

多重耐药铜绿假单胞菌对氨基糖苷类药物耐药研究

周贵平¹, 阴 晴²(1. 江苏省宜兴市第二人民医院检验科 214221, 2. 江苏大学附属医院检验科 212001)

【摘要】 目的 探讨宜兴市第二人民医院临床分离多重耐药铜绿假单胞菌与氨基糖苷类抗菌药物的表型与基因型的关系,为临床抗感染治疗提供依据。**方法** 采用琼脂纸片扩散(K-B)法对临床分离的铜绿假单胞菌进行药敏试验,选出 34 株多重耐药菌株,用聚合酶链反应(PCR)法检测氨基糖苷类修饰酶基因。**结果** 氨基糖苷类修饰酶基因 aac(3)-Ⅱ、ant(2′)-Ⅰ、ant(3′)-Ⅰ、aac(6′)-Ⅱ、aac(6′)-Ⅰ 检出阳性率分别为 85.3%、44.1%、17.6%、11.8%、5.9%。对庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、奈替米星的耐药率分别为 91.18%、44.12%、88.24%、85.29%。**结论** 多重耐药铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药程度不同,临床应根据药敏结果选择用药,以减少耐药菌株的产生,控制院内感染。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 氨基糖苷类抗菌药物; 多重耐药

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.04.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)04-0405-02

Study on aminoglycoside-modifying enzyme genes in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa ZHOU Gui-ping¹, YIN Qing² (1. Department of Clinical Laboratory, Yixing Second People's Hospital, Yixing, Jiangsu 214221, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between drug resistance pattern and aminoglycoside-modifying enzyme genes expressions in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa, so as to provide reference for clinical therapy. **Methods** Antimicrobial susceptibility was evaluated by disk diffusion test(K-B method). Five aminoglycoside-modifying enzyme genes carried on multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa were detected by polymerase chain reaction method(PCR). **Results** The positive rate of aminoglycoside-modifying enzyme genes aac(3)-Ⅱ, ant(2′)-Ⅰ, ant(3′)-Ⅰ, aac(6′)-Ⅱ, aac(6′)-Ⅰ expression was 85.3%, 44.1%, 17.6%, 11.8% and 5.9%, respectively. Thirty-four isolates resistant to gentamicin, amikacin, tobramycin and netilmicin was 91.18%, 44.12%, 88.24% and 85.29%, respectively. **Conclusion** The resistant rate to aminoglycosides in Pseudomonas aeruginosa is different. Doctors should select antimicrobials according to drug susceptibility.

【Key words】 Pseudomonas aeruginosa; aminoglycoside; multidrug-resistant

临床常用抗假单胞菌 β-内酰胺类联合氨基苷类治疗铜绿假单胞菌(PA)感染。随着氨基糖苷类药物的广泛使用,其耐药率也在不断升高。铜绿假单胞菌与氨基糖苷类药物耐药和氨基糖苷类药物修饰酶的产生密切相关,而编码氨基糖苷类药物修饰酶的基因通常存在于质粒和转座子,容易引起水平传播^[1-2]。为了解本地区临床分离的铜绿假单胞菌的耐药机制,作者对 34 株多重耐药 PA 的氨基糖苷类药物耐药表型及其耐药基因进行了检测与分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及细菌鉴定 34 株铜绿假单胞菌来自江苏省宜兴市第二人民医院 2006~2009 年临床送检的痰液、尿液、脓液等标本。细菌的分离与鉴定参照《全国临床检验操作规程》第 3 版,并经 VITEK GNI+ 鉴定卡鉴定。标准菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 仪器和材料 VITEK32 型全自动微生物鉴定药敏测试仪及配套鉴定卡、温箱、低温冰箱、PCR 扩增仪和电泳仪等。MH 琼脂为 OXIDE 公司产品, TaKaRa DR001A Tag 酶为上海(大连)宝生公司产品; Mark 为 TaKaRa 公司产品; 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3 药敏试验及药敏纸片 采用琼脂纸片扩散(K-B)法对临床分离的铜绿假单胞菌进行 3 种药敏试验。根据 CLSI 2005 年版标准规定的临界值判读药敏结果。药敏纸片阿米卡星

(AMK)、庆大霉素(GEN)、妥布霉素(TOB)、奈替米星(NET)购自北京天坛药物生物有限公司。

1.4 耐药基因检测

1.4.1 模板 DNA 提取 挑纯培养细菌菌落少许置入 50 μL 灭菌水中,置 100 ℃ 水浴 10 min, 8 000 r/min 离心 30 s, 上清液即为 DNA 模板液。根据文献^[1-2]和基因库检索,设计引物序列见表 1。

