

· 临床论著 ·

腹腔感染大肠埃希菌PFGE谱型及耐药一致性分析

李玉芝¹ 杜小丽² 陈志海¹

【摘要】目的 探究腹腔感染大肠埃希菌菌株间的相关性及菌株间同源性与药敏结果一致性的关系。**方法** 使用限制性内切酶*Xba* I 对菌株基因组进行酶切, 对酶切后的DNA片段进行脉冲场凝胶电泳(PFGE), 使用Bionumerics软件分析菌株间相关性, 将菌株同源性与药敏结果一致性进行对比分析。**结果** 47株大肠埃希菌PFGE图谱间同源率为60.4%~97.4%, 同源率高于85%有6株。一次自发性细菌性腹膜炎(SBP)可以由一种PFGE谱型的大肠埃希菌引起, 也可能是多种PFGE谱型大肠埃希菌的混合感染。一次SBP可能是新发感染, 也可能是上次感染的复发。同源率高于85%的菌株对本研究中19种抗菌药物中的15种以上抗菌药物的药敏试验结果相同。**结论** 导致不同患者腹腔感染的大肠埃希菌来源不同。同源率高于85%的菌株药敏结果具有较高的一致性。

【关键词】 脉冲场凝胶电泳; 大肠埃希菌; 腹水; 耐药性

PFGE analysis and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from intra-abdominal infection Li Yuzhi¹, Du Xiaoli², Chen Zhihai¹. ¹Department of Infectious Diseases, Division 2ed, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; ²Pulse Net China, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: Chen Zhihai, Email: 13501340403@126.com

【Abstract】Objective To study the relationship of *E. coli* strains isolated from intra-abdominal infection, and the relationship of homology and the antimicrobial susceptibility results of different strains. **Methods** DNA of strains were digested with *Xba* I restriction enzyme, then were typed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). PFGE patterns were analyzed with Bionumerics software. The antimicrobial susceptibility results of *E. coli* strains and the clinical information of patients were collected. **Results** The homology of strains were from 60.4% to 97.4%, 6 among 47 strains were above 85%. One episode of SBP could be a result of reinfection caused by one PFGE type strain, or more than one PFGE type strains, also could be a recurrent infection of the last episode. Antimicrobial susceptibility results of more than 15 antibiotics were identical among strains with genetic similarity $\geq 85\%$. **Conclusions** Most strains isolated from intra-abdominal infection were different. Strains with genetic similarity $\geq 85\%$ have identical or similar antimicrobial susceptibility.

【Key words】 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE); *E. coli*; Ascites; Resistance

脉冲场凝胶电泳是分离大分子线性DNA的电泳技术。通过比较细菌DNA PFGE谱型可了解

菌株间的相关性。PFGE主要用于传染病的流行病学研究及院内感染的监测, 目前尚鲜见对导致腹腔感染的细菌PFGE谱型研究的报道。本研究对导致感染大肠埃希菌的PFGE谱型进行分析, 以了解菌株间的相关性。并对同源率高于85%的菌株药敏结果进行分析, 探究菌株PFGE同源性与药敏结果的一致性。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.05.010

基金项目: 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划 (No. 2011-3-079)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院感染二科¹; 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所²

通讯作者: 陈志海, Email: 13501340403@126.com

资料与方法

一、菌株来源

研究菌株来自首都医科大学附属北京地坛医院2008年10月至2013年2月住院患者腹水分离的大肠埃希菌47株。Marker(沙门菌Braenderup血清型H9812菌株)由中国CDC传染病研究所腹泻室提供。

二、主要实验试剂及设备

Seakem Gold琼脂糖购自美国Lonza公司, 蛋白酶K购自德国Merck公司, *Xba* I 限制性内切酶试剂盒购自日本TaKaRa公司, Gelred购自美国Biotium公司。胶槽、梳子、水平仪、托盘、凝胶电泳仪(美国BIO-RAD公司)、Gel Doc XR凝胶成像仪(美国BIO-RAD公司)。

三、资料收集

收集菌株分离日期、药敏试验结果、对应患者登记号、住院科室、原发病等临床资料, 其中药敏试验结果为首都医科大学附属北京地坛医院检验科使用PhoenixTM 100微生物鉴定/药敏分析系统对大肠埃希菌药敏鉴定结果。包括大肠埃希菌对氨苄西林、阿莫西林克拉维酸、阿米卡星、妥布霉素、氯霉素、头孢他啶、环丙沙星、头孢噻肟、头孢唑啉、头孢吡肟、庆大霉素、亚胺培南、左氧氟沙星、美罗培南、哌拉西林、氨苄西林舒巴坦、复方磺胺、四环素及哌拉西林他唑巴坦19种抗菌药物的药敏试验结果。

