

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.17.013

## 西安某医院临床分离嗜麦芽窄食单胞菌的临床分布及毒力基因检测\*

井发红, 辛娜, 何天娇, 李卓<sup>△</sup>

西安医学院第一附属医院检验科, 陕西西安 710077

**摘要:**目的 了解嗜麦芽窄食单胞菌的临床感染特点、抗菌药物敏感性及毒力基因携带情况, 为嗜麦芽窄食单胞菌的感染控制提供数据支持。**方法** 收集该院 2017 年 1 月至 2018 年 12 月分离的嗜麦芽窄食单胞菌 79 株, 剔除重复菌株, 对其临床感染特点进行总结分析, 用纸片扩散法检测嗜麦芽窄食单胞菌对 3 种抗菌药物的敏感性; 采用改良微孔板法分析其生物膜形成能力; PCR 检测 4 种主要毒力基因 (Stmpr1、Stmpr2、smf-1、Smlt3773locus) 的携带状况。**结果** 临床分离的 79 株嗜麦芽窄食单胞菌主要来自痰标本 62 例、肺泡灌洗液 6 例、分泌物 8 例、尿液 3 例; 分离率最高的科室是呼吸及重症医学科 29 例, 其次是神经外科 28 例, 其余来自全科医学科、内分泌科、肾病血液科及骨科等; 嗜麦芽窄食单胞菌感染患者中, 男性居多, 有 51 例 (64.6%); 大多数患者在检测到嗜麦芽窄食单胞菌前均使用过 2~5 种抗菌药物, 其中抗菌药物的使用种类大于 3 种的患者占比高达 64.5%, 主要的抗菌药物为头孢菌素类 (82.3%)、碳青霉烯类 (53.1%) 和含酶抑制剂复合制剂 (63.3%)。79 株菌株对左氧氟沙星、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的耐药率分别为 12.6% 和 3.8%, 未发现对米诺环素耐药的菌株。生物膜形成试验的结果表明, 生物膜形成能力  $A_{492}$  为  $0.50 \pm 0.42$ , 不同性别患者间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。毒力基因检测显示, Stmpr1、Stmpr2、smf-1、Smlt3773locus 的阳性率较高, 分别为 75.9%、91.1%、93.7% 和 44.3%。**结论** 嗜麦芽窄食单胞菌检出以男性患者居多, 且大多数患者有多种抗菌药物的应用史, 细菌毒力基因携带率较高。

**关键词:**嗜麦芽窄食单胞菌; 临床分布; 毒力基因

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)17-2476-04

**Clinical distribution and prevalence of virulence genes of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in a hospital in Xi'an\***

JING Fahong, XIN Na, HE Tianjiao, LI Zhuo<sup>△</sup>

Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shanxi 710077, China

**Abstract: Objective** To investigate the clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* infection, antimicrobial susceptibility and virulence gene carrying status, so as to provide data support for the infection control of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Methods** A total of 79 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated in the hospital from January 2017 to December 2018 were collected and the repetitive strains were eliminated, and the clinical characteristics of infection were summarized and analyzed. The sensitivity of *Stenotrophomonas maltophilia* to three antimicrobial agents was detected by disk diffusion method, and the biofilm formation ability was analyzed by improved microplate method. PCR was used to detect the carrying status of four major virulence genes (Stmpr1, Stmpr2, smf-1, Smlt3773locus). **Results** A total of 62 strains (78.5%) were isolated from sputum specimens, 6 strains were isolated from bronchoalveolar lavage fluid, 8 strains from secretion and 3 strains from urine. The isolation rate was highest in Department of Respiratory and Severe Diseases Medicine (29 cases), followed by the Department of Neurosurgery (28 cases), and the rest were from Department of General Medicine, Department of Endocrinology, Department of Kidney Hematology and Department of Orthopaedics. A total of 51 strains (64.6%) were from male patients. Most patients used 2-5 kinds of antibiotics before detection of *Stenotrophomonas maltophilia*, and 64.5% of the patients used more than 3 kinds of antibiotics, and the main antibiotics were cephalosporins (82.3%), carbapenems (53.1%) and enzyme inhibitors (63.3%). The resistance rates of 79 strains to levofloxacin and trimethoprim sulfamethoxazole were 12.6% and 3.8% respectively and no minocycline resistant strain was found. The re-

