

· 专家述评 ·

应用分子生物学技术研究医院感染

张莉萍

(重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.03.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)03-0209-02



张莉萍

医院感染有着较高的发病率和病死率,严重威胁着患者的健康和预后。据 WHO 统计,每年全球有超过 140 万人在医院内获得感染。仅发达国家就有 5%~10% 的住院患者发生医院感染^[1]。各种微生物都可引起医院感染的发生,其中细菌最为常见,特别是多重耐药菌的感染日益增加,已成为感染控制领域的一大难题和关注焦点^[2]。

了解院内病原菌分布和亲缘关系,对于明确医院感染的流行病学和建立合理的感染控制措施是非常重要的。通常采用各种分型技术来确定病原菌的亲缘性,其中传统的方法大多基于细菌的表型特征,如细菌的血清型、抗菌药物敏感谱等。但 these 方法受多种因素的影响,使其重复性不好、分辨力不强。近年来,随着分子生物学技术在实验诊断中的广泛应用,使得细菌鉴定、耐药基因检测、分子流行病学调查更加准确、简洁和快速,在判定感染的暴发、确定感染病原菌、寻找感染源等方面起着重要的作用^[3]。

1 流行病学的调查

医院感染的暴发或流行往往是由某种特定细菌引起的,应采用流行病学的方法进行调查。通常需要感染控制人员、临床医师、实验室人员、药剂师等参与,其中实验室检测常被视为早期的预警系统^[4]。调查的基本内容包括收集关键数据和标本;进行实验对照;确定调查人群;回顾性调查与患者相关的时间、人物、地点等。为更好地了解暴发流行相关病原菌的特征,必须采用细菌分型方法进行评估。

2 分型方法的特点

细菌分型方法大致分为表型和基因型两种。不同的分型方法在分型能力、重复性、分辨能力、操作和成本等方面都有各自的特点^[5]。分型能力是指可准确鉴定出每种菌株的能力;表型方法的分型能力较基因型方法差。重复性是指重复检测同一菌株能否产生相同的结果;如果方法重复性较差,说明其在技术上存在多变性,也可能是被测菌株在传代过程中发生了生物学变异。分辨能力是指该方法能够区分流行病学上不相关

菌株的能力;表型方法的分辨能力普遍比基因型方法低。另外,评价一种分型方法的优劣除上述指标外,还应考虑该方法的标准化、可比性、可行性等因素。相对而言,基因型方法需要特殊的材料和设备,但适用于各种生物种群;表型方法虽然简便,却只限于几种菌属,如沙门菌属的血清分型方法就不适用于其他革兰阴性杆菌。

3 基因型方法

近年来,基因分型技术作为分子流行病学的调查方法已备受关注。通常在下列前提条件下才采用基因型方法:怀疑与感染暴发相关的菌株可能是单一菌株或克隆菌株;有亲缘关系的菌株有相同的基因型,且与无关的菌株有不同的基因型。由于菌株可发生基因突变、质粒获得等遗传事件,所以在进行分析时应充分考虑这些情况,选择合适的分型方法以便得出正确的结果。现将常用的基因型方法简单介绍如下。

3.1 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

染色体 DNA 是细菌最主要的遗传物质,也是作为分析研究的首选对象。如用稀有位点的限制性内切酶来消化它,就会产生一系列大小不同的片段。通过 PFGE 周期性改变电场方向,就可使这些大的 DNA 片段得以分离^[6]。目前,PFGE 以其重复性好、分辨力强而被誉为基因分型技术的“金标准”。

一般情况下,暴发株间的 PFGE 图谱极其相似,比较容易辨认。如果当染色体发生点突变、DNA 插入或缺失等遗传事件时,就会改变其条带图谱。Tenover 等^[7]提出了有关测定菌株相关性与 PFGE 图谱的判别标准:如存在 3 个片段的差异,可能是有单一的遗传事件发生,菌株间被认为高度相关;如有 4~6 个片段的差异,可能有 2 个遗传事件的发生,说明菌株间有一定的相关性;而大于 7 个限制性片段的差异,可能存在 3 个或更多的遗传事件发生,表明无相关性。该标准只适用于少量的局部基因的变化研究,有一定的局限性。

