

• 基础实验研究论著 •

耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性分析及耐消毒剂基因检测*

曾 丽, 曾 文, 邓文喻, 周 才

(广东省妇幼保健院检验科, 广东广州 510010)

摘 要:目的 了解临床分离的耐亚胺培南铜绿假单胞菌(IMPRPa)的分布和耐药性,以及携带耐消毒剂基因 qacE Δ 1-sull 的情况。方法 临床标本应用 VITEK-2 compact 全自动微生物鉴定仪进行鉴定及药敏试验,并对 23 株 IMPRPa 的耐消毒剂基因 qacE Δ 1-sull 进行 PCR 扩增。结果 本院 IMPRPa 主要来自新生儿科病房,其检出率为 36.96%,高于儿科门诊及儿科病房($P < 0.05$);IMPRPa 对氨基糖苷类、喹诺酮类药物敏感,对广谱青霉素类、头孢类以及磺胺类的复方新诺明等几乎全部耐药;23 株 IMPRPa 有 19 株 qacE Δ 1-sull 基因阳性,携带率为 82.6%。结论 IMPRPa 早产儿易感,对常用抗生素耐药率高,耐消毒剂基因 qacE Δ 1-sull 携带率较高,存在抗消毒剂的可能性。

关键词:假单胞菌,铜绿; 亚胺培南; 消毒剂; qacE Δ 1-sull 基因; 耐药性,细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1795-03

Investigation on the antimicrobial resistance and disinfectant-resistant gene in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa**

Zeng Li, Zeng Wen, Deng Wenyu, Zhou Cai

(Department of Clinical Laboratory, Mother and Children Health Care Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract:Objective To investigate the antimicrobial resistance and the condition of disinfectant-resistant gene(qacE Δ 1-sull gene) in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*(IMPRPa). **Methods** The bacteria were cultured and isolated according to National Clinical Laboratory Operation Manual, and identified and tested by Compact VITEK-2. Polymerase chain reaction(PCR) was performed to detect disinfectant-resistant gene qacE Δ 1-sull in 23 isolates of IMPRPa. **Results** The positive rate of the IMPRPa was the highest in the department of Neonatal ward in this hospital, with positive rate of IMPRPa for 36.96%. IMPRPa were all susceptible to Aminoglycosides and Quinolones agents, but almost all resistant to broad spectrum penicillins, Cephalosporins and Sulfonamides antibiotics. 19 of 23 strains were qacE Δ 1-sull gene positive, and the carrying rate was 82.6%. **Conclusion** Premature infant might be susceptible to IMPRPa. The resistance rates of IMPRPa to common antibiotic might be high and the resistance patterns could be wide. There might be with high positive percentage of qacE Δ 1-sull gene in IMPRPa.

Key words: pseudomonas aeruginosa; imipenem; disinfectant; qacE Δ 1-sull gene; drug resistance, bacterial

铜绿假单胞菌(PA)是临床上常见的条件致病菌,也是医院感染常见的和主要致病菌。与耐抗菌药物菌株一样,耐消毒剂菌株的出现可能导致医院消毒的失败,细菌耐消毒剂主要为获得 qac 基因所致。碳青霉烯类抗生素(如亚胺培南)以其广谱的抗菌活性,被临床广泛用于治疗重症感染。但近年来,PA 耐药率在不断增加,已经出现一部分对亚胺培南和第三、四代头孢菌素耐药的三重耐药菌株,这给临床治疗带来极大的困难。对其耐消毒剂基因进行探讨,在医院感染预防控制方面具有重要意义。为了解本院耐亚胺培南铜绿假单胞菌(IMPRPa)的分布、耐药特点及消毒剂—磺胺耐药相关基因(qacE Δ 1-sull)存在状况,对本院 2010 年 1 月~12 月临床分离出的 23 株 IMPRPa 进行了相关分析和研究,现总结报道如下。

1 材料和方法

1.1 一般资料 本院 2010 年 1 月~12 月住院及门诊患者送检的(包括痰、血、尿、咽拭子、精液、导管、支气管冲洗液及各种分泌物等)感染性标本中分离出 154 株 PA,其中对 IMPRPa 有 23 株,均分离自呼吸道标本。

1.2 仪器及试剂 临床标本采用法国梅里埃公司生产的 VITEK-2 compact 全自动微生物分析仪及配套试剂进行鉴定

和药敏试验;菌株鉴定采用 GN 鉴定卡。质控菌株为铜绿假单胞菌 ACTT27853,由卫生部临床检验中心提供。ABI9700 PCR 仪、GenePath 脉冲场电泳仪、Eppendorf 低温高速离心机、Bio-Rad 凝胶成像系统等仪器设备用于基因检测;蛋白酶 K、琼脂糖、核酸分子标记物、Taq DNA 聚合酶等试剂购自北京赛百盛基因技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 模板制备 挑纯培养菌落置入 0.5 mL 离心管内(内已预置 400 ng/mL 蛋白酶 K 溶液)。56℃ 水浴消化细菌 2 h,改 95℃ 水浴灭活蛋白酶 K 10 min。15 000 r/min 离心 30 s,移液器吸取上清液移入另一新的 0.5 mL 离心管,作为 qacE Δ 1-sull 基因检测模板液置入-20℃ 冰箱备用。