\* 基金项目: 西安医学院第一附属医院院级课题 (XYFY2016-02)。

作者简介: 井发红, 女, 副主任技师, 主要从事微生物检验相关研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: lizhuo721@163.com。

sults of biofilm formation test showed that the average value  $A_{492}$  of biofilm formation ability was  $0.50 \pm 0.42$ , and there was no significant difference between different genders. Virulence gene detection results showed that the positive rates of *Stmpr1*, *Stmpr2*, *smf-1* and *Smlt3773* locus were relatively high, 75.9%, 91.1%, 93.7% and 44.3% respectively. **Conclusion** *Stenotrophomonas maltophilia* is mainly detected in male patients, and most of the patients have a history of multiple antimicrobial agents, and the bacterial virulence gene carrying rate is high.

**Key words:** *Stenotrophomonas maltophilia*; clinical distribution; virulence gene

嗜麦芽窄食单胞菌是一种革兰阴性非发酵菌,在自然界广泛分布,亦可寄居于人的呼吸道和肠道中,该菌并非强毒力细菌。但是,目前它所造成的医院内感染正在不断增加。中国耐药监测网的数据显示,在非发酵菌中嗜麦芽窄食单胞菌分离率位列第 3 位<sup>[1]</sup>。目前发现,嗜麦芽窄食单胞菌主要感染恶性肿瘤<sup>[2]</sup>、进行了介入性治疗<sup>[3]</sup>、有慢性呼吸道疾病、免疫缺陷、抗菌药物用药史<sup>[4]</sup>、长期在重症监护室进行治疗<sup>[5]</sup>的患者。而且嗜麦芽窄食单胞菌对大多数临床常用的抗菌药物天然耐药,如氨基糖苷类和很多  $\beta$ -内酰胺类(如碳青霉烯类)抗菌药物,导致临床感染难以控制<sup>[6]</sup>。本研究对临床分离的嗜麦芽窄食单胞菌的耐药情况、生物膜形成能力和毒力基因等进行检测,结合患者临床信息进行分析,旨在了解嗜麦芽窄食单胞菌的耐药机制和感染特点,以指导临床的合理用药和控制医院内感染。现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 菌株来源** 收集 2017 年 1 月至 2018 年 12 月西安医学院第一附属医院检验科微生物室分离的嗜麦芽窄食单胞菌菌株 79 株,均来自住院成人患者,剔除重复菌株,所有菌株均经过 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪进行鉴定,同时收集患者的临床信息及抗菌药物的使用情况。

**1.2 抗菌药物及培养基** 抗菌药物包括左氧氟沙星、甲氧苄啶-磺胺甲唑和米诺环素,药敏纸片均购自英国 Oxoid 公司,血琼脂平板和水解酪蛋白琼脂平板购自郑州安图公司,质控菌株为铜绿假单胞

ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922,药敏结果的判定参照美国临床与实验室标准化协会(CLSI)2016 年的标准。

**1.3 仪器与试剂** PCR 扩增仪购自新加坡公司;VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪购自法国生物梅里埃公司;PCR 试剂盒和细菌基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司。

**1.4 生物膜测定** 挑取过夜培养的嗜麦芽窄食单胞菌单个菌落用新鲜配制的 TSB 配制到  $D_{600}=1$ (相当于  $1 \times 10^9$  cfu/mL),再用肉汤按 1 : 100 稀释到  $D_{600}=0.01$ ( $1 \times 10^7$  cfu/mL),分别吸取 200  $\mu$ L 菌液加入到 96 孔微孔板中,37  $^{\circ}$ C 静置培养 24 h。采用结晶紫实验检测嗜麦芽窄食单胞菌生物膜形成能力<sup>[7]</sup>。首先将培养的平皿 60  $^{\circ}$ C 固定 1 h;然后弃去上清液,再用灭菌生理盐水清洗 4 次;每孔加入 50  $\mu$ L 0.5 mg/mL 结晶紫染液,室温静置 5 min;用自来水洗去残余染料,自然晾干;加入 250  $\mu$ L 33%冰醋酸溶解 15 min;用酶标仪测定波长 492 nm 处的吸光度(A)值来评估生物膜的形成能力。

**1.5 毒力基因的检测** 采用 PCR 方法检测嗜麦芽窄食单胞菌的 4 个主要毒力基因(*Stmpr1*、*Stmpr2*、*smf-1*、*Smlt3773* locus),所得产物采用琼脂糖凝胶电泳,电压 5 V/cm,10 min,根据片段大小判断有无,并计算毒力基因的携带率。合成引物参考文献[8],见表 1。