PFGE 传统的处理过程繁琐,且试验周期长,所用仪器及材料相对较贵,限制了其在临床上的应用。Briczinski 和 Roberts^[8]采用一种快速 PFGE 方法对双歧杆菌进行基因分型,这无疑对 PFGE 更多地应用起到了推动作用。随着方法的不断优化,该技术已适用于许多常见病原体的流行病学调查和耐药克隆菌传播机制的研究,同时还作为评判其他分型方法的一个参考标准。目前细菌的 PFGE 数据库需不断的补充和完善,以满足全球范围的流行病学调查及病原菌分析的需要。

3.2 PCR 分型方法(polymerase chain reaction, PCR)

张莉萍:博士,留美学者,硕士生导师。现任重庆医科大学附属第一医院检验科主任,重庆市检验学会委员,《临床检验杂志》、《国际检验医学杂志》、《重庆医学》等杂志编委。所带领实验室率先通过 ISO15189 质量管理体系认可。曾先后主持国家自然科学基金、教育部重点课题等多项研究;在 SCI 杂志、CSCD 核心期刊发表论文 30 余篇;参编国家级规划教材 6 部。

3.2.1 PCR 产物的限制片段长度多态性(RFLP)分析 该方法是基于细菌 DNA 上存在特异性的基因区域,采用相应的引物进行扩增之后,加入限制性内切酶酶切,并进行电泳分离。如不同菌株所形成的图谱完全相同,说明其来源于共同的克隆^[9]。优点在于有很高的分辨力和重复性,但寡核苷酸引物的种属特异性限制了该方法的使用范围。

3.2.2 扩增限制性片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,AFLP)分析 其原理是对基因组 DNA 进行限制性酶切片段的特异性扩增,然后用双链人工接头(adapter)与酶切片段相连接,并作为扩增反应的模板,通过接头序列的 PCR 引物进行选择扩增,再电泳分离。不同的菌株之间由于基因组的序列差异,酶切时产生的片段长度大小不尽相同,通过扩增便能将片段差异显示出来,从而表现出带型的多样^[10]。AFLP 图谱可以标准化,便于实验室间的相互比较。另外,与 PFGE 相比,AFLP 分型 DNA 用量少,无需特定的内切酶,费时短。但是该方法所用仪器比较贵,且较为费时,限制了该方法的普及。

3.2.3 重复序列 PCR(repetitive sequence-based PCR,rep-PCR) 是一种通过扩增细菌染色体中的重复 DNA 片段来获得菌株特异性图谱的方法。目前,有两种主要的重复片段最为常用:一种是基因外重复回文序列(REP);另一种为肠杆菌科基因间重复序列(ERIC)。扩增时可以使用其中一种的单一引物或一对引物,也可选用多组复合引物。REP 与 ERIC 对菌株的分辨能力相似,如同时使用 REP 和 ERIC 引物进行扩增,可增强其分辨力^[9]。

目前,法国生物梅里埃公司的 DiversiLab 系统是应用 rep-PCR 原理结合微流体电泳技术进行细菌分型。它利用 DNA 片段可与一种插入染色剂结合,并用激光激发分离的片段,产生一个随时间变化的荧光强度图,再将其翻译成样品的指纹图谱。该系统简便快速、重复性好,并已商品化。

3.2.4 随机扩增 DNA 多态性分析(random-amplified polymorphic DNA,RAPD) 又称随机引物 PCR(AP-PCR)。它是建立在 PCR 基础之上的一种可对整个未知序列基因组进行多态性分析的分子技术。其原理是人工随机合成的 DNA 引物,在低温退火条件下,与基因组 DNA 上的若干位点结合,当相邻的两个引物结合在 DNA 同一链上,若方向相反,且距离在几千个碱基对之内时,就可得到扩增片段^[9]。由于在同种细菌的不同菌株之间与随机引物结合位点的数量和位置不尽相同,因此扩增后产物所产生的条带图谱也有着各自的特征,进而加以区别。