表 1 耐药基因引物序列

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
aac(6′)-Ⅰ	P1:TAT GAG TGG CTA AAT CGA T	394
	P2:CCC GCT TTC TCG TAG CA	
aac(6′)-Ⅱ	P1:TTC ATG TCC GCG AGC ACC CC	178
	P2:GAC TCT TCC GCC ATC GCT CT	
ant(3′)-Ⅰ	P1:TGA TTT GCT GGT TAC GGT GAC	284
	P2:CGC TAT GTT CTC TTG CTT TTG	
ant(2′)-Ⅰ	P1:GAG CGA AAT CTG CCG CTC TGG	320
	P2:CTG TTA CAA CGG ACT GGC CGC	
aac(3)-Ⅱ	P1:ACT GTG ATG GGA TAC GCG TC	237
	P2:CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA	

1.4.2 基因扩增 反应体系为:10×PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTP 2 μL,P1 和 P2 各 0.5 μL,TaqDNA 聚合酶 1 U,扩增模板液 0.5 μL,反应体系 25 μL。热循环参数为:94℃ 预变性 5 min,然后按 94℃ 1 min→55℃ 45 s→72℃ 1 min,共 35 个循环,纯水为阴性对照;取反应管内液体 5 μL 与 1 μL 电泳指示剂混匀,点样于 1.2% 琼脂糖凝胶,以 100 V 电压电泳 30 min 后,EB 染色,在紫外光下观察结果。

2 结 果

2.1 34 株 PA 对 4 种氨基糖苷类药物阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、奈替米星的耐药情况见表 2。

2.2 氨基糖苷类修饰酶基因检测结果 多重耐药 PA 对氨基糖苷类药物的耐药基因 aac(3)-Ⅱ、ant(2′)-Ⅰ、ant(3′)-Ⅰ、aac

(6′)-Ⅱ、aac(6′)-Ⅰ 检出阳性率分别为 85.3%、44.1%、17.6%、11.8%、5.9%。

2.3 多重耐药 PA 的基因型与 4 种氨基糖苷类药物敏感性的关系 见表 3。

表 2 34 株铜绿假单胞菌对 4 种抗菌药物的药敏结果[n(%)]

抗菌药物	耐药	中介	敏感
GEN	31(91.18)	0(0.00)	3(8.82)
AMK	15(44.12)	3(8.82)	16(47.06)
TOB	30(88.24)	0(0.00)	4(11.76)
NET	29(85.29)	0(0.00)	5(14.71)

表 3 多重耐药 PA 的基因型与 4 种氨基糖苷类药物敏感性的关系

组别	aac(3)-Ⅱ	ant(2′)-Ⅰ	ant(3′)-Ⅰ	aac(6′)-Ⅱ	aac(6′)-Ⅰ	GEN(敏感株/ 表型株)	AMK(敏感株/ 表型株)	TOB(敏感株/ 表型株)	NET(敏感株/ 表型株)
表型 1	—	—	—	—	—	3/4	4/4	3/4	3/4
表型 2	+	+	+	+	—	0/4	1/4	1/4	1/4
表型 3	+	—	—	—	—	0/13	10/13	0/13	0/13
表型 4	+	—	+	—	—	0/1	1/1	0/1	0/1
表型 5	+	—	—	—	+	0/1	0/1	0/1	0/1
表型 6	—	+	+	—	+	0/1	0/1	0/1	1/1
表型 7	+	+	—	—	+	0/1	0/1	0/1	0/1
表型 8	+	+	—	—	—	0/9	0/9	0/9	0/9

注: + 表示基因检出阳性, — 表示基因检出阴性。

3 讨 论

铜绿假单胞菌是医院获得性感染的重要条件致病菌,近年来,其临床标本分离率居首位且对 3 类或 3 类以上抗菌药物表现耐药的多重耐药的 PA 不断增加,特别是近年来出现了对所有抗菌药物全部耐药的严重多重耐药菌,给临床的感染控制带来了巨大困难,对多重耐药菌耐药特征的研究成了人们关注的热点^[3-8]。

