

病原菌源性分析技术在医院感染控制中的应用

黄声雷
复旦大学附属中山医院临床微生物室
hsl_zs@sina.com

全球医院追踪 超级细菌MRSA

ST239 MRSA, 它们具有对
抗菌素的抵抗力, 并占了全世界
与医疗有关的MRSA感染中的
大部分。从全世界采集到的
样本, 通过分析样本间的遗传
变异, 科研人员构建了一个
“系谱图”。该系谱图显示了
ST239 克隆是如何扩散到
世界的不同区域的, 以及他们
在不同国家通过进一步的演化
而产生出成簇的在遗传学上相
似的菌株。

Produced By
KAREN M.
SUGHRUE

- 及时发现和确认医院感染
- 追踪医院感染的源头和传播途径
- 前瞻性监测和预防新发生的传染菌株
- 追踪和根除地方性传染菌株

综合性感染控制计划的一部分

—— Memorial Hospital in Chicago

1997-2002年将住院病人和医院环境分离到的多重耐药菌进行源性分析, 分子流行病学调查。

- 1000病人日的感染率降低13% (infections per 1,000 patient days fell 13 percent)
- 发生院内感染的病人数降低了23%
- 感染发生率减低到43% (The rate of infection fell to 43 percent below the national average)
- 5年时间避免了大约有50位病人死亡
- 每年节省费用\$2000,000

Aparajita Singh, et al., CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, July 2006, p. 512-530

概念

- 克隆 (clone)

许多生物特征(表型或基因型)相同的生物体, 虽然分离来源、地区、时间可能不同, 但它们的特征提示为共同来源, 则这些生物体称为一个克隆。克隆也可以理解为复制、拷贝, 就是从原型中产生出同样的复制品, 它的外表及遗传基因与原型完全相同。

基于表型分析方法

- 生物分型
- 抗菌谱分型
- 血清分型
- 噬菌体分型
- 质谱分型

表型分析方法现状

- 历史上曾发挥了重要的作用
- 某些方法至今仍在使用
- 不能准确反应微生物同源性
- 不能提供可靠的、稳定的流行病学指标

同源性分析技术特点

- 标准化 (Standardized)
- 敏感性 (Sensitive)
- 特异性 (Specific)
- 客观评价 (objective, subject to critical appraisal)
- 重复性 (reproducibility)
- 分辨能力 (discriminatory power)
- 操作简单 (ease of performance)
- 结果解释 (Interpretation)
- 操作时间和费用 (in terms of time and money)

Aparajita Singh, et al., CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, July 2006, p. 512-530

基因型分析方法

GENOTYPIC METHODS

以基因片段为基础的方法

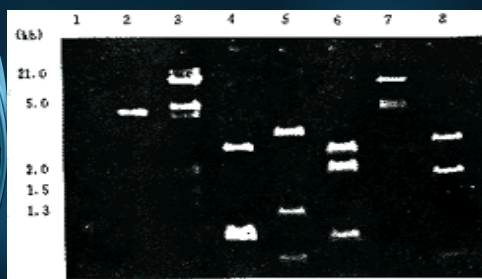
- 一 质粒DNA图谱分型
- 二 染色体DNA 限制性酶切分析
- 三 PFGE技术

一、质粒DNA图谱分型技术 (1)

- 萃取菌株质粒DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳分离DNA
- 质粒图谱分析的再现性和分辨力可通过限制性内切酶消化质粒而提高



质粒DNA图谱分型技术 (2)



质粒DNA图谱分型技术 (3)

优点
快速、简单、有效等特点,广泛应用于葡萄球菌和一些肠杆菌属的分型。

缺点
细菌自发失去或获得质粒中可移动的非染色体遗传物质。带有耐药性决定因子基因的质粒存在转子上,而其易丢失或获得。

染色体DNA 限制性酶切分析 (1)

限制性内切酶 → 凝胶电泳 → 图谱
 染色体DNA → 片断 → 图谱
 Bgl II 和 EcoRI

Chromosomal location of *Bacillus subtilis* DNA fragment

染色体DNA 限制性酶切分析 (2)

