

多耐药铜绿假单胞菌抗药基因检测及对常用消毒剂的抗性分析*

栾耀芳¹, 王冠², 王婧男¹, 李稳¹, 张苗¹ (山东中医药大学附属医院: 1. 检验科; 2. 周围血管科, 济南 250011)

【摘要】 目的 了解临床分离的多耐药铜绿假单胞菌携带抗药基因 *qacE Δ 1-sul 1* (消毒剂-磺胺复合基因) 情况及对常用消毒剂抗性水平。方法 采用聚合酶链反应 (PCR) 法和悬液定量杀菌试验分别检测临床分离的多耐药铜绿假单胞菌 *qacE Δ 1-sul 1* 基因和对三氯异氰尿酸、聚维酮碘、戊二醛的抗性 (杀灭率)。结果 临床分离的 10 株多耐药铜绿假单胞菌中 6 株 *qacE Δ 1-sul 1* 基因阳性, 4 株阴性。浓度为 125 mg/L 的三氯异氰尿酸溶液作用 1 min 的杀灭率为 99.63%~100.00%; 浓度为 250 mg/L 的三氯异氰尿酸溶液作用 1 min 的杀灭率为 99.81%~100.00%; 浓度为 125、250 mg/L 的三氯异氰尿酸溶液作用 3、5 min 的杀灭率及浓度为 500 mg/L 时作用 1、3、5 min 的杀灭率均为 100.00%。有效碘浓度为 125 mg/L 的聚维酮碘溶液作用 0.5 min 的杀灭率为 99.91%~100.00%, 该浓度作用 1、3 min 的杀灭率和浓度分别为 250、500 mg/L 时作用 0.5、1、3 min 的杀灭率均达 100.00%。浓度为 250 mg/L 的戊二醛溶液作用 1 min 的杀灭率为 65.46%~99.75%; 浓度为 500 mg/L 的戊二醛溶液作用 1 min 的杀灭率为 99.84%~100.00%, 这两种浓度的戊二醛溶液作用 3、5 min 的杀灭率均达 100.00%。结论 多耐药铜绿假单胞菌抗药基因 *qacE Δ 1-sul 1* 携带率较高, 本研究显示消毒剂正确运用对多耐药铜绿假单胞菌能起到较好的杀灭效果。

【关键词】 多耐药铜绿假单胞菌; *qacE Δ 1-sul 1*; 悬液定量杀菌试验; 杀灭率

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.16.007 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)16-2207-03

Analysis on the detection of resistance gene and resistance to common disinfectants of multidrug resistance pseudomonas aeruginosa* LUAN Yao-fang¹, WANG Guan², WANG Jing-nan¹, LI Wen¹, ZHANG Miao¹ (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Peripheral Vascular, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250011, China)

【Abstract】 **Objective** To get a general view about drug-resistant gene *qacE Δ 1-sul 1* (disinfectant-sulfanilamide compound gene) carried by multidrug resistance pseudomonas aeruginosa collected from clinic, and the resistant level against common disinfectants. **Methods** PCR (polymerase chain reaction) and suspension quantitative germicidal test were selected to study resistance (killing rate) of gene *qacE Δ 1-sul 1* carried by multidrug resistance pseudomonas aeruginosa to trichloroisocyanuric acid, iodophor, and glutaraldehyde. **Results** 6 of 10 strains of multidrug resistance pseudomonas aeruginosa collected from clinic were *qacE Δ 1-sul 1* positive strains. The others were negative. The killing rate of 125 mg/L trichloroisocyanuric acid affected 1 minute was 99.63%–100.00%. The killing rate of 250 mg/L trichloroisocyanuric acid affected 1 minute was 99.81%–100.00%. The killing rate of the two solutions above affected 3 minutes and 5 minutes and the solution of 500 mg/L affected 1, 3, 5 minutes were all 100%. The killing rate of solutions with effective iodine content of 125 mg/L affected 0.5 minute was 99.91%–100.00%. The solution above affected 1 minute and 3 minute along with the 250 mg/L and 500 mg/L solutions affected 0.5, 1, 3 minutes, the killing rate were all 100%. The killing rate of 250 mg/L glutaraldehyde affected 1 minute was 65.46%–99.75%, that of 500 mg/L solution affected 1 minute was 99.84%–100.00%. Both of the solutions above affected 3 minutes and 5 minutes were 100% effective. **Conclusion** There's a high carrying rate of gene *qacE Δ 1-sul 1* by multidrug resistance pseudomonas aeruginosa. The research shows the proper use of the disinfectants can receive a good result of killing multidrug resistance pseudomonas aeruginosa.

