

## 两种铜绿假单胞菌同源性分析方法比较

毛 璞<sup>1</sup>, 傅 威<sup>1</sup>, 叶 丹<sup>1</sup>, 单靖岚<sup>1</sup>, 林美仪<sup>1</sup>, 李常安<sup>1</sup>, 黎毅敏<sup>1,2</sup>

(1 广州医学院第一附属医院, 广东 广州 510120; 2 呼吸疾病国家重点实验室 广州呼吸疾病研究所, 广东 广州 510120)

**[摘要]** 目的 了解脂肪酸气相色谱分析方法能否应用于铜绿假单胞菌的同源性分析。方法 收集某院 2008 年 1—12 月重症监护室住院患者痰标本分离的 26 株多重耐药铜绿假单胞菌, 分别应用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 和脂肪酸气相色谱分析方法进行同源性分析, 比较两组结果。结果 PFGE 结果表明, 26 株菌有 6 个克隆; 脂肪酸气相色谱分析显示, 26 株菌存在 4 个克隆, 符合率仅 26.92% (7/26)。结论 脂肪酸气相色谱分析方法在菌株同源性判断的准确性上与 PFGE 分型有差距, 其应用于铜绿假单胞菌的同源性分析仍需谨慎。

**[关键词]** 铜绿假单胞菌; 脉冲场凝胶电泳; 气相色谱分析; 同源性; 实验室技术与方法

**[中图分类号]** R378.99<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)03-0161-04

## Comparison of PFGE and gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis for homology of *Pseudomonas aeruginosa*

MAO Pu<sup>1</sup>, FU Wei<sup>1</sup>, YE Dan<sup>1</sup>, SHAN Jing-lan<sup>1</sup>, LIN Mei-yi<sup>1</sup>, LI Chang-an<sup>1</sup>, LI Yi-min<sup>1,2</sup> (1 The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China; 2 State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate whether gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis can be applied to analyze the homology of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** Twenty-six multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDR-PA) strains isolated from sputum samples of intensive care unit (ICU) patients were collected from January to December 2008. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis were performed to analyze the homology. **Results** PFGE analysis revealed that 26 isolates had 6 clones; gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis showed that 26 strains had 4 clones, and consistent rate was only 26.92% (7/26). **Conclusion** Gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis is not identical with PFGE in analyzing homology of *Pseudomonas aeruginosa*.

**[Key words]** *Pseudomonas aeruginosa*; pulsed-field gel electrophoresis; gas chromatographic analysis; homology; laboratory technique and method

[Chin Infect Control, 2012, 11(3): 161-164]

在医院感染控制工作中, 为确定是否存在外源性感染, 寻找感染源头, 需要作快速同源性分析。目前普遍采用的是脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 技术, 虽然该技术是同源性分析的金标准, 但由于耗时长, 难以做到快速分析。脂肪酸气相色谱分析方法是近年来发展的新技术, 通过对气相色谱获得的短链脂肪酸的种类和含量的图谱进行比对, 从而快速地对微

生物种类进行同源性分析。铜绿假单胞菌是医院感染较为常见的革兰阴性 (G<sup>-</sup>) 菌株。近年来, 随着抗菌药物的广泛应用, 多重耐药铜绿假单胞菌 (MDRP) 临床分离比例不断升高<sup>[1]</sup>。我们对 2008 年 1—12 月某院重症监护室 (ICU) 分离的 26 株 MDRP 菌株, 分别采用 PFGE 与脂肪酸气相色谱分析方法作同源性分析, 评价脂肪酸气相色谱分析方

[收稿日期] 2011-10-22

[基金项目] 广州市教育局创新团队科研基金 (B94117) 广州市科技计划项目 (2010J-E171)

[作者简介] 毛璞 (1981-), 女 (汉族), 湖北省宜昌市人, 助理研究员, 主要从事医院感染控制与细菌耐药性研究。

[通讯作者] 黎毅敏 E-mail: lymin98@yahoo.com

法能否作为同源性分析的可靠方法。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 2008 年 1—12 月,某院 ICU 住院患者痰标本分离的非重复菌株,共 26 株。