该方法相对简便、快捷,无需了解待测基因组的碱基序列,不受 DNA 限制性内切酶的限制。但不同的实验条件对结果有影响,因此必须对实验条件进行严格控制,确定最佳反应条件。

3.3 核苷酸序列分析法(nucleotide sequence-based analysis)

随着细菌基因组测序的完成,加快了以测序为基础的分型方法的发展。这些方法主要针对的是单个或多个染色体位点进行碱基测定。这类方法具有很好的重复性和可比性,能提供高度统一的标准和解释,因而是一种很具潜力的方法。

3.3.1 单一位点序列分型(single-locus sequence typing,SLST) 本方法是根据来源于相同种属的不同菌株间存在特殊区域(如毒力基因、致病基因、耐药基因等)的序列差异进行的序列分析方法。目前,SLST 方法主要用于研究金黄色葡萄球菌蛋白 A 基因(spa)中多肽性的特殊区域^[11]。实验表明该分型方法简便,易于掌握,结果的解释也比其他基因型方法如 PFGE 好。虽然目前关于 SLST 分型的实验操作还未出现,但显示了它在以测序为基础的分型方法中的潜力和重要性。当限制性酶切或 PCR 方法不能有效地检测菌株间的遗传差异时,该方法可以作为其分型的辅助手段。

3.3.2 多位点测序分型(multi-locus sequence typing,MLST)

是在多位点酶电泳基础上衍生出来的一种分型方法,主要通过多个看家基因进行测序,比较不同样本的等位基因多样性。MLST 高度自动化,可进行不同实验室的数据比较,有利于全球范围内流行病学的比较与分析。但该技术要求预先知道待测微生物的基因组序列,以便推测出该物种的决定基因,并进行合理的引物设计,同时所需费用较高^[12]。

MLST 目前已成功地用于多种病原菌的流行病学调查研究。各实验室可通过自己所得的序列与已公布 MIST 数据库进行比较分析,从而使流行病学调查和临床诊断变得更加快捷和准确,并及时采取有效的控制措施。

4 结 语

目前,任何分型方法都不能单独作为菌株相关性判断的绝对指标。理论上讲,分析染色体 DNA 上核苷酸序列是最为精确的分型方法,但核苷酸序列分析方法还在起步阶段,需进一步的完善。在医院感染的调查中应结合其流行病学资料,根据实际情况的需要,最好选择两种或多种方法来鉴别菌株,这将会提高细菌分型的分辨能力及结果的可靠性。总之,基因分型方法已成为医院感染监测、控制及治疗的强大工具,有着很好的应用前景。

参考文献:

- [1] McGowan JE. Economic impact of antimicrobial resistance [J]. Emerg Infect Dis,2001,7(2):286-292.
- [2] Singh A,Goering RV,Simjee S,et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection[J]. Clin Microbiol Rev,2006,19(3):512-530.
- [3] Cockerill FR,Smith TF. Response of the clinical microbiology laboratory to emerging(new) and reemerging infectious diseases[J]. J Clin Microbiol,2004,42(6):2359-2365.
- [4] Peterson LR,Noskin GA. New technology for detecting multidrug-resistant pathogens in the clinical microbiology laboratory[J]. Emerg Infect Dis,2001,7(2):306-311.
- [5] Olive DM,Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms[J]. J Clin Microbiol,1999,37(6):1661-1669.
- [6] Chang N,Chui L. A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-(下转第 214 页)

