

• 基础实验研究论著 •

烟台地区嗜麦芽窄食单胞菌整合子分布及其 可变区所携带耐药基因盒的研究*

杜江东, 连培文, 梁英凤, 唐倩青[△]

(青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院检验中心, 山东烟台 264000)

摘要:目的 分析嗜麦芽窄食单胞菌对临床常用抗菌药物的耐药性, 探讨明确嗜麦芽窄食单胞菌 I、II、III 类整合子的存在情况以及所携带的耐药基因盒, 为本地区更好地预防和控制嗜麦芽窄食单胞菌感染性疾病提供帮助。方法 收集临床分离的 51 株嗜麦芽窄食单胞菌采用微量肉汤稀释法测定嗜麦芽窄食单胞菌对 17 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)。根据 GenBank 注册的基因序列设计引物, PCR 扩增 I、II、III 类整合子。对整合子阳性菌株扩增其可变区产物进行测序分析, 所得结果在 GenBank 数据库中进行同源性比对, 了解可变区中含有基因盒的信息。结果 (1) 51 株嗜麦芽窄食单胞菌标本来源分布以痰液最多, 为 41 株, 占 80.39%, 感染人群主要以 60 岁以上年龄段为主, 为 38 株, 占 74.5%。病房分布: 重症监护室(ICU) 20 株, 占 39.22%; 呼吸内科 13 株, 占 25.49%; 干部病房 6 株, 占 11.76%, 所占比例较大。(2) 药敏结果显示嗜麦芽窄食单胞菌对多数常用抗菌药物耐药性较高, 部分菌株表现出对 9 种以上抗菌药物的多重耐药。(3) 51 株嗜麦芽窄食单胞菌 PCR 基因扩增结果 7 株菌 I 类整合子阳性(13.7%), 没有检测到 II、III 类整合子, I 类整合子可变区携带的耐药基因包括 aacA4、aadA1、catB8、dfrA17 和 aphA15 五种。结论 嗜麦芽窄食单胞菌对多数常用抗菌药物耐药性较高, 部分菌株表现出多重耐药性。I 类整合子是嗜麦芽窄食单胞菌多重耐药的重要因素之一。

关键词: 发酵单胞菌属; 抗药性, 微生物; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)13-1667-03

Research of *Stenotrophomonas maltophilia* integrons distribution in Yantai area and their variable regions carrying drug resistance gene cassettes*

Du Jiangdong, Lian Peiwen, Liang Yingfeng, Tang Qianqing[△]

(Department of Laboratory, Yantai Yuhuangding Hospital, Medical College of Qingdao University,
Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* to commonly used antibacterial drugs, and to investigate the existence status of 3 kinds of integron (I, II and III) and the carrying drug resistance gene cassettes so as to offer help for better preventing and controlling the infectious diseases caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in local place. **Methods** 51 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* from clinical samples were collected and the minimum inhibitory concentration (MIC) of 17 kinds of antibacterial drugs to *Stenotrophomonas maltophilia* was measured by the broth microdilution antifungal susceptibility test (Mi-AFST). 3 kinds of integron (I, II and III) were amplified by PCR with primers designed according to registered DNA sequence in GenBank. The variable region products in the positive integron strains were amplified and performed the sequencing analysis. The homological comparison in the Genebank database was performed on the sequencing results for finding out what gene was included in variable domain of those integrons. **Results** (1) Among 51 strains of *Stenotrophomonas maltophilia*, 41 strains (80.39%) were collected from sputum samples, and the infected crowd was dominated by individuals aged over 60 years, 38 strains accounted for 74.5%. In the department distribution, 20 strains (39.22%) were collected from ICU, 13 strains (25.49%) from the respiratory department and 6 strains (11.76%) from the veteran cadres wards, which accounted for the larger proportion. (2) The drug susceptibility test demonstrated that *Stenotrophomonas maltophilia* strains had the higher resistance to most of commonly used antibacterial drugs, some strains even showed the multi-drug resistance to over 9 kinds of antibacterial drugs. (3) The PCR gene amplification results showed that 7 strains (13.7%) were positive integron I, while no strains containing integron II or III were detected; the resistance genes carried in the variable region of integron I included the 5 kinds of aacA4, aadA1, catB8, dfrA17 and aphA15. **Conclusion** *Stenotrophomonas maltophilia* has relatively high resistance to majority of commonly used antibacterial drugs in clinic, and some strains show the multi-drug resistance. Integron I is one of important factors for the multi-drug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*.

