

## 嗜麦芽窄食单胞菌 I 类整合子的分布及耐药谱型

时东彦, 李仲兴, 赵建宏

(河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000)

**[摘要]** **目的** 了解嗜麦芽窄食单胞菌 I 类整合子的存在情况以及耐药谱型。**方法** 2006 年 7 月—2007 年 12 月自临床标本分离 60 株嗜麦芽窄食单胞菌, 采用聚合酶链反应法检测分析其基因 *int I*、*qacE $\Delta$ 1-sul 1*。药敏试验采用微量肉汤稀释法。**结果** 60 株嗜麦芽窄食单胞菌 I 类整合子阳性率为 13.33%(8/60), 对临床常用抗菌药物敏感率 >80% 的仅有米诺环素、复方磺胺甲噁唑、左氧氟沙星。**结论** 嗜麦芽窄食单胞菌是一种重要的医院感染病原菌, 其具多重耐药性, I 类整合子的存在加快了细菌耐药性的传播。

**[关键词]** 嗜麦芽窄食单胞菌; 整合子, I 类; 抗药性; 微生物; 耐药机制; 抗菌药物

**[中图分类号]** R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)01-0033-03

## Detection of class I integrons and drug-resistance phenotype in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates

SHI Dong-yan, LI Zhong-xing, ZHAO Jian-hong (The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the positive rate of class I integrons and drug-resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Methods** Sixty strains of *Stenotrophomonas maltophilia* were clinically isolated between July, 2006 and December, 2007, the genes of *int I*, *qacE $\Delta$ 1-sul 1* of these strains were analyzed by PCR and antimicrobial susceptibility tests were performed by micro-broth dilution method. **Results** The positive rate of class I integrons was 13.33% (8/60), only 80% *Stenotrophomonas maltophilia* were sensitive to minocycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and levofloxacin. **Conclusion** The *Stenotrophomonas maltophilia* is an important pathogen in nosocomial infection, which has multiple-drug resistance, and class I integrons genes can promote the spread of bacterial resistance.

**[Key words]** *Stenotrophomonas maltophilia*; class I integrons; drug resistance, microbial; drug-resistance mechanism; antimicrobial agents

[Chin Infect Control, 2009, 8(1): 33-35]

嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)其本身的固有耐药、外膜渗透性下降、两种金属  $\beta$ -内酰胺酶的产生和外排系统均与其多重耐药性有关<sup>[1]</sup>。嗜麦芽窄食单胞菌多重耐药已成为临床治疗的难点。整合子介导的细菌耐药机制, 因能解释耐药基因的高效快速传播而备受重视。本研究通过分析 I 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 菌株来源与鉴定 60 株实验菌株分离自本院 2006 年 7 月—2007 年 12 月住院患者临床标本。采用法国生物梅里埃公司 API 系统鉴定菌种。标准菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 药敏试验方法 采用微量肉汤稀释法进行药敏试验, 判断标准按照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2006 版执行, 标准菌株为铜绿假单胞菌

[收稿日期] 2008-08-25

[基金项目] 河北省科技厅科技攻关课题(072761546)

[作者简介] 时东彦(1973-), 女(汉族), 河北省武强县人, 主管检验师, 主要从事临床细菌耐药性研究。

[通讯作者] 时东彦 E-mail: sdy1rq@yahoo.com.cn

ATCC 27853。

1.3 基因扩增主要试剂与仪器 ABI 7000 聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国 ABI),凝胶成像系统(美国 bio-rad 公司),琼脂糖(美国 bio-rad 公司)。

1.4 PCR 检测基因 I 类整合子 5'端整合酶基因 *int I* 和 3'端基因 *qacEΔ1-sul 1* 检测, *Int I* 引物 P1: 5' - ACGAGCGCAAGGTTTCGGT - 3', P2: 5' - GAAAGGTCTGGTCATACATG - 3', 产物 565 bp; *qacEΔ1-sul 1* 引物 P1: 5' - TAGCGA-GGGCTTTACTAAGC - 3', P2: 5' - ATTCA-GAATGCCGAACACCG - 3', 产物 287 bp。引物的设计经 blast 检索,参照基因号为 AF550415 的基因序列,经上海生物工程有限公司合成。

1.5 PCR 扩增 将待测菌株热裂解提取 DNA, 65℃ 1 h, 93℃ 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清 5 μL 作为扩增模板, 引物 P1、P2、dNTP、扩增缓冲液、Mg<sup>2+</sup> 等按常规 PCR 配比加入, 反应体系总体积 50 μL; 扩增参数: 93℃ 预变性 5 min, 以后按 93℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s 共 35 个循环, 最后一循环延伸时间为 10 min。反应完毕, 取产物 10 μL 置 2% 琼脂糖凝胶电泳, 照相。阳性对照由华南理工大学石磊惠赠。

## 2 结果

2.1 细菌携带整合子情况 60 株嗜麦芽窄食单胞菌经 PCR 扩增和产物的电泳检测分析, 其中 8 株菌 *int I* 基因和 *qacEΔ1-sul 1* 基因有阳性扩增产物, 阳性率为 13.33%, 见图 1。

2.2 药敏结果 嗜麦芽窄食单胞菌对临床常用抗菌药物敏感率以米诺环素、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑较高, 其次为头孢哌酮/舒巴坦、替卡西林/克拉维酸、头孢他啶, 对头孢吡肟、阿米卡星、庆大霉素的敏感率较低, 见表 1。

