DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.034
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)09-0827-02

论著

院内感染耐药黄杆菌携带β-内酰胺酶基因的研究

罗 羽[1],夏培元[1],王仙园[2],殷春红[1],秦孝建[1],解晓珍[3] ([1]第三军医大学西南医院国家药品临床研究基地,重庆 400038;[2]解放军总后勤部卫生部医疗局,北京 100842;[3]第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨临床分离黄杆菌耐药株携带β-内酰胺酶(bla)基因类型及基因介导方式。方法 研究对象为临床分离所得的6株黄杆菌临床耐药株。产β-内酰胺酶情况采用纸片法定性检测;细菌质粒和染色体以市售试剂盒抽提;酶编码基因类型用PCR检测分析。结果 6株黄杆菌均产bla,在其染色体、质粒上共发现7种不同类型的bla基因,其中菌株02-23存在染色体和质粒共同介导的PSE-1基因,02-237存在质粒介导的SHV、PSE-1基因,02-244存在质粒介导的TEM、AmpC、PSE-1基因,02-258除存在由质粒介导的SHV、OXA-1、CTX-M-1基因外,尚由染色体介导SHV、TEM基因,02-332存在染色体介导的TEM基因,02-372存在质粒介导的OXA-1、Sme-1基因。结论 西南医院临床分离的耐药黄杆菌携带bla酶基因种类较多,可由质粒、染色体分别介导或两者共同介导,耐药株的产生可能与大量、长疗程使用抗生素有关。

关键词:院内感染;黄杆菌;β-内酰胺酶;基因
中图法分类号:R394.6;R378;R915 文献标识码:A

Study of β-lactamase gene in resistant *Flavobacterium* in nosocomial-infection

LUO Yu[1], XIA Pei-yuan[1], WANG Xian-yuan[2], YIN Chun-hong[1], QIN Xiao-jian[1], XIE Xiao-zhen[3] ([1]State Base for Clinical Drug Trial, Southwest Hospital, Chongqing 400038; [2]Bureau of Medical Treatment, Health Department, General Logistics Department of PLA, Beijing 100842; [3]Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the gene types and coding genes of beta-lactamase (bla) in the resistant *Flavobacterium* strains clinically isolated. **Methods** A total of 6 *Flavobacterium* strains isolated clinically were employed in this study. After the qualitative determination of bla production by nitrocefin disc method, the plasmids and chromosomes of these bacteria were extracted with the commercial kit. The bla coding gene was analyzed by PCR. **Results** All 6 *Flavobacterium* strains could produce bla. PCR results showed that there were 7 categories of bla coding gene on the chromosome and the plasmid: chromosome- and plasmid-mediated PSE-1 in strain 02-23, plasmid-mediated SHV and PSE-1 in strain 02-237, plasmid-mediated TEM, AmpC and PSE-1 in strain 02-244, plasmid-mediated SHV, OXA-1 and CTX-M-1 as well as chromosome-mediated SHV and TEM in strain 02-258, chromosome-mediated TEM in strain 02-332, and plasmid-mediated OXA-1 and Sme-1 in strain 02-372. **Conclusion** There are various bla gene categories, mediated by chromosome and plasmid separately or co-mediated by both, in the resistant *Flavobacterium* strains isolated clinically. The production of these resistant strains may be associated with the long-term administration of antibiotics in large amount in hospitals.

Key words: nosocomial infection; *Flavobacterium*; β-lactamase; gene

条件致病菌黄杆菌属(*Flavobacterium*)细菌导致的院内感染发生率在近年出现了逐年增高的趋势,该菌属细菌在医院环境中广泛存在且常表现对临床常用的青霉素、头孢菌素、碳青霉烯类等β-内酰胺类抗生素的高度耐药,临床治疗困难,应引起医护人员的足够重视[1]。目前国内对黄杆菌的研究多为个案分析,尚少见对黄杆菌携带β-内酰胺酶(beta-lactamase, bla)基因及基因介导方式方面的研究。本研究以第三军医大学西南医院临床分离的6株对多种β-内酰胺类抗生素耐药的黄杆菌为研究对象,纸片法检测其产bla情况,PCR扩增法分别检测各菌株质粒和染色体携带的bla基因类型,以期明确国内院内感染耐药黄杆菌对β-内酰胺类抗生素的耐药机制。