表 1 毒力基因引物列表

基因	引物名称	序列(5'-3')	产物大小(bp)
<i>Stmpr1</i>	<i>Stmpr1</i> -F	TGGATGCTTGGTCCCGTAGT	2 540
	<i>Stmpr1</i> -R	CCGTGGTGTCGGCTTCGATCTCT	
<i>Stmpr2</i>	<i>Stmpr2</i> -F	GCCGATTCCGGCATTACACACC	1 764
	<i>Stmpr2</i> -R	GGTCAGGCCCGAGAAGGTGCT	
<i>Smlt3773</i> locus	<i>Smlt3773</i> locus-F	CGGTGCCGAACCTCGTAACCGG	1 342
	<i>Smlt3773</i> locus-R	CTTCCGGCCATGGCAGGCGAA	
<i>smf-1</i>	<i>Smf-1</i> -F	GGAAGGTATGTCGAGTCCG	674
	<i>Smf-1</i> -R	GCGGGTACGGCTACGATCAGTT	

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用双侧 *t* 检

验;计数资料用频数或百分率进行描述统计分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 嗜麦芽窄食单胞菌的来源及临床分布特点** 79 株嗜麦芽窄食单胞菌主要来自于呼吸及重症医学科(29 例),神经外科(28 例),以及全科医学科、内分泌科、肾病血液科和骨科等。嗜麦芽窄食单胞菌感染患者中,男 51 例(占 64.6%),女 28 例(占 35.4%)。<40 岁 2 例(占 2.5%),40~<50 岁 3 例(占 3.8%),50~<60 岁 4 例(占 5.1%),60~<70 岁 9 例(占 11.4%),70~<80 岁 11 例(占 13.9%),80~<90 岁 26 例(占 32.9%),>90 岁 24 例(占 30.4%)。菌株主要来自痰标本 62 例,肺泡灌洗液 6 例,分泌物 8 例,尿液 3 例。79 株菌株对左氧氟沙星、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的耐药率分别为 12.6% 和 3.8%,未检出对米诺环素耐药的菌株。患者在分离到嗜麦芽窄食单胞菌前均应用过 2~5 种抗菌药物,其中使用 3 种以上的患者占 64.5%,主要的抗菌药物为头孢菌素类(82.3%)、碳青霉烯类(53.1%)和含酶抑制剂复合制剂(63.3%)。

**2.2 生物膜形成能力** 嗜麦芽窄食单胞菌的生物膜形成能力  $A_{492}$  为  $0.50 \pm 0.42$ ,女性患者生物膜形成能力  $A_{492}$  为  $0.54 \pm 0.41$ ,男性患者  $A_{492}$  为  $0.48 \pm 0.44$ ,男、女性患者比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 毒力基因检测** 毒力基因检测显示,Stmpr1、Stmpr2、smf-1、Smlt3773locus 的阳性率较高,分别为 75.9%、91.1%、93.7% 和 44.3%。

## 3 讨 论

嗜麦芽窄食单胞菌是一种常见的医院内机会性致病菌,随着广谱抗菌药物的大量使用和免疫抑制剂的广泛应用,且侵入性操作不断增多,该菌的分离率逐年上升,给临床治疗带来极大困难。本研究结果显示,79 株嗜麦芽窄食单胞菌主要来源于呼吸及重症医学科,其次是神经外科。该类科室的患者基础疾病较为复杂,自身免疫力低,同时应用多种广谱抗菌药物治疗,导致菌群失调,并且该类科室患者住院周期长,多需接受机械通气及深静脉置管等创伤性操作,这些均是引起嗜麦芽窄食单胞菌医院内感染的易感因素<sup>[9]</sup>。

本研究结果显示,菌株来自痰标本 62 例。引起患者呼吸道感染的原因主要是由于嗜麦芽窄食单胞菌易定植于呼吸道及胃肠道,同时患者在分离到嗜麦芽窄食单胞菌前均应用过 2~5 种抗菌药物,且使用 3 种及以上抗菌药物的患者占 64.5%。广谱抗菌药物的大量使用使患者体内正常菌群遭到破坏,而有利于嗜麦芽窄食单胞菌的生长。同时发现该菌感染以男性居多,>60 岁患者占 88.6%,说明嗜麦芽窄食单胞菌感染好发于老年人等免疫力低下患者。另一方面随着年龄增长,气管功能逐渐衰退,肺泡弹性及支气

