

35 株多重耐药嗜麦芽窄食单胞菌的 β -内酰胺酶耐药基因分布研究*

罗卉丽¹, 陈姗姗¹, 杨宏伟², 赵颖², 昌睿杰^{2△} (1. 湖北省十堰市妇女儿童医院 442000; 2. 湖北省十堰市太和医院 442000)

【摘要】 目的 对十堰地区 2014 年分离的 35 株多重耐药嗜麦芽窄食单胞菌(SMA)进行耐药表型、耐药基因研究。**方法** 收集十堰地区 2014 年分离的 35 株多重耐药 SMA, 采用纸片扩散法检测细菌耐药性。超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)采用标准纸片法检测, 头孢菌素酶(AmpC)和金属 β -内酰胺酶(MBLs)检测采用三维试验, 非金属碳青霉烯酶(KPC)检测采用改良 Hodge 试验。采用 PCR 法检测细菌耐药基因, 对阳性结果进行基因正、反向测序分析。**结果** 35 株多重耐药 SMA 中, ESBLs、AmpC、MBLs、KPC 阳性率分别为 45.7%、14.3%、94.3%、0.0%。耐药基因 *bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CARB}、*bla*_{IMP}、*bla*_{OXA-10}、*oprD2* 的阳性率分别为 22.8%(8/35)、11.4%(4/35)、17.1%(6/35)、94.3%(33/35)、8.6%(3/35)、28.5%(10/35)。**结论** 该地区的多重耐药 SMA 对碳青霉烯类抗菌药物的耐药状况非常严重, 应引起重视。

【关键词】 医院感染; 多重耐药嗜麦芽窄食单胞菌; β -内酰胺酶; 耐药基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.19.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)19-2839-03

Study of distribution of β -lactamase drug resistance gene in 35 strains of multi-drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia** LUO Hui-li¹, CHEN Shan-shan¹, YANG Hong-wei², ZHAO Ying², CHANG Rui-jie^{2△} (1. Shiyan municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Taihe Hospital of Shiyan City, Shiyan, Hubei 442000, China)

【Abstract】 Objective To study the drug-resistance phenotype and drug resistance gene in 35 strains of multi-drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia*(SMA) in Shiyan area during 2014. **Methods** 35 strains of multi-drug resistant SMA isolated from Shiyan area during 2014 were collected and their drug resistance was detected by using the K-B method. ESBLs was detected by using the standard paper strip method. AmpC and MBLs were detected by the three-dimensional test, KPC was detected by the modified Hodge test. The PCR method was adopted to detect the bacterial drug resistance gene and the positive results were performed the forward and reverse gene sequencing analysis. **Results** Among 35 strains of multi-drug resistance SMA, the positive rates of ESBLs, AmpC, MBLs and KPC were 45.7%, 14.3%, 94.3% and 0.0% respectively. The positive rates of drug resistance gene *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CARB}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-10} and *oprD2* were 22.8%(8/35), 11.4%(4/35), 17.1%(6/35), 94.3%(33/35), 8.6%(3/35) and 28.5%(10/35) respectively. **Conclusion** The resistance of multi-drug resistance SMA in this area to carbapenem antibacterial drugs is very serious, which should arouse the attention.

【Key words】 nosocomial infection; drug-resistant *stenotrophomonas maltophilia*; β -lactamase; drug resistant gene

嗜麦芽窄食单胞菌(SMA)是广泛分布于自然界的条件致病菌,也是医院感染最常见的病原菌之一。近 10 年来, SMA 在医院感染导致死亡的流行病菌中所占的比例越来越高^[1]。广州呼吸疾病研究所 2003~2007 年从下呼吸道分离的 1 709 株革兰阴性菌中, SMA 占 9.2%, 占调查分离菌的第 3 位^[2]; 吴明芝等^[3]报道在儿科临床标本中, SMA 阳性率为 4.6%, 在革兰阴性杆菌中位居第 4。中国 CHINET 细菌耐药性监测网的数据表明, SMA 有较高的耐药率^[4]。本研究旨在调查 2014 年十堰地区分离的 35 株多重耐药 SMA 的耐药基因分布情况, 为指导临床合理使用抗菌药物, 减少 SMA 耐药菌株的暴发流行及传播奠定理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年分离自十堰市太和医院和十堰

