

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.07.023

· 综述 ·

## 脉冲场凝胶电泳技术及其在细菌感染性疾病中的应用

# Pulsed-field gel electrophoresis and its application in bacterial infectious diseases

豆清娅(DOU Qing-ya), 吴安华(WU An-hua)

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[关键词] 脉冲场凝胶电泳; PFGE; 应用; 基因分型; 追踪传染源

[中图分类号] R446 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2017)07-0683-04

为研究细菌的流行特征、追踪传染源,国内外广泛采用的方法是对相关菌株进行分型,分析菌株间的同源性关系。细菌分型方法分为表型分型和基因分型两种,表型分型主要有根据菌落形态和生化特征等的生物分型、抗菌药物药敏谱分型、血清分型、噬菌体分型,基因分型包括质粒分型、核糖体分型、染色体 DNA 限制性内切核酸酶图谱分析(REA)、限制片段长度多态性分析(RFLP)、脉冲场凝胶电泳分型(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、随机引物 PCR(AP-PCR)、重复片段 PCR 分型、多位点序列分型(MLST)等,其中 PFGE 是分子分型技术的“金标准”,其结果重复性好,分辨率高,易于标准化,被国内外研究者广泛接受。本文就 PFGE 技术及其在细菌感染性疾病中的应用进行综述。

### 1 原理

1984 年,美国科学家 Schwartz 等<sup>[1]</sup>发明了 PFGE 技术,该技术是用合适的限制性核酸内切酶对整个细菌的全基因组 DNA 进行消化,产生数量有限(一般 5~20 个)长度不等的 DNA 片段,在普通琼脂糖凝胶中电泳分离。DNA 片段超过一定大小时, DNA 双螺旋的半径超过凝胶的孔径,在普通琼脂糖中的电泳速度达到极限,此时不能按照分子大

小分离 DNA 分子。但大片段 DNA 分子可在不断变化的脉冲电场中进行电泳,不断重新定向,在凝胶中分离开,通过比较 DNA 分子的电泳条带图谱,判断细菌型别。PFGE 技术是对细菌的全基因组 DNA 进行原位酶切,可以反映细菌的整个基因情况,包括基因组的微小变化,如酶切位点的突变、基因序列的丢失或插入造成的条带改变等,对细菌的遗传特征研究有重要意义。

### 2 结果判断

(1)PFGE 图谱条带大小和数量相同为同一型别;(2)2~3 个条带出现差异的为亲缘关系密切;(3)4~6 个条带差异者为可能相关;(4)7 个或以上条带不同为无亲缘关系<sup>[2]</sup>。图谱常用 BioNumerics 软件进行分析,结果用百分率表示,由于细菌之间有变异性,在图谱分析中相似值在 85% 以上的菌株认为流行病学相关。

### 3 主要影响因素

(1)缓冲液温度:温度升高,电泳速度加快,电泳时间缩短,条带的分辨率下降;温度较低时条带的分辨率提高,电泳时间延长,温度一般设置在 14 ℃。

[收稿日期] 2016-12-14

[基金项目] 湖南省科技计划项目(2012SK3200)

[作者简介] 豆清娅(1987-),女(汉族),河南省漯河市人,初级检验技师,主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 吴安华 E-mail: dr\_wuanhua@sina.com

(2)脉冲角度:降低脉冲角度,DNA 电泳速度加快,条带的分辨率高。因此,大片段 DNA 分子电泳时,减小脉冲角度可以提高电泳速度和条带的分辨率,但分子量小的 DNA 分子电泳时若采用较小的脉冲角度,条带会被压缩,脉冲角度一般选择  $120^\circ$ 。(3)脉冲时间:若 DNA 分子变换方向的时间小于脉冲周期,DNA 分子可根据分子量大小分离。DNA 分子越大,重排需要的时间越长,脉冲时间越长;DNA 越小,重排需要的时间越短,需要的脉冲时间越短。(4)电泳时间:由 DNA 片段的迁移率决定,同时受脉冲角度、脉冲时间、电压梯度等影响,需在保证条带分辨率的前提下,优化电泳时间。

