

多药耐药铜绿假单胞菌消毒剂—磺胺耐药基因检测与临床意义

张玉云, 吴金英, 范小莉, 闫博, 杨建华, 杨少虹, 韩英杰

(烟台毓璜顶医院, 山东烟台 264000)

[摘要] 目的 了解多药耐药铜绿假单胞菌消毒剂—磺胺耐药基因(*qacE*△*1-sulI*)的存在状况。方法 采用纸片扩散(K-B)法测定某院临床标本分离的 30 株铜绿假单胞菌对 15 种抗菌药物的敏感性;以聚合酶链反应(PCR)法检测 *qacE*△*1-sulI* 基因。结果 30 株多药耐药铜绿假单胞菌中,*qacE*△*1-sulI* 基因阳性 13 株,阳性率 43.33%。结论 临床分离的铜绿假单胞菌 *qacE*△*1-sulI* 基因携带率较高,应引起高度重视。本结果为山东地区首次报道。

[关键词] 铜绿假单胞菌;耐消毒剂—磺胺基因;聚合酶链反应;抗药性;微生物;多药耐药

[中图分类号] R378.99⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)01-0007-04

Clinical significance of *qacE* △*1-sulI* gene in multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

ZHANG Yu-yun, WU Jin-ying, FAN Xiao-li, YAN Bo, YANG Jian-hua, YANG Shao-hong, HAN Ying-jie (Shandong Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China)

[Abstract] **Objective** To study the *qacE* △*1-sulI* gene in multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods The susceptibility of 30 strains of clinical isolated *Pseudomonas aeruginosa* to 15 antimicrobial agents was tested by Kirby-Bauer method, and *qacE* △*1-sulI* gene was analyzed by PCR. **Results** In 30 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, the positive rate of *qacE* △*1-sulI* gene was 43.33% (13/30). **Conclusion** There is higher positive rate of *qacE* △*1-sulI* gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the inpatients, it is reported for the first time in Shandong province.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; *qacE* △*1-sulI*; PCR; drug resistance; microbial; multiply drug resistance

[Chin Infect Control, 2009, 8(1): 7-9, 20]

我国江浙地区学者已在国内外刊物上报道了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PAE)当地分离株中检出消毒剂耐药基因和磺胺耐药基因 *qacE*△*1-sulI*^[1-5],但山东地区尚无报道。在革兰阴性杆菌耐药机制中,Ⅰ类整合子起着非常重要的作用,其 3' 保守端有季铵类化合物(消毒剂)的耐药基因(*qacE*△*1*)和磺胺耐药基因(*sulI*)^[2,6]。本文报告多药耐药(指对三类及三类以上抗菌药物耐药)PAE 菌株 *qacE*△*1-sulI* 基因检测结果,并讨论其临床意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 30 株多药耐药 PAE 均分离自 2006 年 1—6 月山东烟台毓璜顶医院患者临床标

本。全部菌株均经法国生物梅里埃 ATB Expression 细菌鉴定仪鉴定。

1.2 药敏试验 采用纸片扩散(K-B)法测定抗菌药物的敏感性。共测试 15 种抗菌药物,分别为:哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢噻肟、头孢他啶、头孢西丁、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、复方磺胺甲噁唑、氯霉素和米诺环素,均购自英国 Oxoid 公司。根据美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2007 年版要求进行抗菌药物敏感性判断。质控菌株:铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.3 细菌处理 挑纯培养菌落置于 0.5 mL 离心管内(内预置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200 μL),56℃ 水浴 2 h,改 95℃ 水浴 10 min,加入 Chelex-

[收稿日期] 2008-05-27

[基金项目] 山东省科学技术发展攻关项目(2008GG10002040)

