

## 儿童医院住院患儿铜绿假单胞菌的同源性

高巧营<sup>1</sup>, 管 卫<sup>2</sup>, 孙兰菊<sup>3</sup>, 黄敬孚<sup>2</sup>, 吴尚为<sup>1,3</sup>

(1 天津医科大学病原微生物室, 天津 300070; 2 天津市儿童医院, 天津 300074; 3 天津市南开医院, 天津 300100)

**[摘要]** **目的** 了解某儿童专科医院临床分离的铜绿假单胞菌(PA)感染流行趋势, 观察 PA 的科室分布特征、耐药性及基因型。**方法** 收集该儿童专科医院住院患儿送检标本分离的 56 株 PA 进行耐药性分析, 并应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型技术对其进行基因分型。**结果** 56 株 PA 对氨苄西林耐药率为 100.00%, 对阿米卡星、环丙沙星耐药率为 0.00%, 对其他抗菌药物表现为不同的耐药率(1.79%~96.43%); 共被分为 18 个 PFGE 型别, 其中 A 型 26 株(均分离于呼吸科), B 型 12 株(11 株分离于内分泌科), C 型 3 株, D~R 型各 1 株。不同科室分离的菌株数量不同, 其中呼吸科分离最多, 达 27 株(48.21%); 其次为内分泌科 13 株(23.21%)。**结论** 该儿童医院呼吸科和内分泌科分别存在 PA 的 2 种不同克隆菌株流行。PFGE 具有特异性高、重复性好、结果容易判断等优点, 是目前细菌基因分型较为可靠的技术。

**[关键词]** 铜绿假单胞菌; 脉冲场凝胶电泳; 分子流行病学; 抗药性; 微生物; 儿童

**[中图分类号]** R378.99<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)03-0161-05

## Research on homology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized children

GAO Qiao-ying<sup>1</sup>, GUAN Wei<sup>2</sup>, SUN Lan-ju<sup>3</sup>, HUANG Jing-fu<sup>2</sup>, WU Shang-wei<sup>1,3</sup> (1 Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2 Tianjin Children Hospital, Tianjin 300074; 3 Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100)

**[Abstract]** **Objective** To realize the molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in a children's hospital. **Methods** Fifty-six strains of PA isolated from hospitalized children were performed antimicrobial susceptibility test and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) genotyping. **Results** All strains were resistant to ampicillin, resistant rate was 100.00%, and the resistant rate to amikacin and ciprofloxacin were both 0.00%, the resistant rates to the other antimicrobial agents were between 1.79% - 96.43%; isolates were classified into 18 types by PFGE typing, 26 of which were type A (all were isolated from children in respiratory department), 12 were type B (11 strains from endocrinology department), 3 were type C, and 1 was type D-R each, the isolated bacteria varied with different department, respiratory tract department had the most isolated strains (27 strains, 48.21%), the next was endocrinology department (13 strains, 23.21%). **Conclusion** Two different major epidemic isolates of PA were isolated from respiratory and endocrinology department in this hospital. PFGE typing is a reliable method to characterize the prevalence isolates.

**[Key words]** *Pseudomonas aeruginosa*; pulsed-field gel electrophoresis; molecular epidemiology; drug resistance, microbial; children

[Chin Infect Control, 2011, 10(3): 161-165]

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 属非发酵革兰阴性杆菌, 是引起菌血症、泌尿系感染及多种慢性呼吸道疾病的重要病原菌, 是国内外医

院主要感染病原菌之一<sup>[1-2]</sup>。因其易定植、易变异、天然多药耐药和耐药机制的复杂性等特征, 成为临床抗菌治疗中亟需解决的难题。另一方面, 儿童是

[收稿日期] 2010-11-05

[作者简介] 高巧营(1982-), 女(汉族), 河北省沧州市人, 研究生, 主要从事分子流行病学研究。

[通讯作者] 吴尚为 E-mail: shangwei10021@yahoo.com.cn

PA 的易感人群,研究儿童专科医院 PA 感染的流行趋势,可为 PA 感染的治疗提供科学的依据。脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分型技术是感染病原菌分子流行病学的重要研究方法,本研究应用此方法对天津市儿童医院临床标本分离的 PA 进行同源性分析,以了解其流行趋势。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 待测菌株为 2009 年 3 月—2010 年 7 月天津市儿童医院临床分离的 56 株 PA;质控菌株为 PA ATCC 27853,由天津市南开医院细菌室提供。