## 4 应用

4.1 研究菌株间的遗传差异 Xie 等<sup>[3]</sup>收集 21 株来自腹泻患者的沙门菌株,发现 3 株来自上海和 4 株来自南京的  $H_2S$  实验阴性沙门菌 PFGE 分型图谱有 96% 的相似度,说明  $H_2S$  实验阴性的沙门菌可能存在跨地区的传播。Ciofi 等<sup>[4]</sup>对来自 25 例患者的多重耐药铜绿假单胞菌进行 PFGE 分型,共分为 5 型即 A—E 型,其中 21 株为 A 型,A 型可分为 6 个亚型(A1—A6 型),A1 型为主要型别,各亚型之间的相似度  $\geq 95\%$ ,9 株 A1 型菌株分离自 2011 年 3 月—2012 年 1 月,6 株 A4 型菌株分离自 2012 年 3—9 月,B—E 型均为散发的菌株。潘伟光等<sup>[5]</sup>收集 3 株金黄色葡萄球菌,1 株分离自脐炎新生儿的脐分泌物,另 2 株分离自该新生儿健康母亲左右两侧乳房分泌的乳汁,进行 PFGE 基因分型,发现 3 株菌的图谱相似度为 100%,推测金黄色葡萄球菌在母婴间传播的可能性大。近年来,耐碳青霉烯类药物的肺炎克雷伯菌不断增多,2013 年 Ma 等<sup>[6]</sup>在台湾首次分离到 4 株携带 OXA-48 基因的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌,PFGE 分型分为 3 型,其中 2 株菌属于同一型,有流行病学关系,与其余 2 株菌无相关性。Zhao 等<sup>[7]</sup>收集 24 株多重耐药肺炎克雷伯菌,发现所有菌株  $\beta$ -内酰胺酶基因 KPC-2 均为阳性,同时携带 2~3 种超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因,PFGE 分为 13 型,其中分离自血液科患者(患急性白血病和高血压)的 39 号菌与来自重症监护病房(ICU)患者的 35 号菌均属于 G 型,此两例患者曾同期在 ICU 进行治疗,可能 ICU 是病原菌传播的重要场所,病菌通过患者传播到其他病房,在患者抵抗力低下时造成感染,甚至导致死亡。因此,PFGE 技

术对常见细菌进行分型,结合菌株临床资料分析菌株间的遗传关系,有利于进一步分析菌株间的传播和扩散情况。

4.2 对疑似暴发或已确认疫情进行传染源追踪 可利用 PFGE 技术对疑似暴发或已经确定的暴发疫情进行分析,寻找传染源,控制感染,防止疫情的进一步扩散。新生儿重症监护病房暴发了无乳链球菌引起的感染,Al-Maani 等<sup>[8]</sup>收集相关临床菌株并对病房环境进行采样,同一病房分离的 3 株临床菌株和其中一例患者的监控仪按钮中分离的菌株相同,通过 PFGE 分型发现 4 株菌属于同一型别,可能因为监控仪按钮被污染后保洁人员未进行合适的清洁,医务人员在治疗过程中使用监护器,未执行正确手卫生便进行临床护理;采取相应措施后未出现新发病例。Seara 等<sup>[9]</sup>在西班牙发现 7 株 NDM-7 阳性的肺炎克雷伯菌,除粘菌素和磷霉素外对其余抗菌药物几乎全部耐药,PFGE 分型为同一型且属于 ST437 型,7 株菌来自 3 所医院,其中 3 株来自一所医院同一个病房,在此病房的水槽、淋浴装置中均检测到肺炎克雷伯菌,另外 2 所医院有 2 例患者曾在该院住院,可能高龄或患有慢性疾病患者的频繁转院,以及菌株在环境中长期存在,导致了 NDM-7 阳性肺炎克雷伯菌的暴发流行,通过环境干预感染得到控制。2013 年 6 月韩国一所学校暴发了肠黏附性大肠埃希菌(EAEC 型)相关的食物中毒,有 54 例患胃肠炎,对其中 22 例患者和 4 名无症状厨师的粪便标本分离的大肠埃希菌进行同源性分析,发现 PFGE 分型相同,可能是厨师污染了食物引起感染的暴发<sup>[10]</sup>。同年,某医院暴发一起由洋葱伯克霍尔德菌引起的感染,产科连续出现剖宫产产妇的手术切口感染,实验室检测均确认为洋葱伯克霍尔德菌,且在 B 超探头、三维彩超探头、普通型医用超声耦合剂中检出 PFGE 分型相同的洋葱伯克霍尔德菌,可能是洋葱伯克霍尔德菌污染了超声耦合剂,通过直接接触污染了 B 超探头及产妇,同时产妇术前消毒不彻底导致感染的发生<sup>[11]</sup>。某院同一天上午 3 例患者先后做白内障手术,术后眼睛均感染铜绿假单胞菌,贾磊等<sup>[12]</sup>对可能引起感染的环境物体表面、医疗器械、药物以及洗手用水等进行采样和细菌培养,利用 PFGE 技术对从患者和环境分离的菌株进行同源性分析,发现 3 例患者分离的铜绿假单胞菌和 3 处洗手用水分离的菌株分型相同,患者感染的细菌来源于洗手用水。2012 年美国发生一起由李斯特菌引起的感染暴发事件,发现是使用某