市妇幼保健院患者血液标本的多重耐药 SMA, 共 35 株, 对于同一患者血液分离的重复菌株则选取第 1 次分离的菌株。

1.2 仪器与试剂 DLMedcal-96 II 全自动细菌鉴定系统(迪尔医学); PE9600 型 DNA 扩增仪(美国 PE 公司); 电脑三恒多用电泳仪 DYY-12 电泳仪(北京六一仪器厂); BacT/ALERT® 3D 血培养仪(法国梅里埃公司); G-BOX 全自动凝胶成像系统(Syngene 公司); 3730 型全自动基因测序仪(美国 ABI 公司)。DL-96E 细菌测定系统随机体外诊断试剂板(珠海迪尔医学公司); 细菌微量生化反应管(杭州天和微生物试剂公司); PCR Master Mix 试剂(美国 Promega 公司); 抗菌药物纸片(英国 Oxoid 公司)。基因 *bla*_{TEM}-1、*bla*_{SHV}、*bla*_{CARB}-2、*bla*_{IMP}、*bla*_{OXA-10}、*oprD2*、*bla*_{KPC}、*bla*_{PER}、*bla*_{VEB}、*bla*_{GES}、*bla*_{VIM}、*bla*_{SPM}、*bla*_{GIM}、*bla*_{DHA}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{OXA-2} 所用引物设计参考文献[5-7], 由上海

* 基金项目: 湖北省卫生计生科研基金资助项目(WJ2015Z115); 湖北省十堰市科技局科技计划立项(15K71)。

作者简介: 罗卉丽, 女, 硕士, 主管技师, 主要从事肿瘤检验研究。△ 通讯作者, E-mail: 2671815504@qq.com。

生工生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定和药敏试验 血培养采用 BacT/ALERT 3D 血培养仪,细菌鉴定采用 DLMedcal-96 II 全自动细菌鉴定系统完成,药敏试验采用纸片扩散法进行。

1.3.2 耐药表型检测 分别进行 β -内酰胺酶的提取及检测,包括:超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)检测(标准纸片法)、头孢菌素酶(AmpC)检测(三维试验)、金属 β -内酰胺酶(MBLs)检测(三维试验)、非金属碳青霉烯酶(KPC)检测(改良 Hodge 试验)。

1.3.3 耐药基因检测 各种靶基因 PCR 扩增体系均使用 Promega 的 PCR Master Mix 试剂,总体积 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C,2 min,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,1 个循环。将产物进行琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像分析仪拍摄凝胶照片。以大肠埃希菌 ATCC25922 或空白为阴性对照(阳性对照 DNA 由上海生工生物工程技术有限公司提供)。

1.3.4 基因序列分析 电泳阳性的 PCR 产物纯化后用全自动荧光法正、反向测序,采用读序工具 Chromas 软件察看测序彩图,测序结果登录互联网([www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))进行 BLAST 比对。

1.4 统计学处理 药敏结果采用 WHONET 5.5 软件统计分析。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 35 株多重耐药 SMA 的药敏试验结果,见表 1。

表 1 多重耐药 SMA 的药敏试验结果(%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
头孢他啶	89.0	9.0	2.0
头孢噻肟	72.5	5.0	22.5
哌拉西林	97.0	2.6	0.4
头孢哌酮/舒巴坦	63.5	10.0	26.5
亚胺培南	100.0	0.0	0.0
美罗培南	100.0	0.0	0.0

2.2 耐药表型 35 株多重耐药 SMA β -内酰胺酶试验均为阳性,其中 ESBLs 阳性为 16 株(45.7%),AmpC 阳性为 5 株(14.3%),MBLs 阳性 33 株(94.3%),KPC 均为阴性,见图 1~3。