1.2 主要试剂与仪器 药敏纸片(天津市金章公司)、溶菌酶(Sigma 公司,美国)、蛋白酶 K (Invitrogen 公司,美国)、Spe I 酶、λLadder (New England Biolabs)、PFGE 电泳专用琼脂糖(BioRad 公司,美国);漩涡混合器(上海精科实业有限公司)、台式离心机(Sigma 公司,美国)、蛋白核酸测定仪(Eppendorf 公司,美国)、Bio-Rad CHEF MAPPERTM 型电泳仪、Gel Doe 凝胶成像系统(BioRad 公司,美国)。

1.3 药敏试验 采用 VITEK-32 全自动微生物分析仪 GNS 药敏板,共检测 15 种抗菌药物:阿米卡星、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢唑林、头孢吡肟、头孢他啶、头孢曲松、环丙沙星、庆大霉素、亚胺培南、呋喃妥因、哌拉西林/他唑巴坦、妥布霉素、复方磺胺甲噁唑、左氧氟沙星。

### 1.4 PFGE 分型

1.4.1 样本制备 挑取 5~6 个过夜培养的 PA 菌落于 20 mL 的 LB 培养液中,37℃水浴摇床过夜培养。取 500 μL 菌液以 13 000 r/min 离心 3 min 集菌。500 μL PIV 悬菌洗涤,13 000 r/min 离心 3 min,重复 2 次。取 150 μL 菌液 42℃10 min,1.5% 低熔点胶 42℃水浴,将两者等体积混匀入模具孔中制成胶块,-20℃5 min,室温 10 min,随后将胶块切成 3~4 mm 的小胶块。

1.4.2 溶菌 将小胶块放入 1 mL Eclysis 37℃水浴 3 h,吸出 Eclysis,加 1 mL ESP,50℃水浴消化 17 h。10 mL TE 洗涤胶块 30 min,重复 5 次。

1.4.3 酶切 将胶块浸入 50 μL 酶切体系中(约含 Spe I 酶 20 U),37℃酶切过夜。

1.4.4 电泳 PFGE 专用琼脂糖制胶,将酶切后胶块与 Marker 同时置于胶孔中,在 CHEF Mapper XA system 脉冲场电泳仪中电泳。电泳缓冲液为 0.5×TBE,电泳温度 14℃,电压 6 V/cm,角度 60°/-60°,电泳时间 20 h;脉冲参数:5~15 s,10 h;15~45 s,10 h,线性条件<sup>[3]</sup>。

1.5 PFGE 结果判读 EB 染色后用 Gel Doe 凝胶成像系统扫描成像。按 Tenover 分型标准进行分析。Tenover 分型标准<sup>[4]</sup>:酶切图谱相同则为同一型别;3 条及 3 条以下条带出现差异者为同一型别的不同亚型;3 条以上条带出现差异者为不同型别。

## 2 结果

2.1 临床资料 56 例患儿中,男性 35 例(62.50%),女性 21 例(37.50%);≤1 岁 37 例(66.07%),~3 岁 5 例(8.93%),>3 岁 14 例(25.00%)。56 株 PA 分离自不同标本,其中以痰标本最多,占 91.07%。不同科室分离的菌株数量不同,其中呼吸科分离最多,达 27 株(48.21%),其次为内分泌科 13 株(23.21%),血液科 3 株(5.36%),心内科 3 株(5.36%)。

2.2 药敏结果 见图 1。PA 对氨苄西林耐药率为 100.00%,对阿米卡星、环丙沙星耐药率为 0.00%,对其他抗菌药物表现为不同的耐药率(1.79%~96.43%)。

2.3 PFGE 分型 56 株 PA 经 PFGE 分为 18 个型别,主要为 A、B 两型,见图 2。其中 A 型 26 株, B 型 12 株, C 型 3 株, D~R 型各 1 株。根据 A、B 型菌株的分离时间和科室绘制了主要菌株的流行趋势图(图 3),发现两型别菌株的分离时间和科室有明显不同;除此之外,图 4 表现了 A、B 型菌株对不同抗菌药物的不同耐药情况。