[作者简介] 张玉云(1955-),女(汉族),山东省烟台市人,副主任护师,主要从事感染控制研究。

[通讯作者] 吴金英 E-mail:ytwjy369@126.com

100 40 μ L, 离心(15 000 r/min)30 s。上清液即为基因检测的模板液, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.4 基因检测 *qacE* Δ 1-*sull* 基因以双基因聚合酶链反应(PCR)法检测。鉴于 *qacE* Δ 1-*sull* 基因位于 I 类整合子 3' 保守端为重叠基因。PCR 引物序列根据已在 www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide 登录的各种 I 类整合子序列的保守区域完成设计。PCR 引物序列为 P1: 5' - TAGCGAGGGCTT-TACTAAGC - 3'; P2: 5' - ATTCAGAATGC-CGAACACCG - 3'。在 *qacE* Δ 1 下游设计引物 P1, 在 *sull* 上游设计引物 P2。PCR 扩增阳性表示 *qacE* Δ 1-*sull* 基因同时存在。PCR 扩增体系为: P1、P2 引物(0.5 μ mol/L)各 1 μ L, dNTPs(2 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 2 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, 纯水 6 μ L, 模板液 5 μ L, Taq DNA pol 1 μ L (1U), 总反应体积 20 μ L。PCR 热循环参数为: 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后 93 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 35 周期, 最后 72 $^{\circ}$ C 延长至 5 min。耐药基因检测试剂盒、靶基因 PCR 引物序列和阳性对照 DNA 由无锡市克隆遗传技术研究所提供, 阴性对照为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 于紫外凝胶电泳成像仪下观察, 并记录结果。

1.5 测序 采用双脱氧末端终止法, 在美国 ABI 公司 3730 仪上进行, 由上海博尚生物技术公司完成。

2 结果

2.1 药敏试验结果 30 株 PAE 对 2 种氨基苷类抗菌药物的耐药率以庆大霉素耐药率较高, 为 46.67%; 对碳青霉烯类抗菌药物耐药率为 56.67%~

63.33%; 对青霉素类耐药率为 20.00%; 对头孢菌素类耐药率为 23.33%~96.67%; 对喹诺酮类耐药率为 70.00%; 对其余 5 种抗菌药物的耐药率为 30.00%~100.00%。多药耐药率为 63.33%(19/30)。详见表 1。

表 1 30 株 PAE 药敏试验结果(株, %)

Table 1 Antimicrobial susceptibility test result of 30 strains of PAE (strain, %)

抗菌药物	敏感	中介	耐药
哌拉西林/他唑巴坦	24(80.00)	0(0.00)	6(20.00)
头孢哌酮/舒巴坦	22(73.30)	1(3.00)	7(23.33)
头孢噻肟	1(3.33)	7(23.33)	22(73.33)
头孢他啶	23(76.67)	2(6.67)	5(16.67)
头孢西丁	0(0.00)	0(0.00)	30(100.00)
头孢吡肟	22(73.33)	4(13.33)	4(13.33)
氨基曲南	7(23.33)	3(10.00)	20(66.67)
亚胺培南	11(36.67)	0(0.00)	19(63.33)
美罗培南	13(43.33)	4(13.33)	13(43.33)
庆大霉素	16(53.33)	0(0.00)	14(46.67)
阿米卡星	24(80.00)	0(0.00)	8(26.67)
环丙沙星	9(30.00)	3(10.00)	18(60.00)
复方磺胺甲噁唑	0(0.00)	0(0.00)	30(100.00)
氯霉素	0(0.00)	2(6.67)	28(93.33)
米诺环素	0(0.00)	0(0.00)	30(100.00)

中介计入耐药率统计

2.2 基因检测结果及序列分析 30 株多药耐药 PAE 中, *qacE* Δ 1-*sull* 基因阳性 13 株, 阳性率 43.33%。任取一个 *qacE* Δ 1-*sull* 基因 PCR 阳性产物以双脱氧末端终止法测序, 经 BLASTn(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn) 比对, 与美国 GenBank 已登录的 135 条 I 类整合子的 3' 保守端 *qacE* Δ 1-*sull* 基因相同(截止至 2008-04-07)。图 1 为 *qacE* Δ 1-*sull* 基因 PCR 产物部分测序图。