优点
适用于绝大多数的病原微生物 分离株

缺点
众多片段重叠,图谱一致性,结果分析较为困难,目前只是用于对白色念珠菌分型中。

PFGE操作示意图

常见细菌的PFGE参数

病原体	内切酶	酶切片段数目	酶切片段大小 (KB)
革兰阳性球菌			
金黄色葡萄球菌	SmaI	15-20	10-700
凝固酶阴性葡萄球菌	SmaI	15-20	5-400
肺炎链球菌	SmaI	10-19	20-300
革兰阴性杆菌			
鲍曼不动杆菌	ApaI	20-30	10-300
铜绿假单胞菌	SpeI	20-25	10-700
大肠埃希菌	XbaI	ca. 20	10-500
流感嗜血杆菌	SmaI	10-12	10-500
嗜肺军团菌	SfiI	10-15	50-700

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 1995, p. 2233-2239

PFGE的判断标准

类别	基因差别	片段差别	流行病学意义
无差异	0	0	感染暴发的一部分
相近关系	1	2-3	非常可能是感染暴发的一部分
可能相近关系	2	4-6	可能是感染暴发的一部分
不同	≥3	≥7	与感染暴发无关

Tenover et al, J. Clin. Microbiol. 33:2233, 1995

PFGE结果判读 (1)

----- Vancomycin-Resistant enterococci

- Lane 1, DNA ladder standard;
- lanes 2 to 3, 7 PFGE pattern 1a;
- lane 4, PFGE pattern 1b;
- lanes 5 to 6, PFGE pattern 1c;
- lane 8, PFGE pattern 1d.

PFGE的分析软件

- **Bionumerics**
美国CDC推荐理想的分析软件
价格昂贵
- **Quantity One**
凝胶电泳分析软件

One universal platform for databasing and analysis of 1D patterns, 2D gels, phenotype arrays, and DNA/protein sequences

Powerful databasing, integrated networking and a wide range of data mining, clustering, identification and statistical tools

PFGE 分型 (3)

• 结果判读:
电泳图谱分析软件

同源性树状图 (同缘系数为80%)

PFGE (4)

优点

分辨力强, 重复性好
特异性、敏感性高
被誉为细菌分子生物学分型技术“金标准”。

缺点

时间长, 仪器、试剂昂贵, 实验室间的结果难以比较。

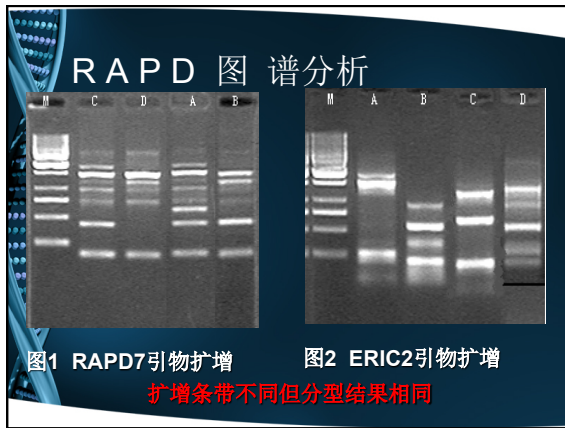
以基因序列为基础的方法

- 一 随机扩增DNA 多态性分析
- 二 重复片段PCR(rep-PCR)
- 三 多位点序列分型技术 - MLST

随机扩增DNA 多态性分析RAPD 流程

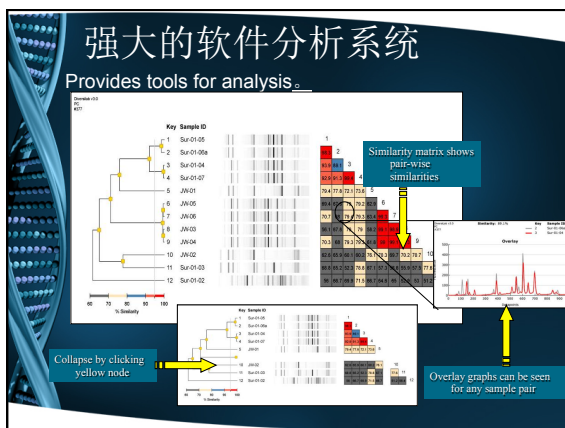
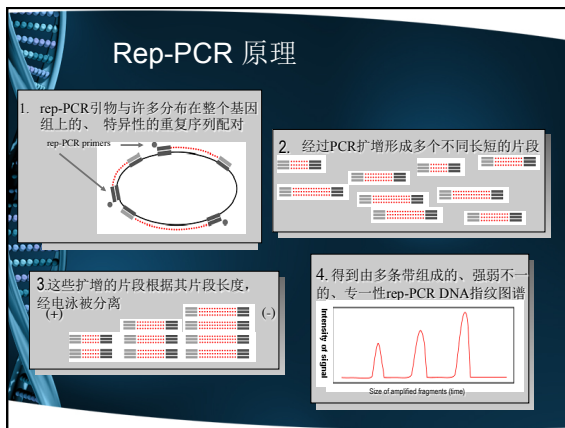
```

    graph TD
      A[引物: (约10个碱基)] --> B[扩增: 距离最近、方向相反的2个引物之间的模板]
      B --> C[电泳: 扩增产物DNA片段]
    
```