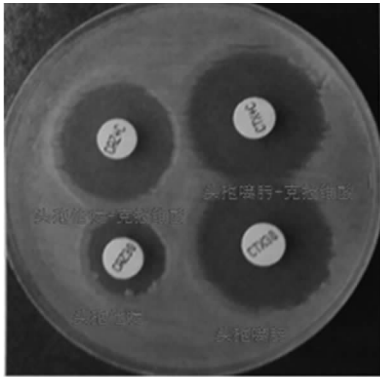


图 1 ESBLs 阳性结果

2.3 β -内酰胺酶相关基因检测结果 35 株多重耐药 SMA 中,耐药基因 *bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CARB}、*bla*_{IMP}、*bla*_{OXA-10}、*oprD2* 的阳性率分别为 22.8%(8/35)、11.4%(4/35)、17.1%(6/35)、94.3%(33/35)、8.6%(3/35)、28.5%(10/35)。未检出 *bla*_{KPC}、*bla*_{PER}、*bla*_{VEB}、*bla*_{GES}、*bla*_{VIM}、*bla*_{SPM}、*bla*_{GIM}、*bla*_{DHA}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{OXA-2} 阳性菌株。 β -内酰胺酶相关基因检测电泳图,见图 4~9(其中,N 为阴性对照,P 为阳性对照,S 为标本,M 为 DNA 标志物,从下向上依次为 150、250、350、450、550、650、750、850、1 000、1 500 bp)。

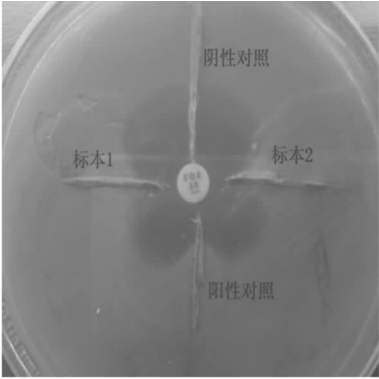


图 2 AmpC 阳性结果

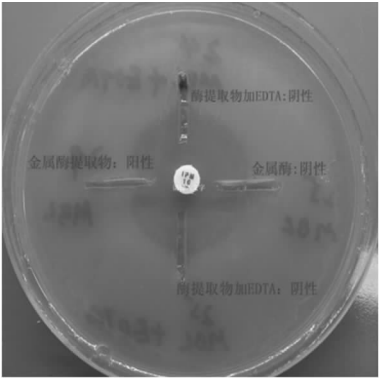


图 3 MBLs 阳性结果

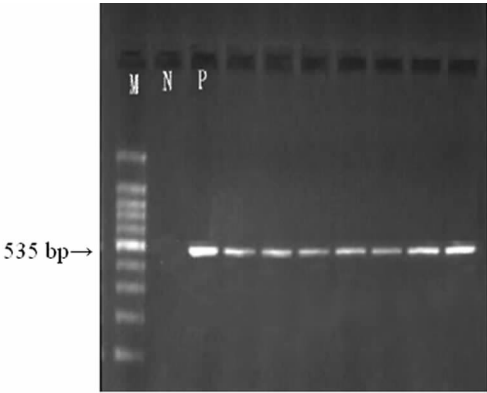


图 4 *bla*_{TEM} 基因电泳图

2.4 基因序列分析结果 扩增阳性基因所测序列采用 GenBank 中的 BLAST 程序进行同源性分析。*bla*_{TEM} 基因与 GenBank 注册号为 AB282997 的 TEM-1 亚型基因序列相同;*bla*_{CARB} 基因与 GenBank 注册号为 HQ157204 的 CARB-2 亚型基因序列相同;*bla*_{OXA-10} 与 GenBank 注册号为 GU367339 的 OXA-10 亚型基因序列相同;*oprD2* 基因与 GenBank 注册号为 GQ324957 的基因序列相同。*bla*_{SHV}、*bla*_{IMP} 基因与 GenBank 注

