维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0497-03

产金属β内酰酶铜绿假单胞菌的表型和基因型分析

吴 倩[1],陈 志[2],夏亭亭[3]

(1.3.重庆医科大学附属第二医院检验科,重庆 400010;2.江津市 094 医院,江津 402260)

【摘 要】目的:了解我院铜绿假单胞菌的耐药与流行病学状况,以便更好控制医院感染。方法:采用纸片法测定产金属 β-内酰酶的 PA,并用随机扩增多态性(RAPD)DNA 基因分型方法对其进行 PAPD 基因分型。结果:24 株耐亚胺培南 PA 通过纸片法检测确定产金属 β-内酰酶 19 株,不产金属 β-内酰酶 5 株,产金属 β-内酰酶检出率 80%;PAPD 法共得 PAPD 十型,分型率为 100%。有 3 例感染个体出现相同基因型,有 1 例病人在不同时期出现两种基因型。结论:纸片法检测能快速简便检测出金属 β-内酰酶,随机扩增多态(PAPD)DNA 基因分型,能满足对 PA 进行分子流行病学调查。

【关键词】铜绿假单胞菌;金属 β-内酰胺酶;基因型;医院感染

【中国图书分类法分类号】R378.99+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-31

Study on of metallo-β-lactamases in pseudomonas aeruginosa

WU qian, et al

(*Department of Ophtha lmology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To monitor the rug resistance and epidemiology state of pseudomonas aeruginosa (PA) isolated clinical patient. *Methods*: antimicrobial sensitivity tests were performed hy K-B method and metallo-β-lactamases-producing PA was genotyped by the randomly amplified polymorphic (PAPD) assay. *Results*: Among24 strains resistant to imipenem.19 (8%) strains produced metal enzyme which could be distingurished into 10 kinds of PAPD type.the type ability was 100%. There was same gene type strain. Isolated from three patient and there were two kinds of gene types. Among 2 strains isolated from the same patient at the different time. *Conclusions*: the K-B method could be used to determine metal enzyme. rapidly and conviently. And PAPD could to be used in the molecular epidemiological study of PA.

【Key words】Pseudomonas aeruginosa; Metallo β-lactamases; Genetype; Hospital infection

铜绿假单胞菌广泛分布于周围环境及正常人的皮肤,呼吸道,消化道的部位,是医院感染的主要病原菌[1]。由于抗菌药物的运用,从临床分离的对多种抗菌药物耐药的铜绿假单胞菌呈增加趋势,而金属酶 β-内酰胺(MBL)酶是引起其多重耐药的重要机制之一。本研究通过 EDTA 络合金属离子来检测金属酶,并结合 PCR 指纹图谱,对产金属酶铜绿假单胞菌进行基因分析,了解感染类型及特征,为今后尽早发现及控制医院感染提供依据。

1 资料和方法

1.1 菌株来源

临床菌株 2004 年 1 月~2006 年 2 月,本院多个病区分离到 24 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌。阴性对照株:铜绿假单胞菌 ATCC27853,购自卫生部临检中心。

1.2 纸片法检测金属酶 β-内酰胺酶的产生

将菌种接种于血平板上 18~24h,挑取单个菌落配制成 108cfu/ml 菌液,用棉签均匀涂抹于 MH 平板,贴上两张头孢他啶纸片和两张亚胺培南纸片,纸片间相距 25mm,并将 500mmol/L EDTA10μl 分别加至上述两种纸片制得 CAZ/EDTA 及 IMP/EDTA 纸片,按 K-B 纸片法测出 CAZ、CAZ/EDTA 及 IMP、IMP/EDTA4 种纸片的抑菌圈直径。如任何一组其抑菌环直径差值大于或等于 5cm,及可判断为 MBL 酶阳性菌株[2,3]。

1.3 PCR 指纹图谱法

根据文献合成随机引物,序列为'5-GTTGGTGGCT-3' dNTP,Taq DNA 聚合酶,PCR 反应配套试剂及 DNA Marker (Puc Mix Marker8)均由上海 Sangon 生物工程公司提供。反应总体积 50 μl,其中 10×PCR 缓冲液 5.0μl,$MgCl_2$ 2.5mmol/L,dNTP 200μmol/L,引物 2mmol/L,DNA 模板 3μl,Taq DNA 聚合酶 2.5U,重蒸水 30.5μl,94℃预变性 5min,然后 94℃变性 1min,50℃退火 1min,72℃延伸 1.5min,

作者介绍:吴 倩(1970-),女,主管技师,主要研究方向:临床微生物。

维普资讯 http://www.cqvip.com

以此进行 35 个循环,最后在 72℃延伸 8min 后结束反应。产物检测 PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶(含溴化乙啶)中,电压 5V/cm, 电泳 10min 后用凝胶成像仪观察结果. 结果判断:DNA 条带位完全相同者,或相差一条则者,为同一亚型,其余皆为的不同亚型[4]。