($P < 0.05$)。

T 及 Gleason 评分是前列腺癌预后的危险指标。何健等^[10]研究发现 Gleason 评分、T 及骨转移均对 PCa 患者预后有影响,通过 Cox 比例风险回归分析显示 Gleason 评分是影响 PCa 患者预后的危险因素。本研究结果也显示 T 是 PCa 预后的危险因素,其相对危险度为 1.963 ($P < 0.05$)。随着 T 及 Gleason 评分增加,患者预后也逐渐变差。但是,本研究结果只提示骨转移、PSAD、T 是 PCa 患者预后的危险因素,而 Gleason 评分作为预后的危险因素差异无统计学意义 ($P > 0.05$),造成这种情况的原因可能是本研究的样本量不足,将需要进一步扩大样本量进行研究。但本研究死亡组与非死亡组各因素的差异分析至少证明 Gleason 评分两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),Gleason 评分与预后有一定关联。

综上所述,骨转移、T、PSAD 及 Gleason 评分与预后存在一定关联;骨转移、PSAD 及 T 是判断预后的危险因素。以 $PSAD = 3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$ 为分界点, $> 3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$ 组累积生存率比小于或等于 $3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$ 组明显降低 ($P < 0.05$),提示 PSAD 对判断 PCa 患者预后可能具有一定价值。

参考文献:

- [1] Jemal A, Tiwari R, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004 [J]. CA Cancer J Clin, 2004, 54(1): 8-29.
- [2] 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(2): 77-80.
- [3] Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, et al. Comparison of a multicentre clinical trial of 6630 men[J]. J Urol, 1994, 151(45): 1283-1290.
- [4] Gregorio EP, Grando JP, Saqueti EE, et al. Comparison between PSA density, free PSA percentage and PSA den-

sity in the transition zone in the detection of prostate cancer in patients with serum PSA between 4 and 10 ng/mL[J]. Int Braz J Urol, 2007, 33(2): 151-160.

- [5] Radwan MH, Yan Y, Luly JR, et al. Prostate-specific antigen density predicts adverse pathology and increased risk of biochemical failure[J]. Urology, 2007, 69(6): 1121-1127.
- [6] Custovic Z, Kraus O, Tomaskovic I, et al. Serum tPSA, cPSA, related density parameters and chromogranin A as predictors of positive margins after radical prostatectomy [J]. Anticancer Res, 2007, 27(4C): 2817-2821.
- [7] Stephan C, Stroebe G, Heinau M, et al. The ratio of prostate-specific antigen(PSA) to prostate volume(PSA density) as a parameter to improve the detection of prostate carcinoma in PSA values in the range of $< 4 \text{ ng/mL}$ [J]. Cancer, 2005, 104(5): 993-1003.
- [8] Milkovic B, Hadzi-Djokic J, Dzamic Z, et al. The significance of TPSA, free to total PSA ratio and PSA density in prostate carcinoma diagnostics [J]. Acta Chir Jugosl, 2007, 54(4): 105-107.
- [9] Zheng XY, Xie LP, Wang YY, et al. The use of prostate specific antigen(PSA) density in detecting prostate cancer in Chinese men with PSA levels of 4-10 ng/mL[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(11): 1207-1210.
- [10] 何健, 曾昭冲, 杨平, 等. 115 例前列腺癌骨转移临床特征与预后因素分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2009, 18(5): 394-397.

(收稿日期: 2010-07-25)

(上接第 210 页)

- field gel electrophoresis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1998, 31(1): 275-279.
- [7] 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.
- [8] Briczinski EP, Roberts RF. Technical note: a rapid pulsed-field gel electrophoresis method for analysis of bacteria [J]. J Dairy Sci, 2006, 89(7): 2424-2427.
- [9] 刘丁, 府伟灵. 细菌基因分型技术及其在医院感染中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(10): 995-998.
- [10] Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, et al. Use of

amplified fragment length polymorphism to identify and type Brucella isolates of medical and veterinary interest [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 761-769.

- [11] Robles JC, Koreen L, Park S, et al. Spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates; implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6): 2480-2488.
- [12] Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, et al. Multilocus sequence typing analysis of human and animal clostridium difficile isolates of various toxigenic types[J]. J Clin. Microbiol, 2004, 42(6): 2609-2617.

(收稿日期: 2010-08-25 修回日期: 2010-10-25)