

多重耐药革兰阴性杆菌耐消毒剂基因 *qacE*△1-*sul1* 监测

何晓锋, 刘 芳, 曹晋桂, 张 虎, 吴 楠, 焦力群, 马文杰

(空军总医院, 北京 100142)

[摘要] **目的** 了解某院临床常见革兰阴性(G⁻)杆菌多重耐药株耐消毒剂基因 *qacE*△1-*sul1* 的产生情况。**方法** 收集临床分离的 G⁻ 杆菌 235 株, 包括 155 株多重耐药株和 80 株敏感株, 采用聚合酶链反应 (PCR) 法检测 *qacE*△1-*sul1* 基因, 并进行 DNA 测序。**结果** 在 50 株产超广谱 β-内酰胺酶 (ESBLs) 大肠埃希菌、27 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌、50 株多重耐药的铜绿假单胞菌和 28 株多重耐药的鲍曼不动杆菌中, 检出 *qacE*△1-*sul1* 株分别为 37、24、46、28 株, 检出率分别为 74.00%、88.89%、92.00% 和 100.00%, 总的检出率为 87.10%; 在非产 ESBLs 的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌以及铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌的敏感株 (各 20 株) 中, 分别检出 *qacE*△1-*sul1* 株 16、7、5、13 株, 检出率分别为 80.00%、35.00%、25.00% 和 65.00%, 总的检出率为 51.25%。**结论** 该院 G⁻ 杆菌多重耐药株耐消毒剂基因 *qacE*△1-*sul1* 的携带率较高, 加强多重耐药菌对消毒剂耐药性的监测, 对临床合理使用消毒剂具有重要意义。

[关键词] 革兰阴性杆菌; 多重耐药菌; 耐消毒剂基因; *qacE*△1-*sul1*; 大肠埃希菌; 肺炎克雷伯菌; 铜绿假单胞菌; 鲍曼不动杆菌

[中图分类号] R187 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)02-0097-03

Surveillance on disinfectant-resistant gene *qacE*△1-*sul1* in multidrug-resistant gram-negative bacilli

HE Xiao-feng, LIU Fang, CAO Jin-gui, ZHANG Hu, WU Di, JIAO Li-qun, MA Wen-jie
(The General Hospital of The Air Force P. L. A, Beijing 100142, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the disinfectant-resistant gene *qacE*△1-*sul1* in clinical multidrug-resistant (MDR) gram-negative bacilli. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect disinfectant-resistant gene *qacE*△1-*sul1* in 235 isolates from clinic, including 155 multidrug-resistant and 80 antimicrobial susceptible isolates. PCR products were sequenced by DNA sequencing. **Results** Among 50 strains of ESBLs-producing *Escherichia coli*, 27 ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae*, 50 MDR *Pseudomonas aeruginosa*, and 28 MDR *Acinetobacter baumannii*, disinfectant-resistant gene *qacE*△1-*sul1* were detected in 37 (74.00%), 24 (88.89%), 46 (92.00%) and 28 strains (100.00%), respectively, the total detection rate was 87.10%; Among non-ESBLs-producing antimicrobial susceptible isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* (each were 20 isolates), disinfectant-resistant gene *qacE*△1-*sul1* were detected in 16 (80.00%), 7 (35.00%), 5 (25.00%) and 13 strains (65.00%), respectively, the total detection rate of *qacE*△1-*sul1* gene was 51.25%. **Conclusion** Disinfectant-resistant gene *qacE*△1-*sul1* has a high detection rate in clinical MDR gram-negative bacilli in this hospital, it is important to the rational use of disinfectant by intensifying the monitor on the disinfectant-resistance of MDR.