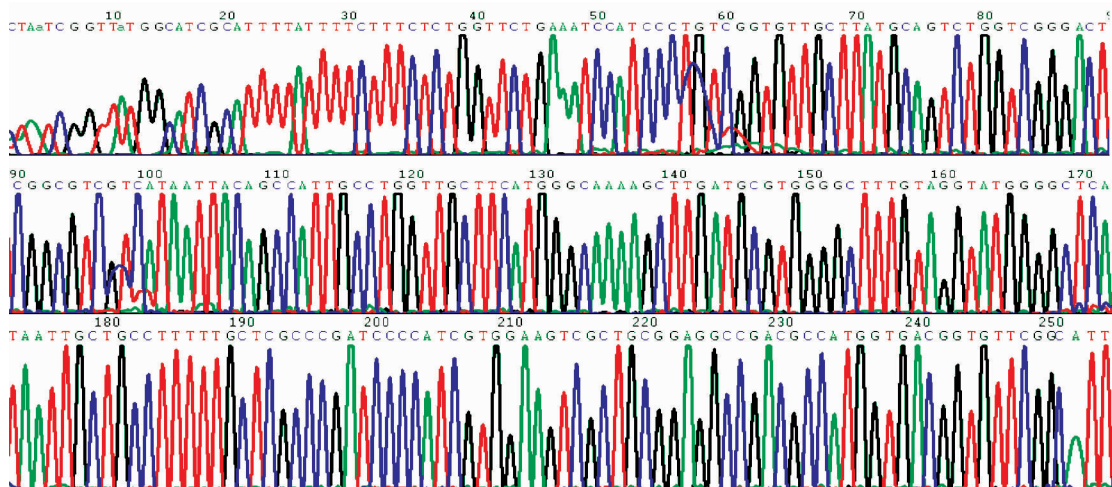


图 1 *qacE* Δ 1-*sull* 基因 PCR 产物部分测序图

Figure 1 Partial sequence map of PCR product of *qacE* Δ 1-*sull* gene

3 讨论

PAE 是医院环境中常见细菌之一, 常定植在不流动的水、空调通风口、插花、各种医疗器具表面以及患者肠道、皮肤上。PAE 为条件致病菌, 正常情况下, 并不感染人体的任何部位。但当人体免疫力降低时(如长期应用肾上腺糖皮质激素、肿瘤化疗、器官移植应用免疫抑制剂、获得性免疫缺陷综合征患者)或严重创伤后(如烧伤、严重复合伤、大型手术后)或医疗操作后(如气管切开、尿道插管和肾透析), PAE 几乎可以感染人体的任何部位。临床表现可为局部化脓性炎症和全身性感染, 其中呼吸道感染、心内膜炎、脑膜炎和败血症等常可危及患者生命。已成为医院感染常见分离菌之一。

近年, 不仅是我国江浙地区学者报道 PAE 临床分离株 *qacE*Δ*1-sull* 基因检出率高^[1-5], 国外也有类似报道^[7-8]。细菌对消毒剂耐药可能是医院感染流行的重要因素之一。本组 30 株多药耐药的 PAE 消毒剂耐药基因阳性率达 43.33%, 与国内江浙地区学者报道^[1-5]相近。同时, 本研究选择的 PAE 已通过其他试验(见该系列文章)证实膜孔蛋白阳性率达 96.67% (29/30), 故碳青霉烯类药物的耐药率较高。

季铵类化合物(Quaternary Ammonium Compounds, *qac*)基因家簇表达细菌多种化合物外排泵(外排消毒剂耐药)。多种化合物种类包括季铵类(苯扎溴铵、苯扎氯铵、度米芬)、双胍类(氯己定)、碱性染料(孔雀石绿)等消毒剂与防腐剂。*qac* 基因家簇已报道的亚型有 *qacA*、*qacB*、*qacC*、*qacD*、*qacE*、*qacE*Δ*1*、*qacF*、*qacG*、*qacH*、*qacJ*。其中 *qacE*Δ*1* 是 *qacE* 的缺失型, *qacE*Δ*1* 位于 I 类整合子的 3' 末端, 并与 *sull* 基因为重叠基因^[1-6]。磺胺的抑菌机制为与对氨基甲酸(PABA)的化学结构相似, 两者竞争二氢叶酸合成酶使二氢叶酸合成减少。细菌额外获得 *sull* 基因所表达二氢叶酸合成酶, 抵消了磺胺与 PABA 竞争性抑制作用, 导致细菌耐磺胺。

