

· 论 著 ·

铜绿假单胞菌的耐药性分析及 I 类整合子和插入序列共同区调查*

高玉录, 杨 悌[△], 凌 峰, 何有华, 何凤春, 朱怡平, 李俊杰

(昆山市中医医院检验科, 江苏昆山 215300)

摘 要:目的 了解临床分离的铜绿假单胞菌的耐药性及其 I 类整合子和插入序列共同区 (ISCR) 携带率, 为临床治疗提供参考依据。方法 收集从临床患者标本分离得到的 106 株铜绿假单胞菌, 使用 WHONET5.6 软件分析其临床分布和耐药性, 采用 PCR 和电泳技术对其进行 I 类整合子和 ISCR 的检测。结果 临床分离的铜绿假单胞菌科室来源以肺病科为主, 占 48.11%; 标本来源以痰液为主, 占 73.58%。铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗菌药物的敏感率为 85% 左右, 对亚胺培南的敏感率为 65.09%, I 类整合子和 ISCR 的携带率分别为 84.91% 和 76.42%。结论 该院铜绿假单胞菌的科室来源以肺病科为主, 标本来源以痰液为主, 对氨基糖苷类抗菌药物的敏感性相对较好, I 类整合子和 ISCR 可能与铜绿假单胞菌的耐药性产生有关。

关键词:铜绿假单胞菌; 抗菌药物耐药性; I 类整合子; 插入序列共同区

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.20.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)20-2923-03

Analysis of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and integron I and insertion sequences common area survey*

Gao Yulu, Yang Ti[△], Lin feng, He Youhua, He Fengchun, Zhu Yiping, Li Junjie

(Traditional Chinese Medicine Hospital of Kunshan, Kunshan, Jinagsu 215300, China)

Abstract: Objective To investigate antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the patients' specimens in the hospital, the carrying rate of integron I and insertion sequences common area (ISCR) and provide reference for clinical treatment.

Methods 106 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were collected and their bacterial antibiotic resistance and clinical distribution were analyzed by using WHONET5.6 software. PCR and electrophoresis were used to screen integron I and ISCR carried by the target strains. **Results** Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* mainly collected from department of pulmonary disease which accounted for 48.11%, and sputum specimens were the major source of the 106 isolates, which accounted for 73.58%. The sensitivities of *Pseudomonas aeruginosa* to tobramycin, amikacin, gentamicin were about 85%, while to imipenem only 65.09%. The carrying rate of integron I and ISCR in *Pseudomonas aeruginosa* was 84.91% and 76.42%, respectively. **Conclusion** *Pseudomonas aeruginosa* distribution of hospital departments mainly concentrate in pulmonary department and the major type of specimen is sputum. The sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycoside antibiotic is relatively good. Integron I and ISCR in *Pseudomonas aeruginosa* could be associated with antibiotic resistance.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; antibiotic resistance; integron I; insertion sequences common area

铜绿假单胞菌是临床分离的常见条件致病菌, 是导致医院感染的重要来源, 由于其多重耐药和泛耐药的不断出现, 给临床治疗带来了挑战^[1]。铜绿假单胞菌耐药机制复杂, I 类整合子和插入序列共同区 (ISCR) 的存在是导致铜绿假单胞菌耐药的重要因素^[2]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 整理本院 2013~2014 年 106 例铜绿假单胞菌感染的患者资料, 男女比例为 57:49, 患者来自肺病科、脑外科、脑内科、重症监护室 (ICU)、肿瘤外科、消化科、肝胆外科等 15 个临床科室。来自上述患者的共 106 株铜绿假单胞菌 (剔除从同一患者标本重复分离到的菌株) 分离自血液、痰液、尿液、脓液、引流液、胸腔积液和腹水等 12 类临床送检标本。铜绿假单胞菌均由细菌室分离、鉴定和保存。

1.2 方法 (1) 采用 Walkaway 40 全自动细菌鉴定及药物敏

感性试验检测仪, 进行菌种鉴定和细菌对药物的敏感性检测。使用 WHONET5.6 软件对细菌临床分布和药敏试验数据进行分析, 药敏折点采用 2014 年临床实验室标准化协会 (CLSI) M100 文件中的标准。(2) 采用聚合酶链反应 (PCR) 对目标菌株进行 I 类整合子和 ISCR 的检测。I 类整合子引物 P1: CCC GAG GCA TAG ACT GTA, P2: CAG TGG ACA TAA GCC TGT TC; ISCR 引物 P1: ATG GT T TCA TGC GGG TT, P2: TTT GAA GGT TCG ACA GC, 均由上海生工生物技术公司合成。PCR 试剂盒购买自英俊生物技术公司。实验方法参照文献^[3]进行。