册的基因同源性均低于 90%，是否是新的基因亚型有待于进一步研究。

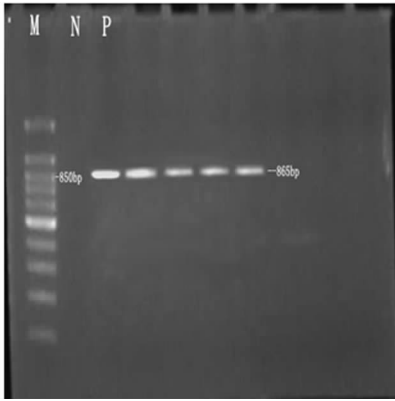


图 4 *bla_{SHV}* 基因电泳图

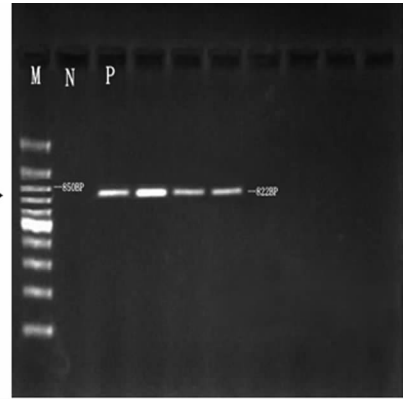


图 9 *oprD2* 基因电泳图

3 讨 论

β -内酰胺类抗菌药物是临床最常用、品种数量最多的抗菌药物^[8],此类抗菌药物具有血药浓度高、杀菌活性强、毒性低、抗菌谱广等特点,因此很受临床青睐。然而近年来随着 β -内酰胺类抗菌药物的广泛应用,特别是在临床治疗过程中的预防使用及滥用,使得产 β -内酰胺酶的细菌越来越多。 β -内酰胺类抗菌药物在此酶的作用下 β -内酰胺环水解开环,使其失去了干扰细菌细胞壁合成的功能。目前,临床对产 β -内酰胺酶细菌感染的治疗越来越困难,已成为临床医务工作者关注的重点。

本次 35 株多重耐药 SMA 中,ESBLs 表型检测阳性 16 株 (45.7%),其中基因检测结果 *bla_{TEM}* 阳性 8 株 (22.8%),*bla_{SHV}* 阳性 4 株 (11.4%)。ESBLs 是能水解氧亚胺基 β -内酰胺抗菌药物,并可被 β -内酰胺酶抑制剂 (如舒巴坦、三唑巴坦、克拉维酸) 所抑制的一类酶^[9-10]。CARB 是由质粒介导的羧苄西林酶,它有 9 个亚型。PCR 检出 *bla_{CARB}* 阳性菌 6 株 (17.1%),基因序列分析显示,该菌所产的 CARB 基因为 CARB-2 亚型。OXA 型酶对氯唑西林、苯唑西林和青霉素有很高的水解活性。PCR 检出 *bla_{OXA-10}* 阳性菌 3 株 (8.6%),未检出携带 *bla_{OXA-1}*、*bla_{OXA-2}* 基因的菌株,表明在本地区,携带 *bla_{OXA-10}* 可能导致细菌产 ESBLs,它们往往由位于可移动的遗传因子的基因编码,这可能是它们在细菌的广泛传播的原因之一。本次研究中的 35 株多重耐药 SMA,经三维试验检出产 AmpC 菌 5 株,占 14.3%。PCR 未检出携带 *bla_{DHA}* 基因的细菌。AmpC 能够有效地水解青霉素类、头霉素类和头孢菌素类抗菌药物等,从而导致细菌对第 3 代头孢菌素产生耐药性。抗菌药物特别是头孢西丁和亚胺培南可使细菌诱导表达 AmpC 类 β -内酰胺酶。本试验中, AmpC 阳性表型检出率较高,但未检出携带 *bla_{DHA}* 基因的细菌,说明本地区 AmpC 引起的 SMA 耐药不是由 *bla_{DHA}* 基因编码的质粒介导。本次 MBLs 三维试验检出阳性菌株 33 株,阳性率为 94.3%,*bla_{IMP}* 基因阳性菌 33 株,阳性率 94.3%,基因检测阳性率与耐药表型阳性率一致。药敏试验显示,35 株多重耐药 SMA 对亚胺培南、美罗培南的耐药率达 100.0%,主要与携带 MBLs 耐药基因 *bla_{IMP}* 有关,*bla_{IMP}* 基因阳性率为 94.3%,与亚胺培南耐药率基本一致。本次检出 *oprD2* 基因阳性菌 10 株 (28.5%),*oprD2* 基因缺失率高达 71.5%,*oprD2* 基因缺失导致 SMA 对亲水性化合物产生低外膜通透性,抗菌活性可以通过外膜孔蛋白通道 (OprD) 的缺失而失去抗菌活性^[11]。总体而言,本地地区的多重耐药 SMA 对碳青霉烯类抗菌药物的耐药状况非常严重,应引起重视。 (下转第 2844 页)