基金项目:全军"十五"重点科研基金资助课题(01L065)
Supported by the "Tenth Five-year Plan" for the Key Sci & Tech Research of PLA (01L065)
作者简介:罗 羽(1969-),女,重庆市人,硕士,副教授,主要从事医院感染的监控及护理教育方面的研究,现在第三军医大学护理管理学教研室。电话:(023)68752371
通信作者:夏培元,电话:(023)68754438
收稿日期:2003-07-14;修回日期:2003-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 菌株来源

黄杆菌 02-23、02-237、02-244、02-258、02-322 及 02-372 为本实验室于 2002 年 4 月至 2003 年 3 月自西南医院临床标本分离所得，经自动细菌生化鉴定仪鉴定。质控菌为大肠杆菌 ATCC25922 和铜绿假单孢菌 ATCC57856，由重庆医科大学传染科惠赠。

1.2 主要仪器与试剂

PCR 扩增仪(英国，ThermoHybaid)，水平电泳仪、凝胶成像系统(美国，BIO-RAD)，Nitrocefin 纸片(英国，Glaxo)，小量质粒抽提试剂盒、染色体 DNA 抽提试剂盒分别购自上海华舜公司和 omega 公司，DNA Marker 购自上海华美公司，引物由上海 Sangon 合成。

1.3 方法

1.3.1 质粒及染色体 DNA 抽提 按试剂盒说明书操作，抽提物经 0.9% 琼脂糖凝胶电泳确证后分装，－20 ℃冻存。

1.3.2 纸片法测定产 bla 情况 取培养于普通琼脂培养基上的单个菌落直接涂布于 Nitrocefin 纸片上，15 min 内纸片变为红色被判断为产 bla 阳性。

1.3.3 PCR 法检测 bla 基因 参照文献[2] 采用 Primer Premier5.0 软件针对 bla 的共同序列及 TEM、SHV 等国内临床耐药菌常见的 bla 编码基因设计引物共 9 对，设计的引物序列见表 1。

表 1 bla 通用引物及针对性引物序列表

Tab 1 List of primers corresponding to common bla primers and various β-lactamases

Bla	Sequence of primers used in PCR		Product
	Sence	Antisence	
Common	5′-TGGGTGCACGAGTGGGTTAC-3′	5′-TTATCCGCCTCCATCCAGTC-3′	550 bp
TEM	5′-AGATCAGTTGGGTGCACGAG-3′	5′-TGCTTAATCAGTGAGGCACC-3′	748 bp
SHV	5′-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3′	5′-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3′	867 bp
AmpC	5′-ATTCGTATGCTGGATCTGCCACC-3′	5′-CATGACCCAGTTGCGCATATCCTG-3′	385 bp
CTX-M-1	5′-GTACAGCGATAACGTGCCG-3′	5′-AGCCGCCGACCCTAAT-3′	459 bp
PSE-1	5′-CTCGTATAGGTGTTTCCGTTCT-3′	5′-ATCCCTCAAATCACCGAGCT-3′	409 bp
OXA-1	5′-ACTACAAATAATGCGGCACG-3′	5′-ACCCAACCAACCCACCAA-3′	523 bp
Sme-1	5′-TTTGATGGGAGGATTGGC-3′	5′-CTCAGGACCGCCAAGAAA-3′	320 bp
L1	5′-TACCCGCCTGCCAATG-3′	5′-CCCGTCGAATTTCTGTTCTG-3′	389 bp

PCR 反应总体积为 50 μl，其中 10× buffer 5 μl；上、下游引物(10 pmol/μl)各 1 μl；$MgCl_2$(25 mmol/L)3 μl；*Taq* 聚合酶(5 U/μl)0.5 μl；4× dNTP mix(10 mmol/L)1 μl，模板 1 μl，双蒸水 37.5 μl。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 7 min，94 ℃变性 1 min、60 ℃退火 1 min、72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环。于末次循环结束后 72 ℃延伸 7 min。扩增产物以 1.5% 琼脂糖凝胶(加 EB)电泳，上样量 5 μl，5 V/cm× 30 min，凝胶成像系统成像观察结果。