管纤毛上皮运动逐渐减弱,使呼吸道清除功能减弱<sup>[10]</sup>。

本研究药敏结果显示,79 株菌株对左氧氟沙星、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的耐药率分别为 12.6% 和 3.8%,所有菌株均对米诺环素敏感,低于国内其他地区的报道<sup>[11]</sup>,与刘加军等<sup>[12]</sup>报道的结果相似。甲氧苄啶-磺胺甲噁唑是目前治疗嗜麦芽窄食单胞菌的首选药物,但是本院目前已出现对其耐药的菌株,应引起重视。国内外已有研究表明,体外联合用药优于单一用药<sup>[13-14]</sup>。因此,临床上针对嗜麦芽窄食单胞菌感染严重的患者可以考虑甲氧苄啶-磺胺甲噁唑联合其他药物的治疗方案。

革兰阴性杆菌重要的特点是易形成生物膜,侵入性操作的增加使生物膜相关感染和病死率不断增加,本研究中嗜麦芽窄食单胞菌的生物膜形成能力  $A_{492}$  为  $0.50 \pm 0.42$ ;毒力基因检测显示,Stmpr1、Stmpr2、smf-1、Smlt3773locus 的阳性率较高。

总之,本院嗜麦芽窄食单胞菌感染主要分布于呼吸及重症医学科、神经外科,患者以男性居多,大多使用过 3 种及以上抗菌药物,毒力基因携带率高,由于该菌对多种抗菌药物耐药,要求医生在临床工作中注重病原学的检验,针对病原菌合理选择抗菌药物,减少嗜麦芽窄食单胞菌的感染及耐药菌株的产生。

## 参 考 文 献

- [1] 周典,魏艳艳,熊自忠,等.临床分离嗜麦芽寡养单胞菌耐药性监测[J].中华医院感染学杂志,2009,19(4):456-457.
- [2] CALZA L, MANFREDI R, CHIODO F. Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia as an emerging opportunistic pathogen in association with HIV infection: a 10-year surveillance study[J]. Infection, 2003, 31(6): 155-161.
- [3] METAN G, HAYRAN M, HASCELİK G, et al. Which patient is a candidate for empirical therapy against Stenotrophomonas maltophilia bacteraemia? An analysis of associated risk factors in a tertiary care hospital[J]. Scand J Infect Dis, 2006, 38(6/7): 527-531.
- [4] APISARNTHANARAK A, MAYFIELD J L, GARISON T, et al. Risk factors for Stenotrophomonas maltophilia bacteremia in oncology patients: a case-control study[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2003, 24(4): 269-274.
- [5] LAI C H, CHI C Y, CHEN H P, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of patients with Stenotrophomonas maltophilia bacteremia[J]. J Microb Immun Infect, 2004, 37(11): 350-358.
- [6] 马玲,袁喆.2006—2009 年鲍曼不动杆菌感染分布特征及耐药性变迁[J].重庆医科大学学报,2010,35(11):1737-1741.
- [7] 段忠亮,秦娟秀,李敏,等.上海某医院临床分离嗜麦芽窄食单胞菌分子流行病学分析[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(3):283-288.

**2.3 MM 阳性性别分布情况** MM 阳性中, 男性阳性数(1 138 例)是女性阳性数(858 例)的 1.33 倍。所有分型中, 男性占比均高于女性, 在 IgG、IgA、IgM、IgD 型中男性占比分别为 54.3%、58.2%、77.1%、60.4%、57.0%, 女性占比分别为 45.7%、41.8%、22.9%、39.6%、43.0%。IgE 型仅有 1 份, 故不计入统计。

### 3 讨 论

本研究中, M 蛋白类型构成比从高到低依次为 IgG>IgA>轻链>IgD>IgM>IgE, 轻链-κ>轻链-λ; MM 在 60~<75 岁人群中发病率最高, 其次是 45~<60 岁人群; 男性发病率高于女性。值得注意的是, 本研究中轻链型所占比例较高, 且 IgD 型高于国外报道的 2%<sup>[4]</sup>, 提示广东地区 M 蛋白轻链型和 IgD 型较西方国家人群高。有研究报道, M 蛋白轻链分布中轻链-κ 型较轻链-λ 型明显更多, 但是本研究中轻链-λ 型明显多于轻链-κ 型<sup>[4]</sup>, 分析原因可能与 IgD-λ 型 M 蛋白较多和游离轻链型 M 蛋白有关。