[Key words] gram-negative bacilli; multidrug-resistant bacteria; disinfectant-resistant gene; *qacE*△1-*sul1*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*

[Chin Infect Control, 2011, 10(2): 97-99]

在革兰阴性(G⁻)杆菌中, 临床常见的多重耐药 肠杆菌科细菌主要有产超广谱 β-内酰胺酶 (extend-

[收稿日期] 2010-08-11

[作者简介] 何晓锋 (1968-), 男 (汉族), 河南省荥阳市人, 副主任医师, 主要从事医院感染管理研究。

[通讯作者] 何晓锋 E-mail: kzhxf@sina.com

ed spectrum beta-lactamase, ESBLs) 的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌以及多重耐药 (multidrug-resistant, MDR) 的鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌等, 表现出对多种抗菌药物耐药, 这些多重耐药菌同时也是医院感染的重要病原菌。因此, 对其耐消毒剂基因进行研究, 在医院感染预防控制方面具有重要意义。笔者对本院 2008 年 1 月—2009 年 12 月检出的部分菌株的耐消毒剂基因 *qacE*Δ1-*sul1* 进行了检测分析, 此部分菌株主要为产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌、多重耐药的鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌等多重耐药株, 同时, 还检测了少量敏感株, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及其来源 产 ESBLs 大肠埃希菌 50 株, 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 27 株, 对头孢他啶、庆大霉素和哌拉西林耐药的铜绿假单胞菌 50 株, 对亚胺培南、庆大霉素和头孢他啶耐药的鲍曼不动杆菌 28 株; 非产 ESBLs 的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌各 20 株, 对头孢他啶、庆大霉素和哌拉西林敏感的铜绿假单胞菌 20 株, 对亚胺培南、庆大霉素和头孢他啶敏感的鲍曼不动杆菌 20 株, 均为空军总医院感染控制科保存菌株。

1.1.2 引物的设计与合成 参考 GenBank 公布的 *qacE*Δ1-*sul1* 基因序列设计引物, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。上游引物: 5'-TAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3'; 下游引物: 5'-ATTCAGAATGCCGAACACCG-3'; 聚合酶链反应 (PCR) 产物为 300 bp。

1.1.3 主要生化试剂及工具酶 蛋白酶 K、PCR Marker、Taq DNA 聚合酶、琼脂糖, 购自北京赛百盛基因技术有限公司。

1.1.4 仪器 9600 型 DNA 扩增仪, 为美国 Perkin Elmer 公司产品; 凝胶成像系统, 为美国 UVP 公司产品; 台式离心机、电泳仪及电泳槽等, 均为国产仪器。

1.2 方法

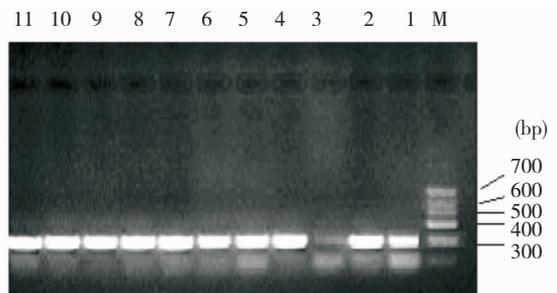
1.2.1 模板制备 挑纯培养菌落置入 0.5 mL 离心管 (内已预置 400 ng/mL 蛋白酶 K 溶液), 56°C 水浴 2 h, 改 95°C 水浴 10 min。15 000 r/min 离心 30 s, 移液器吸取上清液移入另一新的 0.5 mL 离心管作为模板液, 置 -20°C 冰箱备用。

1.2.2 反应体系 反应体积 50 μL, 4 种 dNTPs 的

浓度各为 200 μmol/L, 引物浓度均为 0.6 μmol/L, 含 Taq DNA 聚合酶 2 U, 10 倍的反应缓冲液 5 μL, DNA 模板 4 μL。93°C 预变性 2 min 后, 进行 30 个循环, 每次循环 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1.5 min。30 个循环结束后, 于 72°C 延伸 5 min。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳 30 min, 电压 100 V, 观察结果并测序。