1.2 PFGE 血平板 37℃ 培养过夜。CSB 液 (0.1 mol/L Tris, 100 mmol/L EDTA) 重悬细菌后,调整 OD<sub>600</sub> ≈ 1.9。制小胶后,加入 300 μL 蛋白酶 K 缓冲液 (50 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA) 和 20 mg/mL 蛋白酶 K 5 μL, 50℃ 水浴, 过夜。1 × TE 洗小胶 3 次, 每次 30 min。在 100 μL *Spe* I 酶切缓冲液中 4℃ 平衡 30 min。更换新的酶切体系 100 μL, 25℃ 水浴消化过夜。1 × TE 洗小胶 3 次, 每次 30 min。应用 CHEF-DR III 脉冲场电泳仪 (Bio-rad, USA), 0.5 × TBE, 1% PuLsed Field Certified Agarose (Bio-rad), 14℃, 角度变换 120°, 6 V/cm, 线性梯度变化 5—15 s, 电泳 10 h, 紧接 15—45 s, 电泳 10 h。

1.3 脂肪酸气相色谱分析 收集大约 40 μg 细菌于玻璃瓶底部, 1 mL 皂化试剂 (45 g NaOH, 150 mL 甲醇, 150 mL ddH<sub>2</sub>O) 重悬细菌后, 100℃, 30 min。待冷却至室温后, 加入 2 mL 甲基化试剂 (325 mL 6N 浓盐酸, 275 mL 甲醇) 50℃, 10 min, 快速冷却, 加入 1.25 mL 萃取溶剂 (200 mL 己烷, 200 mL 甲基叔丁醚) 混匀, 再加入 3.0 mL 碱洗涤试剂 (10.8 g NaOH, 900 mL ddH<sub>2</sub>O), 用玻璃针管移取上层液体, 收集于气相色谱样品管。

脂肪酸甲酯分析, 采用 Agilent 7890A 气相色谱仪, 二级程序升温: 起始温度 170℃, 每分钟升高 5℃, 至 260℃ 以每分钟升高 40℃, 升至 310℃, 维持 1.5 min。进样口温度 250℃, 载气为氢气, 流速 0.4 mL/min, 柱压 9.00 psi 分流进样模式, 分流比为 1:100, 进样量 2 μL。检测器温度 300℃, 氢气流速 30 mL/min, 空气流速 400 mL/min, 尾吹气 (氮气) 流速 30 mL/min。MIDI Sherlock 系统根据各脂肪酸组分保留时间计算等链长 (ECL) 值, 确定目标组分的存在, 采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量, 进行基于菌体脂肪酸主成分分析的树状聚类。

1.4 同源性判定标准 PFGE 结果: 应用 BioNumerics 软件对图像进行分析, 选择 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 方法, 条带位置差异容许度 2%, 优化值 0.5%, 电泳条带完全一致判断为同一菌株; 相似度

>85% 为同一亚型, 代表同一克隆株; <85% 者为不同的基因型, 代表不同的克隆株<sup>[2]</sup>。气相色谱结果: 应用 MIDI Sherlock 分析系统中 Dendrogram 聚类分析方法, 欧式距离值 (euclidean distance) < 2.5 为同一菌株; 2.5 ~ < 6 为同一亚种或生物型; 6 ~ < 10 为同一种<sup>[3]</sup>。由于 PFGE 为分型金标准, 符合率为气相色谱分型结果与 PFGE 分型相同的菌株数占总菌株的百分率 (若两种方法判断同一菌株均为散发时, 也认定为分型结果相同)。

## 2 结果

2.1 PFGE 同源性分析 采用 PFGE 对 26 株临床分离株进行同源性分析, 结果表明, 26 株菌有 6 个克隆: 克隆 A 包括 339、3843、389、513、531、793; 克隆 B 包括 3087、3391、3984、2385; 克隆 C 包括 3739、3808; 克隆 D 包括 336、507; 克隆 E 包括 158、2379、1559; 克隆 F 包括 2773、3098。见表 1 与图 1。

表 1 PFGE 与气相色谱同源性分析结果

Table 1 Comparison of homology analysis by PFGE and gas chromatographic whole-cell fatty acid

Isolate	PFGE type	Gas chromatographic type
339	A	c
3843	A	d
389	A	d
513	A	s
531	A	s
793	A	s
3087	B	c
3391	B	d
3984	B	s
2385	B	s
3385	S	s
3980	S	b
3739	C	s
3808	C	s
537	S	a
336	D	s
507	D	s
158	E	s
2379	E	b
1559	E	s
4159	S	s
320	S	s
3825	S	b
685	S	a
2773	F	a
3098	F	a

S and s respectively represent the result of PFGE and gas chromatographic was sporadic.