MM 是一种老年病, 其中位诊断年龄为 69 岁, 低于 40 岁的患者较为少见<sup>[5]</sup>。本研究中, 患者发病年龄集中于 45~<75 岁, 75~<90 岁次之, 40 岁以下和 ≥90 岁者少见。广东地区 MM 阳性检出年龄段分布略高于周爱花等<sup>[6]</sup>报道的发病年龄, 是否由于标本来源及区域性差异有待增加样本量做进一步统计分析。

MM 发病率男性略多于女性, 且受种族和遗传因素的影响, 其发病也受环境因素影响, 如暴露于农业及石化工业的化学品<sup>[7]</sup>, 本研究结果显示, 广东地区 MM 男性发病率为女性的 1.33 倍, 男女发病率比例与周爱花等<sup>[6]</sup>和刘玉梅等<sup>[8]</sup>报道的相当, 表明广东地区男女发病比例与西北兰州地区相似。但是, 广东地区 MM 各分型男女阳性率明显高于周爱花等<sup>[6]</sup>报道的数据, 造成差异的原因可能与临床检测技术及方法的联合应用有很大关系, 是否由于地域或经济条件及

环境因素有待进一步研究。本研究中, IgD 和 IgM 型 MM 阳性率男性明显高于女性, 其他文献对这两种类型少有统计, 尤其是 IgM 型 MM, 阳性率为 4.8%, 提示此型较少见。IgM 分型除具有 MM 的一般临床表现外, 因其相对分子质量较大, 易形成五聚体而使血液黏滞性增高, 易发生高黏滞性综合征, 其预后极差。因此, 通过联合检测, 提高 MM 检出率, 降低 MM 的漏诊、误诊率, 及早发现、及早预防, 对 MM 的预后治疗具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 周健, 陈安辉, 季荏, 等. 多发性骨髓瘤患者 M 蛋白水平的回顾性分析[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(3): 231-232.
- [2] KYLE R A, GERTZ M A, WITZIG T E, et al. Review of 1 027 patients with newly diagnosed multiple myeloma [J]. Mayo Clin Proc, 2003, 78(1): 21-33.
- [3] 贾雁春, 杜鹃. 多发性骨髓瘤的预后评估体系[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(11): 820-824.
- [4] ZAGOURI F, KASTRITIS E, SYMEONIDIS A S, et al. Immunoglobulin D myeloma clinical features and outcome in the era of novel agents[J]. Eur J Haematol, 2014, 92(4): 308-312.
- [5] KYLE R A, GERTZ M A, WITZIG T E, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma [J]. Mayo Clin Proc, 2003, 78(2): 21-33.
- [6] 周爱花, 韩平治, 常若云. 兰州地区多发性骨髓瘤患者 M 蛋白免疫固定电泳结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(9): 1062-1063.
- [7] RIEDEL D A, POTTERN L M. The epidemiology of multiple myeloma[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 1992, 6(1): 225-247.
- [8] 刘玉梅, 赵有利, 石翀, 等. 107 例多发性骨髓瘤 M 蛋白检测与免疫学分型分析[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 132-134.

(收稿日期: 2019-12-21 修回日期: 2020-03-17)

(上接第 2478 页)

- [8] NICOLETTI M, IACOBINO A, PROSEDA G, et al. Stenotrophomonas maltophilia strains from cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants[J]. Int J Med Microbiol, 2011, 301(1): 34-43.
- [9] 桂铭芹, 朱卫民. 嗜麦芽窄食单胞菌耐药机制的研究[J]. 进展国外医药(抗菌药物分册), 2018, 39(6): 501-505.
- [10] WU K H, WANG F P, SUN J J, et al. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(3): 264-267.
- [11] 刘阳, 汤雪萍, 尚学义, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌感染危险因素和耐药性分析[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(4): 258-261.

- [12] 刘加军, 刘春晓, 郭秀英. 152 例临床感染嗜麦芽窄食单胞菌分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(4): 389-393.
- [13] 赵苏瑛, 杨琳, 李鹏飞, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌获得性耐药的机制研究及整合子分布调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(2): 263-271.
- [14] 陈曦, 胡立芬, 马雪娇, 等. 安徽地区嗜麦芽寡养单胞菌中整合子及 ISCR1 流行情况研究[J]. 中国抗菌药物杂志, 2015, 40(4): 285-289.

(收稿日期: 2019-12-26 修回日期: 2020-04-11)