PA 的耐药机制非常复杂,几乎涵盖了所有的耐药机制,细菌对氨基糖苷类药物耐药是因为其产氨基糖苷类修饰酶、细菌 16SrRNA 基因甲基化酶(编码基因 rmtA)和氨基糖苷类抗菌药物作用靶位 16SrRNA 基因突变而致,其中前者为主要原因^[9]。本研究中 34 株 PA 对庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、奈替米星的耐药率分别为 91.18%、44.12%、88.24%、85.29%。共检出氨基糖苷类修饰酶基因 aac(3)-Ⅱ、ant(2′)-Ⅰ、ant(3′)-Ⅰ、aac(6′)-Ⅱ、aac(6′)-Ⅰ,阳性率分别为 85.3%、44.1%、17.6%、11.8%、5.9%,可见本院多重耐药性铜绿假单胞菌对氨基糖苷类药物高度耐药,主要与 aac(3)-Ⅱ、ant(2′)-Ⅰ 基因有关,这与有关报道有一定差异^[1]。同时从其耐药表型与耐药基因检测结果可以看出,表型与基因型存在一定关系,菌株携带的耐药基因种类越多,其耐药程度越高。从药敏结果可以看出,对庆大霉素敏感,往往对阿米卡星、妥布霉素、奈替米星敏感,反之则不成立。对阿米卡星耐药,同时对妥布霉素、奈替米星、庆大霉素也耐药,反之则不成立。多重耐药铜绿假单胞菌对 4 种氨基糖苷类药物的耐药程度不同,阿米卡星是治疗本院多重耐药铜绿假单胞菌最有效的氨基糖苷类药物。

参考文献

[1] 史伟峰,王玉月,何彩珍,等.铜绿假单胞菌氨基糖苷类药物修饰酶基因研究[J].检验医学,2007,22(1):67-70.

[2] 王继东,王晓岚,周丽珍,等.医院感染铜绿假单胞菌对抗菌药物多重耐药基因的研究[J].医院感染控制杂志,2007,6(2):77-82.

[3] Szabó D,Szentandrassy J,Juhász Z,et al.Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary[J].Ann Clin Microbiol Antimicrob,2008,7:12.

[4] Gutierrez O,Juan C,Cercenado E,et al.Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *pseudomonas aeruginosa* isolates from spanish hospitals[J].Antimicrob Agents Chemother,2007,51(12):4329-4335.

[5] Aloush V,Navon-Venezia S,Seigman-Igra Y,et al.Multi-drug-resistant *pseudomonas aeruginosa*; risk factors and clinical impact[J].Antimicrob Agents Chemother,2006,50(1):43-48.

[6] Reinhardt A,Kehler T,Wood P,et al.Development and persistence of antimicrobial resistance in *pseudomonas aeruginosa*; a longitudinal observation in mechanically ventilated patients[J].Antimicrob Agents Chemother,2007,51(4):1341-1350.

(下转第 408 页)

187 例 HFMD 患儿治疗前与治疗后的心肌酶谱各指标比较,AST 差异无统计学意义($P>0.05$);LDH、CK、CK-MB 差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

1957 年新西兰首次报道 HFMD。我国于 1981 年上海首次报道本病。此后,各省份均有本病报道。HFMD 是由肠道病毒[以柯萨奇 A 组 16 型(CoxA16)、肠道病毒 71 型(EV71)多见]引起的急性传染病,多发生于学龄前儿童,尤以 3 岁以下年龄组发病率最高。患者和隐性感染者均为传染源,主要通过消化道、呼吸道和密切接触等途径传播。主要症状表现为手、足、口腔等部位的斑丘疹、疱疹,以每年 5~7 月为发病高峰,四季均可见散发病例。HFMD 传染性强,可在短期内造成大流行,一般病程短而轻,多在 1 周内痊愈。多数预后良好,少数病例可出现脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎、肺水肿、循环障碍等,多由 EV71 感染引起。2008 年 5 月 2 日卫生部正式将 HFMD 纳入丙级传染病管理,加强了对本病的认识、研究和管理。有报道,该病不仅可引起心肌损害,亦有并发暴发性心肌炎导致死亡的报道。2000 年王晓华^[3]报道 HFMD 1 698 例,3 例死于暴发性心肌炎。研究表明, HFMD 严重期,心肌酶谱明显升高,其升高的程度与疾病严重程度呈正比,与预后密切相关^[4]。本组实验提示 HFMD 患儿 AST、LDH、CK、CK-MB 与对照组健康体检儿童相比差异有统计学意义,心电图提示窦性心动过速 124 例,占 66.3%,心肌较易受到侵犯,而心电图不一定有异常,因为心肌损害首先表现为心肌酶谱的改变,当达到一定程度时才出现心电生理紊乱,才表现为心电图异常。本组全部病例均无自觉胸闷、气短、心前区不适、心慌、苍白、发绀、肢体湿冷、血压下降、心音改变(心尖区第一可减低或分裂、杂音等)、心律失常(如奔马律等)、心力衰竭表现,无心脏扩大的影像表现,均未达到心肌炎诊断标准。患儿发病期与恢复期的心肌酶谱比较 AST 差异无统计学意义,LDH、CK、CK-MB 差异有统计学意义。当心肌细胞损伤时,胞浆酶 AST、LDH、CK、CK-MB 释放入血,这时检验血清心肌酶谱会升高。AST 广泛分布于人体各组织、器官中,主要在心、肝、骨骼肌、肾、胰、脾、肺、红细胞中,其中以心肌细胞含量最丰富。LDH 广泛存在于以心、肾、骨骼肌为主的人体组织内,二者特异性不高;CK、CK-MB 在心肌损伤 2~6 h 开始升高,比其他酶出现早,并迅速升至高峰,2 周左右即可恢复正常^[5],其中 CK 在骨骼肌中最多,其次是心肌,脑和平滑肌等组织中也有分布;而 CK-MB 是特异性同工酶,在心肌细胞中含量高,具有较高的特异性和敏感性,故它的升高可作为心肌损伤早期诊断。HFMD 引起心肌酶谱升高可能与下列因素有关:(1)病毒感染直接作用导致心肌细胞坏死和炎症细胞反应;(2)机体免疫反应可加剧心肌细胞的损伤;二者使得心肌细胞内酶的释放。LDH、CK、CK-MB 是目前常用