2.2 脂肪酸气相色谱同源性分析 采用脂肪酸气相色谱对 26 株临床分离菌株进行鉴定及同源性分析,结果表明,26 株临床分离菌株均为铜绿假单胞

菌,存在 4 个克隆:克隆 a 包括 3098、685、537、2773;克隆 b 包括 2379、3980、3825;克隆 c 包括 339、3087;克隆 d 包括 389、3843、3391。见表 1 与图 2。

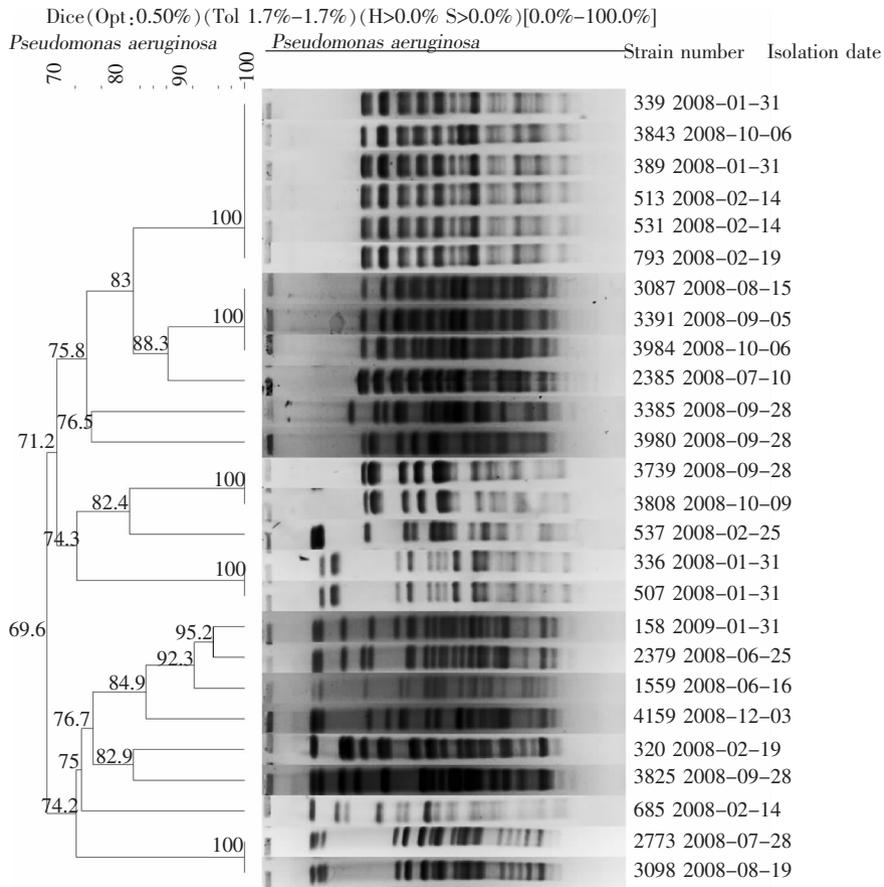


图 1 PFGE 图谱及聚类分析

Figure 1 PFGE profile and cluster analysis

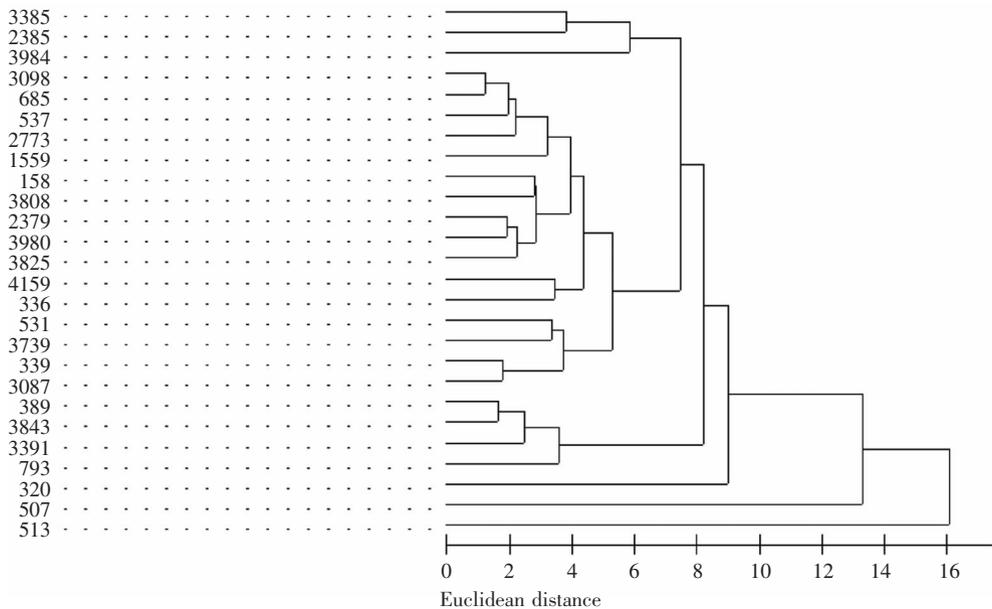


图 2 脂肪酸气相色谱聚类分析

Figure 2 Clustering on MDR-PA isolates by gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis

### 3 讨论

病原微生物的同源性分析为确定感染的暴发,发现医院内病原菌的交叉感染起着重要作用<sup>[4]</sup>。现在较为公认的具有最佳分型效果的同源性分析方法为 PFGE 同源性分析。但该技术耗时长,得到结果的时间大约 2~3 d,这使鉴定的结果不能及时反馈至临床,从而可能错过隔离控制的最有效时机,严重阻碍实验结果对临床工作及时有效的指导,且该技术工作步骤繁琐,工作量大;实验批次间,不同的实验人员之间缺乏可比性,重复性低,结果的判断带有很多主观因素<sup>[5]</sup>。因此,有必要寻找一种快速进行同源性分析的方法。

脂肪酸气相色谱分析是基于微生物脂肪酸组成的一种分子分型方法。细菌的脂肪酸被提取、酯化,然后应用气相色谱分析。根据微生物中特定短链脂肪酸(C9-C20)的种类和含量进行鉴定、分析。美国 MIDI 公司基于以上原理,开发了 SHERLOCK 微生物鉴定系统,该软件联合 Agilent 公司 7890A 型气相色谱,从而快速准确地对微生物种类进行鉴定和同源性分析。该方法具有操作便利,使用常规试剂,成本低廉;大量样品时全自动,速度快的优点。其已应用于霍乱弧菌的同源性分析<sup>[6]</sup>;食品工业上,应用于污染菌的同源性分析<sup>[7]</sup>;在金黄色葡萄球菌的同源性分析上,与 PFGE 分析结果有很好相似性<sup>[8]</sup>。

PFGE 为细菌分型的金标准。应用低频的限制性核苷酸内切酶消化细菌染色体 DNA,产生的 DNA 大片段被脉冲场电泳分离,最终产生含有有限数量的较大片段的核酸条带。该方法被推荐作为多数细菌的分型方法<sup>[9]</sup>。本实验中两种方法同源性分