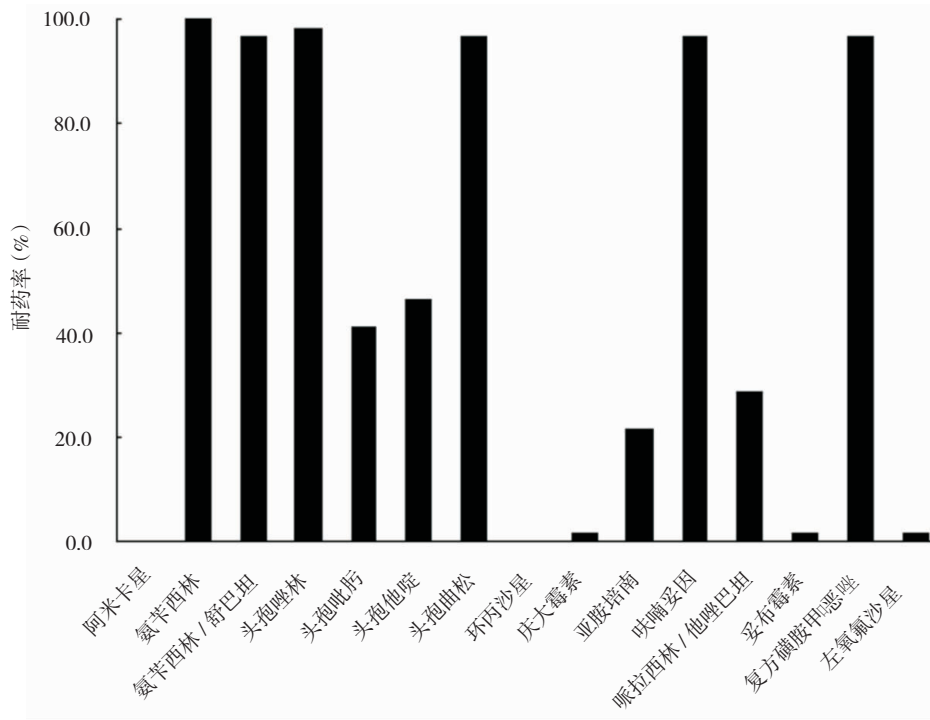
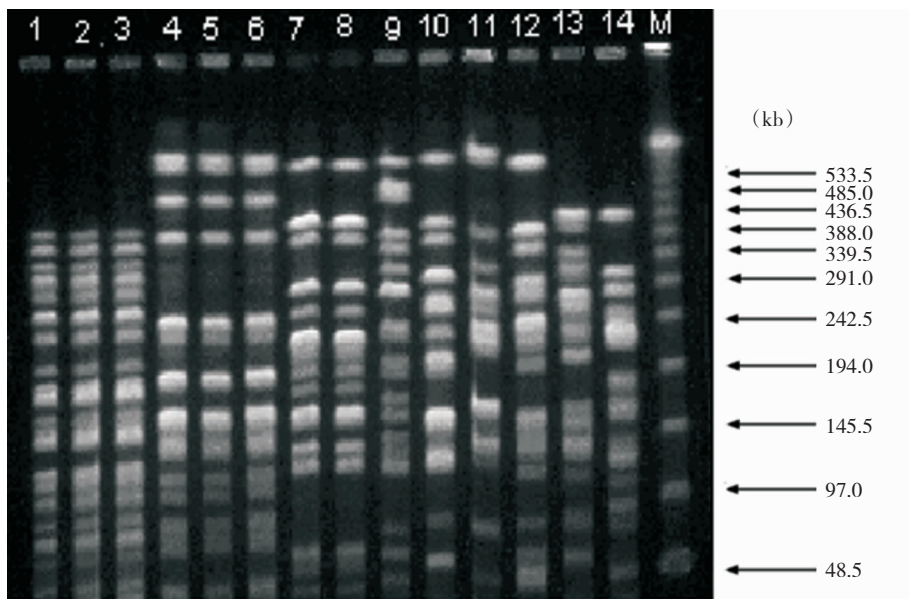