1.3.2 药物敏感试验 采用 VITEK-2 compact 全自动细菌鉴定分析系统测定 MIC,AST-GN10 药敏卡药敏试验结果按 CLSI2007 年版标准判断。

1.3.3 模板 DNA 提取 采用蛋白酶 K 消化法。

1.3.4 耐消毒剂基因的检测 采用 PCR 方法,参考 GenBank 公布的 qacE Δ 1-sull 基因序列设计引物, P1: 5'-TAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3', P2: 5'-ATTGAGAAT-

* 基金项目:广东省医学科研基金立项课题(A2011078)。

GCCGAACACCG-3', 扩增产物长度 300 bp, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。PCR 反应体系如下: 反应总体积 50 μ L, P1、P2 引物各 2 μ L (0.6 μ mol/L), dNTPs 1 μ L (200 μ mol/L), TaqDNA 聚合酶 0.5 μ L (2 U), PCR 反应缓冲液 (10 $\times$) 5 μ L, DNA 模板液为 4 μ L, MgCl₂ 离子 5 μ L, 双蒸水 30.5 μ L。热循环参数均为: 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后, 进行 30 个循环, 每次循环 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s。30 次循环结束后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶 (EB 染色) 中电泳 30 min, 电压 100 V, 置凝胶成像仪观察结果, 出现 300 bp 的条带即为 qacE Δ 1-sulI 基因阳性, 拍照保存。纯水为阴性对照。

1.2.4 统计学处理 WHONET 5.4 软件分析药敏结果; 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2010 年本院临床标本分离出 154 株 PA, 其中有 23 株药物敏感试验显示为对亚胺培南耐药, 均分离自呼吸道标本。新生儿科病房标本的 IMPRPa 检出率明显高于其他有检出 IMPRPa 的科室, 其在各临床科室分布情况见表 1。

表 1 23 株 IMPRPa 在各科室分布情况

科室	PA 株数(n)	IMPRPa 株数(n)	检出率(%)
儿科病房	86	5	5.81
新生儿科病房	46	17	36.96*
产科病房	2	0	0.00
儿科门诊	15	1	6.67
内科门诊	4	0	0.00
男科门诊	1	0	0.00

*: $P < 0.05$, 新生儿科病房 IMPRPa 检出率与儿科门诊及儿科病房的比较。

2.2 IMPRPa 对常用抗生素的耐药特征见表 2。

表 2 23 株 IMPRPa 对常用抗生素敏感试验结果

抗生素	敏感(S)		中介(I)		耐药(R)	
	株数 (n)	构成比 (%)	株数 (n)	构成比 (%)	株数 (n)	构成比 (%)
亚胺培南	0	0.0	0	0.0	23	100.0
氨苄西林	0	0.0	0	0.0	23	100.0
氨苄西林/舒巴坦	0	0.0	0	0.0	23	100.0
哌拉西林/他唑巴坦	2	8.7	0	0.0	21	91.3
头孢替坦	0	0.0	0	0.0	23	100.0
头孢他啶	2	8.7	0	0.0	21	91.3
头孢曲松	0	0.0	0	0.0	23	100.0
头孢吡肟	2	8.7	0	0.0	21	91.3
氨曲南	0	0.0	2	8.7	21	91.3
妥布霉素	23	100.0	0	0.0	0	0.0
丁胺卡拉霉素	23	100.0	0	0.0	0	0.0
庆大霉素	23	100.0	0	0.0	0	0.0
呋喃妥因	0	0.0	0	0.0	23	100.0
复方新诺明	0	0.0	0	0.0	23	100.0
环丙沙星	23	100.0	0	0.0	0	0.0
左氧氟沙星	23	100.0	0	0.0	0	0.0

2.3 耐消毒剂 qacE Δ 1-sulI 基因检测结果 检测结果表明, 在 23 株 IMPRPa 中, 有 19 株耐消毒剂基因 qacE Δ 1-sulI 检出阳性, 阳性率为 82.6%, 图 1 为部分 PCR 产物电泳图。