国外近年有报道^[9], 氯己定敷料可有效减少血管和硬膜外插管的细菌定植, 并能使插管相关血液和中枢神经系统感染呈减少趋势; 氯己定消毒鼻咽和口咽部位, 可有效地减少心脏手术后医院感染^[10]; 口腔局部使用氯己定或氯己定加多粘菌素消毒, 可降低呼吸机相关肺炎发生率^[11]; 覆有氯己定和磺胺的 II 代导管能有效预防细菌定植及细菌生

物膜形成^[12]; 氯己定与磺胺银敷料用于烧伤科患者创面可预防感染^[13]。鉴于我国 *qacE*Δ*1-sull* 的高检出率, 氯己定/氯己定与磺胺预防感染在我国需要重新评估。最近, 国内学者证明耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)所携带的 *qacA* 还能外排左氧氟沙星和利福平^[14]。*qacE*Δ*1* 基因能否外排抗菌药物值得深入研究。

由于中外均无消毒剂药敏判断标准, 因此, *qacE*Δ*1-sull* 基因检测结果可提示临床细菌耐消毒剂与磺胺, 并提示阳性菌携带 I 类整合子。

苯扎溴铵、苯扎氯铵、氯己定不仅在临床医学诊疗工作中常用, 近年在日化用品中(牙膏、肥皂、洗手液等)也有添加。并在家禽、家畜和食用真菌养殖业中广为使用。虽然我国自上世纪 90 年代已禁止在养殖业中使用孔雀石绿作为防腐剂, 但孔雀石绿在水产养殖业中仍被滥用。近年, 本地区即有“多宝鱼”养殖中滥用抗菌药物和消毒剂事件发生。消毒剂滥用也导致了耐消毒剂菌的产生。

(PCR 引物由无锡市克隆遗传技术研究所糜祖煌老师根据 2008 年 3 月 1 日之前已在 www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide 登录的各种 I 类整合子序列的保守区域完成设计, 并获授权使用)

[参考文献]

- [1] Gu B, Tong M, Zhao W, et al. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1): 241-243.
- [2] Wang C X, Cai P Q, Guo Y, et al. Distribution of the anti-septic-resistance genes *qacE* Δ*1* in 331 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in China[J]. J Hosp Infect, 2007, 66(1): 93-95.
- [3] 王继东, 金辉, 糜祖煌, 等. 医院感染铜绿假单胞菌菌株亲缘性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(12): 1137-1139.
- [4] 金辉, 糜祖煌, 钱小毛, 等. 铜绿假单胞菌耐药基因的分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(2): 134-136.
- [5] 王伟, 王春新. 铜绿假单胞菌氯己定-磺胺基因耐药基因型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(2): 137-138.
- [6] Fluit A C, Schmitz F J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999, 18(11): 761-770.
- [7] Kucken D, Feucht H, Kaulfers P. Association of *qacE* and *qacE*Δ*1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 183(1): 95-98.

本调查结果显示,在 A、B 两组中,发生 VAP 新生儿的胎龄、机械通气患儿中早产儿比率、VAP 新生儿中早产儿比率及预防性使用抗菌药物情况等,两组差异均无显著性($P > 0.05$)。在入院时日龄、使用机械通气原因、基础疾病以及环境条件等均无明显改变的情况下,B 组 VAP 的发生率降至 18.18%,较 A 组(30.00%)明显下降($P < 0.01$)。提示采取干预措施(加强手卫生)后,经操作者手传播的感染显著减少。