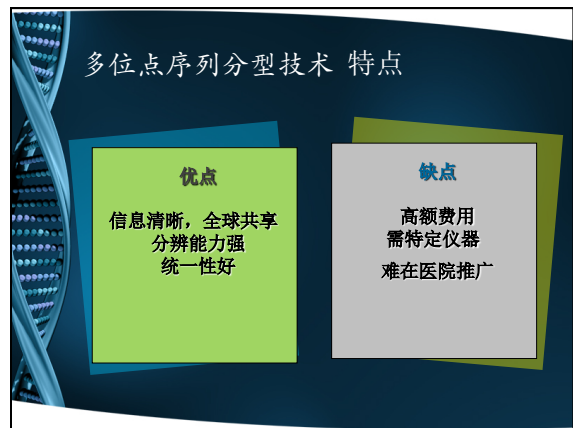
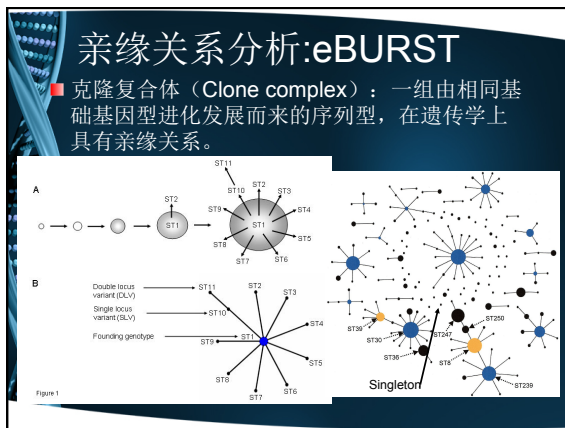
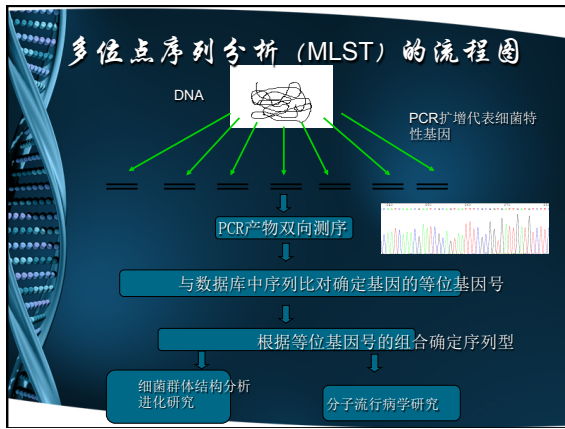
RAPD 分型技术特点

优点	缺点
范围广泛	缺乏重复
分辨结果较好	缺乏标准化
简便、快捷	



Rep-PCR 特点

优点	缺点
操作简单、快速	仪器、试剂昂贵
自动化程度高	分辨力不及PFGE
适合大批量菌株的鉴定	



各种方法对比

分型方法	分辨力	重复性	客观性	可比性	通量
以基因片段为基础的分型方法					
RFLP+探针	Good	Good	Good	Poor	Low
PFGE	Excellent	Good	Poor to good	Poor	Low
RAPD	Good	Medium	Good	Poor	Medium
Rep-PCR	Good	Poor to good	Poor	Poor	Medium
以基因芯片为基础的分型方法					
MLST	Good	Excellent	Excellent	Excellent	Low
单核苷酸多态性	Excellent	Excellent	Excellent	Excellent	High