Key words: *Stenotrophomonas*; drug resistance, microbial; polymerase chain reaction

嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)是一种 条件致病菌, 广泛存在于自然界, 以往认为其致病力低, 临床上

* 基金项目: 山东省科技发展计划(2008GG10002040)。 作者简介: 杜江东, 男, 主管检验师, 主要从事细菌耐药机制研究。 [△] 通讯作者, E-mail: h_li7896@sina.com。

没有足够的重视。近几年该菌的临床感染率不断上升,已成为引起医院感染的重要病原菌之一。嗜麦芽窄食单胞菌具有十分复杂的耐药机制,且常表现为多种耐药机制并存,耐药性远高于其他细菌。整合子属于可移动基因元件,可以捕获外源性耐药基因并通过自身的转移使携带的基因盒共同转移,在细菌耐药性的传播中起着重要作用。笔者对 2010 年 10 月至 2011 年 10 月烟台毓璜顶医院临床分离的嗜麦芽窄食单胞菌进行研究,通过分析 I、II、III 类整合子的存在情况,明确整合子与嗜麦芽窄食单胞菌耐药性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 51 株嗜麦芽窄食单胞菌分离自 2010 年 10 月至 2011 年 10 月烟台毓璜顶医院住院患者痰液、尿液、血液、分泌物等临床标本,剔除同一患者重复菌株。全部菌株均经

VITEK2 Compac 微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司)鉴定确认。标准菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.1.2 主要试剂 抗菌药物、96 孔微量细菌定量药敏测试板购自天津金章科技发展有限公司;M-H 琼脂、水解酪蛋白肉汤购自杭州天和生物;PCR 试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生物工程公司。

1.1.3 主要仪器 法国生物梅里埃公司 VITEK2 Compact 全自动微生物分析仪,长沙医疗器械厂隔水式恒温培养箱,美国 ABI 公司 ABI7000 PCR 扩增仪,北京六一仪器厂 YYII-5 型稳压稳流电泳仪,美国 Bio-Rad 公司外凝胶分析系统。

1.1.4 引物设计 根据 GenBank 注册的基因序列设计 *int1*、*int2*、*int3* 基因及 *int1* 可变区引物,见表 1。

表 1 PCR 引物序列

目的基因片段	引物序列(5'~3')
<i>int1</i>	正向:ACATGTGATGGCGACGCACGA;反向:ATTTCTGTCCTGGCTGGCGA
<i>int2</i>	正向:CACGGATATGCGACAAAAAGGT;反向:GTAGCGAAACGAGTGACGAAATG
<i>int3</i>	正向:GCCTCCGCGACGCACTTTCAG;反向:ACGGATCTGCCAAACCTGACT
<i>int1</i> 可变区	正向:GGCATCCAAGCAGCAAG;反向:AAAGCAGACTTGACCTG

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 微量肉汤稀释法测定嗜麦芽窄食单胞菌对 17 种抗菌药物的最低抑菌浓度,试验结果按临床和实验室标准委员会 NCCLS2009 年标准的最小抑菌浓度(MIC)及抑菌圈直径折点判断敏感、耐药和中介。ATCC25922 和 ATCC27853 作为质控菌株。

1.2.2 DNA 模板的制备(加热裂解法) 先将细菌进行纯培养,然后取单个菌落置于 60 μL、pH 8.0 的 TE 缓冲液中,振荡混匀,配置成一定浓度的菌悬液。将配置好的菌悬液放入 100 ℃沸水中水浴 10 min 取出,迅速置于-20 ℃冷冻 1 min,最后以 12 000 r/min 高速离心 5 min,取上清液置-20 ℃冷冻保存备用。

1.2.3 PCR 扩增 反应体系:Premix Taq PCR 反应液 25 μL,DNA 模板 2 μL,上游引物、下游引物各 1 μL,灭菌双蒸水 21 μL,总体积 50 μL。反应条件:94 ℃预变性 5 min;循环参数为:94 ℃变性 1 min,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 30 循环。最后 72 ℃延伸 7 min 结束。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 测序分析 所有 7 株 I 类整合子可变区扩增产物,送上海生工纯化并进行 DNA 双向测序。测序结果在 Genbank 中 BLAST 序列比对并分析可变区所携带的耐药基因。