2 结果

2.1 多重耐药菌株中耐消毒剂基因 *qacE*Δ1-*sul1* PCR 扩增结果 在 50 株产 ESBLs 的大肠埃希菌、27 株产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌、50 株耐药的铜绿假单胞菌和 28 株耐药的鲍曼不动杆菌中, 分别检出耐消毒剂基因 *qacE*Δ1-*sul1* 株 37、24、46、28 株, 检出率分别为 74.00%、88.89%、92.00% 和 100.00%, 总的检出率为 87.10%。部分产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的 *qacE*Δ1-*sul1* 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。



M: DNA 分子量标准 (DNA molecular weight marker); 1-2, 4-11: *qacE*Δ1-*sul1* 阳性肺炎克雷伯菌, “3”为 *qacE*Δ1-*sul1* 阴性 (Lane 1-2, 4-11: *qacE*Δ1-*sul1* positive *Klebsiella pneumoniae*; lane 3: *qacE*Δ1-*sul1* negative *Klebsiella pneumoniae*)

图 1 *qacE*Δ1-*sul1* 基因 PCR 电泳图

Figure 1 The electrophoresis map of *qacE*Δ1-*sul1* gene

2.2 敏感菌株中耐消毒剂基因 *qacE*Δ1-*sul1* PCR 扩增结果 在非产 ESBLs 的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌以及铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌的敏感株中, 分别检出耐消毒剂基因 *qacE*Δ1-*sul1* 株 16、7、5、13 株, 检出率分别为 80.00%、35.00%、25.00% 和 65.00%, 总的检出率为 51.25%。

2.3 测序结果 产 ESBLs 的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌以及多重耐药的铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌中的 *qacE*Δ1-*sul1* 基因序列与 GenBank 中细菌

的 *qacE*Δ1-*sul1* 基因高度相似(≥99.0%),并且以上4种多重耐药菌的 *qacE*Δ1-*sul1* 基因序列完全一致。多重耐药的鲍曼不动杆菌 *qacE*Δ1-*sul1* 基因的DNA序列为:GGACTTGCTCCCTCCGTGTATAATCGGTTATGGCATCGCATT TTTATT TTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGT CGGTGTTGCTTATGCAGTCTGGTCGGGACT CGGCGTCGTCATAATTACAGCCATTGCCTG GTTGCTTCATGGGCAAAGCTTGATGCGTG GGGCTTTGTAGGTATGGGGCTCATAATTGC TGCCTTTTTGCTCGCCCGATCCCATCGTGG AAGTCGCTGCGGAGGCCGACGCCATGGTGA, 不含引物共计259 bp。

3 讨论

由于广谱抗菌药物的大量应用,G⁻多重耐药菌所占的比例逐渐上升,已成为医院感染的主要病原菌。对于耐药性细菌,除了临床上应用抗菌药物治疗,使用消毒剂也是控制其播散的重要措施。消毒剂杀灭病原菌的机制包括:改变细菌细胞膜通透性、使菌体蛋白凝固变性以及改变或抑制细菌蛋白与核酸功能基团的活性,通常一种消毒剂对细菌的影响常以其中一方面为主,兼有其他方面的作用^[1-2]。对临床上耐药菌株而言,消毒剂的敏感性可能会降低^[3]。