【Key words】 multidrug resistance pseudomonas aeruginosa; drug-resistant gene *qacE Δ 1-sul 1*; suspension quantitative germicidal test; killing rate

* 基金项目: 中华医院感染控制研究基金资助项目 (ZHYY 12-025)。

作者简介: 栾耀芳, 女, 本科, 副主任技师, 主要从事临床微生物工作。△ 通讯作者, E-mail: yaofang.l@163.com。

近些年,随着抗菌药物的大量及不规范使用,铜绿假单胞菌的耐药性不断增强,多耐药铜绿假单胞菌的检出率越来越高,给治疗带来很大困难^[1]。不仅如此,消毒产品的使用,也使细菌对某些消毒剂产生抗性,容易造成环境消毒失败,导致医院感染暴发。为了解本院分离的多耐药(部分泛耐药)铜绿假单胞菌 qacE Δ 1-sul 1 的携带情况及对常用消毒剂三氯异氰尿酸、聚维酮碘、戊二醛的体外抗性,作者进行了铜绿假单胞菌 I 类整合子 qacE Δ 1-sul 1 的检测及上述 3 种消毒剂对 10 株多耐药铜绿假单胞菌的杀灭率检测,现将结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集 2012 年 1 月至 2013 年 3 月住院患者痰液、尿液、分泌物及血液标本中分离的多耐药铜绿假单胞菌 10 株(剔除同一患者同一部位细菌),经 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定/药敏分析系统鉴定(舒普深、美洛培南运用 K-B 法,纸片购自英国 Oxoid 公司)。质控菌株:铜绿假单胞菌 ATCC27853,产酸克雷伯 ATCC \circ R700324。

1.2 仪器 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定/药敏分析系统(法国梅里埃公司);PTC-200 PCR 仪(Bio-Rad 公司);AlphaImagerTM2200 型凝胶成像仪(Alpha 公司)。

1.3 试剂

1.3.1 利尔康泡腾消毒片 II 型 批号:130109,有效期至 2015 年 1 月 8 日,有效成分:三氯异氰尿酸,有效氯浓度:每片(500 \pm 50)mg。

1.3.2 利尔康牌聚维酮碘消毒液 批号:130121A,有效期至 2015 年 1 月 20 日,有效碘浓度:4.5~5.5 g/L。

1.3.3 2%强化戊二醛消毒液 批号:130322,有效期至 2015 年 3 月 21 日,戊二醛浓度:(2.2 \pm 0.2)%。

1.3.4 中和剂 购自百博生物技术有限责任公司。

1.4 方法

1.4.1 细菌悬液配制 取培养 24 h 的纯菌落,以磷酸缓冲液制备浓度为(1~1.5) \times 10⁸ cfu/mL 菌悬液备用。

1.4.2 消毒液配制 按消毒剂有效浓度分别以无菌硬水配制不同浓度消毒剂(试验前新鲜配制)。

1.4.3 中和剂选择试验 根据中华人民共和国国家标准《消毒与灭菌效果的评价方法与标准 GB15981-1995》要求,确认购自百博生物技术有限责任公司的碘中和剂、氯中和剂、醛类中和剂能够满足要求。

1.4.4 耐药基因检测 根据 GenBank 公布的耐药基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件自行设计引物,引物 qacE Δ 1-sul 1 P1:5'-TAG CGA GGG CTT TAC TAA GC-3'; P2:5'-ATT CAG AAT GCC GAA CAC CG-3'。其扩增后产物长度 300 bp^[2-4]。细菌 DNA 提取:按 OMEGA 公司提供试剂盒操作。基因扩增采用 PCR 法,反应体系:10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Plus)5 μ L, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μ L, rTaq(5 U/ μ L)0.25 μ L, DNA 模板 100 ng,上游引物(5 μ mol/L)4 μ L,下游引物(5 μ mol/L)4 μ L, 无菌水补足至 50 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,55 $^{\circ}$ C 退火 20 s(每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 总延伸 5 min。产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下观察结果。

1.4.5 悬液定量杀菌试验 按照中华人民共和国国家标准

《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》附录 C“消毒剂定量消毒试验”方法进行。

2 结果

2.1 细菌耐药状况 10 株多耐药铜绿假单胞菌对 16 种抗菌药物的耐药状况见表 1。

2.2 抗药基因检测结果 10 株临床分离的多耐药铜绿假单胞菌抗药基因 qacE Δ 1-sul 1 PCR 产物电泳结果见图 1。其中菌株编号为 P2、P12、P13 标本有很强的扩增;P6、P10、P11 扩增稍弱,但仍能看到明显的目的带;P3、P4、P9、P14 标本无扩增。

