

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.11.001

· 论 著 ·

鼻咽癌放射治疗患者分离的铜绿假单胞菌同源性分析

李传杰, 陶建萍, 欧宁江, 高健全, 梁锦辉

(梧州市红十字会医院, 广西 梧州 543002)

[摘要] 目的 研究分析某院鼻咽癌放射治疗(放疗)患者临床标本分离的铜绿假单胞菌(PA)基因型别同源关系及危险因素, 预防和控制感染传播。方法 采用 BD phoenix 100 全自动微生物鉴定系统鉴定临床标本分离菌, 应用随机引物扩增多态性 DNA(RAPD) 技术进行基因检测分析。结果 43 例鼻咽癌放疗患者临床标本分离的 49 株 PA 主要来源于咽拭子(46.94%)、痰(32.65%)和口腔分泌物(10.20%)标本。49 株菌样共扩增电泳出 46 个电泳图谱, 分 19 个基因型。高度同源的 H 型菌株和 J 型菌株分别在放疗二区和放疗四区的分布达 57.14%(4/7) 和 60.00%(3/5)。结论 该院不同病区之间存在高度同源 PA 的局部流行, 病区之间的患者交换是同源 PA 感染/定植的危险因素。应用 RAPD 等基因分型技术检测分析医院感染病原菌的同源性, 对防控感染传播具有重要意义。

[关键词] 鼻咽癌; 医院感染; 铜绿假单胞菌; 基因型; 同源性; 放射治疗

[中图分类号] R378.99⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)11-0641-05

Homology analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from nasopharyngeal carcinoma patients undergoing radiotherapy

LI Chuan-jie, TAO Jian-ping, OU Ning-jiang, GAO Jian-quan, LIANG Jin-hui (Wuzhou Red Cross Hospital, Wuzhou 543002, China)

[Abstract] **Objective** To study the risk factors of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infection and homology of PA isolated from nasopharyngeal carcinoma patients undergoing radiotherapy, and prevent and control the spread of infection. **Methods** Bacteria isolated from clinical specimens were identified by BD Phoenix automated microbiology system. Gene homology were analyzed with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. **Results** Forty-nine strains of PA were mainly isolated from 43 nasopharyngeal carcinoma patients, the major specimens were nasopharyngeal swab (46.94%), sputum(32.65%), and oral secretion (10.20%). All these strains were amplified 46 electrophoresis diagrams, and 19 genotypes were identified. The highly homologous genotypes of type H and J strains were mainly isolated from patients in the second section (57.14%, 4/7) and fourth section (60.00%, 3/5) of radiotherapy department respectively. **Conclusion** Localized epidemic of highly homologous PA exists in different sections of ward, transfer of patients between different sections is the risk factor for homology PA infection/colonization. Genotyping technique such as RAPD for analyzing the homology of pathogenic bacteria in healthcare-associated infection has important value in preventing and control Ling infection spread.

[Key words] nasopharyngeal carcinoma; healthcare-associated infection; *Pseudomonas aeruginosa*; genotype; homology; radiotherapy

[Chin Infect Control, 2014, 13(11): 641-645]

[收稿日期] 2014-06-08

[基金项目] 梧州市科技计划项目(201302001)

[作者简介] 李传杰(1973-), 男(瑶族), 广西富川县人, 副主任医师, 主要从事感染性疾病实验室诊断和医院感染管理研究。

[通信作者] 李传杰 E-mail: lcj007@139.com

铜绿假单胞菌(PA)是肿瘤患者医院感染的常见病原菌之一^[1-4]。我市及周边是世界鼻咽癌高发地区,为了解鼻咽癌放射治疗(放疗)患者 PA 感染/定植的基因型别同源关系及危险因素,我们采用随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)技术对本院 2013 年鼻咽癌住院放疗患者临床标本分离到的 PA 进行了同源性检测分析,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 49 株 PA 来源于 2013 年 1—12 月本院 4 个放疗病区的 43 例鼻咽癌住院放疗患者,其中男性 35 例,年龄 27~83 岁,平均 50.31 岁;女性 8 例,年龄 33~61 岁,平均 47.30 岁。43 例患者中因各病区放疗措施不同和病情需要而相互转科治疗者 8 例,其中在放疗二区和四区相互转科者 5 例。转科患者的分离菌按采样时所在病区统计。多次住院或长期住院的同一患者在不同时期或不同部位标本分离的菌株按不同株统计。

