

- 志), 2010, 41(11): 810-822.
- [2] LI J, WANG Z J, ZHENG X L. Discussion of rationality of pharmaceutical water microbiological testing methods [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 735-738.
- [3] PEI L, HU C Q, MA S H, et al. Correlation of bacteria in the contaminated drug and the environmental microbes in the clean room for pharmaceuticalmicrobial test investigated by FTIR [J]. Acta Pharm Sin(药 学 学 报), 2007, 42(11): 1189-1194.
- [4] HARMSSEN D, ROTHGANGER J, FROSCHE M, et al. RIDOM: ribosomal differentiation of medical micro-organisms database [J]. Nucleic Acids Res, 2002(30): 416-417.
- [5] PEI L, HU C Q, MA S H, et al. Correlation of bacteria in the contaminated drug and the environmentalmicrobes in the clean room for pharmaceuticalmicrobial test investigated by FTIR [J]. Acta Pharm Sin(药 学 学 报), 2007, 42(11): 1189-1194.
- [6] FANG Y L, FENG Z, ZHONG W, et al. Investigation and analysis of microbiological contamination in core area of sterile drug manufacturing enterprises [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2014, 28(6): 586-590.
- [7] CHI W Z, SONG T, ZHOU F F, et al. Application of microbe technology in the industry of sterile medicine [J]. Chin J Med Guide(中国医药导刊), 2012, 14(1): 169-172.
- [8] FANG Y L, JIANG B, FANG R, et al. Identification and characterization of bacterial contaminations isolated from drug sterility test [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(6): 1067-1072.
- 收稿日期: 2015-03-10

碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降肠杆菌科细菌耐药基因型研究

厉世笑, 周鹏, 余素飞, 彭敏飞, 王静(台州医院, 浙江 临海 317000)

摘要: 目的 研究碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降肠杆菌科细菌的耐药情况及产碳青霉烯酶基因型。方法 对临床分离到非重复的 36 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌, 应用改良 Hodge 试验进行产碳青霉烯酶的表型确证, PCR 扩增技术分析产碳青霉烯酶基因型。结果 药敏试验显示 36 株碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌具有对第 3, 4 代头孢菌素、碳青霉烯类、氟喹诺酮类和酶抑制剂复合制剂等多重耐药。36 株菌株中有 16 株改良 Hodge 试验阳性; PCR 结果 10 株细菌携带 *bla*_{KPC}, 未检出 *bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{GIM}、*bla*_{SIM}、*bla*_{NDM-1} 基因条带。结论 产 KPC 酶是台州医院碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降肠杆菌科细菌的主要耐药机制, 其中 KPC 是主要基因型。

关键词: 肠杆菌科细菌; 碳青霉烯酶; 耐药基因

中图分类号: R978.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)07-0850-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.07.020

Analysis of Carbapenemase Genotypes in *Enterobacteriaceae* Species with Reduced Susceptibility to Carbapenems

LI Shixiao, ZHOU Peng, YU Sufei, PENG Minfei, WANG Jing(Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Linhai 317000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the drug resistance and carbapenemase genotypes of the *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems. **METHODS** Carbapenemases-producing phenotype of 36 strains was analyzed by modified Hodge test, PCR amplification was used to analyze carbapenemase genotypes. **RESULTS** The susceptibility test showed that the 36 clinical isolates were multi-resistant strains, resistant to third-generation and forth-generation of cephalosporin, carbapenems, fluoroquinolones and β -lactamases inhibitor compounds. Modified Hodge test showed that 16 of all strains produced carbapenemase. PCR amplification indicated that 10 strains carried the carbapenemase genotype of *bla*_{KPC}. Genes of *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{NDM-1} were not detected in all strains. **CONCLUSION** The mainly carbapenem-resistant mechanism of *Enterobacteriaceae* is producing KPC enzyme in Taizhou Hospital. KPC genes are the most popular carbapenemases coding genes.