表 1 10 株多耐药铜绿假单胞菌耐药状况

抗菌药物	P2	P3	P4	P6	P9	P10	P11	P12	P13	P14
头孢哌酮/舒巴坦	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I
哌拉西林/他唑巴坦	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
阿米卡星	R	R	R	S	I	R	R	S	R	S
氨基南	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
头孢吡肟	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S
头孢哌酮	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
头孢他啶	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
头孢曲松	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
庆大霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
亚胺培南	I	I	I	I	R	I	I	R	R	R
哌拉西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
美洛培南	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
替卡西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
替卡西林/棒酸	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
妥布霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
左氧沙星	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

注:S 表示敏感;I 表示中介;R 表示耐药。

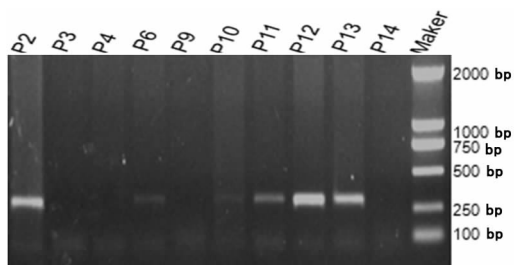


图 1 10 株多耐药铜绿假单胞菌 qacE Δ 1-sul 1 基因 PCR 产物电泳图

2.3 悬液定量杀菌试验结果

2.3.1 三氯异氰尿酸试验 结果表明,浓度为 125 mg/L 的三氯异氰尿酸溶液作用 1 min 的杀灭率为 99.63%~100.00%;浓度为 250 mg/L 的三氯异氰尿酸溶液作用 1 min 的杀灭率为 99.81%~100.00%;浓度为 125、250 mg/L 的三氯异氰尿酸溶液作用 3、5 min 的杀灭率及浓度为 500 mg/L 时溶液作用 1、3、5 min 的杀灭率均为 100.00%。

2.3.2 聚维酮碘试验 结果表明,有效碘浓度为 125 mg/L 的聚维酮碘溶液作用 0.5 min 的杀灭率为 99.91%~

100.00%，其作用 1、3 min 和浓度分别为 250、500 mg/L 作用 0.5、1、3 min 的杀灭率均达 100.00%。

2.3.3 戊二醛试验 结果表明，浓度为 250 mg/L 的戊二醛溶液作用 1 min 的杀灭率为 65.46%~99.75%；浓度为 500 mg/L 的戊二醛溶液作用 1 min 的杀灭率为 99.84%~100.00%，这两种浓度作用 3 min 和 5 min 的杀灭率均达 100.00%。

3 讨论

铜绿假单胞菌分布范围广，生存能力强，长期应用激素、免疫制剂，进行化疗、放疗等导致患者免疫功能低下，以及手术后或某些侵入性操作下的患者易感染该菌^[5]。加上广谱抗菌药物的大量和不合理使用，铜绿假单胞菌对多种抗菌药物产生了耐药性，给临床治疗带来很大困难，为有效控制医院感染，消毒剂的合理正确使用必不可少。但因消毒剂的使用已有相当长的历史，如同细菌对抗菌药物的耐药性一样，长时间接触同一种(类)消毒剂的细菌会对该类消毒剂产生抵抗力，即产生抗性^[6]。文献报道多种细菌 qacE Δ 1-sul 1 基因携带率高^[2,7]。因此，及时了解细菌对消毒剂的抗性，科学选择、使用消毒产品，避免消毒失败，对医院感染控制意义重大。

研究发现，qac 基因家族已有 A、B、C、D、E、E Δ 1、F、G、H、J 10 种，可以表达多种化合物外排泵(multidrug efflux pump)。qacE Δ 1 为消毒剂耐药基因，是 qacE 基因的截断衍生物，由整合子介导，可被革兰阳性和革兰阴性菌广为获取，其表达产物可使多种化合物排出胞外，赋予细菌对季铵类化合物的耐药性。sul 1 为二氢蝶酸合成酶的编码基因，阳性提示细菌对磺胺类药物耐受^[8]。本研究显示，10 株多耐药铜绿假单胞菌 qacE Δ 1-sul 1 基因携带率较高(60%)，提示在医院感染中占重要地位的多耐药铜绿假单胞菌对季铵类消毒剂已产生耐受性，此类消毒剂用于多耐药铜绿假单胞菌的感染控制消毒已不合适。