四、菌株PFGE及聚类分析

按美国CDC非O157大肠埃希菌PFGE标准操作对研究菌株及沙门菌Braenderup血清型H9812菌株进行PFGE。将图像及菌株临床资料表输入Bionumerics软件进行聚类分析。

结 果

一、细菌复苏结果及菌株相应患者的临床资料

收集首都医科大学附属北京地坛医院2008年10月至2013年2月43例住院患者腹水分离培养出的大肠埃希菌成功复苏47株。其中4位患者(登记号分别为295392、361834、91066和116361)各分离出2株菌株; 其中2位患者一次自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)病程分离到的2株大肠埃希菌; 另有2位患者在2次SBP病程中各分离到1株大肠埃希菌。42株(89.36%)大肠埃希菌分离自SBP患者, 4株(8.51%)分离自继发性腹膜

炎患者, 1株(2.13%)分离自卵巢癌, 癌性腹水感染者。

二、47株大肠埃希菌及参考菌株的PFGE结果

参考菌株为沙门菌Braenderup血清型H9812, *Xba* I 酶切, 作为分子量标准, 即Marker。同时将47株复苏大肠埃希菌编号, 分为5组进行PFGE。大肠埃希菌经限制性内切酶*Xba* I 酶切后的PFGE图谱为图1~5。

三、47株大肠埃希菌PFGE图谱聚类分析结果

将PFGE图谱及相应患者的临床信息, 输入Bionumeric软件聚类分析。结果如图6。不同患者分离的菌株间同源性的60.4%~97.4%。其中6对(12株)菌株间同源性较高, 高于85%: 3406和3496同源性为94.4%; 1009和1670同源性为94.7%。3196和3224同源性为96.8%; 1972和4122同源性为86.5%, 1624和1729同源性为97.4%; 1510和1262同源性为88.9%。除以上菌株外, 其他任何菌株间的同源性均低于85%。

四、同一患者两次腹水培养出的大肠埃希菌图谱聚类分析

同一患者两次腹水培养出的大肠埃希菌图谱聚类分析结果如图7所示。

五、同源性 $\geq 85\%$ 和同源性 $< 85\%$ 的菌株药敏结果一致性

在PFGE谱型同源性 $\geq 85\%$ 的菌株中, 同源性为97.4%的菌株对19种抗菌药物的药敏结果一致; 同源性为96.8%的菌株以及同源性为94.7%的菌株, 对18种抗菌药物药敏试验结果一致; 同源性为94.4%的菌株以及同源性为86.5%的菌株, 对17种抗菌药物的药敏试验结果一致; 同源性为88.9%的菌株对16种抗菌药物的药敏试验结果一致。

同源性低于85%的菌株中, 4106和4097号菌株间有4/19种抗菌药物的药敏结果不一致; 4223和1510号菌株有8种抗菌药物的药敏试验结果不一致; 2474和2650号菌株有10种抗菌药物药敏试验结果不一致; 1130和1416号菌株间有11种抗菌药物的敏感性不一致; 2271和2309号菌株间多达149种抗菌药物的药敏试验结果不一致。

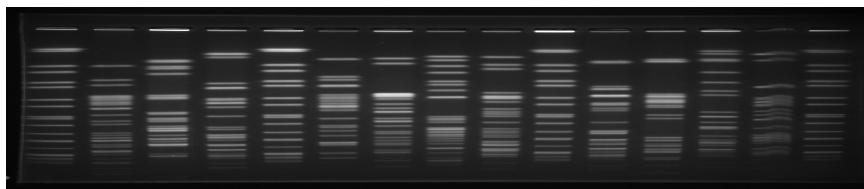
讨 论

PFGE是分离大分子线性DNA的电泳技术。PFGE分型是一种基于全基因组DNA序列的分型方法。对细菌进行原位裂解获得完整DNA, 然后用稀有酶切位点的限制性内切酶对DNA进行酶切,

获得大片段DNA。进而利用PFGE对DNA片段进行分离。通过比较不同菌株PFGE图谱条带的差异可以了解菌株间同源性和相关性。

由于细菌具有高度变异性，PFGE时一个限制

性内切酶酶切位点的改变会导致多个条带发生变化，一般认为具有85%以上相同条带的菌株具有相关性，属于同一克隆^[1]。因PFGE结果受多种因素影响，为了保证PFGE结果的质量及一致性，增加不同



