

脉冲场凝胶电泳技术及其在细菌分型中的应用

穆红

作者单位:300192 天津市,天津市第一中心医院检验科

随着对细菌感染研究的日益深入,传统的细菌鉴定技术已不能很好地满足医院感染的诊断和流行病学调查的需要,表型分型方法如药敏试验等可用于检测疫情的爆发流行,但不能确认菌株之间的相关性^[1]。如今,从型、亚型、株甚至分子水平上去认识细菌变得愈来愈重要,因此分子生物学在细菌分型上得到了广泛应用。如脉冲场凝胶电泳技术(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、限制性内切酶技术、质粒 DNA 图谱分析、多位点序列分析(multilocus sequence typing, MLST)技术和基因测序的分型技术,这些分子分型技术将有助于在全球范围内进行病原微生物流行病学研究。其中 PFGE 技术分辨率高,是病原微生物分子分型的最佳选择。近年来,以 PFGE 为代表的分子生物学分型方法日渐受到青睐。本文对 PFGE 技术在细菌分型中的应用作一综述。

1 PFGE技术的原理和特点

脉冲电泳是在琼脂糖凝胶上加正交的交变脉冲电场,其方向、时间与电流大小交替改变,每当电场方向发生改变,DNA 分子在脉冲电场中随着电泳方向的改变而不断改变其分子构象,挤过凝胶间隙。大分子的 DNA 便滞留在爬行管内,直至沿新的电场轴重新定向后,才能继续向前移动,小的 DNA 分子比大的分子重新定向较快,在凝胶中移动快,从而使小分子 DNA 片段与大片段相分离,DNA 分子越大,这种重排所需时间就越长。当 DNA 分子变换方向的时间小于脉冲周期时,DNA 就可以按其分子量大小分离开了。在凝胶上按染色体片段长度的不同而呈现出电泳带型。

PFGE 分型技术是使用对染色体有很少酶切位点的限制性核酸内切酶消化细菌 DNA,产生大的 DNA 片段(10~800 kb),这些大片段不能通过常规电泳方法进行有效分离^[2]。在电场方向周期改变(脉冲)的凝胶电泳条件下,DNA 片段根据大小有效分离。PFGE 产生的染色体 DNA 图谱比用那些高频率切割的限制性内切酶产生的图谱更为简单清晰^[3]。对于 PFGE 而言,无论是在固体还是液体培养基中生长的细菌,均可与可溶性凝胶结合,制备成细菌栓,经蛋白酶水解,DNA 内切酶消化,脉冲场电泳将大片段细菌 DNA 有效分离。PFGE 以其重复性好,分辨力强的优势而被誉为细菌分子生物学分型技术的“金标准”^[4]。

2 PFGE结果的解释

用 PFGE 方法进行细菌分型鉴定可通过限制性内切酶消化菌株 DNA,经 PFGE 分离,比较染色体限制性内切图谱,确定菌株的亲缘关系。但给出的只是一个条带不同的 DNA 指纹图谱,因此还需要通过有效的手段对其加以判定,目前 PFGE 已用于常见的细菌病原体分析。

Tenover 等^[5]提出了有关菌株同源性的判别标准,按其电泳条带可分为:无差异,说明为相同菌株;有 1~3 个条带的差异说明菌株间有相近关系,且只有单基因的改变;4~6 个条带的差异说明菌株间可能有相近关系,表示有两个独立基因的差异;如菌株间有 6 个或更多个条带差异,说明有三个或更多基因的变化,被视为无相关性。该标准只适合于小量的局部性基因的变化研究,有一定的局限性。因为细菌的高变异性,判断是否是同一菌株时允许一定的变异存在,因此在解释 PFGE 结果时,将具有 85%以上相同条带的菌株认为是相同的菌株,50%以上的条带不相同时,菌株被认为流行病学不相关^[6]。

此外还有应用不同的计算机分析软件进行结果判断的,计算机凝胶扫描和软件分析有助于创建病原菌 PFGE 图谱数据库,通过与数据库中的病原菌 PFGE 图谱比较,来判断被测序菌株与相同菌属间的染色体 DNA 相似程度及遗传学关系。

