

参考文献

[1] 郑松柏, 庄俊华, 张秀明. 临床酶学参考系统研究进展[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(4): 309-311.
 [2] 叶应妩, 王毓三. 全国临床操作规程[M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 204-234.
 [3] 康格非. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 398-421.
 [4] 潘彤, 张孝山, 李研, 等. 献血者丙氨酸氨基转移酶不同方法的探究[J]. 中国医学检验杂志, 2004, 5(1): 29-30.
 [5] 汪宏良, 陈丽峰, 胡芳. 生物化学分析仪检测结果的临床评价[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(6): 558-559.

[6] 王传新, 王国礼. 现代检验医学技术及质量控制[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 233-234.
 [7] 张克坚, 苏增留, 张传宝. 建立自动化生化分析仪室内质控时应注意的几个问题[J]. 世界医疗器械, 2000, 6(8): 10-15.
 [8] 严旻瑜, 陆华, 姚震. 以质控品为校准品的尝试[J]. 上海医学检验杂志, 2001, 16(5): 227-228.
 [9] 传良敏, 黄文方, 饶绍琴. Beckman 校准品经检测系统量值传递后用于校正 AU2700/中生试剂系统[J]. 检验医学, 2004, 5(7): 413-415.

(收稿日期: 2010-05-10)

• 经验交流 •

多耐药肺炎克雷伯菌同时携带 16S rRNA 甲基化酶和氨基糖苷类修饰酶基因

陈 菁, 孙桂芹

(浙江省绍兴市人民医院检验科 312000)

摘要:目的 调查肺炎克雷伯菌中 16S rRNA 甲基化酶基因和氨基糖苷类修饰酶基因(AMEs)的存在情况。方法 收集绍兴市人民医院 2007 年 10 月到 2009 年 6 月患者标本中分离的肺炎克雷伯菌共 20 株, 采用聚合酶链反应(PCR)及序列分析的方法分析 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因 (armA、rmtA、rmtB、rmtC、rmtD、npmA) 和 14 种 AMEs 基因 [aac(3)-I、aac(3)-II、aac(3)-III、aac(3)-IV、aac(6')-I b、aac(6')-II、ant(2'')-I、ant(3'')-I、aadA4/5、aadA6/16、ant(4'')-I、aph(3'')-I、aph(3'')-II a、aph(3'')-II b]。结果 20 株肺炎克雷伯菌共检出 1 种 16S rRNA 甲基化酶基因:rmtB 8 株(40.0%); 5 种氨基糖苷类修饰酶基因:aac(3)-II 17 株(85.0%), ant(3'')-I 12 株(60.0%), aph(3'')-I 6 株(30.0%), aac(6')-I b 2 株(10.0%), aadA5 2 株(10.0%), 其余 14 种基因未检出。20 株菌均检出 16S rRNA 甲基化酶基因或氨基糖苷类修饰酶基因, 与庆大霉素全部耐药的表型相符。8 株 rmtB 阳性株同时携带氨基糖苷类修饰酶基因, 可分为 4 种阳性检出模式, 其中 [rmtB+aac(3)-II+ant3'')-I] 模式检出率最高, 共 4 株(20.0%)。结论 在多耐药肺炎克雷伯菌中发现同时携带 16S rRNA 甲基化酶和氨基糖苷类修饰酶基因的菌株国内鲜见报道。携带 16S rRNA 甲基化酶和氨基糖苷类修饰酶基因是本组菌对氨基糖苷类药物耐药的主要原因。

关键词:克雷伯菌, 肺炎; 抗药性, 多药; 16S rRNA 甲基化酶基因; 氨基糖苷类修饰酶基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.036

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)04-0501-03

多耐药肺炎克雷伯菌(multidrug-resistant klebsiella pneumoniae, MDRKP)已是医院感染的重要病原菌。近年来, 尽管国内已有部分肺炎克雷伯菌的相关基因研究报道, 但上述报道所涉及耐药相关基因较少^[1-2]。为了解本院 MDRKP 的氨基糖苷类药物各种耐药相关基因存在状况, 本文对 20 株分离自绍兴市人民医院 2007 年 10 月至 2009 年 6 月住院患者的 MDRKP 进行了 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因和 14 种氨基糖苷类修饰酶基因检测, 结果发现了同时携带 16S rRNA 甲基化酶和氨基糖苷类修饰酶基因的菌株, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源及鉴定 20 株 MDRKP 均分离自绍兴市人民医院 2007 年 10 月至 2009 年 6 月住院患者送检标本, 其中分离自痰液 13 株、尿液 6 株、伤口分泌物 1 株。采用法国生物梅里埃公司微生物鉴定系统(VITEK2 COMPACT)鉴定菌种。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、大肠埃希菌 ATCC35218、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