的与心肌损害有关的酶学检查,其中 CK-MB 是心肌特异性同工酶,在心肌细胞中含量最高,正常血清中含量极微,当心肌细胞受损时释放入血,对判断心肌损害有高度特异性^[6]。本组资料显示, HFMD 急性期心肌酶谱明显升高,而治疗后随体温降至正常,皮疹消退而酶下降。本组资料无 1 例死亡,亦无并发心肌炎病例,考虑本组患儿为普通病例,而且与在给予中药、抗感染和支持治疗基础上早期给予抗病毒,营养心肌(VitC、辅酶 Q10、VitE、1,6-二磷酸果糖等)治疗,减少心肌损害有关。本组资料表明,对 HFMD 患儿严密观察心脏体征,对合并心肌损害早期发现,并予保护心肌、促进损伤心肌细胞迅速恢复正常功能,对预后起重要作用^[7]。

一旦发现感染 HFMD,则应将患儿隔离,以免传染他人引起流行蔓延,应适当休息,清淡饮食,做好口腔和皮肤护理。如出现心肌酶升高,要提高警惕,应尽早行胸片、心电图等检查以避免延误最佳治疗时机^[8]。同时可给予营养心肌药物以防止心肌损伤进一步加重或并发心肌炎。预防本病的传播流行主要是及时发现并隔离患儿,对污染的日常用品,食具、玩具、洁具等进行消毒处理,切断传播途径。并做好环境卫生、食品卫生和个人卫生。同时加强疫情报告,在疾病流行期间家长应尽量少让幼儿出现在拥挤的公共场所,以减少被感染的机会,控制疾病的流行。

参考文献

[1] 韩文宁,李锦亮. 62 例手足口病患儿心肌酶谱及心电图改变临床分析[J]. 中国社区医师:综合版,2009,11(8):97.

[2] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南[J]. 中华实验和临床感染病杂志,2008,2(3):210-213.

[3] 王晓华. 小儿手足口病 1 698 例分析[J]. 中华传染病杂志,2002,20(4):242.

[4] 李兰娟. 手足口病[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2008:62.

[5] 吴冬梅. 34 例小儿病毒性心肌炎的心肌酶谱和 T 淋巴细胞群的分析[J]. 山西医学院学报,1996,27(4):14.

[6] 肖曙芳,刘益林,杨芸风,等. 58 例婴幼儿轮状病毒性肠炎心肌酶测定及临床意义[J]. 临床儿科杂志,1999,17(4):224.

[7] 马沛然,王伟. 手足口病并发心肌炎的诊治[J]. 山东医药,2008,48(17):112.

[8] 刘跃,吴智娟. 小儿手足病 172 例临床分析[J]. 检验医学与临床,2007,4(2):127-128.

(收稿日期:2010-09-06)

(上接第 406 页)

[7] Doi Y, Ghilardi A, Adams J, et al. High prevalence of metallo-β-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant pseudomonas aeruginosa Isolates in brazil [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(9):3388-3390.

[8] Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, et al. Pseudomonas aeruginosa may accumulate drug resistance

mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(10):3531-3536.

[9] 陈裕胜,吴晓琴,林材元,等. 铜绿假单胞菌感染的临床分布及耐药性变迁[J]. 检验医学与临床,2009,6(11):852-853.

(收稿日期:2010-08-19)