DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.05.020

泌尿道革兰氏阴性杆菌抗生素耐药性及其质粒图谱的分析

俞晓峰 张 凌 薛 强* 冷泰俊 (第三军医大学卫防系流行病学教研室) 630038

提 要 本文对由泌尿科住院患者尿液中分离的 28 株革兰氏阴性杆菌进行了抗生素耐药谱及其质粒图谱的分析。结果表明:有 92%以上的分离株对氨苄青霉素、庆大霉素、氯霉素、萘定酸、环丙氟哌酸和洁霉素耐药;且所有分离株均至少对 5 种以上的抗生素耐药。有 13 个分离株(46.4%)带质粒,其中以分子量为 50Md 的质粒出现率最高,该质粒可能为泌尿科内的流行质粒。本文还发现来自医院内两泌尿道感染者的分离株虽为不同菌种,却显示相同的质粒图谱,提示此两感染患者可能存在某种相互联系。

关键词 革兰氏阴性菌;耐药性;质粒;医院内感染

泌尿科住院患者因留置导尿等操作过程易发生医院内泌尿道感染,而医院内多种抗生素耐药性革兰氏阴性杆菌的广泛存在则是医院感染暴发的主要原因之一。革兰氏阴性杆菌对多种抗生素耐药性多由其所带的接合性 R 质粒编码,这种 R 质粒往往具有传递性,从而产生在医院环境内的非同种细菌分离株可带相同或非常相关质粒的现象[1,2,3]。

在以 R 质粒作为流行质粒的医院感染暴发研究中,质粒图谱分析已成为一种非常有利的工具[4]。为了解医院泌尿科革兰氏阴性杆菌抗生素耐药性及其质粒图谱的特征,以期对可能发生的医院感染进行有效的监控,我们应用质粒图谱结合抗生素敏感试验的方法分析了西南医院泌尿科患者尿液中的革兰氏阴性杆菌分离株,结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌种收集及培养

1990 年 4～6 月收集西南医院泌尿科 20 位住院患者的中段尿标本,接种于血琼脂培养基,在 37℃下培养 24h,按伯杰系统细菌学手册进行菌种鉴定。

1.2 抗生素敏感试验

将革兰氏阴性杆菌分离株按纸片扩散法检测其对 9 种抗生素的敏感性。选用的抗生素有:氨苄青霉素(AMP)、庆大霉素(GEN)、丁胺卡那霉素(AKN)、氯霉素(CMP)、萘啶酸(NA)、头孢噻吩(CTN)、多粘菌素 B(PB)、环丙氟哌酸(CFA)和洁霉素(CLI)。

1.3 质粒 DNA 提取及鉴定

参照 Kado 和 Liu[5]的方法提取及纯化分离株的质粒 DNA;用 40μl TE 缓冲液(20mmol/L Tris-HCL,1mmol/L EDTA,pH7.4)溶解 DNA 沉淀。将提取的 DNA 与溴酚蓝液按 4:1 比例混合后,取约 20μl 标本点样,在 0.7%琼脂糖凝胶上电泳约 2.5 h 后,凝胶于 EB 液(1μg/ml 溴化乙锭)中染色约 1 h,在紫外灯下观察并照像。以大肠杆菌 V_{517} 株为 DNA 分子量标准品,测定电泳照片上各质粒 DNA 带的位置,参照 Meyer[6]法计算相对迁移率(Log RM)和分子量(Log MW),并建立相应的直线回归方程,算出各待测质粒 DNA 的分子量。

2 结果

2.1 菌谱及抗生素耐药性

共分离出 28 株革兰氏阴性杆菌,经鉴定由 8 种革兰氏阴性杆菌组成,其中以绿脓杆菌最多见(13 株),其它有克雷伯氏杆菌(4 株)、沙雷氏杆菌(4 株)、大肠杆菌(2 株)、哈夫尼亚杆菌(2 株)、阴沟肠杆菌(1 株)、枸橼酸杆菌(1 株)和产黄杆菌(1 株)。抗生素敏感试验结果见有 92%以上的分离株对氨苄青霉素、庆大霉素、环丙氟哌酸、萘啶酸、洁霉素和氯霉素耐药;82.1%分离株对头孢噻吩耐药;53.6%和 21.4%的分离株分别对丁胺卡那霉素和多粘菌素 B 耐药;而且这些分离株均至少对 5 种以上抗生素具有耐药性,其中以耐 7 种抗生素的分离株最多见(占 46.4%),耐