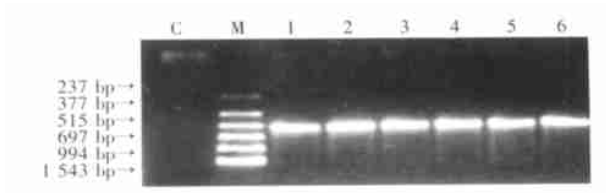
2 结果

2.1 纸片法定性检测

6 株黄杆菌均产 β-内酰胺酶。

2.2 PCR 扩增结果

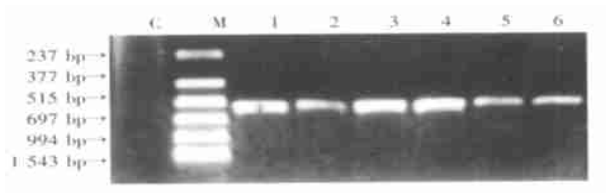
6 株黄杆菌的染色体和质粒模板均分别获得约为 550 bp 的扩增片段，与 bla 通用引物预期的目的片段大小相符，见图 1、2。各菌株染色体和质粒模板获得的与预期大小相符的 bla 基因类型情况见表 2。



C: Control; M: DNA-Marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6: PCR products of chromosome genomes of clinical isolates 02-203, 02-237, 02-244, 02-258, 02-332 and 02-372, respectively

图 1 6 株黄杆菌染色体模板 PCR 扩增产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis analysis of PCR products of 6 *Flavobacterium* isolates amplified with common bla primers and chromosome template



C: Control; M: DNA-Marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6: PCR products of plasmid genomes of clinical isolates 02-203, 02-237, 02-244, 02-258, 02-332 and 02-372, respectively

图 2 6 株黄杆菌质粒模板 PCR 扩增产物电泳图

Fig 2 Electrophoresis analysis of PCR products of 6 clinical *Flavobacterium* isolates amplified with common bla primers and plasmid template

表 2 6 株黄杆菌染色体和质粒模板获得阳性扩增片段的 bla 基因类型

Tab 2 Types of bla gene mediated by the chromosome and plasmid

Strain		Types of β-lactamases
02-23	Chromosome	PSE-1
	Plasmid	PSE-1
02-237	Chromosome	
	Plasmid	SHV、PSE-1
02-244	Chromosome	=
	Plasmid	TEM、AmpC、PSE-1
02-258	Chromosome	SHV、TEM
	Plasmid	SHV、OXA-1、CTX-M-1
02-332	Chromosome	TEM
	Plasmid	
02-372	Chromosome	
	Plasmid	OXA-1、Sme-1

3 讨论

迄今国内外关于产 bla 黄杆菌的研究报道极少，虽然国外已有黄杆菌产质粒介导的超广谱 β-内酰胺酶的个案报道，但对青霉素、头孢菌素等 β-内酰胺类抗生素的高度耐药目前仍多认为主要由染色体介导的 bla 引起[3,4]，同一菌株中由染色体和质粒共同介导同一类 bla 的黄杆菌耐药尚少见报道，对该菌属细菌产 bla 的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

特点和酶基因的介导方式目前仍不十分明确。

本研究中 6 株黄杆菌用纸片法和 PCR 扩增法均显示为产 bla 株, 提示西南医院黄杆菌可能普遍产 bla。染色体和质粒共携带了 7 种不同类型的 bla 基因, 同一菌株的染色体和质粒最多竟携带了 5 种 bla 酶基因, 远超过国外文献关于黄杆菌携带 bla 基因种类的数量, 说明黄杆菌携带的 bla 基因呈多样性, 提示临床治疗黄杆菌感染时应慎用不耐酶的 β-内酰胺类抗生素[5]。研究还表明, 黄杆菌的 bla 基因除可分别由染色体和质粒独立介导外, 同一酶基因在同一株菌中可同时由染色体和质粒共同介导, 且由质粒介导的耐药基因类型远多于染色体, 提示在医院环境中的细菌耐药基因通过质粒进行交换和转移的现象已相当普遍。