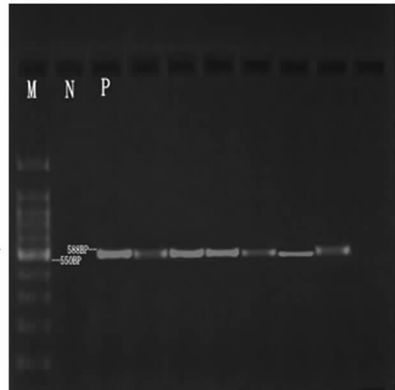


图 6 *bla_{CARB}* 基因电泳图

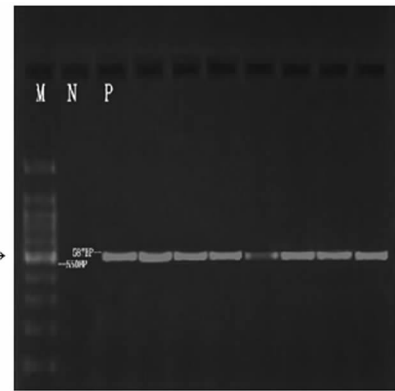


图 7 *bla_{IMP}* 基因电泳图

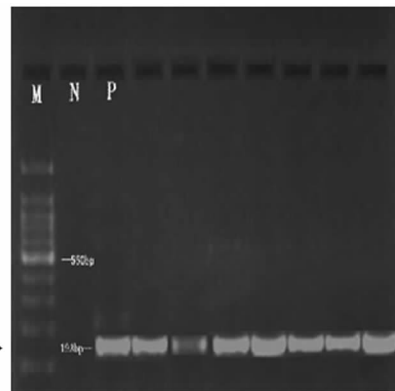


图 8 *bla_{OXA-10}* 基因电泳图

大。对较大体积血小板计数时采用何种检测方法相关研究报道结果存在差异。Park 等^[7]研究发现,对大体积血小板计数时采用电阻抗法、光学法可造成计数结果偏低,与临床实际情况存在较大误差。Kayadibi 等^[8]报道手工法、电阻抗法、光学法检测 PLT 时,血小板体积大小对其影响较小,因此上述 3 种方法均可用于较大体积血小板的检测。本研究对大体积幼稚血小板标本进行监测,结果显示,监测 1、3、5 d 时 3 种方法 PLT 结果差异较大,电阻抗法、光学法检测 PLT 结果均较手工法结果偏低,与 Park 等^[7]的研究结果一致。光学法因采用的是侧向散射光检测 PLT,对体积较大的血小板无法识别,易将其计算在网织红细胞区域,致使 PLT 结果偏低。提示当遇到较大体积血小板标本时,电阻抗法、光学法检测效果均不理想,存在较大偏差,此时宜采用手工法检测。

综上所述,使用 Sysmex XT1800i 血液分析仪检测 PLT 时,要根据具体情况采取相应方法。当 MCV<70 fL、存在 FRC 或血小板参数不显示时,宜采用光学法进行检测;当血小板体积较大时,宜采用手工法进行 PLT 检测,以提高检测准确性,减少检测误差。