美国医院流行病学协会

常见病原菌的分型鉴定方法

表 1 常见病原菌的推荐分型方法

细菌名称	参考方法	备选方法
金黄色葡萄球菌	PFGE	AP-PCR 质粒分析
凝固酶阴性葡萄球菌	PFGE	
肺炎链球菌	PFGE	血清分型
肠球菌属	PFGE	AP-PCR
大肠埃希菌 (除 O ₁₅₇ :H ₇)	PFGE	AP-PCR
柠檬酸杆菌属		
变形菌 普罗威登斯菌		
克雷伯菌 肠杆菌 沙雷菌	PFGE	质粒分析
沙门菌属 志贺菌属	血清分型	PFGE
铜绿假单胞菌	PFGE	
艰难梭菌	rep-PCR, AP-PCR	REA
结核分支杆菌	RFLP (IS6110 探针)	rep-PCR

ICU环境与临床分离耐碳青霉烯类 鲍曼不动杆菌的rep-PCR分型研究

目的与方法

目的
上海市ICU环境分离的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌（CRAB）的同源性

方法
PFGE
rep-PCR



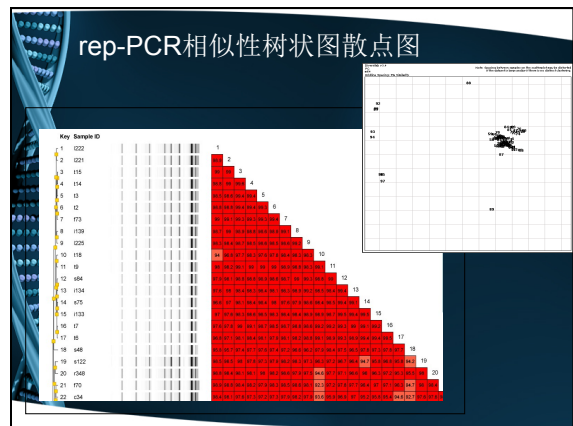
上海市ICU环境分离CRAB的分型结果

型别	亚型	菌株数	菌株百分比(%)
G1	P1	28	45.9
G1	P2	16	26.2
G1	P3	2	3.3
G2	P4	8	13.1
G3	P5	2	3.3
G4	P6	1	1.6
G5	P7	1	1.6
G6	P8	2	3.3
G7	P9	1	1.6

上海市13所医院ICU环境中CRAB的检出率和分型结果

Table 2. The isolate rate and genotype of CRAB isolated from ICU environment in 13 Shanghai hospitals

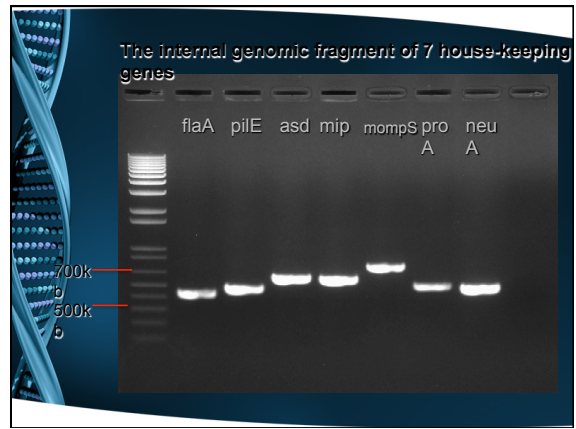
医院编号	采样数	检出数	检出率(%)	型别	菌株数	菌株百分比(%)
B	10	4	40.0	G1	1	1.6
				G2	3	4.9
				G1	1	1.6
C	10	2	20.0	G1	1	1.6
				G7	1	1.6
D	12	1	8.3	G6	1	1.6
E	13	1	7.7	G1	1	1.6
F	12	4	33.3	G1	4	6.6
G	15	1	6.7	G1	1	1.6
I	24	5	20.8	G1	4	6.6
				G2	1	1.6
L	15	10	66.7	G1	10	16.4
				G1	4	6.6
M	20	4	20.0	G1	4	6.6
				G1	1	1.6
N	14	2	14.3	G1	1	1.6
				G2	1	1.6
P	15	5	33.3	G1	4	6.6
				G4	1	1.6
				G1	7	11.5
R	24	11	45.8	G1	7	11.5
				G2	3	4.9
				G6	1	1.6
S	122	11	9.0	G1	8	13.1
				G3	2	3.3
				G5	1	1.6
				G5	1	1.6