1.2 主要仪器与试剂 BD phoenix 100 全自动微生物鉴定系统;ABI 9700 PCR 仪,ABI 3900 DNA 合成仪;DNA 提取试剂 QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit(Qiagen 公司),Taq PCR(Qiagen 公司),引物(英潍捷基公司);DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂),凝胶成像系统(Kodark Electrophoresis Documentation and Analysis System 120+)。

1.3 细菌培养与鉴定 按照《医院感染诊断标准(试行)》和《全国临床检验操作规程》(第 3 版),对临床表现为不同程度发热、咳嗽、咽痛、咽红,皮肤灼伤破损,尿急、尿痛或腹泻、腹痛等疑似感染的患者采样后进行细菌培养,并采用 BD phoenix 100 系统对分离菌鉴定到种。

1.4 扩增和电泳 应用 RAPD 技术对临床分离菌进行扩增和电泳^[5-6]。引物序列:5'-ACGGC-CGACC-3'。DNA 提取:将 1.5 mL 菌液置于 Eppendorf 管多次孵育、振荡、离心后提取备用。扩增条件:93℃预变性 2 min;94℃变性 5 min,36℃退火 5 min,循环 4 次;72℃延伸 1 min;94℃变性 1 min,36℃退火 1 min,循环 30 次;72℃退火 2 min;最后 72℃延伸 10 min。产物检测:取扩增产物 5 μL 与 1 μL 6×Loading buffer 充分混匀,于 3%琼脂糖凝

胶、150V 电压电泳 55 min,采用紫外线凝胶成像分析仪观察、照相。

1.5 基因分型 DNA 基因型别判断以每一分离物的所有电泳带具有相同的电泳距离定为同一型,电泳带移动的距离不同或所有电泳带的电泳距离有两条以上不同者定为另一型。各个菌株的扩增电泳条带数目和电泳距离相同,表示这些菌株之间高度同源。

1.6 聚类分析 用 Cross Checker 软件对条带进行识别,自动识别错误的条带用手工识别调整,识别完成后导出 NTS 文件。将 NTS 文件导入 NT-SYSpC 2.0 软件模拟计算遗传距离后选择“SAHN”功能做聚类分析,分析结果再次导入生成亲缘关系树状图。

2 结果

2.1 PA 临床分布 49 株 PA 在放疗一至四区的分布分别为 14 株、17 株、7 株、11 株;在咽拭子、痰、口腔分泌物、皮肤黏膜和伤口分泌物、尿液、血液等临床标本中的构成比分别为 46.94%、32.65%、10.20%、4.08%、4.08%、2.04%,其中 12 株分离自 6 例患者的菌株来源于不同住院时间的相同部位。

2.2 分型结果 49 份 PA 菌样扩增电泳出 46 个图谱,分 19 个基因型别,见图 1~3。其中:H 型 7 株(15、16、20、25、44、45、46 号样本),C 型 6 株(5、7、9、12、17、41 号样本),J 型 5 株(21、22、23、30、33 号样本),L 型 4 株(32、34、35、38 号样本),S 型 4 株(6、26、27、49 号样本),E 型 3 株(10、11、24 号样本),I 型 3 株(18、19、29 号样本),N 型 2 株(37、40 号样本),P 型 2 株(42、43 号样本);其他型别各 1 株;电泳条带太弱,未分型 3 株(1、4、28 号样本)。

2.3 不同型别 PA 临床分布 46 株不同型别 PA 的临床分布见表 1。在放疗二区高分布(57.14%)的 H 型菌株和在放疗四区高分布(60.00%)的 J 型菌株不仅高度同源,而且在咽拭子标本中的分布也分别高达 57.14%(4/7)和 80.00%(4/5)。6 例患者不同时期相同部位分离菌(各 2 株)的基因型别对比中,同型 1 例,不同型 3 例,条带弱未区分 2 例。放疗二区的 2 例 H 型菌株感染患者和 1 例 C 型菌株感染患者转科自放疗四区,放疗四区的 1 例 J 型菌株感染患者转科自放疗二区。