1.2 药敏试验 系微量肉汤稀释法。采用法国生物梅里埃公司产品 AST-GN13 药敏试验卡。仪器对药敏卡自动分析判定药敏结果。

1.3 细菌处理 挑纯培养菌落置入 0.5 mL 离心管内(内预

置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200 μL), 56 °C 水浴 2 h, 改 95 °C 水浴 10 min, 离心(15 000 r/min)30 s。上清液即为基因检测的模板液, -20 °C 冰箱保存备用。

1.4 基因检测 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因和 14 种氨基糖苷类修饰酶基因检测均为 PCR 法。插入 PCR 引物由无锡市克隆遗传技术研究所糜祖煌、江苏大学临床医学院糜家睿完成设计, 生物信息学数据处理由虎马信息工作室完成, 并获授权使用, 各种靶基因 PCR 扩增体系均为: 每反应体系 P1 引物 1 μL(1.0 μmmol/L)、P2 引物 1 μL(1.0 μmmol/L)、dNTPs 2 μL(2 mmol/L)、10 倍缓冲液 2 μL[KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl (pH9.0) 10 mmol/L, NP40 0.5%, BSA 0.02% (wt/vol)], Taq DNA pol 1U(不计体积), 超纯水 9 μL, 模板液 5 μL, 总反应体积 20 μL。PCR 扩增热循环参数为: 93 °C 预变性 2 min, 然后 93 °C 30 s → 55 °C 30 s → 72 °C 60 s, 循环 35 周期, 最后 1 个 72 °C 延长至 5 min。PCR 产物长度大于 500 bp 者 PCR 扩增热循环参数为: 93 °C 预变性 2 min, 然后 93 °C 60 s → 55 °C 60 s → 72 °C 60 s, 循环 35 周期, 最后 1 个 72 °C 延长至 5 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 出现与阳性对照分子相当的目的条带为阳性。检测试剂盒和阳性对照 DNA 由无锡市克隆遗传技术研究所提供。

1.5 阳性基因测序 PCR 阳性产物为 PCR 直接全自动荧光

法测序,委托上海博尚生物技术有限公司完成(测序在美国 ABI 公司 3730 型毛细管全自动测序仪上进行)。

1.6 测得序列经比对 读序工具软件为 Chromas,测序结果用 Chromas 直接作 BLASTn (www. ncbi. nlm. nih. gov/BLASTn) 比对。

2 结 果

20 相提并论 MDRKP 对 22 种抗菌剂耐药性见表 1。20 株 MDRKP6 种 16S rRNA 甲基化酶基因和 14 种氨基糖苷类修饰酶基因检测结果见表 2。共检出 16S rRNA 甲基化酶基因 1 种(rmtB)、氨基糖苷类修饰酶基因 5 种[aac(3)-II、aac(6')-I b、ant(3'')-I、aadA5、aph(3')-I]。8 株 rmtB 16S rRNA 甲基化酶基因阳性菌株同时携带 1 种氨基糖苷类修饰酶基因,rmtB 阳性株氨基糖苷类修饰酶基因检出状况见表 3。

表 1 20 株 MDRKP 22 种抗菌剂的药敏试验结果(%)

药物名称	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
氨苄西林	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢唑啉	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢呋辛	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢曲松	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢替坦	2(10.0)	0(0.0)	18(90.0)
头孢噻肟	19(95.0)	1(5.0)	0(0.0)
头孢他啶	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢吡肟	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢西丁	14(70.0)	0(0.0)	6(30.0)
氨基南	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
氨苄西林/舒巴坦	19(95.0)	1(5.0)	0(0.0)
哌拉西林/他唑巴坦	8(40.0)	1(5.0)	11(55.0)
头孢哌酮/舒巴坦	10(50.0)	5(25.0)	5(25.0)
亚胺培南	3(15.0)	0(0.0)	17(85.0)
美洛培南	3(15.0)	0(0.0)	17(85.0)
厄他培南	4(20.0)	1(5.0)	15(75.0)
庆大霉素	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
妥布霉素	16(80.0)	1(5.0)	3(15.0)
丁胺卡那霉素	14(70.0)	0(0.0)	6(30.0)
环丙沙星	17(85.0)	0(0.0)	3(15.0)
左氧氟沙星	17(85.0)	0(0.0)	3(15.0)
复方新诺明	17(85.0)	0(0.0)	3(15.0)

表 2 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因和 14 种氨基糖苷类修饰酶基因检测结果

基因名称	阳性株数	阳性率(%)
rmtB	8	40.0
aac(3)-II	17	85.0
ant(3'')-I	12	60.0
aph(3')-I	6	30.0
aac(6')-I b	2	10.0
aadA5	2	10.0

