

利用 DiversiLab 系统快速诊断医院感染菌的亲缘关系

钟 敏, 刘 华, 姜 伟, 杨永长, 肖代雯, 喻 华, 黄文芳[△] (四川省医学科学院/四川省人民医院 检验科, 成都 610072)

【摘要】 目的 应用 DiversiLab 系统对医院感染的鲍曼不动杆菌进行同源性分析, 评价 DiversiLab 系统在诊断医院感染细菌中的作用。**方法** 收集该院重症监护病房暴发的鲍曼不动杆菌 16 株, 应用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统进行鉴定和药敏试验, 同时应用基于重复序列聚合酶链反应 (rep-PCR) 技术的 DiversiLab 系统进行同源性分析。**结果** 16 株鲍曼不动杆菌被分为 4 个克隆组, 其中第 1 克隆组是主要的流行克隆, 有 4 个亚克隆, 9 株鲍曼不动杆菌同属于第 1 亚克隆, 亲缘关系近。**结论** 第 1 克隆组是该院医院感染主要流行克隆, DiversiLab 系统可在 24 h 内快速、准确地诊断医院感染细菌的同源性, 可广泛应用于医院感染细菌的诊断。

【关键词】 DiversiLab 系统; 医院感染; 鲍曼不动杆菌

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.01.024 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)01-0058-03

Application of DiversiLab system in quickly diagnosing genetic relationship of nosocomial infection bacteria ZHONG Min, LIU Hua, JIANG Wei, YANG Yong-chang, XIAO Dai-wen, YU Hua, HUANG Wen-fang[△] (Department of Clinical Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

【Abstract】 Objective To analyze the homology of *A. baumannii* by DiversiLab system and to evaluate the value of DiversiLab system in the diagnosis of hospital infection bacteria. **Methods** 16 outbreak strains of *A. baumannii* were collected in intensive care unit (ICU) of our hospital. The bacterial identification and microbial susceptibility test were performed by VITEK 2 COMPACT automatic analysis system. The homology analysis of 16 strains was performed by repetitive-sequence-based PCR DiversiLab system. **Results** 16 *A. baumannii* strains were classified into 4 unrelated clone groups by DiversiLab system, of which the first clone group was the main popular clone with 4 sub-clones. 9 *A. baumannii* strains with close relationship belonging to the first subclone. **Conclusion** The first clone group is the major epidemic clone of nosocomial infection in this hospital. The DiversiLab system can quickly and accurately diagnose the homology of hospital infection bacteria within 24 h and can be widely applied to diagnosis of nosocomial infection bacteria.

【Key words】 DiversiLab system; nosocomial infection; *A. baumannii*

医院感染已成为全球微生物学家和各国政府共同关注的公共卫生问题, 不仅给患者造成严重的经济损失, 更严重的是给患者身体上和精神上造成严重的伤害。引起医院感染病原菌种类较多, 主要包括细菌、病毒、真菌、立克次体等。如今鲍曼不动杆菌在全世界的分离率在逐渐提高, 其已经成为医院感染的主要致病菌, 可引起菌血症、呼吸机相关性肺炎、继发性脑膜炎、泌尿道感染等医院感染疾病^[1]。多重耐药鲍曼不动杆菌在医院内克隆传播现象严重, 一旦怀疑有医院感染的暴发, 一个快速的、可靠的分型工具对医院感染的诊断是至关重要的。DiversiLab 系统是基于重复序列聚合酶链反应 (rep-PCR) 技术原理的半自动基因分型方法, 通过 PCR 扩增细菌基因组的非编码重复序列后根据扩增片段的多态性比较菌株间相似性, 其操作简单、可重复、数据标准化, 可广泛应用于医院感染菌的快速诊断分型^[2-3]。本研究应用 DiversiLab 系统对医院感染的鲍曼不动杆菌进行同源性分析, 评价 DiversiLab 系统在诊断医院感染细菌中的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集本院 2014 年 2~4 月重症监护病房

(ICU) 患者痰液、部分呼吸机、床栏、被褥等物体表面分离的鲍曼不动杆菌 16 株, 其中急诊重症监护病房 (EICU) 12 株、ICU 4 株, 见表 1。菌种经 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统鉴定确认为鲍曼不动杆菌。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2 COMPACT 微生物鉴定药敏分析系统 (法国生物-梅里埃公司); PCR 扩增仪 (PTC-200, 美国 Bio-Rad 公司); 核酸蛋白测定仪 (Biophotometer, 德国 Eppendorf 公司); Agilent 2100 生物分析仪 (美国 Agilent Technologies 公司); MO Bio UltraClean™ Microbial DNA Isolation kit, DiversiLab Acinetobacter kit (MO Bio Laboratories, 法国 bioMérieux 公司); DNA Reagents & Supplies and DNA Chips (MO Bio Laboratories, 法国 bioMérieux 公司)。