参考文献

- [1] Ranghino A, Mella A, Borchellini A, et al. Assessment of platelet function analyzer(PFA-100) in kidney transplant patients before renal allograft biopsy: a retrospective single-center analysis[J]. Transplant Proc, 2014, 46(7): 2259-2262.
- [2] 刘非, 梁绮华, 姜志勇, 等. 血小板分布异常原因分析及对血小板计数的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(6): 726-728.
- [3] Slavik L, Svobodova G, Ulehlova J, et al. The advantages and limitations of impedance aggregometry in detection of heparin-induced thrombocytopenia[J]. Clin Lab, 2014, 60(8): 1319-1324.
- [4] Ulehlova J, Slavik L, Kucerova J, et al. Genetic polymorphisms of platelet receptors in patients with acute myocardial infarction and resistance to antiplatelet therapy

[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2014, 18(9): 599-604.

- [5] Smith JR, Smith KF, Brainard BM. Platelet parameters from an automated hematology analyzer in dogs with inflammatory clinical diseases[J]. Vet J, 2014, 201(3): 406-411.
- [6] 孙育. 血液分析仪计数血小板假性异常及其影响因素分析[J]. 医学综述, 2013, 19(4): 762-764.
- [7] Park IJ, Ahn S, Kim YI, et al. Performance evaluation of Samsung LABGEO (HC10) hematology analyzer[J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 138(8): 1077-1082.
- [8] Kayadibi H, Sertoglu E, Uyanik M, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio is useful for the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(28): 9631-9632.
- [9] 吴京凤, 杨媛华, 庞宝森, 等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重患者血浆血小板因子 4 及 β 凝血球蛋白水平的变化及其意义[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(18): 1378-1382.
- [10] Abdollahi B, Abbasi MM, Milani PZ, et al. Hydro-methanolic extract of cornus MAS L. And blood glucose, lipid profile and hematological parameters of male rats[J]. Iran Red Crescent Med J, 2014, 16(5): e17784.
- [11] Grecu DS, Paulescu E. Quality assurance in the laboratory testing process; Indirect estimation of the reference intervals for platelet parameters in neonates[J]. Clin Biochem, 2014, 47(15): 33-37.
- [12] Sachdev R, Tiwari AK, Goel S, et al. Establishing biological reference intervals for novel platelet parameters (immature platelet fraction, high immature platelet fraction, platelet distribution width, platelet large cell ratio, platelet-X, plateletcrit, and platelet distribution width) and their correlations among each other[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2014, 57(2): 231-235.

(收稿日期: 2015-01-14 修回日期: 2015-03-15)

(上接第 2841 页)

参考文献

- [1] Garazi M, Singer C, Tai J, et al. Bloodstream infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a seven-year review[J]. J Hosp Infect, 2012, 81(2): 114-118.
- [2] 刘媛, 孙明月, 王本祥, 等. 临床非发酵革兰阴性杆菌感染的分布及耐药性分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2012, 5(2): 112-114.
- [3] 吴明芝, 张林, 张赤炎, 等. 254 例儿童感染嗜麦芽窄食单胞菌耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2010, 17(4): 774-776.
- [4] 肖永红, 王进, 朱燕, 等. Mohnarin 2008 年度全国细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(16): 2377-2383.
- [5] 黄支密, 糜祖煌, 石晓霞, 等. 医院感染革兰阴性杆菌耐消毒剂基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(7):

721-724.

- [6] 糜祖煌, 陆亚华. 氨基糖苷类修饰酶及其基因检测[J]. 现代实用医学, 2004, 16(1): 13-14.
- [7] 陈东科, 孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 797-803.
- [8] 许恒忠, 张鉴. 抗菌药物临床合理应用指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [9] Jacoby GA. AmpC β -lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(1): 161-182.
- [10] 李金钟, 栗瑛洁. 质粒介导 AmpC β -内酰胺酶的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(7): 646-648.
- [11] 卓志娟, 姚莉娟. 重症监护病房内嗜麦芽窄食单胞菌医院感染肺炎的临床及耐药研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(5): 430-431.

(收稿日期: 2015-06-05 修回日期: 2015-08-10)