品牌的奶酪引起,对与该品牌奶酪生产相关 6 个厂家进行环境采样,有 3 家检测到同种菌,且细菌的 PFGE 分型相似度为 100%<sup>[13]</sup>。韩国一所学校一周内 5 名学生出现腹泻,3 名学生的直肠拭子中分离到志贺菌,同时从其室友(无临床症状)的直肠拭子也分离到志贺菌,且 PFGE 分型相同,研究发现,5 株志贺菌均携带超广谱 β-内酰胺酶基因 CTX-M-15,该基因位于质粒 IncI1 上,可通过接合实验传递给大肠埃希菌 J53,耐药质粒在细菌间转移可能是导致此次感染暴发的原因<sup>[14]</sup>。综上所述,在疑似暴发或感染暴发时,可以收集相关菌株,同时对环境或各个环节进行多次采样和培养,采用 PFGE 技术研究菌株的同源性,结合菌株的资料分析,可以鉴定是否为暴发,暴发时有利于发现传染源,对控制感染暴发的进一步扩大,降低损失有重要意义。

4.3 进行分子流行病学调查研究 Cui 等<sup>[15]</sup>利用 PFGE 对来自新疆、云南、上海的 40 株 1b 型福氏志贺菌进行分型,按 82% 的相似度分为 5 型,新疆的菌株分为 A、D、E 型,云南和上海的菌株分别为 B 和 C 型,不同地区的菌株分型不同,同一地区药敏结果相似的菌株可分为不同亚型。Wu 等<sup>[16]</sup>收集了深圳市人民医院 2002—2009 年 231 株携带碳青霉烯酶基因的鲍曼不动杆菌,利用 PFGE 可分为 14 型,其中 A、J、H 型为主要型别,分别占 43.3%、42.0% 和 8.2%,2008 年之前主要以 A 型为主(OXA-58 基因阳性),2007—2008 年以 H 型(ST 229,OXA-23 基因阳性)为主,2009 年以 J 型(ST 381,OXA-23 基因阳性)为主。Chen 等<sup>[17]</sup>调查中山大学社区居民和医务工作者鼻咽部金黄色葡萄球菌定植情况,从 589 份标本中分离出 138 株金黄色葡萄球菌,其中 4 株为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),用 PFGE 对其中 129 菌进行分型,共分为 23 型,其中 A、N、E、L、O 型为主要型别,4 株 MRSA 属于不同型别。2010 年越南南部暴发了霍乱弧菌感染,Nguyen 等<sup>[18]</sup>将与暴发有关的 34 株菌(来自 23 例患者,5 例接触者及 6 株环境分离菌株)和 1999—2004 年该地区暴发的 18 株霍乱弧菌菌株进行 PFGE 分型,发现两次暴发菌株分型不同,说明两次暴发不相关。因此,PFGE 技术可以对一段时间特定范围收集的菌株进行同源性分析,结合相关资料研究菌株的时间和地域分布。

4.4 为患者临床诊断提供实验室依据 王亚娟等<sup>[19]</sup>在不同时间内留取一例患儿血培养的 2 株人葡萄球菌,PFGE 分型一致,明确此患儿为新生儿败

血症,同时另一例患儿血培养的 2 株表皮葡萄球菌 PFGE 分型不同,可以协助临床排除败血症。

## 5 不足之处

在细菌感染性疾病中 PFGE 在分子分型方面有很多优点,可研究不同菌株的遗传关系和传播关系,对研究细菌的流行病学特征有重要作用,但其也有一些不足之处及需要改进的地方,如 PFGE 仪器及数据分析软件价格昂贵,一般实验室难以开展;整个过程耗时长,通常需要 2~3 d,分离大片段 DNA 时可能需要更长的时间;操作者需要较高的技术水平,电泳条件的很小改变就可能影响图谱中条带的位置,不同实验室之间难以标准化;菌株分离后应尽快进行 PFGE 实验,防止 DNA 重排影响结果,实验中需挑取多个菌落,单一菌落的代表性差<sup>[20]</sup>;分析条带的数目和大小,但相同大小的条带 DNA 序列不一定相同,可能两株菌 PFGE 图谱相同,但 DNA 序列不同;酶切位点变化时可能引起不止一个条带的变化,当一种限制性内切酶分辨率不佳时可同时采用 2 种或以上限制性内切酶进行分析<sup>[21-22]</sup>,与其他常用分型方法比较见表 1。