2 结 果

2.1 菌株的临床分布 上述 106 株铜绿假单胞菌分布于 15 个不同科室, 以肺病科为主, 占 48.11% (51/106), 然后依次为重症医学科 16.04% (17/106)、脑病内科 13.21% (14/106)、脑

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81372212); 江苏省昆山市社会科学技术发展基金资助项目 (KS1011)。 作者简介: 高玉录, 男, 主管检验医师, 主要从事从事临床微生物方面的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: 120618542@qq.com。

病外科 12.26%(13/106)、其他科室 10.38%(11/106),见表 1;分离于 12 类标本,其中以痰标本为主,占 73.58%(78/106),然后依次为脓液 10.38%(11/106)、尿液 7.55%(8/106)、血液 4.72%(5/106)、其他 3.77%(4/106),见表 2。

表 1 106 株铜绿假单胞菌的临床科室来源分布

科室	n	所占比例(%)
肺病科	51	48.11
重症医学科	17	16.04
脑病内科	14	13.21
脑病外科	13	12.26
其他科室	11	10.38
合计	106	100.00

表 2 106 株铜绿假单胞菌的标本来源分布

标本类型	n	所占比例(%)
痰液	78	73.58
脓	11	10.38
尿	8	7.55
血	5	4.72
其他	4	3.77
合计	106	100.00

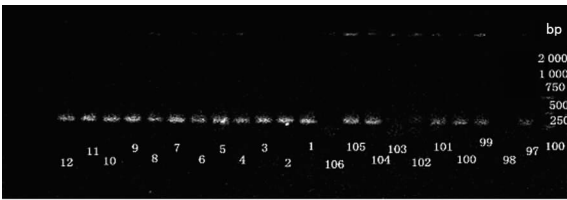
2.2 耐药性分析 这 106 株铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗菌药物(妥布霉素、阿米卡星、庆大霉素)的敏感率为 85%左右,对四代头孢菌素类抗菌药物头孢吡肟敏感率在 70%以上,而对亚胺培南的敏感率只有 65%,见表 3。

表 3 106 株铜绿假单胞菌的耐药性分析[n(%)]

抗菌药物	耐药	中介	敏感
哌拉西林	75(70.75)	12(11.32)	19(17.92)
哌拉西林/他唑巴坦	60(56.60)	6(5.66)	40(37.74)
头孢他啶	40(37.74)	8(7.55)	58(54.72)
头孢曲松	65(61.32)	11(10.38)	30(28.30)
头孢吡肟	20(18.87)	8(7.55)	78(73.58)
氨基曲南	50(47.17)	17(16.04)	39(36.79)
亚胺培南	31(29.25)	6(5.66)	69(65.09)
庆大霉素	21(19.81)	5(4.72)	80(75.47)
阿米卡星	12(11.32)	3(2.83)	91(85.85)
妥布霉素	10(9.43)	6(5.66)	90(84.91)
环丙沙星	51(48.11)	9(8.49)	46(43.40)
左旋氧氟沙星	40(37.74)	10(9.43)	56(52.83)

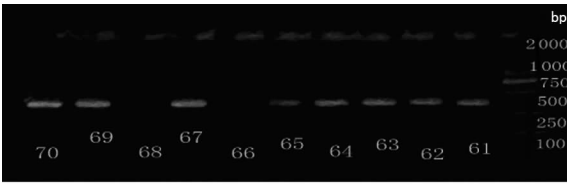
2.3 I 类整合子的检测 I 类整合子阳性株的 PCR 产物电泳结果在 160 bp 处显示目的条带,见图 1。本院铜绿假单胞菌中 I 类整合子的携带率为 84.91%(90/106)。

