

危重患者常见感染细菌耐药性和耐药基因的检测及分析

刘明霞(青岛大学医学院微生物教研室/工作单位:山东省青岛市胸科医院 266043)

【关键词】 大肠埃希菌; 肺炎克雷伯菌; 喹诺酮类耐药基因; 超广谱 β -内酰胺酶
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.15.068 **文献标志码:**B **文章编号:**1672-9455(2011)15-1908-02

本文对重症监护病房(intensive care unit, ICU)和临床各科危重患者大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌分离菌株的耐药情况,耐药菌株喹诺酮类耐药基因携带状况,及是否为产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)菌株进行检测分析,为指导临床合理应用抗菌药物、有效预防和控制耐药细菌感染提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源 2009 年 9 月至 2010 年 5 月自莒县中医院、莒县人民医院和青岛大学医学院附属医院检验科细菌室收集临床分离菌株,上述标本取自两地重症监护室和临床各科危重症患者的多种标本,如血、尿、分泌物、咽拭子、脓液、胸腔积液、腹水、胆汁、脑脊液、引流液等。

1.2 仪器与方法 采用 BD Phoenix100 全自动微生物分析仪对临床分离的细菌菌株进行鉴定, Kirby-Bauer 纸片扩散法进行药物敏感试验;药敏推测法鉴定产 ESBLs 菌株;聚合酶链反应(PCR)技术检测耐喹诺酮类药物菌株 *parC* 和 *gyrA* 喹诺酮类耐药相关基因;对药敏结果和基因检测结果进行综合分析。PCR 扩增:靶基因 PCR 扩增体系为 25 μ L,包括 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 1.5 mmol/L,上下游引物各 0.4 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, dNTPs 0.2 mmol/L, DNA 模板 3 μ L, PCR 专用水加至 25 μ L。PCR 扩增热循环参数为:*gyrA* 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 94 $^{\circ}$ C 50 s, 56 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 冷却至 4 $^{\circ}$ C。*parC* 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 冷却至 4 $^{\circ}$ C。PCR 引物序列见表 1。取 6 μ L 扩增产物与 1 μ L 6 $\times$ 上样缓冲液混匀,于 20 g/L 或 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物长度大于 500 bp

用 12 g/L 琼脂糖凝胶, 小于 500 bp 用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 电压电泳 40 min, EB 染液浸泡 30 min, 凝胶成像仪观察分析结果。

表 1 喹诺酮类抗菌药物耐药基因 PCR 引物

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
P1:EC-gyrA-A:	5'-AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT-3'	343
P2:EC-gyrA-B:	5'-GCCATACCTACGGCGATACC -3'	
P3:EC-parC-C:	5'-AAACCTGTTCAGCGCCGCAATT-3'	327
P4:EC-parC-D:	5'-AAAGTTGTCTTGCCATTCACT-3'	

2 结 果

2.1 菌株鉴定结果及耐药率分析 (1)鉴定出大肠埃希菌 88 株,肺炎克雷伯菌 57 株;其中喹诺酮类药物耐药菌株分别为 70 株、32 株;耐药菌株中有 57 例为产 ESBLs 大肠埃希菌, 18 株为产 ESBLs 肺炎克雷伯菌。(2)2 种细菌均有明显的耐药现象,对于喹诺酮类药物的耐药情况,以大肠埃希菌最严重,其次为肺炎克雷伯菌,见表 2。(3)将产 ESBLs 临床分离菌株与 ESBLs 阴性菌株耐药特点进行比较,发现产 ESBLs 大肠埃希菌和产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对抗生素的耐药性普遍高于不产 ESBLs 大肠埃希菌和不产 ESBLs 肺炎克雷伯菌,见表 2。

2.2 菌株耐药基因分析 产 ESBLs 大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌临床分离菌株与不产生 ESBLs 大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌临床分离菌株比较,耐药基因 *parC* 和 *gyrA* 的检出率均无显著性差异,见表 3。

表 2 产 ESBLs 菌株与不产 ESBLs 菌株对 17 种抗菌药物耐药率

抗菌药物	产 ESBLs 大肠埃希 菌株(57 株)	不产 ESBLs 大肠埃希 菌株(31 株)	产 ESBLs 株肺炎 克雷伯菌(18 株)	不产 ESBLs 株肺炎 克雷伯菌(39 株)
阿米卡星	19.3%(11)	9.68%(3)	83.3%(15)	7.7%(3)
头孢吡肟	100.0%(57)	54.8%(17)	100.0%(18)	20.5%(8)
头孢噻肟	100.0%(57)	51.6%(16)	100.0%(18)	15.4%(6)
头孢他啶	100.0%(57)	22.6%(7)	100.0%(18)	10.3%(4)
头孢唑林	100.0%(57)	41.9%(13)	100.0%(18)	10.3%(4)
氨曲南	100.0%(57)	35.5%(11)	100.0%(18)	25.6%(10)
环丙沙星	80.7%(46)	74.2%(23)	55.6%(10)	5.1%(2)
左氧氟沙星	86.0%(49)	6.5%(2)	55.6%(10)	10.3%(4)
庆大霉素	77.2%(44)	16.1%(5)	94.4%(17)	7.7%(3)