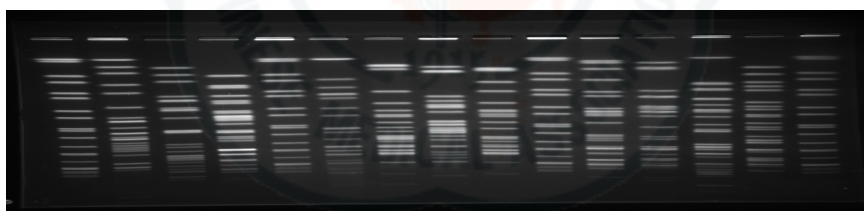
注：从左向右对应1到15泳道，其中第1、5、10、15为Marker

图1 菌株PFGE图谱-1



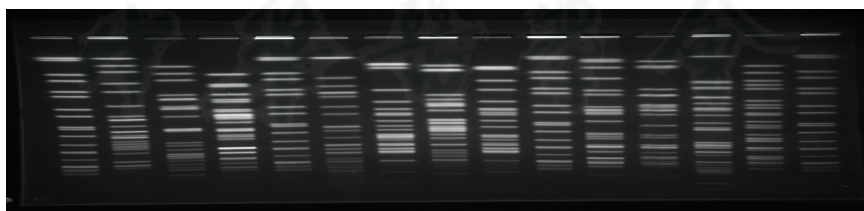
注：从左向右对应1到15泳道，其中第1、5、10、15为Marker

图2 菌株PFGE图谱-2



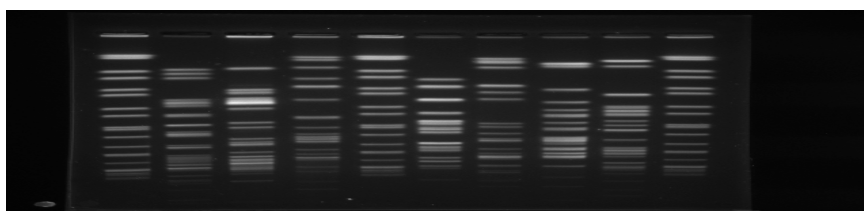
注：从左向右对应1到15泳道，其中第1、5、10、15为Marker

图3 菌株PFGE图谱-3



注：从左向右对应1到15泳道，其中第1、5、10、15为Marker

图4 菌株PFGE图谱-4



注：从左向右对应1到10泳道，其中第1、5、10泳道为Marker；第9泳道重新电泳为图1中第14泳道菌株

图5 菌株PFGE图谱-5

实验室之间的可比性, PFGE时使用全球统一参考菌株——沙门菌Braenderup血清型H9812, 以*Xba*I 酶切, 作为分子量标准, 即Marker。Marker酶切后产生20.5~1 135 kb的一系列片段。通过与Marker图谱