2.4 ISCR 的检测 ISCR 阳性株在 475 bp 处显示目的条带,见图 2。本院铜绿假单胞菌 ISCR 携带率为 76.42%(81/106)。



1~12、97、99~101、104、105: I 类整合子阳性;98、102、103、106: I 类整合子阴性。

图 1 I 类整合子 PCR 检测的部分凝胶电泳图



61~65、67、69、70: ISCR 阳性;66~68: ISCR 阴性。

图 2 ISCR PCR 检测部分凝胶电泳图

3 讨论

本院临床分离的铜绿假单胞菌的临床分布相对集中,分布的 15 个科室中仅肺病科就占近一半,而标本分布更为集中,仅痰液标本就占到七成以上。这除了与本院肺病科标本送检率高和痰标本所占比例较大有关外,不排除有局部院内感传播的可能,故需做进一步表型和基因型的同源性分析^[4-5]。铜绿假单胞菌是医院感染的重要条件致病菌^[6]。使用激素、患者昏迷、手术操作、引流管的使用、机械通气、开放气道是铜绿假单胞菌医院感染的危险因素^[7-8],临床对重点科室和易感患者应注意风险评估,减少医院感染发生。

本院铜绿假单胞菌的耐药情况严重,尤其是对内酰胺类药物,对二、三代头孢菌素、哌拉西林及哌拉西林复合制剂的敏感性较差,对单环类抗菌药物,如氨基曲南,也只有 30%左右的敏感率,对亚胺培南的敏感性低于头孢吡肟,只对氨基糖苷类抗菌药物敏感性相对较好,如对妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星的敏感率均在 80%左右,与相关报道相近^[9]。有研究报道,铜绿假单胞菌的耐药率呈逐年上升的趋势^[10],亚胺培南作为临床治疗革兰阴性菌的限制级使用抗菌药物,其耐药率也在不断上升,阿米卡星等氨基糖苷类抗菌药物的敏感性也在逐年降低^[11]。临床铜绿假单胞菌在抗菌药物的选择压力下耐药性会发生变化^[12],有的在用药 3~5 天耐药性就会发生变化,实验室要及时分离变异株进行药敏检测,临床对铜绿假单胞菌的治疗也应根据细菌药敏试验结果合理使用抗菌药物。

铜绿假单胞菌的耐药性机制复杂,主要有靶位的改变^[13]、膜通透性的改变、产生灭活酶和钝化酶^[14]、外排系统^[15]及生物膜^[16]的形成,细菌通过基因的水平转移,获得外源性耐药基因是细菌耐药性变迁的重要原因。整合子是细菌中一种能识别并俘获移动性元件的基因盒,有位点特异性的重组表达系统。整合子有 10 余种类型,其中 I 类整合子在临床株中最为常见的,整合子可变区可携带多种耐药基因盒,并随细菌的繁殖复制到子代基因中^[17]。ISCR 属 IS91-like 因子家族,缺少反向重复序列,通过滚环方式转移邻近的耐药基因^[18]。ISCR 常出现在复杂性 I 类整合子。ISCR 介导转座发生,转座不同长度的耐药基因,如 catA2、dfrA、qnr、blaCTX-M、blaCMY 等。

ISCR 可以在种属间传递耐药基因。此次调查本院铜绿假单胞菌中 I 类整合子和 ISCR 的携带率分别高达 84.91% 和 76.42%, 对于菌株移动元件携带的耐药基因分布, 有待于对其开放读码框架的进一步测序研究。铜绿假单胞菌的多重耐药性的产生和播散与 I 类整合子和 ISCR 有一定的相关性。

本院铜绿假单胞菌的科室分布相对集中, 科室以肺病科为主, 标本以痰为主; 对氨基糖苷类抗菌药物敏感性相对较好, 慎用第二、三代头孢菌素和碳青霉烯类抗菌药物进行治疗; I 类整合子和 ISCR 与铜绿假单胞菌耐药性的产生有一定关系。

参考文献

[1] 沈继录, 朱德妹, 王明贵, 等. 泛耐药铜绿假单胞菌耐药机制研究[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(26): 1859-1862.

[2] 吴奎海. 临床分离非发酵 G-杆菌 I 类整合子及 ISCR1 的结构研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2011.

[3] 王凤平. 1 800 株 G-杆菌插入序列共同区和整合子的耐药机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2010.

[4] 庞杏林, 陈守义, 邓志爱, 等. 重症监护病房医院感染铜绿假单胞菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分型[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(1): 17-20.

[5] 卓超, 伍晓峰, 金光耀, 等. 广州地区泛耐药铜绿假单胞菌的分子流行病学调查[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(6): 643-647.