* 西南医院检验科

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

8 种和 9 种抗生素的分离株分别占 27.8%和 7.2%。

2.2 质粒图谱分析

质粒图谱分析证明，有 13 株革兰氏阴性杆菌分离株带有数目及分子量不等的质粒 DNA，分析这 13 株分离菌的抗生素敏感性及其所带质粒的数目和分子量大小发现，这些分离株均对氨苄青霉素、庆大霉素、氯霉素、萘啶酸、环丙氟哌酸和洁霉素等 6 种抗生素耐药；但对多粘菌素 B 除沙雷氏杆菌 9020 株外均敏感；其抗生素耐药谱可分为 5 种类型(见表 1)。这 13 株分离菌中最多可带 6 个质粒，按质粒分子量的大小可分为 13 种不同质粒，其中以分子量为 50Md 的质粒出现率最高(76.9%)。按分离株所带质粒分子量与数目的特点，其质粒图谱可有 10 种类型(见表 2)。

表 1 13 株革兰氏阴性杆菌抗生素耐药谱

菌株	抗生素敏感性									耐药谱
	AMP	GEN	AKN	CMP	NA	CTN	PB	CFA	CLI	
绿脓杆菌 902	+	+	+	+	+	−	−	+	+	I
绿脓杆菌 9027	+	+	+	+	+	+	−	+	+	II
绿脓杆菌 9011	+	+	−	+	+	+	−	+	+	II
绿脓杆菌 9014	+	+	+	+	+	+	−	+	+	II
克雷伯氏杆菌 908	+	+	−	+	+	−	−	+	+	V
克雷伯氏杆菌 9015	+	+	−	+	+	+	−	+	+	II
沙雷氏杆菌 905	+	+	+	+	+	+	−	+	+	II
沙雷氏杆菌 9020	+	+	−	+	+	+	+	+	+	IV
大肠杆菌 9010	+	+	+	+	+	+	−	+	+	II
大肠杆菌 9024	+	+	−	+	+	+	−	+	+	II
哈夫尼亚杆菌 9017	+	+	−	+	+	+	−	+	+	II
哈夫尼亚杆菌 9013	+	+	+	+	+	+	−	+	+	II
阴沟肠杆菌 9025	+	+	+	+	+	+	−	+	+	II

+ 为耐药　　− 为敏感

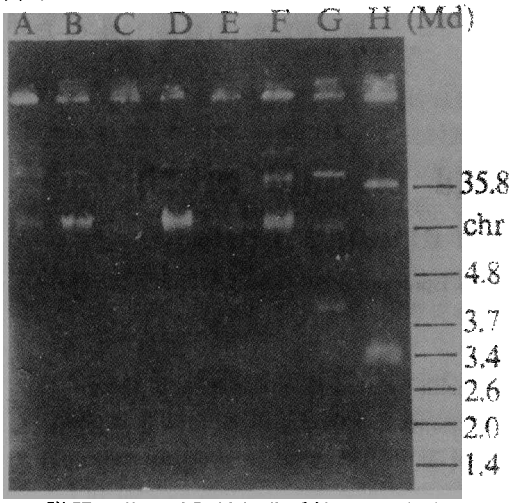
表 2 13 株革兰氏阴性杆菌质粒谱

菌株	质粒 DNA 分子量 (Md)	质粒谱
绿脓杆菌 902	62, 50, 36, 4.6, 3.7, 2.7	A
绿脓杆菌 9027	62, 50, 36	B
绿脓杆菌 9011	40, 36, 28	H
绿脓杆菌 9014	50	J
克雷伯氏杆菌 908	80, 38, 36, 28	F
克雷伯氏杆菌 9015	50	J
沙雷氏杆菌 905	62, 50, 36, 4.6, 3.7, 2.7	A
沙雷氏杆菌 9020	105, 50, 40, 28	E
大肠杆菌 9010	40, 4.6, 2.9	G
大肠杆菌 9024	70, 50	I
哈夫尼亚杆菌 9017	62, 40, 36, 3.4	C
哈夫尼亚杆菌 9013	62, 50, 28, 3.4, 2.7	D
阴沟肠杆菌 9025	62, 50, 36	B