KEY WORDS: *Enterobacteriaceae* species; carbapenemases; resistance gene

肠杆菌科细菌是医院感染主要的条件致病菌, 可引起肺炎、心内膜炎、皮肤软组织感染、

腹腔感染、关节炎、骨髓炎、尿路感染和菌血症等^[1]。碳青霉烯类药物, 如亚胺培南、美罗培南、

作者简介: 厉世笑, 女, 主管技师

Tel: 15157289076

E-mail: lsx0992@126.com

厄他培南,具有良好的通透性和广谱抗菌活性,是目前治疗肠杆菌科细菌感染最有效的抗菌药物。随着碳青霉烯类抗菌药物的大量使用,肠杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药也越来越多。肠杆菌科细菌对碳青霉烯类的耐药机制主要是碳青霉烯酶的产生^[2]。本研究对2012—2013年台州医院临床分离的36株碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降肠杆菌科细菌的耐药基因型进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集2012—2013年从台州医院各类临床标本分离出的36株对第3、4代头孢菌素以及碳青霉烯类抗菌药物耐药或敏感性下降的肠杆菌科细菌作为实验菌株,主要来自ICU、急诊病区、脑外科、脑外科等科室送检的痰液、尿液、分泌物、全血等标本。

1.1.2 主要试剂与仪器 Taq酶(批号:SC0010)、dNTPs(批号:4356887)、DNA maker(批号:S0079)、引物(批号:9303936580-9303936591)均购自上海生工生物有限公司。VITEK 2 Compact全自动微生物分析仪及配套鉴定卡(批号:241280510)和药敏卡(批号:113272640)购自法国梅里埃公司。药敏纸片(英国Oxoid公司)。PCR仪、电泳仪、电泳槽及凝胶成像系统为美国BioRad公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定及药敏 运用VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定仪与配套的卡片对菌株进行鉴定及药敏试验。用K-B法对所有菌株的药敏试验进一步复核,结果解释标准参照2010年CLSI标准判断。质控菌株为大肠杆菌ATCC 25922、铜绿假单胞菌ATCC 27853。

1.2.2 改良的Hodge试验 从表型上检测肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶。将0.5麦氏单位的大肠埃希菌(ATCC 25922)进行1:10稀释,菌液均匀涂布在MH平板上,中间贴每片10 μg的厄他培南纸片,将待测菌株以纸片为起点,从纸片边缘向外划线接种,35℃培养16~20 h,观察结果,当抑菌圈内呈矢状者为阳性,即可判断菌株产碳青霉烯酶,并设阴性和阳性对照。

1.2.3 PCR扩增 用煮沸法提取细菌DNA模板,对碳青霉烯酶基因 bla_{KPC} 、 bla_{IMP} 、 bla_{VIM} 、 bla_{GIM} 、 bla_{SIM} 、 bla_{NDM-1} 进行PCR扩增,引物序列见表1。PCR反应体系:共50 μL,其中10×Buffer 5 μL,

dNTP 4 μL,引物各1 μL,DNA聚合酶0.25 μL,无菌水28.75 μL,DNA模板2 μL。PCR扩增条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环,最后72℃延伸10 min。扩增结束,扩增产物置1.2%琼脂糖凝胶,120 V,电泳30 min,最后经溴乙锭染色后在凝胶成像系统上分析结果。

表1 各引物序列

Tab. 1 The primer sequences

引物名称	序 列	片段大小/bp
KPC	5'-ATGTCAGTGTATCGCCGTCT-3'	893
	5'-TTTTTCAGAGCCTTACTGCCC-3'	
IMP	5'-TGAGCAAGTTATCTGTATTC-3'	740
	5'-TTAGTTGCTTGGTTTGTATG-3'	
VIM	5'-TTATGGAGCAGCAACCGATGT-3'	920
	5'-CAAAAGTCCCGCTCCAACGA-3'	
GIM	5'-AGAACCTTGACCGAACGCAG-3'	748
	5'-ACTCATGACTCCTCACGAGG-3'	
SIM	5'-TACAAGGGATTTCGGCATCG-3'	571
	5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'	
NDM-1	5'-CAGCACACTTCCTATCTC-3'	292
	5'-CCGCAACCATCCCTCTT-3'	

2 结果

2.1 敏感性下降菌株类别

36株碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降的肠杆菌科细菌的菌株类别见表2,其中以肺炎克雷伯菌占多数。

表2 实验所用的菌株类别情况

Tab. 2 The category of strains used in the experiments

菌 种	株数
肺炎克雷伯菌	23
产气肠杆菌	5
阴沟肠杆菌	3
弗氏柠檬酸杆菌	2
黏质沙雷菌	2
摩根摩根菌	1
总计	36

2.2 药敏结果

对36株碳青霉烯类敏感性下降肠杆菌科细菌的耐药检测结果见表3。由表3可见,36株耐药菌株对单环β-内酰胺类、第3、4代头孢菌素、氟喹诺酮类、磺胺类等的耐药率均>70%,对碳青霉烯类和酶抑制剂复合制剂的耐药率>50%,但对阿米卡星、替加环素等均敏感。