比较不仅可以估计特定染色体酶切片段的大小; 还能校正其他因素对PFGE结果的影响^[2]。

PFGE主要用于传染病的流行病学研究及细菌分子分型, 疾病预防控制中心利用PFGE验证传染

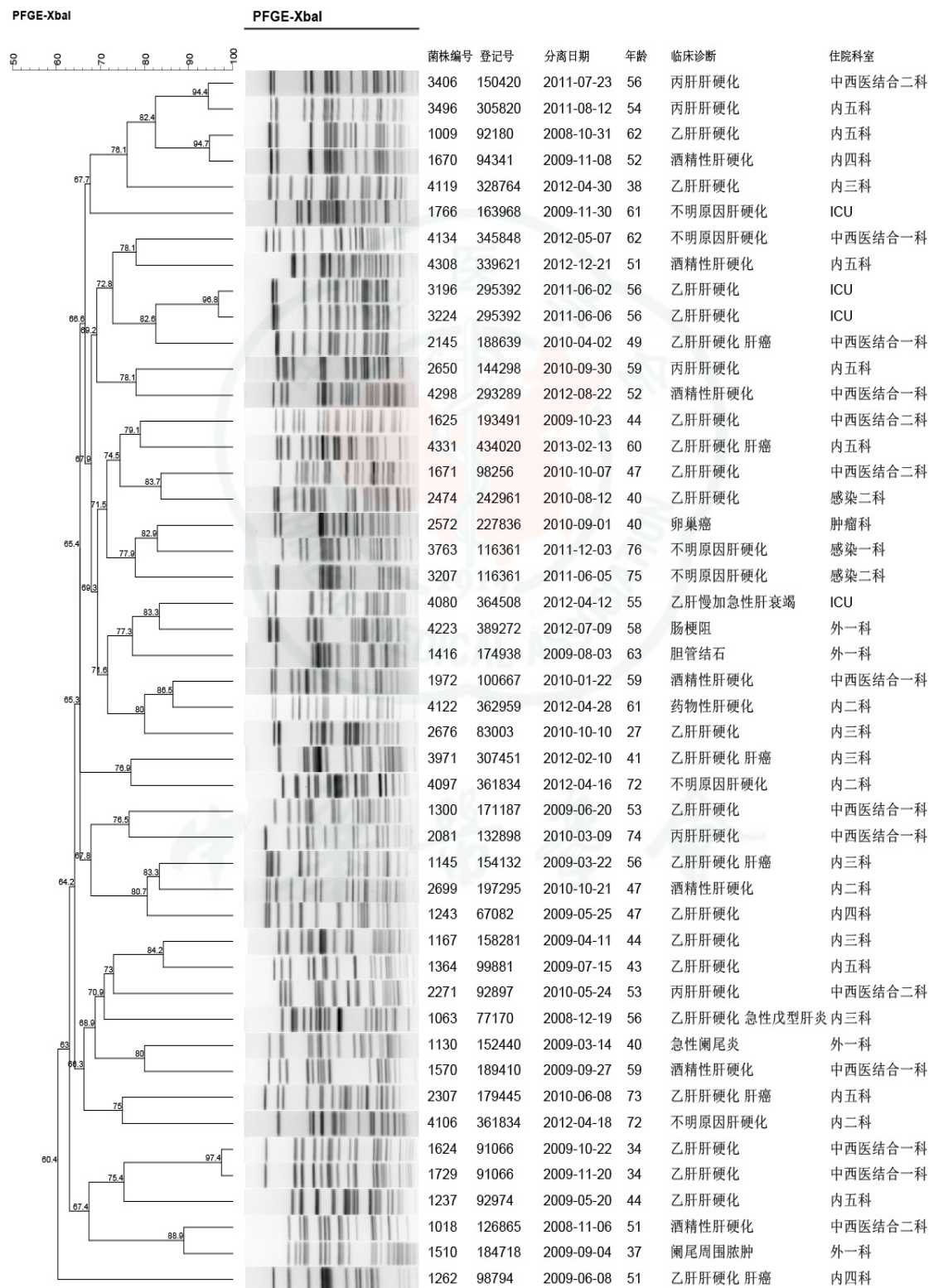


图6 大肠埃希菌PFGE谱型聚类分析图



图7 相同患者多次分离菌株PFGE图谱聚类分析结果(同一登记号为同一患者)

病的暴发流行,追溯传染源及传播途径^[3]。如借助PulseNet,美国CDC证实空肠弯曲菌^[4]、切斯特沙门菌^[5]、海德堡沙门菌^[6]及李斯特菌^[7]感染的跨州界流行,加拿大的Gaulin等^[8]PFGE发现了李斯特菌感染在魁北克省的流行,中国CDC通过PFGE确认了一起沙门菌食物中毒^[9]。在临床工作中,PFGE主要用于院内感染的监测^[10]。如用于多重耐药铜绿假单胞菌^[11-12]、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌^[13]、多重耐药鲍曼不动杆菌^[14]、多耐药肺炎克雷伯杆菌^[15]、耐万古霉素肠球菌^[16]等导致的院内感染。也有研究者通过PFGE判断同一部位多次感染是否为感染复发^[17]。有研究报道,PFGE相同的菌株耐药谱相同或相似^[18-19]。

将一时间段多个地区或同一地区分离到的同种细菌的PFGE图谱进行比较,如果发现不同菌株具有相同或高度相似的PFGE图谱,提示菌株有相同的来源,存在细菌感染的暴发流行。本研究中大肠埃希菌经限制性内切酶Xba I酶切后,所得PFGE图谱经Bionumerics软件聚类分析显示,不同患者分离的菌株间DNA同源率为60.4%~97.4%。但大多数菌株间同源性低于85%,这说明大多数患者分离的菌株来源不同。

目前研究认为SBP多由单一细菌感染引起,本研究中登记号295392的患者一次SBP病程中先后2次分离到的菌株同源性为96.8%(>85%),考虑为同一菌株。而登记号为361834的患者1次SBP病程中分离到的2株大肠埃希菌的同源性为63%(<85%),虽然同是大肠埃希菌,但非同一菌株。说明SBP既可由某种单一PFGE类型的菌株感染导致,也可能是多种PFGE类型的同种细菌混合感染。