表 1 几种常用细菌分型方法的比较

分型方法	优点	缺点
表型分型	操作简单	不适用于所有菌属
质粒分型	简单、快速	分辨率低;质粒构型可以发生改变,影响重复性
PFGE 分型	重复性好、分型力强	仪器贵,操作繁琐,耗时长,相同大小的条带 DNA 片段序列不一定相同,酶切位点的变化可能引起不止一个条带的变化
重复片段 PCR 分型	简单、快速,适合于大批量标本的检测,分辨力与 PFGE 分型有高度相关性	分辨率不及 MLST 和 PFGE 分型
MLST	对管家基因检测,重复性好,操作简单、快速,结果可在不同实验室间对比	要预先知道管家基因,测序费用高

综上所述,PFGE 技术是分子分型技术的“金标准”,PFGE 图谱分析时需与流行病学资料结合进行分析,同时可与其他方法,如 MLST 结合对细菌进行分型,研究暴发菌株是如何扩散的,以及各细菌群随时间的变化。基于 BioNumerics 的数据分析和监

测数据库,2004 年我国成立了细菌性传染病分子分型实验室监测网络(PulseNet China),其采用标准化的细菌分子分型技术,通过各地的网络实验室建立网络平台及时交流数据进行病原菌的分型监测,在细菌感染性疾病暴发流行的识别、预警中发挥很大作用。随着系统的完善和各种病原菌 PFGE 标准化操作规程及数据库的建立,PFGE 技术将会应用更加广泛。

## [参 考 文 献]

- [1] Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis[J]. Cell, 1984, 37(1): 67 - 75.
- [2] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233 - 2239.
- [3] Xie J, Yi S, Zhu J, et al. Antimicrobial resistance and molecular investigation of H<sub>2</sub>S-negative *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis* isolates in China[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e139115.
- [4] Ciofi Degli Atti M, Bernaschi P, Carletti M, et al. An outbreak of extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care pediatric hospital in Italy[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 494.
- [5] 潘伟光,陈重,邓启文. 一对母婴同时携带的金黄色葡萄球菌同源性分析[J]. 中国感染控制杂志,2013,12(1):12 - 15.
- [6] Ma L, Wang JT, Wu TL, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e139152.
- [7] Zhao F, Zhang J, Fu Y, et al. Dissemination of extensively drug-resistant and KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infections[J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9(9): 1016 - 1021.
- [8] Al-Maani A, Streitenberger L, Clarke M, et al. Nosocomial transmission of group B *streptococci* proven by positive environmental culture[J]. Oman Med J, 2014, 29(5): 376 - 379.
- [9] Seara N, Oteo J, Carrillo R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain[J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 46(2): 169 - 173.
- [10] Shin J, Oh SS, Oh KH, et al. An outbreak of foodborne illness caused by *Enterobacteriaceae Escherichia coli* in a high school in South Korea[J]. Jpn J Infect Dis, 2015, 68(6):514 - 519.
- [11] 梁洪,吴灿权,郑悦康,等. 应用 PFGE 检测技术进行一起洋葱伯克霍尔德菌感染溯源[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(4): 519 - 520.
- [12] 贾磊,马燮峰,蔡莹,等. 一起铜绿假单胞菌引起的白内障术后感染调查[J]. 浙江预防医学,2014,26(12):1268 - 1270.
- [13] Acciari VA, Iannetti L, Gattuso A, et al. Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: investigations in Italy[J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(13): 2719 - 2727.
- [14] Kim JS, Kim J, Jeon SE, et al. Complete nucleotide sequence of the IncI1 plasmid pSH4469 encoding CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a clinical isolate of *Shigella sonnei* from an outbreak in the Republic of Korea[J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 44(6): 533 - 537.
- [15] Cui X, Yang C, Wang J, et al. Antimicrobial resistance of *Shigella flexneri* serotype 1b isolates in China [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129009.
- [16] Wu W, He Y, Lu J, et al. Transition of blaOXA-58-like to blaOXA-23-like in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Southern China: an 8-year study [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137174.
- [17] Chen B, Dai X, He B, et al. Differences in *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among community residents and healthcare workers at Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Southern China [J]. BMC Infect Dis, 2015, 15: 303.
- [18] Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, et al. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004 [J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(6): 1241 - 1247.
- [19] 王亚娟,沈叙庄,高薇,等. 新生儿血培养中凝固酶阴性葡萄球菌的脉冲电场凝胶电泳分型[J]. 中国新生儿科杂志,2008,23(4):208 - 211.
- [20] 张志凯,海荣,宋志忠,等. 鼠疫菌基因组与脉冲电场电泳图型 [J]. 国外医学(医学地理分册),2009,30(3):113 - 116, 119.
- [21] Davis MA, Hancock DD, Besser TE, et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 1843 - 1849.
- [22] 王庆忠,娄峥,宣瑛. 病原菌分子分型方法研究进展[J]. 检验医学,2009,24(5): 397 - 400.

(本文编辑:左双燕)