1.3 方法

1.3.1 医院感染的初步诊断 医院感染菌的诊断遵照卫生部颁布的《医院感染诊断标准 (试行)》^[4], 其判断标准为: 主要根据患者病历资料, 首先入院时无明确的潜伏期感染, 细菌培养鉴定为阴性; 入院 48 h 后细菌培养鉴定出感染鲍曼不动杆菌; 同时有相应的临床感染症状; 在同时或较短时间内, 在 EICU

和 ICU 病区中出现了 3 例以上或大量的同类感染的医院感染暴发菌。

表 1 16 株鲍曼不动杆菌采集时间、科室分布、标本来源和 DiversiLab 分型

菌株编号	采集时间	分布	标本来源	DiversiLab 分型	
				克隆组	亚克隆组
1	2014 年 2 月	EICU-2 患者	痰	1	3
2	2014 年 2 月	EICU-1 患者	痰	4	4
3	2014 年 2 月	EICU-10 患者	痰	1	1
4	2014 年 2 月	EICU-5 患者	痰	1	1
5	2014 年 3 月	EICU-3 患者	痰	1	1
6	2014 年 3 月	EICU-11 患者	痰	1	1
7	2014 年 3 月	EICU-9 患者	痰	1	2
8	2014 年 3 月	EICU-9 床头柜	物体表面	1	1
9	2014 年 3 月	EICU-3 呼吸机臂	物体表面	1	3
10	2014 年 3 月	EICU-11 床栏	物体表面	1	1
11	2014 年 3 月	EICU-9 输液泵	物体表面	2	6
12	2014 年 3 月	EICU-5 输液泵	物体表面	1	2
13	2014 年 3 月	ICU-6 输液泵	物体表面	1	1
14	2014 年 3 月	ICU-13 监护仪	物体表面	1	1
15	2014 年 3 月	ICU-6 患者	痰	1	1
16	2014 年 3 月	ICU-13 患者	痰	3	5

1.3.2 DiversiLab 系统分型 (1) 细菌 DNA 的提取方法: 将保存的菌株常规方法复苏, 然后接种于血平板, 放 37 °C 孵箱孵育 18~24 h。参照鲍曼不动杆菌 DNA 提取试剂盒的方法进行提取。DNA 提取后进行定量检测, 核酸纯度控制在 25~50 ng/ μ L。(2) rep-PCR 扩增: 应用 rep-PCR DNA 指纹图谱试剂盒进行细菌基因组 rep-PCR 扩增, 以提取的鲍曼不动杆菌 DNA 为模板, 应用 rep-PCR DNA 指纹图谱试剂盒, 配制 25 μ L PCR 扩增体系如下, 18 μ L rep-PCR MM1, 2.5 μ L GeneAmp 10 \times PCR 缓冲液, 2 μ L Primer Mix LL, 0.5 μ L AmpliTaq DNA 聚合酶和 2 μ L DNA 模板。反应条件如下, 预变性 94 °C 2 min, 94 °C 变性 30 s, 45 °C 退火 30 s, 70 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环, 最后 70 °C 延伸 3 min。(3) 芯片电泳和指纹图谱检测: 按照 DNA Reagents & Supplie box 和 DNA Chips 要求配制凝胶-染料混合物 Gel-Dye Mix, 加载芯片, 在 Agilent2100 生物分析仪进行凝胶分析。根据细菌 DNA 指纹图谱条带、峰的位置、数目和峰度等因素判断菌株的同源性^[5]; 菌株间的相似性大于 95%, 即出现 1~2 个条带或峰的位置、峰度有差异, 可认为菌株亲缘性很接近, 划分为同一克隆组; 菌株间的相似性大于 97%, 即峰的位置、数目和峰度均一致, 两者的电泳图形可以重叠, 划分为同一亚克隆组; 菌株间的相似性小于 95%, 即出现 3 个或 3 个以上的条带或峰的位置、峰度有差异, 则划分为不同克隆。