表中 16S rRNA 甲基化酶、氨基糖苷类修饰酶基因检测均为阴性结果未列出。

表 3 rmtB 阳性株氨基糖苷类修饰酶基因检出状况

阳性检出模式	株数
rmtB+ant3''-I	2
rmtB+aac(3)-II	1
rmtB+aac(3)-II+ant3''-I	4
rmtB+aac(3)-II+aadA5	1

3 讨 论

氨基糖苷类药物问世 60 年以来,除天然不敏感的厌氧菌外,因对大多数革兰阳性和阴性细菌均有较强抗菌作用而得到广泛应用。但由于滥用和过度使用,耐药问题随之出现。细菌对氨基糖苷类耐药主要是通过产氨基糖苷类修饰酶(aminoglycoside-modifying enzyme, AMEs)和产 16S rRNA 甲基化酶(编码基因为 rmtA、rmtB、rmtC、rmtD、armA、npmA)。氨基糖苷类修饰酶通过共价修饰氨基糖苷中具有特异性的 OH 和 NH₂ 基团,以此干扰了药物与细菌核糖体小亚单位的 16S rRNA 结合而耐药^[3-4]。而 16S rRNA 甲基化酶能使药物作用靶位 16S rRNA 甲基化,导致甲基化后的 16S rRNA 与氨基糖苷类药物亲和力下降而高耐氨基糖苷类药物^[5]。产 16S rRNA 甲基化酶和产氨基糖苷类修饰酶的细菌为获得性耐药,从美国 NCBI 检索可知,16S rRNA 甲基化酶基因、氨基糖苷类修饰酶基因位于质粒、插入序列、转座子和整合子等可移动的遗传元件上,因而可在细菌间迅速传递。绍兴市人民医院 20 株 MDRKP 均检出 16S rRNA 甲基化酶基因或氨基糖苷类修饰酶基因,与庆大霉素全部耐药的表型相符。16S rRNA 大小在 1 500 bp 左右,所代表的信息长度适中,其作为“细菌的活化石”在分型和鉴定中得到了广泛应用^[6],国内学者已从多种革兰阴性菌中查出 armA 和 rmtB 型 16S rRNA 甲基化酶基因^[7-8],而绍兴市人民医院 20 株 MDRKP 中,6 种 16S rRNA 甲基化酶基因和 14 种氨基糖苷类修饰酶基因检测共检出 1 种 16S rRNA 甲基化酶基因和 5 种氨基糖苷类修饰酶基因,且 20 株 MDRKP 均检出 16S rRNA 甲基化酶基因或氨基糖苷类修饰酶基因,8 株 rmtB 16S rRNA 甲基化酶基因阳性株同时携带氨基糖苷类修饰酶基因,国内鲜见报道。

参考文献

- [1] 黄支密,糜祖煌,储秋菊,等.肺炎克雷伯菌临床分离株中出现 16S rRNA 甲基化酶基因 rmtB[J].中华流行病学杂志,2008,29(9):879-884.
- [2] 陈淑贞,郑宇琼,姚芬,等.多重耐药肺炎克雷伯菌基因型和整合子的分析[J].国际检验医学杂志,2009,6(30):587-588.
- [3] 糜祖煌,黄支密,秦玲,鲍氏不动杆菌耐药性和氨基糖苷类修饰酶、β-内酰胺酶基因研究[J].中华医院感染学杂志,2004,14(9):968-971.
- [4] 糜祖煌,秦玲.泛耐药铜绿假单胞菌 16S rRNA 甲基化酶基因、氨基糖苷类修饰酶基因研究[J].中华医院感染学杂志,2008,18(12):1656-1658.
- [5] Wachino JI,Shibayama K,Kurokawa H,et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA mla1408 methyltransferase, npmA, found in a clinically isolated escherichia coli strain resistant to structurally diverse aminoglycosides[J]. Antimicrob Agents Chemother,2007,51(12):4401-4409.
- [6] 刘春江. 16S-23SrRNA 基因区间在快速鉴定病原菌中的应用进展

[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 7(30): 685
 [7] 黄支密, 单浩, 糜祖煌, 等. 阴沟肠杆菌 16S rRNA 甲基化酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(4): 369-373.

[8] 吕建国, 苏青和, 张烽, 等. rmtB 基因在铜绿假单胞菌烧伤分离株中流行[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(20): 2686-2689.