本研究黄杆菌携带的多种酶基因中, PSE-1、AmpC 应引起特别注意。PSE-1 基因根据 Bush-Jacoby- Medeiros 的最新分类法, 属于可以被克拉维酸抑制的 2c 亚组β-内酰胺酶, 其优先的底物为青霉素和羧苄西林, 该酶基因最先发现于铜绿假单胞菌, 其后其它肠杆科细菌中也相继发现了该酶, 以往的相关研究认为该酶多存在于细菌的染色体上, 但本研究显示 PSE-1 基因在黄杆菌中已同时由染色体和质粒共同介导, 表明 PSE-1 基因能稳定地传代并介导对青霉素等抗生素的耐药。至于黄杆菌中有否存在质粒转化、转座等机制, 则有待于深入研究。AmpC 为 Bush 分类法中的头孢菌素酶, 既往多认为该酶由染色体介导, 但由于近年已发现其也可由质粒编码并介导, 已有人将其看作超广谱 bla, 本研究也显示 AmpC 酶基因可由质粒介导, 应该引起重点关注。

随着新型抗生素的不断开发和在临床的广泛运用, 近年院内细菌面临着空前的抗生素选择压力, 在这种高抗生素选择压力作用下的细菌可能通过自身染色体突变或获得外源性质粒而获得耐药性[6], 因此, 加强抗生素管理、合理使用抗生素以减轻抗生素压力应是延缓院内细菌耐药性发生的关键, 此外还应对临床医护中可能导致质粒交换、转移的各种途径加强管理和控制, 避免耐药性借由质粒在医院中快速扩散[7]。

参考文献:

[1] 汪　复, 朱德妹, 胡付品, 等. 上海地区细菌耐药监测分析[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(1): 17－19.

[2] 束学安. 流感嗜血杆菌β-内酰胺酶机制的研究[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(10): 770－772.

[3] Bellais S, Poirel L, Nass T, *et al*. Genetic-biochemical analysis and distribution of the Ambler class A beta- lactamases CME-2, responsible for extended-spectrum cephalosporin resistance in Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(1): 1－9.

[4] Bellais S, Poirel L, Leotard S, *et al*. Genetic diversity of carbarpennem-hydrolyzing metallo-lactamase from Chryseobacterium (Flavobacterium)[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(11): 3028－3034.

[5] 宋世平, 黄春基, 解晓珍. 下呼吸道感染的病原菌变迁及耐药状况分析[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(1): 114－116.

[6] 华　川, 府伟灵, 李苏利. MRSA 院内感染的实验监测[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(2): 82－83.

[7] 夏培元, 肖光夏. 细菌对抗生素的耐药性——一个必须面对的严重问题[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 17(2): 71－74.

(编辑　汪勤俭)

(上接 826 页)

举等肩关节运动 15 min, 2 次/d; 器械运动是借助肋木、肩梯、体操棒、滑轮器、肩关节旋转器等进行肩关节练习。有肌肉萎缩者加哑铃操锻炼。1 次/d, 每次 20 min, 10 次为 1 疗程。

疗效标准。治愈: 症状与体征消失, 肩关节活动恢复正常; 显效: 症状与体征明显改善, 肩关节活动基本恢复; 好转: 症状与体征部分改善, 肩关节活动范围较治疗前增大; 无效: 症状及体征无变化或加重。

2　结果

显示 282 例中治愈为 69 例, 占总数的 24%, 显效为 105 例, 占 37%, 病人症状明显好转者 97 例, 占总数的 34%, 治疗后症状及体征无明显改变或加重者 11 例, 占 4%。

3　讨论

同传统的单一治疗方法相比, 采用综合法能提高肩周炎治疗效果。治疗中超短波、超声波、电脑中频同期使用, 既起到消炎、止痛、解痉的作用, 又可有效的防止和松解粘连[1]。在此基础上结合手法、运动疗法, 可进一步松解软组织粘连, 改善肩关节各个方向的活动。充分发挥治疗因子间的相加与协同互补作用, 其治愈率、显效率均优于单-方法。证明超短波、超声波、电脑中频、手法、运动疗法的结合是治疗肩周炎较为理想、有效的方法[2]。

关键词: 肩周炎; 理疗; 运动疗法; 综合疗法
中图法分类号: R268　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 张清根. 冻结肩治疗的进展[J]. 中华理疗杂志, 1988, 11(3): 165.

[2] 杜宝琮, 任晓东, 曾　畅. 超声——中频电同步叠加疗法治疗瘢痕和粘连的临床研究[J]. 中国医科大学学报, 1996, 25(2): 209－210.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net