3 PFGE 在细菌分型中的应用

3.1 脉冲场凝胶电泳对铜绿假单胞菌的分型研究

铜绿假单胞菌是目前最严重的医院内获得性感染的条件致病菌之一,它往往对多种抗菌药物耐药,临床上治疗比较困难,并且易于引起医院感染的爆发流行。金春光等^[7]应用 PFGE 对医院环境物体表面分离到的铜绿假单胞菌进行了分析,将 14 株铜绿假单胞菌分为 9 型,提示临床不同株不同型病房流行的潜在可能,为了追踪感染源,有必要对分离菌进行分型。

3.2 PFGE 对阪崎肠杆菌的分型研究

阪崎肠杆菌是导致婴儿(尤其是新生儿)感染的重要病原菌之一。近年来,全球范围内对阪崎肠杆菌的重视,使对该菌的研究日益深入。裴晓燕等^[8]对从市售婴儿配方奶粉等食品中分离到的 29 株阪崎肠杆菌进行了 PFGE 分型研究,研究结果发现产品在生产过程中可能存在不同的阪崎肠杆菌污染源。因此为了解传染

源、传播途径以及流行株中占主导地位的菌株类型,对分离株进行多层次的分型是十分必要的。该研究对阪崎肠杆菌的分型研究为食品和环境中的该菌污染的分子溯源提供了技术储备,并且初步建立了阪崎肠杆菌分子分型数据库。

3.3 PFGE 对志贺氏菌的分型研究 细菌性痢疾是由志贺氏菌引起的一种常见的急性肠道传染病,近年来,肠道传染病的发病率有所下降,但菌痢的发病率仍然较高^[9]。刘桂荣等^[10]对 11 个区县的 30 株宋内志贺菌菌株的 PFGE 图谱进行分析比较,共获得 17 个带型,虽然菌株数不多,但带型较多,大部分属于来源高度相似的克隆系,广泛分布于 9 个区县。该研究对该菌进行了系统的分子流行病学研究,为掌握痢疾的流行特点和发展动态提供了准确、实用及高技术水平的分子流行病学分析方法。

3.4 PFGE 对副溶血弧菌的分型研究 副溶血弧菌是一种革兰阴性嗜盐杆菌,是引起食源性疾病的重要病原菌之一,可导致患者出现腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧等典型胃肠炎反应^[11,12]。兰全学等^[13]对 56 株副溶血弧菌菌株 PFGE 图谱进行分析比较,其主要血清型为 O3:K6,与亚洲其他国家和国内一些省市流行型别一致^[14]。利用 PFGE 方法可以快速地来自患者和可疑食品的细菌进行比较,追溯致病食品源头,有助于副溶血弧菌的主动监测、爆发调查和传染源追踪,为预防和控制副溶血弧菌引起的食源性疾病发挥重要作用。

3.5 PFGE 对肠炎沙门菌的分型研究 肠炎沙门菌是最早发现能够引起大规模食物中毒的非伤寒沙门菌血清型之一,同时肠炎沙门菌是造成非伤寒沙门菌的感染性腹泻病例和食源性疾病的优势菌型,也是近年我国沙门菌食物中毒爆发和流行案例的主要病原菌。Kim 等^[15]在韩国两个不同的鸡肉加工厂分离到 22 株肠炎沙门菌,经 PFGE 分型发现,归为 5 种(X1~X5)不同的 PFGE 型,说明肠炎沙门菌分离株的 PFGE 型别具有多态性。Kim 等^[16]分析了 66 株 2002 年分离的肠炎沙门菌,结果表明,人肠炎沙门菌感染是由于食用受污染的鸡造成的。许学斌等^[17]的研究初步证明禽肉制品可能是肠炎沙门菌病例的潜在传染源。通过对肠炎沙门菌的分子分型,可最终形成有效的流行病学监测体系,制定更合理的控制策略,以有效地对食源性疾病进行预警和溯源。