Amplification primers

Gene	Primer name ¹	Position ²	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature
flaA	flaA-587F	588-587	GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG	55 °C
	flaA-960R	981-960	CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G	
pilE	pilE-35F	12-35	CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA	55 °C
	pilE-453R	471-453	GCT GGC GCA CTC GGT ATC T	
asd	asd-511F	487-511	CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G	55 °C
	asd-1039R	1062-1039	CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC	
mip	mip-74F	58-74	GCT GCA ACC GAT GCC AC	55 °C
	mip-598R	616-595	CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C	
mompS	mompS-450F	430-450	TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG	55 °C
	mompS-1126R	1140-1126	TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C	
proA	proA-1107F	1090-1107	GAT CGC CAA TGC AAT TAG	55 °C
	proA-1553R	1570-1553	ACC ATA ACA TCA AAA GCC	
neuA	neuA-198F	178-196	CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG	55 °C
	neuA-611R	634-611	CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC	

¹ the number in the primer name is the position in the reference sequence where the 3'-terminus of the oligonucleotide binds
² shows the binding positions of the primer with respect to the reference sequence on the website and table



The allele numbers were determined using the online Sequencer Quality Tool of the EWGLI website.

Legionella pneumophila Sequence-Based Typing

Enter either an allelic profile or a sequence type, and the alternate field will update.

Enter the complete allelic profile and press "Retrieve" to retrieve the appropriate Sequence Type.

1 4 3 1 1 1 1

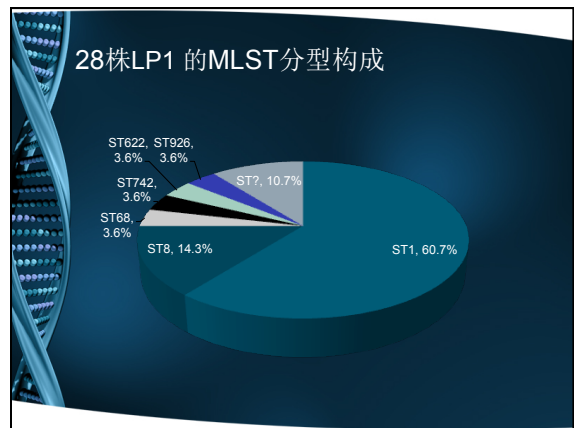
Retrieve

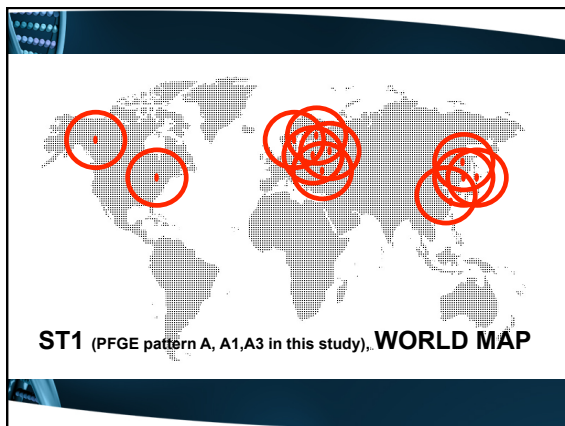
Enter the Sequence Type and press "Retrieve" to retrieve the appropriate Allelic Profile.

1

STs gained after nucleotides sequences uploaded and analyzed via SBT database

Strains	Tower No.	Sample source	PFGE Pattern	STs	Genes							
					flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	
4	14	water	A	1	1	4	3	1	1	1	1	1
15	14	water	A1	1	1	4	3	1	1	1	1	1
21	17	water	A2	8	1	4	3	1	1	1	1	9
25	15	water	A3	1	1	4	3	1	1	1	1	1
40	11	water	A4	1	1	4	3	1	1	1	1	1
61	19	water	A5	1	1	4	3	1	1	1	1	1
26	16	water	B	K1*	1	14	16	16	15	13	2	
46	16	water	B1	K1*	1	14	16	16	15	13	2	
1	14	water	C	22	2	3	6	10	2	1	6	
30	16	water	D	K2*	1	14	16	25	7	13	2	
31	17	water	E	68	3	13	1	28	14	9	3	
65	16	water	F	742	3	6	1	3	14	11	11	
7p	-	sputum	G	622	3	13	1	3	9	9	9	
24p	-	sputum	H	926	12	8	11	20	40	12	6	





选择何种分型方法应首先由研究的目标决定

- 短期单中心爆发或病人研究
 - 高分辨率的分型方法，如PFGE
 - 收集病例相关的菌株以及与先证者不相关的菌株
- 长期多中心研究
 - 首先进行PFGE分型
 - 选择部分菌株进行MLST/rep-PCR分型
 - 注意收集流行病学资料
- 种群研究
 - PFGE, MLST, rep-PCR, DNA芯片