续表 2 产 ESBLs 菌株与不产 ESBLs 菌株对 17 种抗菌药耐药率

抗菌药物	产 ESBLs 大肠埃希菌株(57 株)	不产 ESBLs 大肠埃希菌株(31 株)	产 ESBLs 株肺炎克雷伯菌(18 株)	不产 ESBLs 株肺炎克雷伯菌(39 株)
亚胺培南	1.75%(1)	0.0%(0)	0.0%(0)	0.0%(0)
哌拉西林	100.0%(57)	54.8%(17)	94.4%(17)	56.4%(22)
哌拉西林/他唑巴坦	5.3%(3)	3.2%(1)	72.2%(13)	33.3%(13)
复方新诺明	84.2%(48)	74.2%(23)	88.9%(16)	17.9%(7)
氯霉素	54.4%(31)	32.3%(10)	66.7%(12)	35.9%(14)
氨苄西林	100.0%(57)	87.1%(27)	100.0%(18)	94.9%(37)
氨苄西林/舒巴坦	82.5%(47)	54.8%(17)	100.0%(18)	76.9%(30)
阿莫西林/克拉维酸	82.5%(47)	16.1%(5)	100.0%(18)	76.9%(30)

表 3 产 ESBLs 临床分离菌株和非产 ESBLs 临床分离菌株耐药基因检出率比较

基因	大肠埃希菌			肺炎克雷伯菌		
	产 ESBLs 株	非产 ESBLs 株	<i>P</i>	产 ESBLs 株	非产 ESBLs 株	<i>P</i>
<i>parC</i>	30.0%(15/50)	25.0%(5/20)	0.776	50.0%(7/14)	38.9%(7/18)	0.721
<i>gyrA</i>	14.0%(7/50)	10.0%(2/20)	0.999	28.6%(4/14)	11.1%(2/18)	0.365

3 讨 论

大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌及鲍曼不动杆菌都是临床上常见的病原菌,均为革兰阴性菌。近年来由于抗生素的不合理应用,导致这些临床常见菌耐药情况严重。产生 ESBLs 是导致肠杆菌科细菌对第三代头孢菌素耐药的最常见机制。ESBLs 尤其在肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌最为多见,ESBLs 由质粒介导,易在同种属甚至不同种属细菌间传递,造成对多种抗菌药物的耐药^[1]。喹诺酮类药物的抗菌机制主要是抑制细菌体内的 DNA 回旋酶(又称拓扑异构酶Ⅱ)的活性,导致细菌死亡^[2]。

DNA 回旋酶和拓扑异构酶Ⅳ是细菌体内最基本的酶,在所有细菌中都呈高度表达状态,编码靶酶的基因分别为 *gyrA*/*gyrB*/*parC*/*parE*,这些基因的点突变有可能引起耐药^[3]。在 *gyrA* 和 *parC* 基因内有一个称之为热点的氟喹诺酮耐药决定区(QRDR)^[4]。细菌对喹诺酮类药物产生耐药的机制可有多种,其中主要的有如下 3 种:(1)编码 DNA 旋转酶(由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码)和拓扑异构酶Ⅰ(由 *parC* 和 *parE* 基因编码)的基因发生突变。(2)膜的通透性降低。(3)主动外排系统功能增强^[5]。

分析以上结果,作者认为:(1)重症监护病房和临床各科危重症患者 2 种细菌分离菌株耐药现象严重,且表现为多药耐药;与不产 ESBLs 菌株比较,产 ESBLs 菌株耐药现象尤为严

重。(2)分离菌株均检出喹诺酮类耐药基因 *parC* 和 *gyrA*,但其药物敏感率和耐药基因携带率有一定差异,提示携带喹诺酮类耐药基因是其对喹诺酮类药物产生耐药的原因,此外可能尚有其他喹诺酮类耐药机制存在。(3)大肠埃希菌和肺炎克雷伯临床分离株中喹诺酮类耐药基因的存在与 ESBLs 的产生无明显相关性。

参考文献

[1] 陈萍,刘丁,余志海.产超广谱 β-内酰胺酶菌医院感染的危险因素[J].中华医院感染杂志,2003,13(5):476-477.
[2] 赵汝霞,虞亦鸣,邓在春.喹诺酮类药物的研究进展[J].临床肺科杂志,2010,15(12):1969-1770.
[3] Tillotson GS,Blondeau JM. Structure-activity-function al-
uation of the fluoroquinolones. In Moxifloxacin in Practice
[J]. Maxim Medical,1999,20(1):91-101.
[4] 王茜.265 例 ICU 患者病原菌菌谱和耐药性分析临床研究[J].临床和实验医学杂志,2010,9(14):1101-1102.
[5] 蒋杰.产 ESBLs 大肠埃希菌对氟喹诺酮类的耐药机制研
究[D].云南:昆明医学院,2008.

(收稿日期:2011-06-10)

从血液常规分析看贫血

葛 林(江苏省沭阳县人民医院检验科 223600)

【关键词】 血液常规; 贫血; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.15.069 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2011)15-1909-03

贫血是由多种原因引起外周血单位容积内血红蛋白(Hb)浓度、红细胞计数(RBC)及血细胞比容(Hct)低于本地区相同年龄和性别人群的参考值下限的一种症状。

1 贫血的临床表现^[1]

- 1.1 一般表现 主要有疲乏无力,皮肤、黏膜和甲床苍白等。
1.2 心血管及呼吸系统 心悸、气短,心律加快及呼吸加深,