4 PFGE 存在的问题

尽管 PFGE 方法已经成功地被应用于各个方面,但是由于 PFGE 方法只能在细菌菌株核酸内切酶图谱的基础上对带型进行区分,因此具有一定的局限性。如分子量相近的染色体 DNA 难以有效地分离开来,不能肯定相同大小的条带就是相同的 DNA 片段^[18];电泳条件的选择比较复杂,电泳带型易受人为等多种因素的影响,电泳条件稍微不同就可以改变每条电泳谱带间的距离,使用不同凝胶进行电泳得到的结果也比较复杂,这为不同实验室间的结果比较带来一定麻烦^[19];

检测时间长,不适用于实验室大量样本的分析,且使用的试剂非常昂贵,需要特殊设备,从而限制了其适用范围^[20];PFGE 有时不能区分同一地区一段时间内的散发病例,这可能是由于这些病例来源于同一菌株的原因^[21]。

5 展望

自 PFGE 方法问世以来,十几年间得到了长足的发展,大大加快了 DNA 分子水平的研究步伐。PFGE 技术在公共卫生健康、食品工业及农业和兽医学等研究领域得到广泛地应用。PFGE 以其分型性好,准确度高,可重复性强等特点在该领域中占有极其重要的地位,目前 PFGE 技术已经成为世界各实验室的主要分型方法。在实际应用中仅使用一种分型方法所得出的结论可能会存在较大的片面性,应用一种分辨力较低的方法进行初筛,然后用分辨力较高的方法进行进一步分型是目前大多数实验室所采用的方法。随着 PFGE 技术的不断发展和普及,必将为病原微生物的流行病学监测带来生机,必将推动病原微生物致病机制、分子流行病学和基础科学的发展。

6 参考文献

- 1 叶菊莲,占利,罗芸,等.应用脉冲常凝胶电泳技术对浙江省福氏痢疾志贺氏菌的分型的研究.疾病监测,2008,23:7-10.
- 2 Guera B, Helmuth R, Tsen HY, et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. J Appl Microbiol, 2005, 99: 1472-1483.
- 3 Tayfour MA, Eris FN, Alanazi AR. Comparison of antibiotic susceptibility tests, Plasmid profiles and restriction enzyme analysis of plasmid DNA of methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from intensive care units. Saudi Med J, 2005, 26: 57-63.
- 4 Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol, 1999, 37: 1661-1669.
- 5 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 Clin Microbiol, 1995, 33: 2233-2239.
- 6 Talon D, cailleaux V, Thouverez M, et al. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. J Hop Infection, 1996, 32: 135-145.
- 7 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分析.中国微生物学杂志,2007,19:148-149.
- 8 裴晓燕,郭云昌,刘秀梅.阪崎肠杆菌脉冲场凝胶电泳分型的研究.卫生研究,2008,37:179-186.
- 9 Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al. Global

(下接第 256 页)

是滥用抗生素是形成耐药菌株的首要原因,而滥用抗生素的最直接原因是不能区分细菌和病毒感染^[3]。从本文研究可以看出,虽然 WBC 计数是诊断和鉴别感染类型的常规指标,但其敏感度低于 CRP,在急性细菌性感染儿童中 CRP 的阳性率明显高于 WBC,通过 CRP 和 WBC 测定结果的互补,综合分析可进一步提高诊断的准确率,可为细菌和病毒感染的鉴别诊断提供有意义的指导数据,使一些病毒感染患儿免除无意义的抗生素应用,对预防耐药菌株的形成有重要意义。随着检验方法和仪器的更新,CRP 已可用末梢血快速定量检测,即在做血常规的同时快速检测 CRP,及时报告结果,为临床医生的诊断提供及时、可靠的判断依据。所以非常适用于小儿早期感染性疾病的鉴别诊断。本文研究中 A 组患儿中有 82 例 WBC 和 CRP 同时增高,但有 26 例 CRP 和 WBC 不相符的情况,结合病史、其他实验数据和最后的临床诊断分析探讨 CRP 和 WBC 检测结果不一致的原因。WBC 增高 CRP 正常的 8 例病例中,经肝功能检测发现有 4 例肝功能损害的患儿,因为 CRP 作为一种急性时相蛋白,在炎症的刺激下通过体内各种淋巴因子的辅助在肝脏中合成。因此凡是有肝功能损害的患者,在炎症的情况下 CRP 生成的量肯定要比肝功能正常的人明显偏低。另外 4 例营养状况不良的患儿,在发生炎症的情况下,CRP 的水平要比营养状况正常的人明显偏低。遇有以上情况,应首先了解和关注患儿肝功能和营养的