图 1 PA 菌株的耐药性

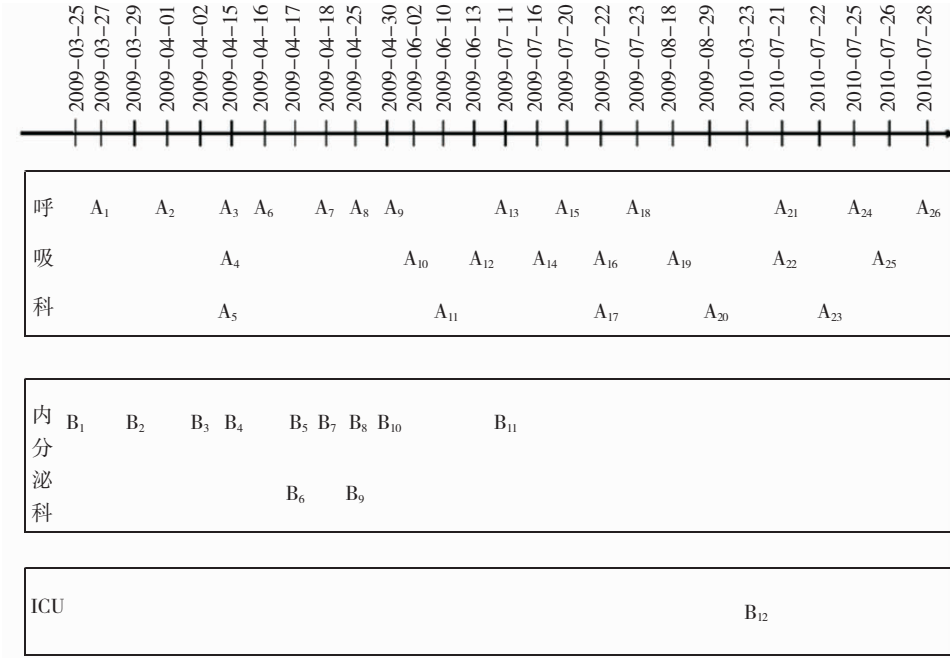
Figure 1 Drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*



1-3 为 A 型; 4-6 为 B 型; 7-8 为 C 型; 9-14 分别为 D-I 型; M 为 marker

图 2 部分菌株 PFGE 分型

Figure 2 Genotypes of PFGE genotyping of partial strains



横向为主要流行株按分离时间的排列,纵向是菌株在临床科室的分布;大写英文字母代表 PFGE 分型,数字表示菌株分离的时间顺序

图 3 PFGE 优势型的时间和空间分布

Figure 3 Time and space distribution of PFGE dominant types

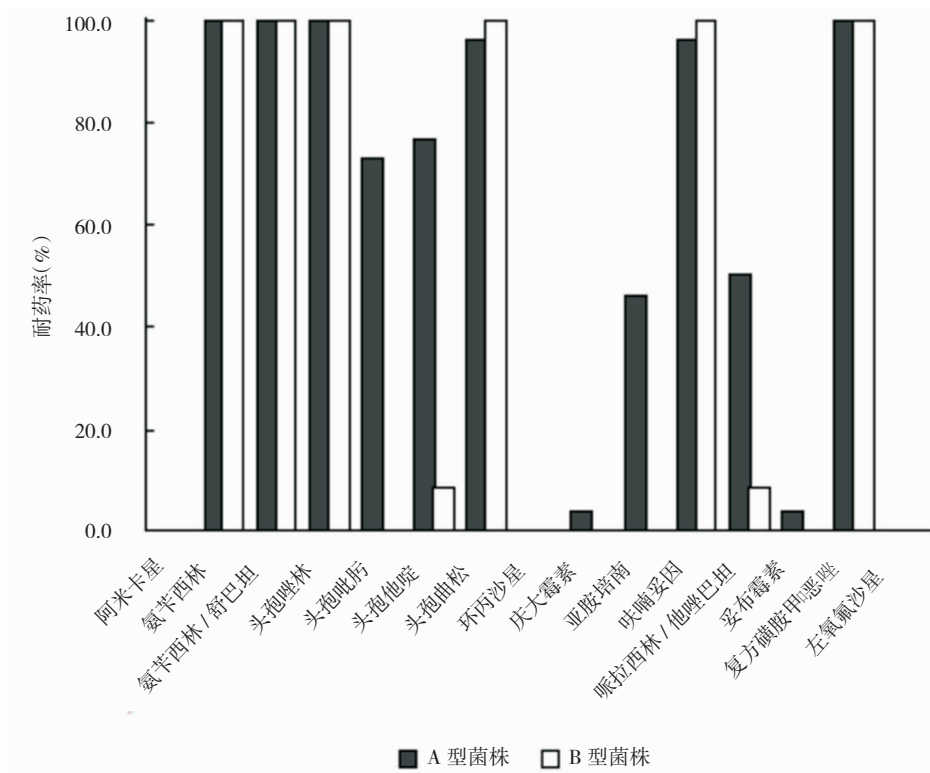


图 4 PFGE 分型与菌株耐药率的关系

Figure 4 Relationship between PFGE types and drug resistant rates of strains

### 3 讨论

PA 作为多种难治性疾病的重要病原菌及医院感染的主要病原菌之一,广泛分布于自然界、人体皮肤、肠道和呼吸道等处。婴幼儿免疫功能不成熟,机体抵抗力低,更易感染 PA。本研究中所用菌株源于住院患儿的不同部位标本,但痰标本的 PA 检出率最高,这显然与呼吸道为 PA 的定植部位有关。通过对患者的科室来源分析发现,菌株主要来源于呼吸科和内分泌科,这 2 个科室主要收治患有肺炎或支气管炎等呼吸道感染疾病的患儿,这与痰液标本分离菌株较多相符。同时,本研究中男性患儿多于女性患儿,且以 1 岁以下患儿为主,这与文献报道<sup>[5]</sup>相似。

