盛, 等. ICU 病区大肠埃希菌中 qnr 基因的分布与耐药性的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(10): 1149-1152.

[5] 郑齐锏, 曹小利, 周爱平, 等. 尿路感染大肠埃希菌耐药特点与种系分型和遗传相关性分析[J]. 检验医学, 2013, 28(12): 1102-1105.

[6] 张财富. 重症监护病房分离的产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌耐药性与同源性分析[J]. 现代实用医学, 2009, 20(2): 122-124.

[7] 林琳, 马晓波, 宋秀宇, 等. 大肠埃希菌的 qepA 基因检测及菌株同源性分析[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(3): 204-206.

[8] 赵霞, 王力红, 张京丽, 等. 19 株产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌同源性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(12): 2396-2399.

[9] 常洪美, 戴忠红, 李建英, 等. 金双歧去除肠道产 ESBLs 大肠埃希菌定植效果的临床观察[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(4): 416-417.

(收稿日期: 2014-02-05)

(上接第 2136 页)

Neck, 2001, 23(3): 194-200.

[4] Hao SP, Tsang NM, Chang KP. Screening nasopharyngeal carcinoma by detection of the latent membrane protein 1(LMP-1) gene with nasopharyngeal swabs[J]. Cancer, 2003, 97(8): 1909-1913.

[5] 张琛, 张卓铭, 乐东海, 等. 鼻咽癌患者鼻咽拭子中 EB 病毒 LMP1 基因 C 末端的变异及序列分析[J]. 实用肿瘤杂志, 2009, 24(2): 110-113.

[6] Hao SP, Tsang NM, Chang KP, et al. Molecular diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: detecting LMP-1 and EBNA by nasopharyngeal swab[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2004, 131(5): 651-654.

[7] 李珀, 何常, 徐恒天, 等. 鼻咽癌中 EB 病毒 LMP1 基因的序列变异发生机制探讨[J]. 贵州医药, 2009, 33(1): 3-5.

[8] 宋勇春, 王平. VEGF、LMP-1 在鼻咽癌中的表达及其与预后的相关性[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(4): 556-559.

[9] 王娟, 徐洁洁, 乔明哲, 等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义[J]. 江苏医药, 2009, 35(5): 508-509.

[10] 季明芳, 郑爱昂, 郭媛卿, 等. 中山市鼻咽癌高发区 13 年前瞻性研究[J]. 肿瘤, 2003, 23(4): 272-274.

[11] 唐国全, 周向阳, 阳茂春. EB 病毒 IgA 滴度在鼻咽癌诊断的敏感性和特异性[J]. 广西医学, 2008, 30(6): 831-832.

(收稿日期: 2014-02-28)