[6] 林冬玲, 陈茶, 曾建明, 等. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(3): 91-95.

[7] 伍育旗, 单红卫, 赵贤瑜, 等. 重症监护病房铜绿假单胞菌医院感

染病例对照研究[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(2): 88-90.

[8] 侯飞, 王玲, 崔伟锋, 等. 铜绿假单胞菌医院感染的危险因素及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(16): 4050-4052.

[9] 施晓群, 孙景勇, 倪语星, 等. 2011 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(3): 218-221.

[10] 窦懿, 张勤. 烧伤病房六年内铜绿假单胞菌的耐药性及抗菌药物使用情况分析[J]. 中华烧伤杂志, 2014, 30(1): 9-14.

[11] 叶志强, 钟新华, 席云. 192 株铜绿假单胞菌的耐药性调查分析[J]. 广东医学, 2009, 30(7): 1089-1090.

[12] 郭仲辉, 黎毓光, 卓超. 抗生素压力下铜绿假单胞菌耐药机制变化的动态研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(9): 715-720.

[13] 王颖, 黄梅, 奚海燕等. 耐喹诺酮铜绿假单胞菌药物作用靶位改变的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(6): 18-20.

[14] 侯杰. β -内酰胺酶, 膜通透性及外膜蛋白介导铜绿假单胞菌多重耐药性研究[D]. 北京: 北京大学, 2001.

[15] 李显志. 铜绿假单胞菌主动外排泵介导的多重抗生素耐药性(英文)[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(10): 577-596.

[16] 徐笑洋, 邱晨. 铜绿假单胞菌生物膜耐药的研究进展[J]. 广东医学, 2012, 33(10): 1509-1513.

[17] 余广超, 徐霖, 袁广卿, 等. 铜绿假单胞菌中 I 类整合子及携带的耐药基因研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(9): 711-714.

[18] 孙静静. 耐碳青霉烯 G-杆菌碳青霉烯酶基因、整合子和 ISCR1 结构特征及基因分型研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.

(收稿日期: 2015-04-28)

(上接第 2922 页)

[2] Cao Y, Yang K, Zhang Z, et al. Correlation between plasma asymmetric dimethylarginine and different types of coronary heart disease[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2010, 35(4): 301-306.

[3] Lu TM, Ding YA, Charng MJ, et al. Asymmetrical dimethylarginine: a novel risk factor for coronary artery disease[J]. Clin Cardiol, 2003, 26(10): 458-464.

[4] Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(1): 170-176.

[5] Kocaman SA, Sahinarslan A, Biberoglu G, et al. Asymmetric dimethylarginine and coronary collateral vessel development [J]. Coron Artery Dis, 2008, 19(7): 469-474.

[6] Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, et al. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an Independent risk factor of ICU mortality[J]. Clin Nutr, 2003, 22(1): 23-30.

[7] Cavusoglu E, Ruwende C, Chopra V, et al. Relation of baseline plasma ADMA levels to cardiovascular morbidity and mortality at two years in men with diabetes mellitus referred for coronary angiography[J]. Atherosclerosis, 2010, 210(1): 226-231.

[8] 佚名. 不稳定性心绞痛诊断和治疗建议[J]. 中国循环杂志, 2001, 16(3): 226-226.

[9] 高润霖. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(12): 9-24.

[10] 中华医学会传染病学与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒学肝病防治方案[J]. 中华肝病杂志, 2000, 8(6): 324-329.

[11] Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor[J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(4): 824-833.

[12] Krempel TK, Maas R, Sydow K, et al. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events[J]. Eur Heart J, 2005, 26(18): 1846-1851.

[13] Landim MB, Casella Filho A, Chagas AC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis[J]. Clinics (Sao Paulo), 2009, 64(5): 471-478.

[14] 吴宗虎, 耿英杰. 血清非对称二甲基精氨酸水平与急性冠状动脉综合征的相关性研究[J]. 现代预防医学, 2011, 38(15): 3147-3148.

[15] 王洪巨, 刘俊, 史晓俊, 等. 血浆非对称二甲基精氨酸浓度与急性冠状动脉综合征的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2008, 24(2): 106-108.

[16] 黄日茂, Jiang HH, 罗万俊, 等. 冠心病患者血清非对称二甲基精氨酸水平与冠状动脉狭窄程度的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(7): 549-552.

(收稿日期: 2015-04-13)