2 结 果

2.1 纸片法检测 MBL 结果

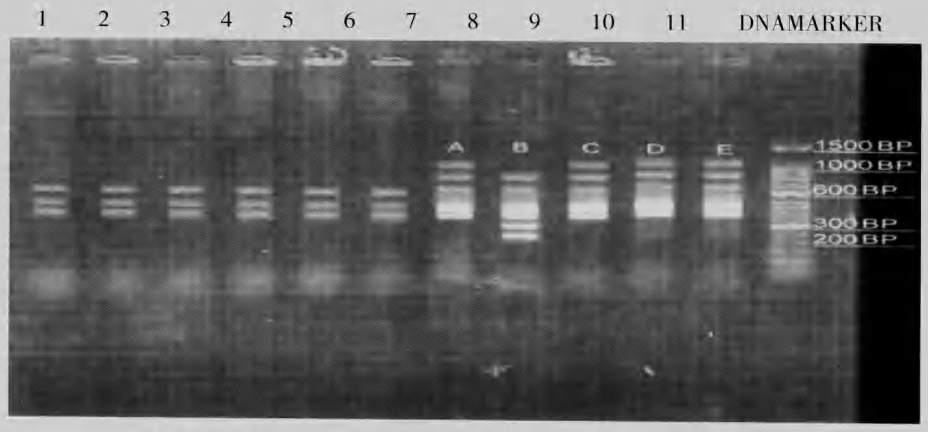
24 株耐亚胺培南 PA 通过纸片法检测确定 MBL19 株,不产 MBL5 株,产 MBL 检出率 80%。

2.2 RAPD 基因分型结果

RAPD 将 24 株铜绿假单胞进行分型,全部菌株均能产生指纹图谱,分型率为 100%。扩增 DNA 片段数目为 1~12 条,最小片段为 100bp,最大片段为 2000bp 根据所得的 DNA 片段数目和大小对 PA 进行相似度比较,24 株 PA 的基因型共被分为十型。

2.3 病区个体感染 PA 的分型结果

见图 1,处于不同病区的三位病人的 1~6 株 PA 出现的相同基因型; 一病人不同时期 ACDE 株 PA 为同一基因型,B 株出现跳跃性指纹图谱,且与其他分型指纹图谱不同。同一病区患者的 PA 未检出相同的基因型。



1~6 株为不同病区三病人的 PA;7~11 株为同一病人连续检测的 PA

图 1 11 株铜绿假单胞菌基因型检测结果

3 讨 论

铜绿假单胞菌(PA)是医院感染中的重要条件致病菌, 其多重耐药的问题在世界上所有国家都存。PA 的耐药机制主要与以下因素有关:①细菌产生抗菌活性酶,如 MBL、氨基糖苷钝化酶等;②细菌改变抗菌药物作用的靶位, 如青霉素结合蛋白(PBPs)、DNA 旋转酶等结构发生改变, 从而逃避抗菌药物的抗菌作用;③外膜通透性降低;④生物膜形成;⑤主动泵出系统等等[5];所有耐药机制中,MBL 的出现导致 PA 突破亚胺培南-抗革兰氏阴性杆菌感染最后一道防线,直接造成临床抗感染治疗失败[6]。MBL 是一类含金属的 β-内酰胺酶,能够水解包括碳青霉烯类在内的绝大多数 β-内酰胺类抗生素,但是不能水解单环类药物。所有耐药机制中,MBL 的出现导致 PA 突破亚胺培南-抗革兰氏阴性杆菌感染最后一道防线,直接造成临床抗感染治疗败[6]。MBL 是一类含金属的 β-内酰胺酶, 能够水解包括碳青霉烯类在内的绝大多数 β-内酰胺类抗生素,但是不能水解单环类药物。MBL 的出现是碳青霉烯类抗生素选择性压力的结果, 其由染色体和质粒介导,能在革兰氏阴性菌间快速传播,而临床实验室快速检测革兰氏阴性菌是否产 MBL,有助于对医院内感染的控制和减少耐药菌的播散,常用表型筛选的方法为纸片敏感实验。本研究采用纸片敏感实验对 24 株耐亚胺培南的 PA 进行检测,确定产 MBL19 株, 不产 MBL5 株, 产 MBLPA 占临床分离株的 15.7%,低于沈定霞,罗燕萍等报道的 32.3%[7]。其原因可能与地区差异与各医院抗生素的使用情况有关。

目前对控制耐药铜绿假单胞菌尚无好方法,最佳策略是控制该菌在医院的传播。认识 PA 在医院内传播的流行特征,对采取有效的预防措施是非常关键的。本次实验采用 RAPD 基因分型技术,对我