2 结 果

2.1 医院感染的诊断结果 初步诊断患者携带的 9 株鲍曼不动杆菌为医院感染菌。

2.2 DiversiLab 系统分型结果 DiversiLab 系统将 16 株鲍曼

不动杆菌分为 4 个不同亲缘关系的克隆组及 6 个亚克隆组。克隆组 1 有 13 株鲍曼不动杆菌, 分为 3 个亚克隆组, 其中第 1 亚克隆亲缘关系较近, 相似性达到了 97% 以上, 是主要的流行组, 包含了 9 株(56.25%)鲍曼不动杆菌, 第 2 亚克隆含 2 株, 第 3 亚克隆含 2 株。克隆组 2、克隆组 3 和克隆组 4 各有 1 株鲍曼不动杆菌。见图 1~2。

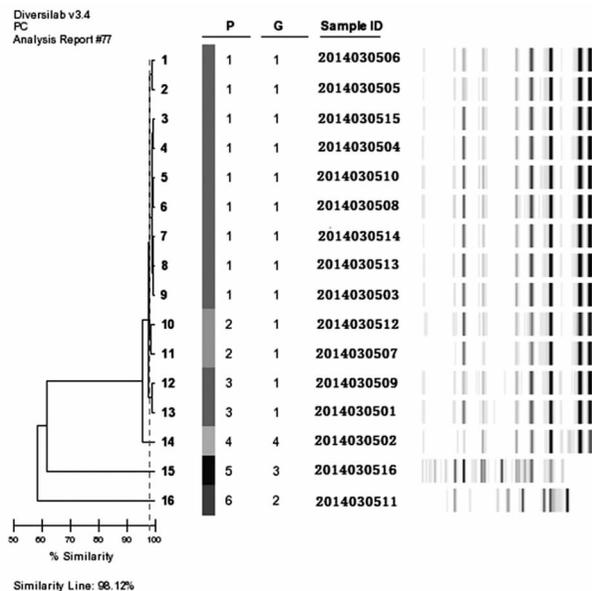


图 1 基于 DiversiLab 系统的 16 株鲍曼不动杆菌基因同源性分析树状图及凝胶图

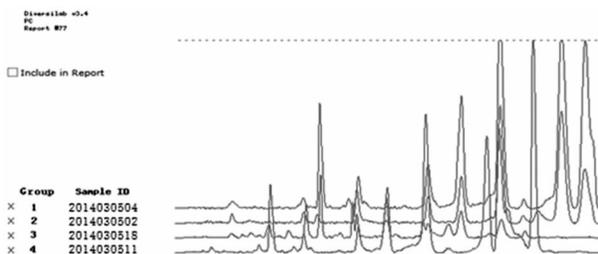


图 2 各克隆组的 DNA 指纹图谱重叠图

3 讨 论

多重耐药鲍曼不动杆菌医院内克隆传播现象严重。据报道显示, 在英国、法国、德国、意大利、西班牙等欧洲的多个国家暴发了鲍曼不动杆菌引起的医院感染^[6]。不仅如此, 在同一城市甚至在全球范围内的医院间克隆传播多重耐药鲍曼不动杆菌的现象已被相继报道。Naas 等^[7]报道在法国的北部和东南部的 55 个医疗中心之间发生了产内酰胺酶 VEB-1 鲍曼不动杆菌的克隆传播。在巴西也发现了携带 OXA-23 基因型的多重耐药鲍曼不动杆菌在多个医院间广泛的播散^[8]。本次调查共收集了 16 株鲍曼不动杆菌, 均来自 ICU 患者和周围环境中的物体表面, 暴发时间集中, 波及范围较广。可能与监护室环境、仪器设备、物体表面、接触传播等有关, 使患者感染或定植或发生医院暴发感染。

快速、准确地对鲍曼不动杆菌进行同源性研究是预防和控制医院感染的重要措施。一个完美的分型方法应该速度快、易操作、分辨率高、可靠度高、重复性好、与其他分型方法结果一致并且可以应用于绝大多数微生物实验室^[9]。目前用于鲍曼不动杆菌分型研究方法主要有: 脉冲场凝胶电泳、随机扩增多

态性 DNA 分析、扩增片段长度多态性分析、多位点序列分型、重复序列 PCR 技术等。这些技术大多因为操作复杂、重复性差、耗时长等原因没能广泛应用于临床。而基于扩增细菌基因组的非编码重复序列根据扩增片段的多态性来比较菌株间相似性的 DiversiLab 系统均克服了以上缺点,可广泛应用于医院感染菌的快速诊断分型。这种半自动 rep-PCR 方法包括 3 个步骤:提取 DNA 的标准化操作、专用的 rep-PCR 试剂盒、自动的 DiversiLab 系统分析软件处理系统,从而呈现出很好的重复性且操作速度快,在短时间内可对医院感染菌的亲缘关系作出诊断。