析的符合率仅 26.92%(7/26)。分析导致符合率低的原因,有可能是由于气相色谱所基于的物质基础为细菌的脂肪酸,容易受到细菌生长条件、生长时间的影响而发生变化。鉴于铜绿假单胞菌 PFGE 与脂肪酸同源性分型结果不一致,脂肪酸气相色谱应用于铜绿假单胞菌同源性分析仍需谨慎。

### [参考文献]

- [1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5):321-329.
- [2] Koh T H, Khoo C T, Tan T T, *et al.* Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo- $\beta$ -lactamase genes, including the novel blaIMP-26 gene[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48 (7):2563-2564.
- [3] MIDI. Sherlock analysis user's manual [M]. 5th ed, MIDI, Inc., Newark, Delaware, USA, 2005.
- [4] Wenzel R P. 医院内感染的预防与控制[M]. 李德淳,汤乃军,李云,等译. 4 版. 天津:天津科技翻译出版公司,2005:472-473.
- [5] 王丽丽,徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状[J]. 疾病监测,2006,21(5):276-279.
- [6] 王瑞白,刘海洪,邱海燕,等. 我国霍乱弧菌的脂肪酸分型研究[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(6):15-21.
- [7] 郑华英,郭爱玲,余功保. 食品中沙门菌细胞脂肪酸组分的气相色谱分析[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(12):1443-1444.
- [8] Ehrhardt C J, Chu V, Brown T, *et al.* Use of fatty acid methyl ester profiles for discrimination of *Bacillus cereus* T-strain spores grown on different media [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(6):1902-1912.
- [9] Tenover F, Arbeit R, Goering R, *et al.* How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(6):426-439.