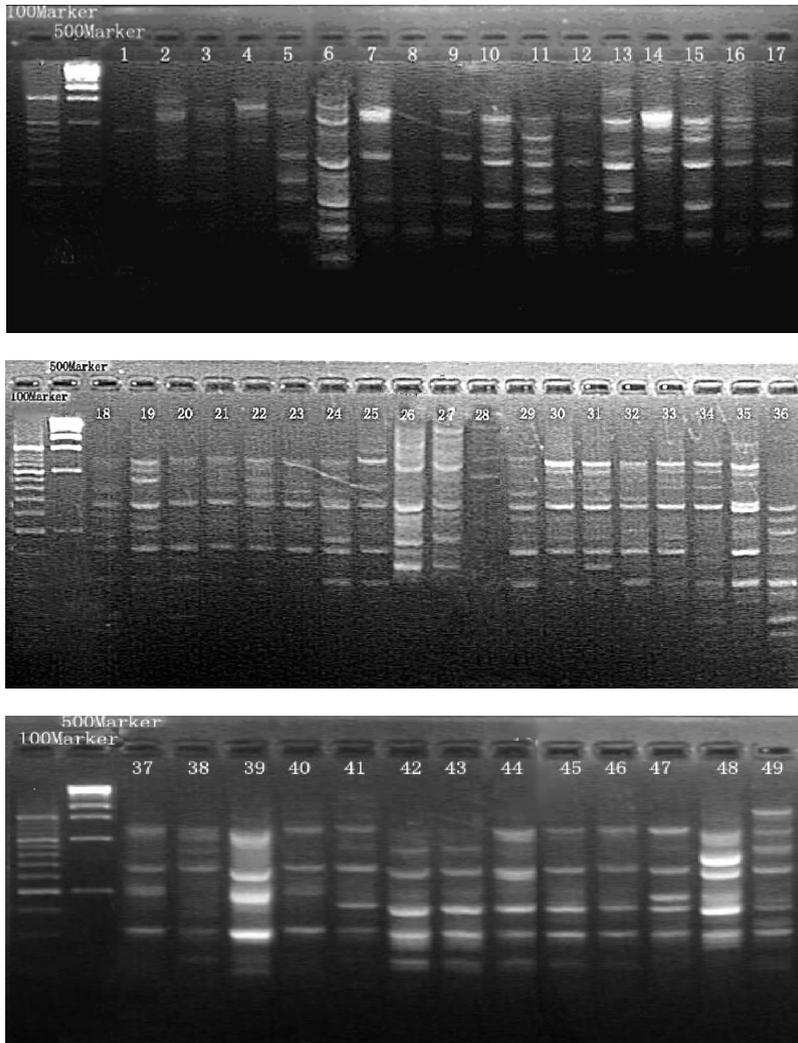


图 1 49 份 PA 样本的 RAPD 电泳图

Figure 1 RAPD electrophoresis diagram of PA strains from 49 specimens

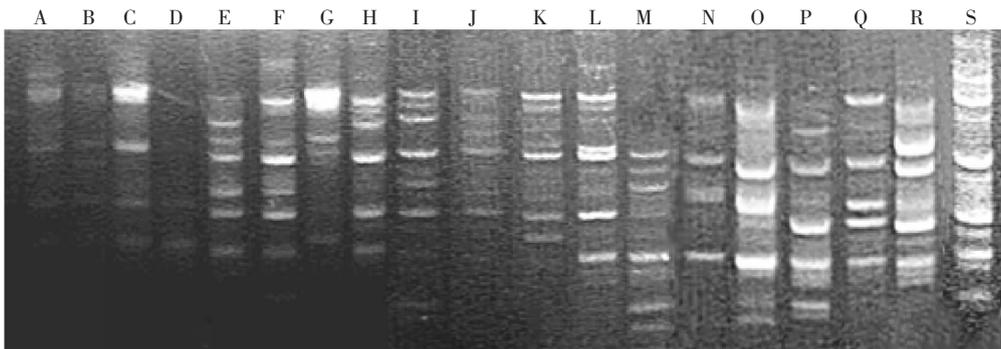


图 2 19 株不同型别 PA 典型电泳图

Figure 2 Typical electrophoresis diagram of 19 PA strains of different genotypes

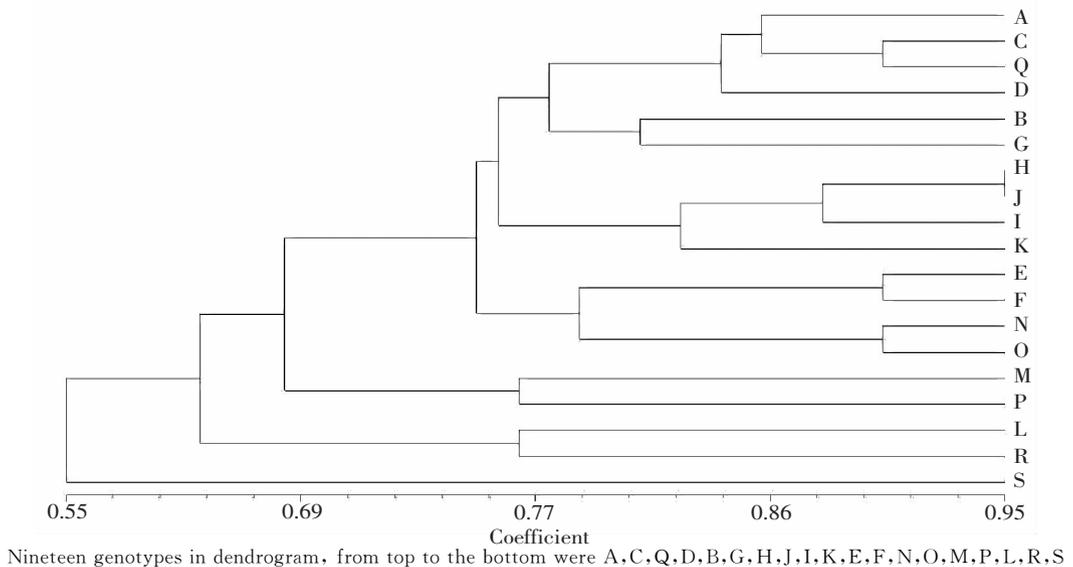


图 3 19 个不同型别 PA 的亲缘关系树状图

Figure 3 Genetic relation dendrogram of 19 PA of different genotypes

表 1 46 株不同型别 PA 临床分布(株)

Table 1 Clinical distribution of 46 PA strains of different genotypes(No. of iaolates)

Genotype	Distribution among sections of ward				Distribution of specimen sources				Total	Constituent ratio(%)