基于以上优点, DiversiLab 系统已经广泛用于不动杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌等的分子流行病学研究^[5,10-12]。Fluit 等^[13]通过检测医院感染的不同菌种来评估 DiversiLab 系统,发现其可以取代 MLVA 和 PFGE 对鲍曼不动杆菌、大肠杆菌的流行暴发作出诊断。Lau 等^[2]发现可以利用 DiversiLab 系统快速鉴定尿路大肠致病菌 O25:H4-ST131,并得出 DiversiLab 系统比 MLST 的分辨率高,对诊断尿路大肠致病菌 O25:H4-ST131 医院感染有很大帮助。

本研究通过 DiversiLab 系统对初步诊断为医院感染菌的 16 株鲍曼不动杆菌进行同源性研究,结果分为亲缘性不同的 4 个克隆组及 6 个亚克隆组。研究结果显示,克隆组 1 是主要流行克隆,其中的第 1 亚克隆亲缘关系较近,相似性达到了 97% 以上,是主要的流行组,包含了 9 株(56.25%)鲍曼不动杆菌; EICU 与 ICU 部分患者分离的鲍曼不动杆菌为同源株,提示这两个病房同时存在有同源鲍曼不动杆菌的感染和定植; ICU 患者与 EICU 患者分离的鲍曼不动杆菌存在同源性,原因可能是部分 EICU 患者在住院后转入 ICU,将感染的鲍曼不动杆菌带入了 ICU;亦可能为 ICU 患者与 EICU 患者在做相应辅助检查时在仪器上携带了鲍曼不动杆菌,从而造成了相互之间的传播; EICU 呼吸机、床栏、输液泵和 ICU 监护仪、输液泵分离的鲍曼不动杆菌存在亲缘性,说明 EICU 和 ICU 部分设备存在鲍曼不动杆菌的定植。

综上所述,应加强医院 ICU 的消毒隔离工作,定期做好消毒灭菌效果的监测。当怀疑有医院感染暴发时,快速、准确地对细菌进行同源性研究,从而鉴定这些医院感染菌的病原关系,发现了其中的传播克隆源,及时确认并处理医院感染菌的暴发流行。DiversiLab 系统具有操作快速、简单、可靠性高和数据的自动化分析等优点,可以在短时间内对医院感染暴发菌的同源性进行快速判断,从而有效控制医院感染和细菌耐药基因的克隆播散。

参考文献

[1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*; emergence of a successful pathogen[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(3): 538-582.

[2] Lau SH, Cheesborough J, Kaufmann ME, et al. Rapid identification of uropathogenic *Escherichia coli* of the O25:H4-ST131 clonal lineage using the DiversiLab repetitive sequence-based PCR system[J]. *Clin Microbiol*

Infect, 2010, 16(3): 232-237.

- [3] Deplano A, Denis O, Rodriguez-Villalobos H, et al. Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multi-drug-resistant health care-associated bacterial pathogens [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(10): 3616-3620.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. *现代实用医学*, 2003, 15(7): 460-465.
- [5] Shutt CK, Pounder JI, Page SR, et al. Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of staphylococcus aureus strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(3): 1187-1192.
- [6] Van Looveren M, Goossens H, ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp in Europe [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10(8): 684-704.
- [7] Naas T, Coignard B, Carbonne A, et al. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(8): 1214-1222.
- [8] Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 34(1): 25-28.
- [9] Deplano A, Denis O, Rodriguez-Villalobos H, et al. Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multi-drug-resistant health care-associated bacterial pathogens [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(10): 3616-3620.
- [10] Carretto E, Barbarini D, Farina C, et al. Use of the DiversiLab semiautomated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on *Acinetobacter baumannii* isolates in different Italian hospitals [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(1): 1-7.
- [11] Pitout JD, Campbell L, Church DL, et al. Using a commercial DiversiLab semiautomated repetitive sequence-based PCR typing technique for identification of *Escherichia coli* clone ST131 producing CTX-M-15 [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4): 1212-1215.
- [12] Doléans-Jordheim A, Cournoyer B, Bergeron E, et al. Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28(9): 1105-1111.
- [13] Fluit AC, Terlingen AM, Andriessen L, et al. Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(11): 3979-3989.