B 组新生儿入院后开始使用机械通气的时间明显短于 A 组($P < 0.05$),说明 B 组新生儿入院时病情更严重,需要的干预治疗更多,医院感染高危因素也随之增加。B 组新生儿病情相对复杂,持续使用机械通气时间稍长于 A 组,但由于其 VAP 的发生率明显下降,避免了由于 VAP 而造成的撤机困难、治疗难度增加,其平均住院时间较 A 组仅延长 4.5 d,为新生儿减轻了痛苦,降低了住院费用。研究结果显示^[4-5],使用机械通气时间越长,VAP 的发生率越高;机械通气持续时间的延长是发生 VAP 的独立危险因素。还有研究认为,ICU 内发生 VAP 的患者有 25% 是交叉感染所致,主要是通过不严格的操作引起^[6]。本研究中,B 组的 VAP 发生率理论上应高于 A 组,但是经过合理的手卫生措施干预后,切断了感染传播途径,减少了感染的发生。

B 组使用机械通气后 5 d 内发生 VAP 的比率明显低于 A 组($P < 0.05$),而 NICU 中进行机械通气治疗的新生儿在入院 5 d 内病情多不稳定,需要频繁吸痰,更换气管导管等操作。提示加强手卫生

后,在机械通气 5 d 内由于治疗操作引起的病原菌传播明显减少。

随着 NICU 急救技术的不断提高,侵入性操作随之增加,我们在重视医疗环境、各项消毒隔离措施的同时,更要重视手卫生,避免由于医务人员在诊疗、护理操作过程中而造成经手传播的感染。韩黎等^[7]的调查显示,医务人员在接触患者后的洗手率为 56.5%,明显高于接触患者前及接触物品后手卫生的执行率 35%。我们认为,要提高医务人员对手卫生的依从性,首先应加强培训,强化医务人员对手卫生的认识;同时设置方便使用的、完善的手卫生设施,并加大监督力度,以达到促使医务人员自觉执行手卫生的目的,有效控制医院感染。

[参 考 文 献]

- [1] 周小光,肖昕,农绍汉,等. 新生儿机械通气治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:223-232.
 - [2] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[S]. 北京,2001.
 - [3] 徐秀华. 临床医院感染学[M]. 修订版. 长沙:湖南科学技术出版社,2005:377-384.
 - [4] 孙树梅,李琼,王茵茵,等. 发生呼吸机相关性肺炎的高危因素及病原分析[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(8):882-883.
 - [5] 王美霞,徐建英,段虎斌,等. 呼吸机相关性肺炎的危险因素和临床分析[J]. 山西医学杂志,2007,36(10):945-946.
 - [6] 杨庆,林财珠,王绪绪,等. 呼吸机相关性肺炎的发病因素及相关的预防措施[J]. 国际呼吸杂志,2007,27(12):940-945.
 - [7] 韩黎,朱士俊,郭燕红,等. 中国医务人员执行手卫生的现状调查[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(2):140-142.
-
- (上接第 9 页)
- [8] Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, *et al.* Distribution of the antiseptic-resistance genes qacE and qacE Δ 1 in gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett,1998,159(2):173-178.
 - [9] Ho K M, Litton E. Use of chlorhexidine-impregnated dressing to prevent vascular and epidural catheter colonization and infection: a meta-analysis[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(2):281-287.
 - [10] Segers P, Speekenbrink R G, Ubbink D T, *et al.* Prevention of nosocomial infection in cardiac surgery by decontamination of the nasopharynx and oropharynx with chlorhexidine gluconate: a randomized controlled trial[J]. JAMA,2006,296(20):2460-2466.
 - [11] Craven D E, Duncan R A. Preventing ventilator-associated pneumonia: tiptoeing through a minefield[J]. Am J Respir Crit Care Med,2006,173(12):1297-1298.
 - [12] Heard S O, Wagle M, Vijayakumar E, *et al.* Influence of triple-lumen central venous catheters coated with chlorhexidine and silver sulfadiazine on the incidence of catheter-related bacteremia[J]. Arch Intern Med,1998,158(1):81-87.
 - [13] Fraser J F, Bodman J, Sturgess R, *et al.* An in vitro study of the antimicrobial efficacy of a 1% silver sulphadiazine and 0.2% chlorhexidine digluconate cream, 1% silver sulphadiazine cream and a silver coated dressing[J]. Burns, 2004, 30(1):35-41.
 - [14] 莫晓能,李建国,唐英春,等. 主动外排系统在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌多重耐药中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志,2007,20(1):40-43.