2 结 果

2.1 细菌检出分布 51 株嗜麦芽窄食单胞菌来自 51 个不同的患者,其中 1~19 岁的 3 例(5.88%),20~39 岁的 1 例(1.96%),40~59 岁的 9 例(17.64%),60 岁以上的 38 例(74.51%);标本来源分布:痰液 41 株(80.39%)、引流液 3 株(5.88%)、伤口分泌物 2 株(3.92%)、尿液 4 株(7.84%)、血液 1 株(1.96%);临床科室分布:重症监护室(ICU)20 株(39.22%)、呼吸内科 13 株(25.49%)、干部病房 6 株(11.76%)、肿瘤内科 3 株(5.88%)、血液内科 2 株(3.92%)、

其他科室 7 株(13.73%)。

2.2 药敏试验结果 临床分离的 51 株嗜麦芽窄食单胞菌耐药现象严重,未见有对所有测定抗菌药物敏感菌株,多重耐药菌株(耐受 3 种或 3 种以上分属于不同类别抗菌药物的细菌)为 45 株,占细菌总数的 88.2%;30 株细菌耐受 9 种以上抗菌药物,占 58.8%;51 株嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南和美洛培南耐药率均高达到 100%;值得关注的是,有 1 株 ICU 病房分离的菌株对所有测定的 17 种抗菌药物全耐药。

2.3 整合子 PCR 检测结果 51 株嗜麦芽窄食单胞菌检测到 7 株 I 类整合子阳性(13.7%)分别为为样本 SM007、SM012、SM021、SM032、SM033、SM037、SM046,没有检测到 II、III 类整合子。

2.4 I 类整合子阳性样本可变区 PCR 基因扩增结果 7 例 *int1* 阳性样本可变区 PCR 基因特异性扩增,有两株(SM007、SM012)扩增得到 2 500 bp 阳性条带,3 株(SM021、SM033、SM037)扩增得到 1 200 bp 阳性条带,两株(SM032、SM046)扩增得到 600 bp 阳性条带。

2.5 I 类整合子可变区 PCR 产物测序分析 所有 7 株 I 类整合子阳性样本可变区特异性扩增产物测序结果显示,2 500 bp 长度片段携带 3 个耐药基因 *aacA4*-*aphA15*-*catB8*,1 200 bp 长度片段耐药基因携带 2 个耐药基因 *frA17*-*aadA1*,600 bp 长度片段耐药基因携带 1 个耐药基因 *aadA1*。

3 讨 论

近年来,随着科技技术迅猛发展,新的医疗技术和抢救措施不断涌现,治愈率和抢救成功率得到很大提高。同时这些新技术的使用也增加了一些条件致病菌引起医院感染的概率^[1]。大量的滥用广谱抗菌药物,也加速引发一些条件致病菌和多重耐药菌的出现,嗜麦芽窄食单胞菌便是其中之一,该菌的临床分离率呈逐年上升趋势,且常常伴有混合感染。同时该菌的耐药机制十分复杂,常常表现为多重耐药,这导致临床对该菌治

疗也十分棘手^[2]。

本研究显示从嗜麦芽窄食单胞菌的病区分布看,重症监护室(ICU)和呼吸内科所占的比例最高,达到 39.22% 和 25.49%,原因是这 2 个病房患者往往年龄偏大,多有严重的基础疾病,且住院时间较长,普遍应用广谱抗菌药物,并发严重呼吸衰竭时需要进行气管插管和机械通气等侵入性操作。干部病房住院患者也存在年龄偏大、抵抗力弱等因素,故其所占比例也较高,为 11.76%。从标本来源分布看,呼吸道标本所占比例最高,为 80.39%,占总量的五分之四,在各种标本中具绝对优势,说明嗜麦芽窄食单胞菌以引起呼吸道感染为主。另外,尿液、脓液、血液和其他组织液等多种标本均分离出嗜麦芽窄食单胞菌,说明它可以引起多种部位感染。因此,应该引起临床足够的重视,积极做好预防和治疗措施,避免该菌的发展和蔓延。

嗜麦芽窄食单胞菌对大多数常用抗菌药物都耐药,对临床使用的全部抗菌药物几乎都有耐药的报道,对部分抗菌药物甚至表现出高度耐药^[3]。嗜麦芽窄食单胞菌自身可产生金属 β 内酰胺酶,故绝大多数嗜麦芽窄食单胞菌都表现出对亚胺培南和美洛培南天然耐药。国内外很多研究都发现嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南耐药率高于 90%,甚至高达 100%^[4]。本研究显示,51 株嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南和美洛培南耐药率均达到 100%,多重耐药菌株为 45 株,占细菌总数的 88.2%。这给临床治疗带来很大的困难,应该引起临床医生的高度关注。