本研究还表明，虽然多耐药铜绿假单胞菌 qacE Δ 1-sul 1 基因携带率较高，但对该研究中涉及的含氯消毒剂、聚维酮碘、戊二醛没有表现出抗药性，低浓度的含氯消毒剂和含碘消毒剂作用 1 min 均能达到满意效果；而戊二醛相较其他两种消毒剂作用 1 min 时间的效果稍差，需要延长或增加浓度，本研究所试浓度在 3 min 的杀灭率均可达 100.00%^[9]。因此，在日

常工作中应按照消毒剂说明书的使用剂量和使用范围对医院感染菌进行消毒，避免滥用及用量不足，科学、合理、有效使用消毒剂，才能确保消毒效果^[10]。

参考文献

- [1] 赵祝香,陈惠玲,赵子文,等. 2007~2010 年铜绿假单胞菌感染分布及耐药性变迁分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(14):1667-1668.
- [2] 侯明玖,曾明,侯伶俐,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐消毒剂、灭菌剂基因研究[J]. 长江大学学报:自科版医学卷, 2012,9(4):62-64.
- [3] 徐燕,吴晓松,谈智,等. 鲍曼不动杆菌抗药基因检测及对消毒剂抗性研究[J]. 中国消毒学杂志, 2008, 25(4): 341-343.
- [4] 余琳,江风茹,卢鉴财,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 OXA-23 基因与 qacE Δ I 基因检测的研究[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(15):1793-1794.
- [5] 王玉月,史伟峰,朱永华,等. 铜绿假单胞菌对 5 种消毒剂抗性的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(12): 1717-1719.
- [6] 叶慧芬,杨银梅,陈慧玲,等. 2001 年广州地区常见病原菌耐药性调查[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(10): 602-605.
- [7] 张玉云,吴金英,范小莉,等. 铜绿假单胞菌耐消毒剂基因检测及对消毒剂抗性研究[J]. 实用预防医学, 2008, 15(6):1697-1699.
- [8] 周月清,陆开来. 鲍氏不动杆菌耐消毒剂磺胺基因、I 类整合酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(7): 728-731.
- [9] 周风莲,杨莉娜,余阳,等. 常用消毒剂对临床分离多重耐药铜绿假单胞菌的杀灭效果[J]. 中国消毒学杂志, 2010, 27(3): 250-252.
- [10] 王震宇. 细菌对消毒剂抗性研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2007, 24(2): 169-173.

(收稿日期:2013-11-13 修回日期:2014-02-16)

(上接第 2206 页)

3.4 开展规范化护理告知程序,有利于护士素质提升 护士在履行护理告知时,要主动提供患者疾病相关的各种信息,患者和家属也会提出和自身疾病相关的各种问题。因此护士除了需具备丰富的基础知识与专科理论,熟练的操作技能外,还要掌握沟通技巧、文明礼仪、学科新进展等,在实施规范化护理工作程序的过程中,使护士更新服务理念,学会换位思考,树立严谨的工作态度,责任心和自律性加强,避免和减少临床工作中的护理差错,全面提升护理质量,真正满足患者需要。

参考文献

- [1] 王作珍. 规范性护理告知在颅脑外伤患者中的应用[J]. 护士实践与研究, 2013, 10(6): 37-38.
- [2] 王素玉,盖卫凯. 论患者知情同意权的代理[J]. 解放军医

院管理杂志, 2013, 20(11): 1069-1070.

- [3] 李小红,李祥平. 浅析护士履行告知程序的方法与技巧[J]. 护理研究, 2009, 23(8): 2045-2046.
- [4] 柴小琴,刘艳霞. 病房履行护理告知的临床实践[J]. 中国实用医药, 2010, 5(1): 273.
- [5] 钱小洁,陈珺,高琳. 知情同意权在临床护理中的应用及进展[J]. 解放军护理杂志, 2013, 30(23): 37-39.
- [6] 牛新兰. 谈护理告知[J]. 现代护理, 2007, 4(21): 69.
- [7] 齐继红,王伯峰. 临床护理告知程序的实施及意义探讨[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 11, 8(32): 7897-7898.
- [8] 刘俊,姚蔚兰,朱慧. 临床护理工作中知情同意存在的问题及对策[J]. 中国医药指南, 2013, 11(28): 278-279.

(收稿日期:2014-02-16 修回日期:2014-04-25)