	Section one	Section two	Section three	Section four	Nasopharyngeal swab	Sputum	Oral secretion	Others		
H	2	4	1	-	4	1	2	-	7	15.22
C	2	2	1	1	2	3	1	-	6	13.05
J	-	1	1	3	4	-	1	-	5	10.87
L	-	1	1	2	2	2	-	-	4	8.70
S	2	2	-	-	3	1	-	-	4	8.70
E	1	-	1	1	1	1	-	1	3	6.53
I	1	1	-	1	1	1	1	-	3	6.53
N	-	2	-	-	1	1	-	-	2	4.35
P	-	2	-	-	2	-	-	-	2	4.35
A	1	-	-	-	1	-	-	-	1	2.17
B	1	-	-	-	1	-	-	-	1	2.17
D	-	-	-	1	-	1	-	-	1	2.17
F	1	-	-	-	-	1	-	-	1	2.17
G	1	-	-	-	-	1	-	-	1	2.17
K	1	-	-	-	1	-	-	-	1	2.17
M	-	-	1	-	-	1	-	-	1	2.17
O	-	-	-	1	-	-	-	1	1	2.17
Q	-	-	-	1	-	1	-	-	1	2.17
R	-	-	1	-	-	1	-	-	1	2.17
Total	13	15	7	11	23	16	5	2	46	100.00