M: 核酸分子标记物; P: 阳性对照; N: 阴性对照; S: 标本。

图 1 qacE Δ 1-sulI PCR 电泳图

3 讨 论

本资料显示, 本院临床标本分离出 154 株 PA, 其中有 23 株药物敏感试验显示为对亚胺培南耐药, 耐药率 14.94%, 比同地区报道的 18.41% 稍低^[1], 这可能与本院是专科医院有关。23 株 IMPRPa 均分离自呼吸道标本, 其中 17 株来自新生儿科病房, 其检出率和构成比均明显高于其他任何门诊和病房。临床资料显示 17 例感染的患儿均是早产儿^[2], 提示新生儿是 IMPRPa 的易感人群。新生儿因其器官功能发育尚未成熟, 免疫功能低下, 同时随着围产医学水平的不断提高, 早产儿、低体质量儿的存活率明显上升, 以及新生儿住院后各种侵入性操作、糖皮质激素的使用使呼吸道局部的抵抗力下降, 病菌易进入下呼吸道, 这都增加了条件致病菌 PA 感染的机会。因此, 医院感染控制部门应更重视对易感人群病区的预防和控制。

亚胺培南是抗菌药物中抗菌谱最广、抗菌作用最强的一类碳青霉烯类抗生素, 大多数革兰阴性杆菌都对其敏感, 但随着碳青霉烯类药物的使用越来越广泛, 由于特异性外膜孔蛋白 (Opr) D2 缺失、产金属酶、外排泵等耐药机制^[3-4], 以及各种耐药机制相互影响, 相互协同导致 PA 对亚胺培南的敏感性逐年下降^[5]。23 株 IMPRPa 的药物敏感试验显示对氨基糖苷类、喹诺酮类药物敏感, 对广谱青霉素类、头孢类和磺胺类的复方新诺明等抗生素几乎全部耐药。但是由于氨基糖苷类、喹诺酮类等药物在妊娠期、哺乳期和婴幼儿期禁用或慎用。因此, 对 IMPRPa 感染新生儿及婴幼儿几乎是到了无药可治的地步, 这给临床用药带来了很大的压力。因此应加强细菌耐药监测和合理使用抗生素, 当出现 IMPRPa 有增加趋势应及时查找原因, 避免 IMPRPa 引起医院感染流行。

qac 基因家族表达多种化合物外排泵, 细菌获得 qac 基因并表达, 可将季胺类、双胍类和碱性染料排出菌体^[6]。PA 易于获得 qacE Δ 1 基因而耐消毒剂, sulI 为二氰磷酸合成酶的编码基因, 阳性提示细菌对磺胺类药物耐受。qacE Δ 1-sulI 为 I 类整合子的遗传标记, 可被革兰阳性和革兰阴性细菌获取^[7-8], 更广泛存在于多药耐药革兰阴性杆菌中^[9]。2005 年王春新^[10]由 PA 检出 qacE Δ 1 基因, 为国内首次发现。本研究结果显示, 23 株 IMPRPa qacE Δ 1-sulI 基因携带率 82.6%。2007 年四川颜英俊等^[11]报道该院 IMPRPa qacE Δ 1-sulI 基因携带率 41.2%; 2011 年北京空军总医院多重耐药 PA 的检出率为 92.0%^[12], 不同地区报道差异较大, 可能不同地区抗生素和消毒剂种类、剂量使用的不同, 导致病原菌耐消毒剂基因携带率也可能有所不同。本组 23 株菌对复方新诺明全部耐药, 只有 19 株 sulI 基因阳性, 推断可能存在其他耐磺胺药机制。

消毒剂的使用是预防和控制医院感染的重要手段,可应用于医院不能进行高压灭菌的某些器械、导管、手术野、医务人员的手部、病房环境卫生、患者皮肤黏膜等方面的消毒。这样广泛过度使用消毒剂,促使细菌产生耐消毒剂现象。PA 是医院感染常见病原菌,由于耐药和多重耐药,对临床感染控制构成严重威胁,而 IMPRPa 具有更大的危险。在妇幼医院可用的药物更少情况下,应及时了解 IMPRPa 在医院的分布和耐药特点,以及进行耐消毒剂基因检测,为合理正确使用消毒剂提供依据。

本研究 23 株 IMPRPa 菌大多数是在同一季度出现,新生儿科病房 17 株 IMPRPa 菌均检出耐消毒剂 qacE Δ 1-sulI 基因。在临床实行定期轮换所选用的消毒剂后,IMPRPa 菌株得到了很好的控制。因此,携带耐消毒剂基因的多重耐药菌对临床使用的消毒剂是否产生了抗性应引起医院感染控制部门及医务人员的重视,亦有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 庄俊华,黄宪章,杨洁,等.广州地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌的感染现状 & 耐药性检测[J].国际检验医学杂志,2009,30(2):111-113.
- [2] 曾丽,邓文喻,曾文,等.2010 年本院五种常见病原菌分布及耐药性分析[J].热带医学杂志,2011,11(11):1272-1275.
- [3] Statake S, Yoneyama H, Nakae T. Role of Omp D2 and chromosomal β -lactamase in carbapenem resistance in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa [J]. Antimicrob Chemother, 1991, 28(2):199-207.

