

铜绿假单胞菌消毒剂—磺胺耐药基因检测及对消毒剂的抗性研究

邹义春, 柯俊, 罗卓跃, 鲍群丽

(黄石市中心医院, 湖北 黄石 435000)

[摘要] 目的 了解铜绿假单胞菌 I 类整合子消毒剂—磺胺耐药基因 (*qacEΔ1-sul1*) 的携带情况以及阳性菌株对碘伏、戊二醛、氯己定、“84”消毒液的抗性。**方法** 对某院 2007 年 12 月—2008 年 1 月连续分离的 20 株铜绿假单胞菌以聚合酶链反应 (PCR) 法检测 *qacEΔ1-sul1* 基因, 测定其阳性菌株对上述 4 种消毒剂的最低抑菌浓度 (MIC)。**结果** 20 株铜绿假单胞菌中检出 *qacEΔ1-sul1* 阳性株 10 株 (50.00%)。碘伏、戊二醛、氯己定、“84”消毒液对 *qacEΔ1-sul1* 阳性菌株的 MIC 范围分别为: 8.0~128.0 μg/mL、16.0~256.0 μg/mL、1.0~16.0 μg/mL、4.0~64.0 μg/mL。**结论** *qacEΔ1-sul1* 基因普遍存在于临床分离的铜绿假单胞菌中, 阳性菌株对碘伏、戊二醛、氯己定、“84”消毒液存在抗性差异, 应合理使用消毒剂并增加作用时间, 以有效控制铜绿假单胞菌的播散。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 消毒剂—磺胺耐药基因; 消毒剂; 最低抑菌浓度; 抗性; 微生物

[中图分类号] R187 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)05-0331-03

Detection of disinfectant-sulfadiazine-resistance gene *qacEΔ1-sul1* and resistance to *Pseudomonas aeruginosa*

ZOU Yi-chun, KE Jun, LUO Zhuo-yue, BAO Qun-li (Huangshi Central Hospital, Huangshi 435000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the distribution of disinfectant-sulfadiazine-resistance gene *qacEΔ1-sul1* in *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and the resistance of positive strains to four kinds of disinfectants (iodophor, glutaraldehyde, chlorhexidine and “84” disinfectant). **Methods** Twenty strains of *P. aeruginosa* isolated from a hospital between December, 2007 and January 2008 were detected *qacEΔ1-sul1* gene by polymerase chain reaction, minimum inhibitory concentrations (MICs) of the above four disinfectants were detected. **Results** In 20 strains of *P. aeruginosa*, 10 (50.00%) strains were positive for *qacEΔ1-sul1* gene. MICs of iodophor, glutaraldehyde, chlorhexidine and “84” disinfectant to positive *qacEΔ1-sul1* strains were 8.0~128.0 μg/mL, 16.0~256.0 μg/mL, 1.0~16.0 μg/mL, and 4.0~64.0 μg/mL, respectively. **Conclusion** *qacEΔ1-sul1* gene is widespread in the clinical isolated *P. aeruginosa*, there are differences in resistance of positive strains against four kinds of disinfectants, disinfectants should be used rationally so as to control the spread of *P. aeruginosa*.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; *qacEΔ1-sul1* gene; disinfectants; minimum inhibitory concentration; drug resistance; microbial

[Chin Infect Control, 2010, 9(5): 331-333]

铜绿假单胞菌是医院感染常见的病原菌, 广泛分布于医院环境中。由铜绿假单胞菌引起的医院感染涉及面广, 几乎可以累及身体各种组织和器官, 主要引起呼吸道炎症、败血症、伤口感染、泌尿道感染等。通常具有感染时间长、治疗难度大、易于传播、难以控制等特点, 适时进行医院环境的消毒灭菌处

理是控制铜绿假单胞菌医院感染的重要措施。近年来, 铜绿假单胞菌的耐药性不断上升, 广泛呈现多药耐药现象, 也陆续出现耐消毒剂铜绿假单胞菌菌株^[1-2], 给医院感染控制带来隐患。铜绿假单胞菌对消毒剂的耐药, 通常由 I 类整合子消毒剂—磺胺耐药基因 (*qacEΔ1-sul1*) 介导, I 类整合子携带有 β-

[收稿日期] 2009-12-22

[作者简介] 邹义春 (1969-), 男 (汉族), 湖北省黄冈市人, 副主任医师, 主要从事临床微生物检验研究。

[通讯作者] 邹义春 E-mail: zhouyichun@163.com

内酰胺酶基因、氨基糖苷类修饰酶基因、*qnr* 基因、*qac* 基因等多种抗生素和消毒剂耐药基因,其中 *qac* 基因家簇表达多种消毒剂外排泵^[3]。为了解我院分离的铜绿假单胞菌的 *qacEΔ1-sul1* 的携带情况及对常用消毒剂碘伏、氯己定、戊二醛、“84”消毒液(有效成分为次氯酸钠)的体外抗性,我们进行了铜绿假单胞菌 I 类整合子 *qacEΔ1-sul1* 的检测及上述 4 种消毒剂对其最低抑菌浓度(MIC)的测定,现将结果报告如下。