(收稿日期: 2010-05-10)

• 经验交流 •

糖尿病合并足感染病原菌的分布及耐药分析

吕春兰, 丁志红, 张有忠, 杨荣生
 (湖北省襄阳市中医医院检验科 441000)

摘要:目的 了解该院糖尿病合并足感染病原菌的分布及耐药状况。方法 收集该院 2008 年 1 月至 2010 年 11 月糖尿病合并足感染者送检的分泌物标本分离的 281 株病原菌的鉴定及药敏的结果进行统计分析。结果 281 株病原菌中排名前 3 位的分别是铜绿假单胞菌(18.51%)、金黄色葡萄球菌(15.30%)和阴沟肠杆菌(13.17%)、铜绿假单胞菌对除亚胺培南(17.31%)、美洛培南(15.38%)和头孢他啶(11.53%)外的其他抗菌剂均有较高的耐药率。金黄色葡萄球菌对青霉素(97.67%)、红霉素(88.35%)和克林霉素(83.72%)有较高的耐药率, 阴沟肠杆菌对氨苄西林(91.89%)、米诺环素(75.67%)、头孢菌素(>50%)均有较高的耐药率。结论 铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌为糖尿病合并足感染者主要病原菌, 铜绿假单胞菌多重耐药现象严重。

关键词:病原; 抗药性; 糖尿病合并足感染

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.037

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2011)04-0503-02

糖尿病患者由于血管神经病变的共同作用易导致足溃疡、坏疽, 使感染不易控制、为此笔者对本院 2008 年 1 月至 2010 年 11 月糖尿病合并足感染者送检的分泌物标本分离的 281 株病原菌进行回顾性分析, 为临床用药提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 来自本院 2008 年 1 月至 2010 年 11 月糖尿病合并足感染患者送检的分泌物标本进行培养分离菌株 281 株。

1.2 细菌鉴定及药敏试验 细菌鉴定严格按《全国临床检验操作规程》(3 版), 中华人民共和国卫生部医政司 1997 年 1 月的规定进行操作, 并参加湖北省临床检验中心开展的室间质评活动, 细菌均鉴定到种的水平, 药敏试验方法亦用全国临床检验操作规程的 K-B 法进行, 判定标准按美国临床实验室标准研究所(CLSI)的判定标准进行判定。

1.3 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC25922、ATCC35218; 金黄色葡萄球菌 ATCC25923; 肠球菌 ATCC29212 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 均购自湖北省临床检验中心。

1.4 MRS 检测 采用 sLSI 2009 年推荐的头孢西丁法检测。

1.5 ESBLs 试验 采用 NCCLS 推荐的表型确定试验, 即用头孢噻肟/克拉维酸和头孢他啶/克拉维酸 2 组纸片同时进行检测并用大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC700603 作质控。

2 结 果

2.1 细菌分布 共分离病原菌 281 株, 其中革兰阳性球菌株 132 株占 45.19%, 革兰阴性杆菌 144 株占 51.25%, 真菌 5 株占 1.78%。病原菌检出排名前 3 位依次是铜绿假单胞菌 52 株, 占 18.51%; 金黄色葡萄球菌 43 株, 占 15.30%; 阴沟肠杆菌 37 株, 占 13.17%; 菌种分布及构成比见表 1。

2.2 耐药率 铜绿假单胞菌对除亚胺培南(17.31%)、美洛培南(15.38%)和头孢他啶(11.53%)外的其他抗菌剂均有较高的耐药率。金黄色葡萄球菌对青霉素(97.67%)、红霉素

(88.35%)、克林霉素(83.72%)有较高的耐药率; 阴沟肠杆菌对氨苄西林(91.89%)、米诺环素(75.67%)和头孢菌素(>50%)均有较高的耐药率。其结果见表 2。

表 1 281 株细菌的菌株分布及构成比

病原菌	检出株数	构成比(%)
铜绿假单胞菌	52	18.51
阴沟肠杆菌	37	13.17
大肠埃希菌	16	5.69
肺炎克雷伯菌	13	4.62
变形杆菌属	11	3.91
鲍氏不动杆菌	7	2.49
沙雷菌属	5	1.78
其他革兰阴性杆菌	3	1.1
金黄色葡萄球菌	43	15.30
表皮葡萄球菌	30	10.68
其他葡萄球菌	25	8.90
肠球菌属	28	9.96
其他链球菌	6	2.1
真菌	5	1.78
合计	281	100.0

表 2 糖尿病合并足感染者主要菌种对抗菌药物耐药率

抗菌剂	铜绿假单胞菌 (n=52)		金黄色葡萄球 菌(n=43)		阴沟肠杆菌 (n=37)	
	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)
头孢噻肟	35	67.31	—	—	21	56.75
头孢他啶	6	11.53	—	—	22	59.45
头孢吡肟	28	53.85	—	—	17	45.95
头孢曲松	—	—	—	—	20	54.05