维普资讯 http://www.cqvip.com

院 PA 引起的医院感染进行回顾性分型研究。结果 24 株 PA 全部能产生指纹图谱，分型率为 100%. RAPD 分型结果既表现种系发育过程的相互联系，也反应不同克隆之间存在的差异，从而可鉴定不同菌株在基因水平上的差异[8]。

从图 1 可知三位不同病区的住院病人六株 PA 出现的相同基因型，由此我们可推测这株 PA 在不同的科室间发生了传播，引起了院内的交叉感染。临床上往往只重视个体患者的治疗，忽略了病房中可能存在的交叉感染的传播媒介。因 PA 在医院内环境中广泛分布，可见于医院各个角落。通过于医护人员的手、病床、病房空气或其他患者，各种医疗器械如：吸痰管、吸氧管、胃管、湿化瓶、气管套管、呼吸机管道、导尿管等共同媒介物的进行外源性传播，而病人免疫功能低，体质弱，又不规则长期使用抗生素导致再次感染发生的可能性就很大，常可在不同科室的住院病人间暴发流行[9]。因此阻断外源性传播媒介，是控制医院感染的重要环节。

图 1 所示患者连续监测的五株 PA 中，ACDE 株得到完全相同的指纹图谱，而 B 株图谱发生了跳跃性的变化，说明此患者感染的 PA 出现两种型别，不同 PA 的感染可能有两方面原因，一为由院外带入、病区菌库，另一为 PA 的基因突变的.前者是由于共同媒介物所致，后者则是由于不合理使用抗生素，导致耐药基因发育过程中发生了突变，从而使指纹图谱发生了的跳跃性的变化。

因此为了有效控制医院感染的发生。我们应从这两方面着手：通过洗手、消毒、隔离等手段，切断交叉感染的传播途径，阻断外源性传播媒介；临床与实验室密切配合，以病原菌的药敏结果指导临床合理的使用抗生素[10]。只有处理好这些引起外源感染和内源感染的因素才能科学有效的控制医院感染的爆发。

参 考 文 献

[1] 马王玲，魏殿军.铜绿假单胞菌分型方法研究进展[J].江西医学检验，2003；21(3)：189-191.

[2] 吕火祥，孙明洪，刘建栋，等.协同法过筛检测金属酶的研究[J].中华检验医学杂志，2002；25：232-235.

[3] Arakawa Y，Shibata N，Shibaynama K，et al.Covenient testfor screening metallo-p-lactamase—produicing Gram-negativebacteria by usingthiol compounds[J].J Clin Microbiol，2000；38(1)：40-43.

[4] Reboli AC，Houston ED，Monteforte JS，et al.Discrimination of epidemic and sporadic isolates of Acinetobacter baumannii by repetitive element PCR—mediated DNA fingerprinting[J].Clin Microbiol，1994；32(11)：2635.

[5] 张凤凯，Malcom G，PageP，等.铜绿假单孢菌对 B-内酰胺酶类抗生素耐药性决定因素的研究[J].中国抗生素杂志，2000；25(5)：362-367.

[6] Saino Y，Kobayashi F，Inoue M，et al.Purification and properties of inducible penicillin beta—lactamase isolated from Pseudomonas mahophilia[J].Antimicrob Agents Chemother，1982；22(4)：564-570.

[7] 沈定霞，罗燕萍，崔 岩，等.分离产金属酶的铜绿假单胞细菌[J].中华感染杂志，2004；14(1)：86-88.

[8] Nordmnn P.Poirel L.Emerging carbapenemases in Gram - neagtlve aerobes[J].Clin Microbiol Infect，2002；8：321-331.

[9] Berthet FX，Rasmussen PB，Rosenkrands I，gt al.A Mycobac—terium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10)[J].Micro-biology，1998；144(Pt 11)：3195-3203.

[10] ChuY，Afzal-ShahM，Houan，et al.Nip4，a novemota18-obeta-act8m Behom mosocomialAcinetobae ter spp.collectedinHongKOngbe-tween1994and1998[J].Antimicmb Chemother，2001；45：710-714.

(上接第 469 页)

应用于临床还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 张永学，主编.实验核医学[M].北京：人民卫生出版社，2002.

[2] Jose B.Why the epidermal growth factor receptor.The rational for cancer therapy[J].Oncologist，2002；7(4)：2-8.

[3] Ciardiello F，Tortora G.A novel approach in the treatment of cancer：Target the epidermal growth factor receptor [J].Clin Cancer Rev，2001；51(2)：474-477.

[4] Mendelsohn J，Baselga J.Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer[J].J Clin Oncol，2003；21(14)：2787-2799.

[5] 石全红，支兴刚.Surviving 在脑胶质瘤中的表达及其与 bcl-2，bax 相关性的研究[J].重庆医科大学学报，2005；(3)：386-389.

[6] Grunwald V，Hidalgo M.The epidermal growth factor receptor：a new target for anticancer therapy [J].Curr Probl Cancer，2002；26：109-164.