1 材料与方法

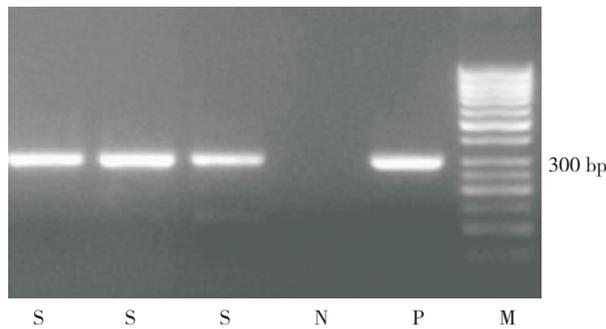
1.1 菌株来源 对本院 2007 年 12 月—2008 年 1 月铜绿假单胞菌连续分离株 20 株进行 *qacEΔ1-sul1* 检测。

1.2 基因检测 以聚合酶链反应(PCR)法进行 *qacEΔ1-sul1* 基因检测,引物序列 P1: 5' - TAGCGAGGGCTTTACTAAGC - 3'; P2: 5' - ATTCA-GAATGCCGAACACCG - 3'。靶基因 PCR 扩增体系均为:每反应体系 P1、P2 引物各 0.5 μmol/L, dNTPs 各 200 mmol/L, KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, NP₄₀ 0.5%, BSA 0.02% (w/v), Taq DNA pol 1 U。总反应体积 20 μL (其中模板液 5 μL)。PCR 扩增热循环参数(PCR 产物长度 300 bp)为:93℃ 预变性 5 min,然后 93℃ 60 s→55℃ 60 s→72℃ 60 s,循环 35 周期,最后一个 72℃ 延长至 5 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,出现与阳性对照分子相当的目的条带为阳性。

1.3 消毒剂 MIC 测定^[4] 将 *qacEΔ1-sul1* 基因阳性菌株用蒸馏水配制成 0.5 麦氏单位菌悬液,用蒸馏水倍比稀释成梯度浓度,将 30 μL 菌液分别加入稀释的消毒液,作用 30 min 后,转种 M-H 平板,37℃ 18~24 h 后观察结果,以消毒液最高稀释度无菌生长的浓度为其 MIC 值。

2 结果

2.1 基因检测 20 株铜绿假单胞菌中检出 *qacEΔ1-sul1* 基因株 10 株(50.00%),其 PCR 电泳图见图 1。*qacEΔ1-sul1* 基因阳性条带位于 300 bp 区域。



M:分子量标记,由上而下分别为 1 000、900、800、700、600、500、400、300、250、200、150、100、50 bp;P:阳性对照;N:阴性对照;S:标本阳性

图 1 *qacEΔ1-sul1* 基因电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of *qacEΔ1-sul1* gene

2.2 消毒剂 MIC 测定 4 种消毒剂对标准菌株的 MIC 值分别为:碘伏 8.0 μg/mL、戊二醛 16.0 μg/mL、氯己定 8.0 μg/mL、“84”消毒液 32.0 μg/mL;对 10 株 *qacEΔ1-sul1* 阳性铜绿假单胞菌的 MIC 范围分别为:碘伏 8.0~128.0 μg/mL、戊二醛 16.0~256.0 μg/mL、氯己定 1.0~16.0 μg/mL、“84”消毒液 4.0~64.0 μg/mL。

3 讨论

铜绿假单胞菌的耐药性日益增加,其耐药机制复杂,主要包括:(1)细菌 MexA-mexB-OprM 等多药主动外排系统过度表达;(2)膜孔蛋白 OprD2 基因编码缺失或通透性改变;(3)β-内酰胺酶、超广谱 β-内酰胺酶、金属锌酶、糖苷修饰酶、钝化酶、细菌染色体基因突变等^[5-7]。整合子可介导细菌多种耐药基因,获得整合子的细菌多表现为多药耐药^[3]。铜绿假单胞菌主要携带 I 类整合子, I 类整合子 3' 端保守区序列为耐消毒剂和磺胺基因(*qacEΔ1-sul1*),为 I 类整合子遗传标记。*qac* 基因家簇表达细菌多种化合物外排泵,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。*qacEΔ1-sul1* 基因阳性表明细菌 I 类整合子的存在,不仅反映出细菌耐药元件携带高,也反映出对消毒剂和防腐剂的耐受高。本实验检测 20 株铜绿假单胞菌,共检出 *qacEΔ1-sul1* 基因 10 株,检出率 50%。提示我院分离到的铜绿假单胞菌具有潜在的多药耐药倾向,对多种消毒剂、防腐剂亦存在产生抗性或抗性增强趋势。

临床常用的消毒剂有含氯制剂、双胍类消毒剂、季铵盐类消毒剂、酚类消毒剂、重金属消毒剂等,不

同类型的消毒剂其消毒作用机制各不相同。目前认为,消毒剂的滥用、处理方法不当及用量不足是消毒剂抗性产生的主要原因,产生这种抗性的机制主要包括:细胞膜通透性改变,生物膜形成,主动外排系统表达,作用靶点改变,获得质粒或整合子、转座子而具有耐药性等^[8-9]。