由表 2 可见，绿脓杆菌 902 株、9027 株、9011 株和 9014 株虽为同种细菌株，但它们的质粒谱却不完全相同；其它如克雷伯氏杆菌 908 和 9015 株，沙雷氏杆菌 905 和 9020 株，以及大肠杆菌和哈夫尼亚杆菌株均为不同的质粒谱。来自医院内泌尿道感染者的不同时期分离株，也显示不同的质粒谱(如 菌株 905、9027 和

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

9017)。另外也发现来自医院内泌尿道感染的两患者分离株，虽为不同的菌种，却显示相同的质粒图谱类型，如绿脓杆菌 902 株与沙雷氏杆菌 905 株(见附图)。



附图　革兰氏阴性杆菌质粒 DNA 电泳图谱

A 沙雷氏杆菌 9020；B 哈夫尼亚杆菌 9017；C 阴沟肠杆菌 9025；D 沙雷氏杆菌 905；E 绿脓杆菌 902；F 克雷伯氏杆菌 908；G 大肠杆菌 9010；H 大肠杆菌 V_{517}；Chr 染色体 DNA

3　讨论

目前医院内感染大部分是由多种耐药株的革兰氏阴性杆菌引起的，其主要原因是耐药质粒的流行传播所致[7]。因此追踪 R 质粒的流行特点，将有助于临床上采取有效措施控制医院感染的发生。而质粒图谱分析方法是利用分子生物学技术研究细菌的特征，并逐渐在医院内革兰氏阴性杆菌和葡萄球菌感染的分子流行病学研究中显示出其优越性[4,8,9]。

本文应用质粒图谱分析法结合抗生素敏感试验对 28 株革兰氏阴性杆菌分离株的分析表明，分离株除对多粘菌素 B、丁胺卡那霉素和头孢噻吩外，对其余 6 种抗生素的耐药性均超过 92%，其中对氯霉素全部耐药；而且每个分离株均表现对 5 种以上的抗生素具有耐药性，说明这些菌株为多种抗生素耐药性革兰氏阴性杆菌。比较 13 株带质粒的分离株抗生素耐药谱与其质粒谱发现，这些菌株的耐药谱可分为 5 种类型，而质粒谱则可有 10 种类型，表明质粒图谱分型较抗生素耐药谱分型更为精细。

从本文分离株发现的 13 种质粒中，以分子量为 50Md 者出现机率最高，由此推测这种质粒可能是该医院泌尿科环境中主要的流行质粒。由于流行质粒在医院感染暴发及流行中起着重要的作用，该质粒的传播有可能导致多种耐药细菌医院感染暴发，故应予以重视和警惕。

本文的质粒图谱分析结果表明，同种菌株其质粒图谱可不相同，同一来源不同时期的分离株也可表现不同的质粒图谱；而不同菌种却可显示相同的质粒图谱，例如绿脓杆菌 902 株和沙雷氏杆菌 905 株是分别来自医院感染的不同患者标本，且两者在发生感染的时间上相隔 4 d，这两分离株虽为不同菌种，且抗生素耐药谱也不完全相同，但它们的质粒图谱却显示一致性，提示此两患者先后发生的医院内泌尿道感染可能存在某种相互联系，这为进一步探讨医院感染的发生及其传播机制，以及采取有效防治措施提供了线索。

参考文献

1. Smith PW, Rusuak PG. Aminoglycoside-resistant Pseudomonas aeruginosa urinary tract infection: study of an outbreak. J Hosp Infect, 1981; 2: 71
2. Giffin HG, Foster TJ, Falkiner FR, et al. Molecular analysis of multiple-resistance plasmids transferred from gram-negative bacteria isolated in a urological unit. Antimicrob Agents Chemother, 1985; 28: 413
3. Tompkins LS, Plorde JJ, Falkow S, et al. Molecular analysis of R-factors from multiresistant nosocomial isolates. J Infect Dis, 1980; 141: 625
4. Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. Clin Microbial Rev, 1988; 1: 228
5. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol, 1981; 145: 1365
6. Meyer JA, Sanchez D, Elwell LP, et al. Simple agarose gel electrophoretic method for the identifi-