状况。有 18 例 WBC 正常 CRP 增高的患儿,这种情况可以视为正常,因为 CRP 试验本身要比 WBC 计数更为敏感,出现增高的时间要比 WBC 增高的时间要早。WBC 正常值范围偏大 (4.0~10.0)×10⁹/L,有些儿童基础的 WBC 水平可能只有 3.0×10⁹/L,当发生炎症时 WBC 增加到 9.0×10⁹/L。这种情况表面看来 WBC 还在正常范围,但具体分析这个病例的 WBC,实际上比平时已增加了三倍,患者的嗜中性粒细胞的百分比增高,评价这些儿童的 CRP 和 WBC 的相关性时,应视为 WBC 也在同步增高^[4]。

综上,儿科医生应重视 CRP 与 WBC 的联合检测,以便于对儿童早期感染性疾病进行鉴别诊断,减少不必要的抗生素应用。

4 参考文献

- 1 陆燕珍,吕波,张明真,等.细菌性肺炎患儿血清 CRP、ESR、WBC 的变化及临床意义.中国医药导报,2010,7:27-28.
- 2 邓敏茹,叶志华,郑婉君.CRP NAP WBC DC 的联合检测在儿童上呼吸道感染中的诊断价值.河北医学,2007,13:823-825.
- 3 王秀荣.C 反应蛋白与白细胞计数在儿科感染中的应用.实用医技杂志,2008,27:2788.
- 4 戴越刚.30 例 CRP 和 WBC 检测结果不一致的原因分析及探讨.放射免疫学杂志,2009,22:410-411.

(收稿日期:2010-09-02)

(本文编辑:张志成)

(上接第 244 页)

burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ, 1999, 77: 651-666.

- 10 刘桂荣,黄芳,金东,等.北京市宋内氏志贺菌脉冲场凝胶电泳图谱研究.中国热带医学,2008,8:1075-1076.
- 11 张蔚,潘劲草,孟东梅,等.杭州地区 2000-2002 年副溶血弧菌的分子分型研究.中华流行病学杂志,2006,27:343-346.
- 12 翁文川,焦红,王方金,等.食品中副溶血弧菌荧光定量 PCR 方法快速检测.中国公共卫生,2005,21:1359-1361.
- 13 兰全学,扈庆华,石晓路,等.副溶血弧菌脉冲场凝胶电泳技术分子分型分析.中国公共卫生,2007,23:1183-1184.
- 14 董雪,李继耀,王冰,等.沈阳地区 2005 年腹泻患者副溶血弧菌分离株的血清分群.中国卫生检验杂志,2006,16:707-708.
- 15 Kim A, Lee YJ, Kang MS, et al. Dissemination and tracking of Salmonella spp. in integrated broiler operation. J Vet Sci, 2007, 8: 155-161.
- 16 Kim SH, Kim S, Chun SG, et al. Phage types and pulsed-field gel electrophoresis patterns of Salmonella enterica serovar Enteritidis iso-

lated from humans and chickens. J Microbiol, 2008, 46: 209-213.

- 17 许学斌,袁政安,金汇明,等.上海市肠炎沙门菌流行特征和分子分型研究.上海预防医学杂志,2009,21:149-152.
- 18 付晓燕,胡克兴,范黎.脉冲场凝胶电泳技术及其在真菌学研究中的应用.微生物学通报,2006,33:144-148.
- 19 Lukacs G, Tako M, Nyilasi I. Pulsed-field gel electrophoresis: a versatile tool for analysis of fungal genomes. Acta Microbiol Immunol Hung, 2006, 53: 95-104.
- 20 Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect, 2000, 6: 635-643.
- 21 Brian MJ, Van R, Townsend I, et al. Evaluation of the molecular epidemiology of an outbreak of multiply resistant Shigella sonnei in a day care center by using pulsed-field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. J Clin Microbiology, 1993, 31: 128-133.

(收稿日期:2011-05-25)

(本文编辑:杨军)