表 3 36 株肠杆菌科细菌对常用抗菌药物的耐药率

Tab. 3 Drug resistance rates of the 36 *Enterobacteriaceae* species to the antibiotics

抗菌药物	耐药株数	耐药率/%
氨曲南	36	100.0
头孢曲松	35	97.2
头孢他啶	34	94.4
头孢吡肟	31	86.1
哌拉西林/他唑巴坦	22	61.1
头孢哌酮/舒巴坦	19	52.8
环丙沙星	26	72.2
左旋氧氟沙星	27	75.0
复方新诺明	30	83.3
阿米卡星	0	0
亚胺培南	22	61.1
美罗培南	20	55.6
替加环素	0	0

2.3 改良 Hodge 试验筛选结果

改良 Hodge 试验结果临床分离的 36 株对碳青霉烯类抗菌药物非敏感菌株中, 改良 Hodge 试验结果 16 株为阳性, 包括 14 株肺炎克雷伯菌、2 株产气肠杆菌, 其余均为阴性, 见图 1。

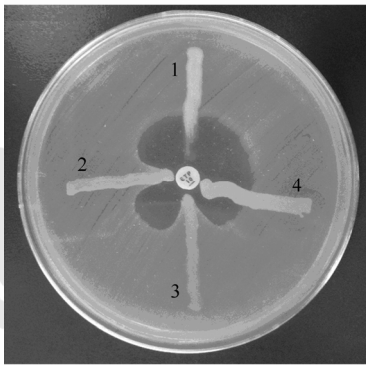


图 1 临床分离株改良 Hodge 试验

1-阴性对照; 2-阳性对照; 3,4-试验菌株。

Fig. 1 The modified Hodge test of the strains

1-negative control; 2-positive control; 3,4-the clinical strains.

2.4 PCR 基因扩增

本研究对上述 Hodge 试验阳性的 16 株碳青霉烯类敏感性下降肠杆菌科细菌用 PCR 法进行碳青霉烯酶基因筛查, 其中有 10 株细菌扩增出 *bla*_{KPC} 基因, 包括 9 株肺炎克雷伯菌和 1 株产气肠杆菌, 部分菌株的 PCR 结果见图 2, 但未检出 *bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{GIM}、*bla*_{SIM}、*bla*_{NDM-1} 等基因条带。其余 6 株 Hodge 试验阳性的菌株未发现携带碳青霉烯酶基因。

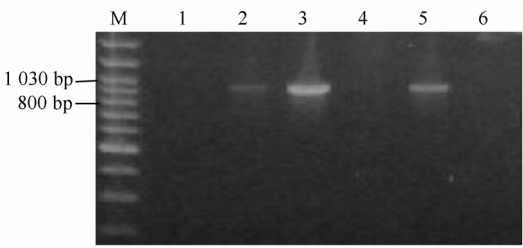


图 2 PCR 扩增产物电泳结果

1~6-临床分离株; M-100 bp DNA maker。

Fig. 2 Electrophoretic profiles of PCR products

1-6-the clinical isolates; M-100 bp DNA maker.

3 讨论

肠杆菌科细菌是医院感染重要的病原菌, 碳青霉烯类抗菌药物具有抗菌谱最广、抗菌活性最强等特点, 是临床用来治疗肠杆菌科细菌感染的首选抗菌药物之一。耐药菌株不断出现, 已有的报道包括肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、摩根摩根菌等^[3-5]。

本研究分离的 36 株碳青霉烯类敏感性下降肠杆菌科细菌对常用抗菌药物呈现不同程度的耐药。药敏结果显示, 除阿米卡星、替加环素外, 对头孢类抗菌药物的耐药率均>85%, 再加上对氟喹诺酮类、磺胺类的耐药, 增加临床抗感染治疗的难度。