登记号116361的患者2次自发性腹膜炎病程中分离到的细菌同源性仅为76.9%(<85%),提示

2次SBP为2种不同PFGE类型的菌株感染引起。而登记号为91066的患者2次SBP分离到的菌株同源性高达97.4%,提示该患者两次SBP感染是由同一菌株引起,第二次SBP可能为前一次SBP致病菌未彻底清除导致。说明一次SBP发生可能是一种PFGE类型的菌株新发感染,也可以是上一次SBP感染的复发。

本研究中同源性高于85%的菌株对抗菌药物的药敏试验结果一致性较高,即耐药谱相同或相似。与其他报道一致^[20-21]。同源性高于85%的菌株间药敏试验结果不完全相同,可能与菌株分离的间隔时间较长或留取腹水培养后就使用了抗菌药物治疗,细菌在抗菌药物选择压力下发生一定变异,耐药性变化有关。同源性低于85%的菌株药敏结果一致性相对较低。提示菌株间同源性在85%以上时,可根据其中一株细菌的药敏结果大致估计另一菌株的药敏情况,但当两株细菌同源性小于85%,则无法根据其中一种PFGE谱型细菌的药敏结果预测另一菌株的药敏情况。

参 考 文 献

- 1 Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, et al. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Hosp Infect, 1996, 32(2): 135-145.
- 2 Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3): 1045-1050.
- 3 李伟, 崔志刚, 阚飙, 等. 转化预防医学的实践: PulseNet China [J]. 疾病监测, 2012, 27(2): 88-92.
- 4 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of campylobacter jejuni infections associated with undercooked chicken livers-Northeastern United States, 2012 [J]. MMWR, 2013, 62(44): 874-876.

- 5 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of salmonella chester infections associated with frozen meals--18 States, 2010[J]. MMWR,2013,62(48):979-982.
- 6 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Salmonella Heidelberg* infections linked to a single poultry producer--13 states, 2012-2013[J]. MMWR,2013,62(27):553-556.
- 7 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of invasive listeriosis associated with the consumption of hog head cheese--Louisiana, 2010[J]. MMWR,2011,60(13):401.
- 8 Gaulin C, Ramsay D, Bekal S. Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, Quebec, Canada, 2008[J]. J Food Prot,2012,75(1):71-78.
- 9 赵萌, 崔旭初, 于慧霞, 等. 一起沙门菌食物中毒的实验室诊断与分析[J]. 疾病监测,2015,30(5):381-384.
- 10 Fernández CF, López CL, Pascual HA. Molecular typing methods for infection monitoring and control[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin,2013,31(Suppl 1):20-25.
- 11 Seki M, Machida N, Yamagishi Y, et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* caused by damaged transesophageal echocardiogram probe used in cardiovascular surgical operations[J]. J Infect Chemother,2013,19(4):677-681.
- 12 Kiddee A, Henghiranyawong K, Yimsabai J, et al. Nosocomial spread of class 1 integron-carrying extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Thai hospital[J]. Int J Antimicrob Agents,2013,42(4):301-306.
- 13 代文霞, 沈叙庄, 高薇, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起医院内感染的基因分型及耐药监测[J]. 中华流行病学杂志,2009,29(7):740-741.
- 14 宣迎梅. 院内感染多重耐药鲍曼不动杆菌的同源性分析[J]. 吉林医学,2012,33(34):7434-7436.
- 15 Yu F, Ying Q, Chen C, et al. Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harbouring blaIMP-4 and blaDHA-1 in a neonatal intensive care unit in China[J]. J Medical Microbiol,2012,61(Pt 7):984-989.
- 16 Sun H, Wang H, Xu Y, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2012,74(4):399-403.
- 17 Luo Y, Ma Y, Zhao Q, et al. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection[J]. J Clin Microbiol,2012,50(12):4002-4007.
- 18 代文霞, 沈叙庄, 高薇, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起医院内感染的基因分型及耐药监测[J]. 中华流行病学杂志,2008,29(7):740-741.
- 19 王红, 赵爱兰, 白向宁, 等. 一起肠产毒性大肠杆菌O128: H45引起的院内新生儿腹泻暴发[J]. 中国人兽共患病学报,2013,29(3):304-308.
- 20 Yu F, Ying Q, Chen C, et al. Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harbouring blaIMP-4 and blaDHA-1 in a neonatal intensive care unit in China[J]. J Med Microbiol,2012,61(Pt 7):984-989.
- 21 宣迎梅. 院内感染多重耐药鲍曼不动杆菌的同源性分析[J]. 吉林医学,2012,33(34):7434-7436.

(收稿日期: 2015-07-27)

(本文编辑: 孙荣华)

李玉芝, 杜小丽, 陈志海. 腹腔感染大肠埃希菌PFGE谱型及耐药一致性分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2016, 10(5): 559-564.