对消毒剂抗性的研究目前公认最常用、最简便易行的方法是进行 MIC 测定^[10]。本实验研究的 10 株携带有 *qacEΔ1-sul1* 基因的铜绿假单胞菌对戊二醛、氯己定、碘伏、“84”消毒液等消毒剂的 MIC 值有较大差异。该类铜绿假单胞菌对戊二醛的抗性最强,对氯己定的抗性最弱,与相关文献报道^[11]相近。氯己定作为临床使用广泛的消毒剂,具有消毒效果好、应用范围广、毒性低等特点,常被用作漱口液、多功能护理液的添加剂及医疗诊疗行为中手、皮肤、黏膜、器械等的消毒剂。有实验表明^[12-13],携带有 *qac* 家簇基因的细菌较未携带 *qac* 基因的细菌,氯己定 MIC 值更高,这些氯己定抗性菌株的出现,可引发感染甚至医院感染的暴发流行。对 *qacEΔ1-sul1* 基因阳性的细菌,应考虑谨慎使用氯己定。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 张玉云,吴金花,范小莉,等.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[J].中国感染控制杂志,2009,8(1):7-9.

[3] 邹义春,汪宏良,罗卓跃,等.多药耐药铜绿假单胞菌 β-内酰胺酶基因及整合子、转座子遗传标记研究[J].中华医院感染学杂志,2008,18(12):1659-1662.

[4] 中华人民共和国卫生部.实验技术规范[S].北京,2000.

[5] 汪宏良,邹义春,柯俊,等.多药耐药铜绿假单胞菌 16srRNA 甲基化酶、氨基糖苷修饰酶基因研究[J].中华医院感染学杂志,2008,18(11):1505-1508.

[6] 马增煌,邹义春,汪宏良,等.多药耐药铜绿假单胞菌对氯霉素与四环素耐药相关基因研究[J].中华医院感染学杂志,2009,19(2):135-137.

[7] 邱红,胡礼仪.铜绿假单胞菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制研究进展[J].国际检验医学杂志,2008,29(4):330-332.

[8] 周庭权,黄文祥,贾蓓.细菌对消毒剂抗性的研究进展[J].国外医药抗生素分册,2008,29(1):32-34.

[9] 梁爱华,贺志安.全面质量管理在化学消毒剂管理中的应用[J].中华医院感染学杂志,2007,17(1):60-62.

[10] 周庭权,黄文祥,贾蓓.细菌对消毒剂抗性的研究进展[J].国外医药抗生素分册,2008,29(1):32-34.

[11] 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.

[12] 黄支密,仵蕾,吴林松,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对消毒剂及常用抗菌药物的耐药性及相关基因的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(12):1116-1117.

[13] 蔡培泉,王春新,黄支密,等.阴沟肠杆菌耐药性、氯己定-磺胺耐药基因研究[J].中华医院感染学杂志,2006,16(8):841-843.

(上接第 336 页)

脂肪细胞坏死而发生^[6-7]。基础疾病、全身状况较差或切口局部组织营养不良常导致切口裂开;用力咳嗽、便秘等腹压增高因素也是导致切口裂开的常见原因^[8]。切口脂肪液化、裂开使手术切口创面有较多坏死脂肪组织、渗液等,这些均为微生物的生长繁殖提供了良好的生长环境,促使 SSI 的发生;同时,切口感染又是切口裂开的常见原因之一,两者互为因果,造成恶性循环。本研究显示,无术后并发症组与切口脂肪液化组、切口裂开组 SSI 发生率存在显著性差异($P < 0.01$)。由此可见,有效预防术后切口脂肪液化和裂开是降低 SSI 发生率的主要措施之一。

综上所述,SSI 的发生是多因素的综合,且其感染途径有内源性的,也有外源性的。必须采取综合性预防措施才能有效地降低 SSI 的发生率。

[参考文献]

[1] Weber W P, Zwahlen M, Reck S, et al. Economic burden of surgical site infections at a European university hospital[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008, 29(7):623-629.

[2] 欧阳育琪, 欧阳丹明, 曹继国, 等. 手术切口感染监测与分析[J]. 中国感染控制杂志, 2002, 1(1):39-40.

[3] 王小文, 李宁, 陈惠德, 等. 肝移植后患者抗生素相关性肠炎[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(1):67-69.

[4] 李广森, 吴俊霞, 叶尔强. 恶性肿瘤患者术后切口感染临床分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(5):520-521.

[5] 徐秀华. 临床医院感染学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2005:369.

[6] 林佐东, 李超樟, 伍夏源, 等. 手术切口脂肪液化 47 例治疗分析[J]. 实用中医药杂志, 2009, 25(10):698-699.

[7] 方复, 卢国春, 毛华辉. 腹部切口脂肪液化 69 例分析[J]. 现代实用医学, 2009, 21(4):367-368.

[8] 刘德才, 杨春发, 鄂佳鑫. 19 例腹部切口全层裂开分析[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(19):145-146.