56 株 PA 被分为 A~R18 个 PFGE 型别,其中 A 和 B 型为主要型别。A 型 26 株,均分离于呼吸科;B 型 12 株,其中 11 株分离于内分泌科。这表明该儿童医院目前主要存在 2 种主要 PA 克隆株,分别流行于 2 个不同科室。随着时间的推移,两主要型别菌株表现出不同的流行趋势。A 型似“波浪式”流行,以 2009 年 4 月最多(8 株),2009 年 7 月和 2010 年 7 月各有一小高峰(6 株);而 B 型主要分离于 2009 年 4 月(8 株)。

图 1 中体现了菌株对不同抗菌药物的耐药性:均对氨苄西林耐药;对头孢唑林、氨苄西林/舒巴坦、复方磺胺甲噁唑、呋喃妥因、头孢曲松耐药率在 90%以上;对环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素敏感性较高。与其他研究<sup>[6]</sup>相比,PA 的药敏结果不同,可能与不同医院用药情况不同,分离的 PA 耐药情况不同<sup>[7]</sup>有关;另外,一些抗菌药物(如喹诺酮类和氨基糖苷类)对儿童有特殊的副作用,临床应用较少,故表现为 PA 对此类药物敏感。值得我们注意的是,A 和 B 型菌株耐药情况的不同。A 型和 B 型菌株对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢唑林、复方磺胺甲噁唑共同耐药;而对头孢吡肟、头孢他啶、亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦的耐药率有明显的差异性。亚胺培南为控制 PA 感染的最有效药物之一,而本研究中 A 型菌对其耐药率达 46.15%,高于文献报道<sup>[1]</sup>。A、B 两型菌株的耐药性差异可能与 A 型菌株长期存在而暴露于以上

抗菌药物治疗有关。分析导致此种耐药率的差异性,对指导临床用药或有参考意义;也提示进行抗感染治疗时应根据各菌株的药敏试验结果合理选用抗菌药物。

PFGE 是通过分析菌株的染色体 DNA 而达到分型的目的,能较准确、可靠地反映菌株的亲缘关系,是追踪病原菌传染源和传播途径的有效方法,曾被誉“为细菌分子流行病学分型技术的‘金标准’”<sup>[8]</sup>。本研究应用 PFGE 对儿童专科医院分离的 PA 进行基因分型并取得了较理想结果,表明 PFGE 具有特异性高、重复性好、结果容易判断等优点,是目前细菌基因分型较为可靠的技术<sup>[9]</sup>。

### [参考文献]

- [1] 董方,徐樾巍,宋文琪,等. 2003—2008 年儿科临床分离菌的分布变迁及耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(6): 440-445.
- [2] Crivaro V, Di Popolo A, Caprio A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures[J]. BMC Infect Dis, 2009,9:70.
- [3] 金春光,林辉,徐景野,等. 脉冲场凝胶电泳对铜绿假单胞菌的分子检测与相关性分析[J]. 中国微生态学杂志,2007,19(2): 148-149.
- [4] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R C, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing[J]. J Clin Microbiol, 1995,33(9): 2 233-2 239.
- [5] 周明锦,石红娜,陈宁,等. 铜绿假单胞菌感染分布及抗生素耐药分析[J]. 中国小儿急救医学,2007,14(5):431-432.
- [6] Fukushima Y, Fukushima F, Kamiya K, et al. Relation between the antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory specimens and antimicrobial use density (AUD) from 2005 through 2008[J]. Intern Med, 2010,49(14): 1 333-1 340.
- [7] Paterson D L. The epidemiological profile of infection with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species[J]. Clin Infect Dis, 2006,43(2): 43-48.
- [8] Maslow J N, Mulligan M E, Arbeit R D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms[J]. Clin Infect Dis, 1993,17(2): 146-153.
- [9] Johnson J K, Arduino S M, Stine O C, et al. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Clin Microbiol, 2007,45(11): 3 707-3 712.