常用的消毒剂有多种,由于季铵盐类和双胍类消毒剂具有毒性小,稳定性好,且对皮肤黏膜无刺激,对消毒物品无损害等特点,在临床应用十分广泛。但自上世纪50年代起就发现细菌对该类消毒剂出现了耐药现象,到目前为止已经报道的季铵盐类消毒剂耐药基因有:*qacA*、*qacB*、*qacC*(*qacD*、*smr*)、*qacE*、*qacE*Δ1、*qacF*、*qacG*、*qacH*和*qacJ*等9种^[3]。*qac*基因家族可表达细菌针对多种化合物的主动外排泵,从而将季铵盐类、双胍类、碱性染料(孔雀石绿)等消毒剂与防腐剂的化合物排出菌体外,出现对这类消毒剂的耐药。在上述9种耐消毒剂基因中,*qacE*Δ1与二氢叶酸合成酶基因(*sul1*)互为重叠基因,二者组成了I类整合子的3'保守端,*sul1*的存在常导致细菌对磺胺类药物耐药,所以*qacE*Δ1-*sul1*的检测更具有临床意义。本研究发现*qacE*Δ1-*sul1*在本院多重耐药菌中的检出率比较高,总的检出率为87.10%,在多重耐药的鲍曼不动杆菌中甚至高达100.00%,该结果与有关报道^[4-12]接近。通过对4种病原菌的*qacE*Δ1-*sul1*基因序列分析发

现,所采用的引物适合多种细菌,推断不同细菌的*qacE*Δ1-*sul1*基因可能具有高度的同源性。

本实验结果显示,G⁻多重耐药株的*qacE*Δ1-*sul1*基因检出率为87.10%,明显高于敏感株,这可能就是由于*qacE*Δ1基因与*sul1*基因互相重叠的结果。具体到每一种菌,*qacE*Δ1-*sul1*基因的携带情况有很大差异,例如20株非产ESBLs的大肠埃希菌中,*qacE*Δ1-*sul1*基因检出率就高达80.00%,高于产ESBLs株,下一步需要扩大样本量进行深入研究。

对于临床检测出携带*qac*基因的病原菌,并非就不能使用季铵盐类或双胍类消毒剂,但有可能造成低浓度情况下消毒无效。因此,加强多重耐药菌对消毒剂耐药性的监测,对临床合理使用消毒剂具有重要的现实意义。

[参考文献]

- [1] Maillard J Y. Bacterial target sites for biocide action[J]. J Appl Microbiol, 2002, 92(Supp 1): 16S - 27S.
- [2] McDonnell G, Russell A D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 1999, 12(1): 147 - 179.
- [3] 徐峰倩. 卤类、醛类消毒剂对产诱导型β-内酰胺酶菌株的敏感性观察[J]. 中国感染控制杂志, 2005, 4(3): 265 - 266.
- [4] 钱小毛, 糜祖煌, 金海勇. 鲍氏不动杆菌流行株耐药基因及菌株亲缘性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(16): 2082 - 2084.
- [5] 许小敏, 毛联钢, 金春光, 等. 烧伤病房鲍曼不动杆菌分离株消毒剂-磺胺耐药基因研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1197 - 1199.
- [6] 王继东, 周丽珍, 钱小毛. 大肠埃希菌连续分离株对消毒剂-磺胺耐药基因的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2007, 24(4): 331 - 333.
- [7] 乔响, 张珏, 迟令侃. 社区及院内感染产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌耐药及耐消毒剂基因分析[J]. 检验医学, 2008, 23(3): 220 - 224.
- [8] 唐丽凤, 王继东, 周丽珍. 肺炎克雷伯菌连续分离株耐药性及I类整合子遗传标记研究[J]. 现代实用医学, 2007, 19(6): 432 - 433.
- [9] 金法祥, 钟建平, 李水法. 老年病区肺炎克雷伯菌分离株消毒剂-磺胺耐药基因携带情况的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2009, 26(2): 147 - 149.
- [10] 王春新, 王继东, 蔡培泉, 等. 国内9家医院铜绿假单胞菌消毒剂-磺胺耐药基因的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(12): 733 - 735.
- [11] 常东, 蒋伟, 于勇, 等. 多药耐药铜绿假单胞菌对β-内酰胺类、氨基糖苷类、消毒剂耐药相关基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(2): 154 - 156.
- [12] 邓笑伟, 刘长庭. 嗜麦芽芽生单胞菌耐消毒剂-磺胺基因和I类整合酶基因的研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5): 369 - 371.