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

cation and characterization of plasmid DNA. J Bacteriol,1976;127:1529
7. 张邦燮。医院感染。成都:四川科学技术出版社,1985:161
8. John JF. Molecular analysis of nosocomial epidemics. Nosocomial Infections,1989;3:683
9. Moller JK. Drug resistance and plasmid profiles in Staphylococcus epidermidis in 1964 and 1986. J Hosp Infect,1988;12:19

(收稿:1992-01-18;修回:1992-05-15)

Analysis of antibiotic resistance and plasmid profile of Gram-negative bacilli isolated form a urologic unit

Yu Xiaofeng, Zhang Ling, Xue Jiang, et al (Department of Epidermiology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Twenty-eight strains of Gram-negative bacilli isolated from the urine of the patients of a urologic unit were studied for their antibiotic resistance and their plasmid profile. It was found that 92% of the strains were resistant to most of antibiotics used in the unit except cephalothin, amikacin and polymyxin B, and each of the resistant strains was resistant at least to 5 antibiotics. 13 strains out of the 28 harbored plasmids ranging from 1 to 6 in number and 105 Md to 2.7 Md in molecular weight. The plasmid with 50 Md was the most popular one in this study, which may be the epidemic plasmid in the urologic unit. It was also found that 2 different species of bacteria isloated from the patients with infection of the urinary tract showed identical plasmid profile, which indicates that these 2 patients may be associated with each other.

Key words Gram-negative rods; antibiotics resistance; plasmids; nosocomial infection

左侧胸导管自发性破裂并发乳糜胸一例

段绪伟 凌培基 陈摩端 (第三军医大学大坪医院呼吸科) 630042

王某 女性,39 岁,农民,住院号 163379。1991 年 9 月,自感无明显诱因始左侧胸痛,呈持续性隐痛,咳嗽,咳少许白色粘稠痰,不咯血。2 月后上述症状加重并感夜间发热,盗汗,服中药无效,今年 4 月到某县医院诊断左侧胸腔积液——"脓胸",给予抽胸水,消炎,对症等治疗,胸水大部分吸收出院。半月后感胸闷,活动后呼吸困难,再次到县医院,胸透示左侧胸腔积液复发,为明确诊断入我院。既往身体健康,否认肺结核,生吃螃蟹史,无外伤手术史。查体:体温 37℃,脉搏 82 次/min,呼吸 22 次/min,血压 16/9 kPa。全身皮肤无黄染,体表淋巴结不肿大,气管居中,胸廓对称,左肺语颤减弱,左锁骨中线第 4 肋以下叩诊呈浊音,呼吸音消失。右肺无异常发现。心率 82 次/min,律齐,无杂音,腹软,肝脾肋下未及,无移动性浊音,未见杵状指(趾)。辅助检查:RBC 3.0×10^{12}/L,Hb 9g/L,BPC 120×10^{9}/L,WBC 5.1×10^{9}/L,N 0.66,L 0.34,肝功、肾功、生化、血糖、血沉正常。类风湿因子阴性。OT 1∶2000U 试验(-)。痰找抗酸杆菌 6 次(-)。肺吸虫皮试(-)。血找微丝蚴 3 次(-)。痰细胞学 6 次(-)。胸片示除胸水征象外无异常病灶发现。抽胸水多次,外观乳白色,浑浊粘稠,常规检查 WBC 0～4,RBC ++,比重 1.017,胸水蛋白定量测定 6.7g/L,胸水细胞学查见大量淋巴细胞,无癌细胞,胸水 LDH 528U,AKP18.4U,胸水细菌培养(-)。血脂:总胆固醇3.63 mmol/L,甘油三脂 1.0 mmol/L,HDL-C 1.5 mmol/L,LDL-C 1.98 mmol/L。胸水:胆固醇 7.33 mmol/L,甘油三脂 3.59 mmol/L,HPL-C 0.36 mmol/L,

(下转 477 页)

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