本研究结果显示, 36 株碳青霉烯类敏感性下降的肠杆菌科细菌中有 16 株为改良 Hodge 试验阳性, 对这 16 株菌株进一步用 PCR 法进行碳青霉烯酶基因筛查, 发现其中 10 株均产 KPC 型碳青霉烯酶, 检出菌中主要为肺炎克雷伯菌, 其次为产气肠杆菌, 其余 6 株 Hodge 试验阳性的肠杆菌科细菌均未检出碳青霉烯酶基因。表明产 KPC 碳青霉烯酶是引起肠杆菌科细菌对碳青霉烯类的耐药主要机制之一。临床资料显示, 10 株 KPC 型阳性菌株中有 8 株均分离自 ICU 和急诊病区, 并且多数患者住院时间超过 1 个月, 住院期间使用多种抗菌药物包括碳青霉烯类抗菌药物。回顾分析 10 株菌株对 β -内酰胺类抗菌药物呈多种耐药, 但对阿米卡星、替加环素均敏感。有研究表明, KPC 型碳青霉烯酶基因位于可移动的质粒上, 其质粒可能同时携带多种 β -内酰胺酶, 如 AmpC 酶和 ESBLs 基因, 可导致多重耐药^[6-7]。但本研究未检出 *bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{GIM}、*bla*_{SIM}、*bla*_{NDM-1} 等基因, 可能还存在着别的基因型别, 如其他 β -内酰胺酶基因, 有待于进一步研究。

综上所述,该院肠杆菌科细菌对碳青霉烯耐药的主要机制是产 KPC 型碳青霉烯酶, KPC 酶常位于可移动元件上,具有高整合性和可转移性,临床上应引起高度重视,更应避免这些耐药菌株的扩散和传播。

REFERENCES

- [1] XIA Y, LIANG Z, SU X, et al. Characterization of carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae* species exhibiting decreased susceptibility to carbapenems in a university hospital in Chongqing, China [J]. *Ann Lab Med*, 2012, 32(4): 270-275.
- [2] 范建中,董晓勤,王贤军. KPC 型碳青霉烯酶研究概况和进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(6): 1469-1471.
- [3] WEI Z Q, DU X X, YU Y S, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(2): 763-765.
- [4] HU L Q, WANG S, SHI Y B, et al. Analysis of carbapenemase genotypes of carbapenem-resistant *Proteus mirabilis* strains clinically isolated from 2009 to 2012 [J]. *Chin J Microbiol Immunol*(中华微生物学和免疫学杂志), 2013, 33(6): 416-420.
- [5] SHI D, KUAI S G, SHAO H F, et al. A study on the resistance mechanism of *Morganella morganii* to carbapenems [J]. *Lab Med*(检验医学), 2012, 27(4): 266-270.
- [6] MANOHARAN A, PREMALATHA K, CHATTERJEE S, et al. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases among *Enterobacteriaceae* with their *in vitro* antimicrobial susceptibility [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2011, 29(2): 161-164.
- [7] SMITH M E, HANSON N D, HERREEA V L, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(2): 763-765.

收稿日期: 2014-11-15

HPLC 测定硫酸阿托品片的含量及含量均匀度

陈德俊, 徐志洲, 张雷, 刘明洁* (山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定硫酸阿托品片的含量及含量均匀度。方法 采用 SHISEIDO CAPCELL C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(含 0.15% 三乙胺,用磷酸调节 pH 值至 6.0)-甲醇(75:25)为流动相,流速:1.0 mL·min⁻¹,检测波长:210 nm,柱温:35℃,进样量:20 μL。结果 硫酸阿托品浓度在 5.878 8~58.788 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好,回归方程为 $Y=24.0158X+0.0959$, $r=1.0000$,平均回收率为 100.2%($n=9$)。结论 该方法简便快速,可用于硫酸阿托品片含量和含量均匀度的测定。

关键词: 硫酸阿托品; 含量; 含量均匀度; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)07-0853-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.07.021

Determination of the Content and Content Uniformity of Atropine Sulfate Tablets by HPLC

CHEN Dejun, XU Zhizhou, ZHANG Lei, LIU Mingjie* (*Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of the content and content uniformity of atropine sulfate tablets. **METHODS** SHISEIDO CAPCELL C₁₈ chromatographic column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was 0.01 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution(including 0.15% triethylamine, adjusted to pH 6.0 by phosphoric acid)-methanol(75:25) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 210 nm, and the column temperature was 35℃. The injection volume was 20 μL. **RESULTS** Good linear correlation was found in the range of 5.878 8~58.788 μg·mL⁻¹, and the linear equation was $Y=24.0158X+0.0959$, $r=1.0000$. The average recovery was 100.2%($n=9$). **CONCLUSION** This method is simple, rapid and efficient for the quality control of atropine sulfate tablets.

KEY WORDS: atropine sulfate; content; content uniformity; HPLC

作者简介: 陈德俊,男,硕士,副主任药师 Tel: (0531)81216520
任药师 Tel: (0531)81216515 E-mail: liumingjie63@sina.com

E-mail: chendejunweiwei@sina.com

*通信作者: 刘明洁,女,主