(上接第 1794 页)

明医学生物学研究所制备的流感病毒裂解疫苗(儿童剂型)通过动物实验、血清学检测结果表明,免疫后 H1N1 型、H3N2 型、和 B 型 HI 抗体阳性率(抗体滴度不小于 1:40)分别为 97%、97%和 64%,HI 抗体 4 倍增长率各型分别为 30 倍、24 倍、8 倍,并且通过与巴斯德流感病毒裂解疫苗(儿童剂型)动物比较实验表明,昆明流感裂解疫苗和巴斯德流感裂解疫苗在小鼠的安全性和免疫性均达到标准要求,具有良好的安全性和免疫抗原性,为下一步开展人体临床试验研究提供了依据。

参考文献

- [1] 赵铠,章以浩,李河民,等.医学生物制品学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2007:805-816.
- [2] Mendelman PM, Cordova J, Cho I. Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live cold2adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults [J]. Vaccine, 2001, 19(17-19):2221-2226.
- [3] 徐翠玲,杨磊,温乐英,等.1918 年流感大流行的流行病学概述[J].病毒学报,2009,23(增刊):23-26.
- [4] World Health Organization. Ten things you need to know about pandemic influenza[EB/OL]. [2005-10-14]. www.who.int/csr/disease/influenza/pandemic10things/en/.
- [5] World Health Organization. Influenza pandemic preparedness plan- the role of WHO and guidelines for national and regional planning[M]. Geneva:World Health Organization, 1999.

- [4] 黄支密,陈亚华,诸葛青云,等.多重耐药 MRSA 耐消毒剂基因及抗生素耐药相关基因检测[J].中国抗生素杂志,2005,30(5):270-273.
- [5] 李翔,陈辉,伍勇,等.铜绿假单胞菌外排泵及整合子与碳青霉烯类耐药中的关系[J].国际检验医学杂志,2011,32(1):6-8.
- [6] Miyazaki NH, Abreu AO, Marin VA, et al. The presence of qacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007, 102(4):539-540.
- [7] Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, et al. Distribution of the antiseptic-resistance gene qacE delta 1 in Gram-positive bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 165(2):295-299.
- [8] Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, et al. Distribution of the antiseptic-resistance genes qacE and qacE delta 1 in gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 159(2):173-178.
- [9] 朱健铭,姜如金,吴康乐,等.多药耐药革兰阴性杆菌 qacE Δ 1-sulI 基因检测及临床意义[J].中华医院感染学杂志,2008,18(9):1209-1211.
- [10] 王春新.临床分离铜绿假单胞菌耐消毒剂基因 qacE Δ 1 检测[J].世界感染杂志,2005,5(2):140-141.
- [11] 颜英俊,糜祖煌,刘华,等.耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药特征及耐消毒剂基因的检测分析[J].中国抗生素杂志,2007,32(4):249-251.
- [12] 何晓锋,刘芳,曹晋,等.多重耐药革兰阴性杆菌耐消毒剂基因 qacE Δ 1-sulI 监测[J].中国感染控制杂志,2011,10(2):97-99.

(收稿日期:2011-12-08)

- [6] 宋绍辉,李卫东,廖国阳,等. TritonX-100 裂解流感病毒的研究[J].云南大学学报(自然科学版),2009,31(5):515-520.
- [7] 国家药典委员会编.流感病毒裂解疫苗//中华人民共和国药典(三部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:162-164.
- [8] 郭芳,陶瑞,沈云松,等.流感病毒分离鉴定方法研究[J].国际检验医学杂志,2010,31(4):409-411.
- [9] 沈艳华,王忠.甲型流感重症成年人死亡患者 RBC 结果分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(9):998-999.
- [10] Vu T, Farish S, Jenkins M, et al. A meta analysis of effectiveness of influenza vaccine in persons aged 10 years and over living in the community[J]. Vaccine, 2002, 20(17):1831-1836.
- [11] 曾祥兴,李康生.流感百年:20 世纪流感大流行的回顾与启示[J].医学与社会,2010,23(11):4-6.
- [12] 叶红.流感疫苗使用现状与研究进展[J].江苏卫生保健,2009,11(5):14-15.
- [13] 陈昌标,郑春早,顾建祥,等.国产流行性感冒病毒裂解疫苗临床安全性和免疫原性观察[J].实用预防医学,2009,16(2):397-399.
- [14] WHO. Safety of pandemic vaccines[EB/OL]. [2011-04-10]. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/briefing_20091119/en/index.htm.
- [15] 赵艳伟,冯子健.国产与进口流行性感冒病毒裂解疫苗安全性和免疫原性的 Meta 分析[J].中国疫苗和免疫,2009,15(1):19-26.

(收稿日期:2011-12-12)