嗜麦芽窄食单胞菌经常表现出对 3 种或 3 种以上结构不相关的抗菌药物耐药,即多重耐药性。导致其出现多重耐药的机制很多,质粒、整合子、转座子等可转移元件携带耐药基因转移便是其中之一。

近年来整合子介导的耐药性越来越受到学者们关注。整合子-基因盒^[5]系统属于可移动的基因元件,它由两侧的保守区及中间的可变区构成,可变区可含有一个或多个耐药基因。在整合酶的作用下,整合子可以捕获外源性耐药基因并通过自身的转移使携带的基因盒共同转移。整合子可位于细菌的染色体上,也可借助可移动的质粒、转座子在不同细菌之间水平传播,在细菌耐药性的传播中起着重要作用。目前已发现的整合子有 10 多种,其中 I、II、III 类整合子最常见并且与细菌耐药基因的传播关系密切,被合称为耐药整合子(resistance integron, RI),整合子所携带的耐药基因盒现已发现超过 80 种^[6]。已有研究证实, I 类整合子广泛存在于革兰阴性杆菌中,与细菌的多重耐药密切相关。本研究共检测 51 株临床分离的嗜麦芽窄食单胞菌,其中 I 类整合子阳性 7 株菌,占 13.7%,未检测到 II、III 类整合子说明现阶段在本地区嗜麦芽窄食单胞菌中传播以 I 类整合子为主。

从本院临床标本中分离的嗜麦芽窄食单胞菌 I 类整合子携带 5 种耐药基因分别是 aacA4、aadA1、aphA15、catB8 和 dfrA17。其中 aacA4 编码 6'-N-氨基糖苷乙酰转移酶, aadA1 编码氨基糖苷核苷转移酶, aphA15 编码磷酸转移酶,都引起对氨基糖苷类抗菌药物耐药; catB8 编码氯霉素乙酰转移酶,引起对氯霉素耐药; dfrA17 编码二氢叶酸还原酶主要介导甲氧苄啶耐药。这与 7 株 I 整合子阳性嗜麦芽窄食单胞菌耐药表型相吻合。

尽管有文献报道显示整合子在细菌耐药机制的发展和传播中具有非常重要的作用,但是细菌的耐药性并不完全是由整合子介导的,细菌的耐药机制复杂而多样,在细菌的耐药机制中整合子的介导作用只是一小部分^[7]。整合子-基因盒系统的发现,为细菌的耐药机制研究指出了新的方向,耐药基因的捕获和表达系统并能在不同细菌间水平和垂直传播,成为细菌抵抗抗菌药物的又一个强有力的武器。因此,研究临床菌株中整合子的种类、性质和作用机制有利于了解细菌多重耐药的发生和转移机制,更好地控制细菌耐药性的发展,加强临床合理使用抗菌药物,有效防止细菌耐药性的产生并阻止耐药性的传播。

参考文献

- [1] Penzak SR, Abate BJ. *Stenotrophomonas* (Xanthomonas) maltophilia: a multidrug-resistant nosocomial pathogen[J]. *Pharmacotherapy*, 1997, 17(2): 293-301.
- [2] Talmaci I, Varlotta L. Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2000, 30(1): 10-15.
- [3] Zhang Li, Li XZ, Poole K. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(2): 287-293.
- [4] 李红玉, 潘昆皓, 伍锡泉, 等. 广州地区 2000~2003 年嗜麦芽窄食单胞菌的耐药性调查[J]. *国际医药卫生导报*, 2005, 11(1): 4-5.
- [5] Cameron FH, Groot Obbink DJ, Ackerman VP, et al. Nucleotide sequence of the AAD aminoglycoside adenyltransferase determinant aadB. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrII in R388[J]. *Nucl Acids Res*, 1986, 14(21): 8625-8635.
- [6] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(8): 608-620.
- [7] 王辉, 陈民钧, 倪语星, 等. 2006 年中国十家教学医院革兰阴性菌耐药状况[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(6): 623-626.

(收稿日期: 2014-01-08)

(上接第 1666 页)

2010, 21(6): 1059-1071.

- [9] Adell MA, Teis D. Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(20): 3191-3196.

- [10] 王维鹏, 夏剑波, 李磊, 等. 重叠延伸 PCR 法构建 VPS4B 基因定点突变真核表达载体[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(1): 57-59.

- [11] Xia J, Wang W, Li L, et al. Inhibition of HBV replication by VPS4B and its dominant negative mutant VPS4B-K180Q in vivo[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, 32(3): 311-316.

(收稿日期: 2014-01-24)