3 讨论

鼻咽癌放疗患者由于放射线对口咽黏膜的损害和骨髓的抑制、机体免疫系统损害、体质变弱、血红蛋白减少、白细胞减少等原因,导致抗感染能力下

降,增加了内源性和外源性感染 PA 等条件致病菌的机会,医院感染发生率可高达 79.33%^[4]。本组 PA 在咽拭子、痰、口腔分泌物中的构成比分别为 46.94%、32.65%、10.20%,本院鼻咽癌放疗患者医院感染的类型和部位与张锦林^[3]、罗晋卿^[4]等关于肿瘤患者医院感染以口咽部和下呼吸道感染为主的

报道基本一致。PA 在放疗一区(28.52%)、放疗二区(34.70%)分布较高的主要原因与这两个病区以收治病情较重、照射剂量较大、易感染的三期和四期鼻咽癌患者有关。

患者带菌和医务人员双手、衣物、医疗器械以及物体表面被污染,是病原菌在不同病区之间或病区内不同病房之间交叉传播,以及在同一患者不同部位之间移位感染或定植的高危因素。近年来,逐步应用分子生物学基因分型技术开展医院感染病原学同源性分析的研究^[6-8]发现,不同医疗机构常见病病原菌的同源特点存在较大差异。童郁等^[9]报道,某院临床分离的 PA 大多无同源性,但个别病区存在轻微的克隆播散现象;简翠等^[10]报道了不同病区发生过不同型别的亚胺培南耐药 PA 流行。

本研究中 PA 基因分型结果显示,高度同源的 H 型菌株(7 株)和 J 型菌株(5 株)分别在放疗二区、四区的高分布,以及分离自这两个病区之间相互转科治疗患者的菌株基因同型(H 型 2 例、C 型 1 例、J 型 1 例),说明本院不同放疗病区之间存在高度同源 PA 的局部流行,病区之间因病情需要和治疗措施调整而相互交换患者是同源 PA 感染或定植的危险因素。H 型菌株和 J 型菌株在咽拭子标本中的分布高达 57.14% 和 80.00% 的特点,提示因放疗被损伤黏膜的口腔和鼻咽部容易发生同源 PA 感染或定植。相同患者在不同住院时期相同部位的分离菌基因同型,提示临床上发现住院患者疑似感染时应注意区分同种同源病菌的反复感染或定植。研究结果表明,应用 RAPD 等基因分型技术检测分析医院感

染病原菌的同源性,对防控感染传播具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] 龙娟,刘宗阳,杨通梦,等.某省级肿瘤医院医院感染现患率调查[J].中国感染控制杂志,2013,12(2):126-128.
- [2] 彭建忠,詹熹.肿瘤患者医院感染的病原菌分布及危险因素分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(4):715-716.
- [3] 张锦林,倪美鑫,季屹红,等.肿瘤专科医院恶性肿瘤患者医院感染的调查分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(7):1334-1336.
- [4] 罗晋卿,蔡永林,钟伟铭,等.鼻咽癌患者放射治疗中发生医院感染的危险因素研究[J].中国全科医学,2012,15(16):1839-1843.
- [5] Azfer A, Bashamboo A, Ahmed N, et al. Random amplification of polymorphic DNA with conserved sequences reveals genome specific monomorphic amplicons: Implications in clad identification[J]. J Biosci, 1999, 24(1):35-41.
- [6] 李传杰,罗晋卿.医院感染同源性基因分型研究进展[J].检验医学与临床,2013,10(20):2767-2769.
- [7] 毛璞,单靖岚,叶丹,等.ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌医院感染的同源性分析[J].中国感染控制杂志,2010,9(1):6-9,14.
- [8] 高巧营,管卫,孙兰菊,等.儿童医院住院患儿铜绿假单胞菌的同源性[J].中国感染控制杂志,2011,10(3):161-165.
- [9] 童郁,周铁丽,费静娴,等.铜绿假单胞菌 ESBLs 基因分布及同源性分析[J].中国现代医生,2011,49(18):21-23.
- [10] 简翠,孙自镛.亚胺培南耐药铜绿假单胞菌金属 β 内酰胺酶的检测和同源性分析[J].中国感染与化疗杂志,2008,8(2):107-111.

(本文编辑:任旭芝)

欢迎投稿

欢迎订阅