表 1 60 株嗜麦芽窄食单胞菌对临床常用抗菌药物的敏感率  
Table 1 Antimicrobial susceptibility rates of 60 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* to commonly used antimicrobial agents in clinic

抗菌药物	敏感(株)	%
头孢他啶	41	68.33
头孢吡肟	19	31.67
哌拉西林/他唑巴坦	33	55.00
头孢哌酮/舒巴坦	46	76.67
替卡西林/克拉维酸	41	68.33
左氧氟沙星	54	90.00
复方磺胺甲噁唑	50	83.33
米诺环素	59	98.33
庆大霉素	9	15.00
阿米卡星	13	21.67
亚胺培南	0	0.00

## 3 讨论

整合子—基因盒系统属于可移动基因元件, 可位于细菌的染色体上, 也可借助于移动的质粒、转座子在同种或不同种细菌之间水平传播, 对细菌耐药性的传播起着重要作用。整合子根据整合酶基因的不同分类, 迄今已发现 10 类整合子<sup>[2]</sup>, 在临床菌株中常见的为 I、II、III 类整合子, 其中尤以 I 类整合子最常见。I 类整合子在转座子(如 Tn21)、质粒以及细菌染色体上被发现, 其基本结构由 3 部分组成: 两端是高度保守序列, 分别称作 5' 保守端(5'CS)和 3' 保守端(3'CS), 5'CS 和 3'CS 之间的区域称作可变区, 可变区由一个或多个基因盒组成, 基因盒一般含抗菌药物耐药基因。5'CS 含启动子 P1(Pant), 启动子负责基因的转录, 编码位点特异重组酶的整合酶基因 *int I* 负责催化基因盒的整合和切除以及重组位点 *att I*。3'CS 一般含 3 个开放读码框, 分别为季铵盐化合物和溴乙锭耐受基因(*qacEΔ1*)、磺胺耐药基因(*sul 1*)以及功能不明的开放读码框 ORF5。对大多数 I 类整合子而言, 5' 保守末端均相似, 而 3' 保守末端存在差异, 这些差异均来源于某些基因的插入或删除。I 类整合子在临床革兰阴性菌株中广泛流行<sup>[3]</sup>。现已在许多革兰阴性菌中分离

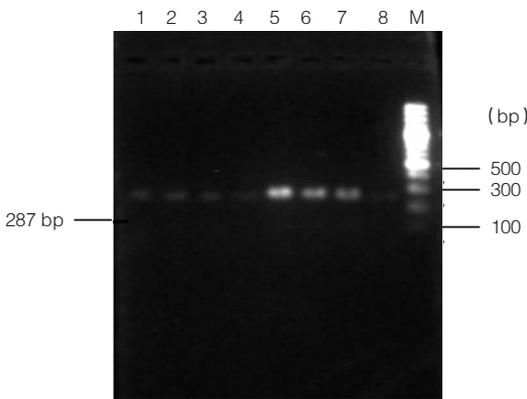


图 1 嗜麦芽窄食单胞菌 I 类整合子基因 PCR 电泳结果  
Figure 1 PCR electrophoresis map of class I integrons in *Stenotrophomonas maltophilia*

出 I 类整合子,包括大肠埃希菌、沙门菌属、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、不动杆菌属等。

在细菌耐药机制的研究中,以基因突变和耐药性质粒介导细菌耐药来解释似乎不够完全。整合子作为可移动的基因元件得到广泛关注,并取得了很大的进展。嗜麦芽窄食单胞菌已经成为非发酵菌中占第 3 位的细菌,因具有外膜低渗透性,抗菌药物难以通过外膜进入细菌细胞内,加上泵出机制等,其对多种抗菌药物具天然耐药性<sup>[3]</sup>。此外,该菌可产生超广谱  $\beta$ -内酰胺酶和金属  $\beta$ -内酰胺酶,故呈现出包括碳青霉烯类药物在内的多重耐药。本研究药敏结果显示,嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南和美罗培南天然耐药,对庆大霉素和阿米卡星有较高的耐药性,而米诺环素、复方磺胺甲噁唑、左氧氟沙星对其显示了较好的抗菌活性,尤其米诺环素的敏感率达到了 98.33%。据报道<sup>[4]</sup>,复方磺胺甲噁唑是治疗嗜麦芽窄食单胞菌感染的最有效药物,但是近年报道嗜麦芽窄食单胞菌耐复方磺胺甲噁唑的比率为 10%~15%,正表现为逐年增高的趋势。近几年有关嗜麦芽窄食单胞菌耐药机制的研究集中于 I 类整合子及其所带的基因盒<sup>[5]</sup>。邓笑伟等<sup>[6]</sup>研究了 I 类整合子在嗜麦芽窄食单胞菌中的分布,I 类整合子的检出率为 13.4%,其中 3 株菌同时带有 I 类和 II 类整合子,II 类整合子的阳性率为 3.6%,未检测到 III 类整合子。凌华志等<sup>[7]</sup>报道嗜麦芽窄食单胞菌的 I 类整合子阳性率为 29.4%。台湾学者<sup>[8]</sup>报道 I 类整合子的阳性率为 21.36%(22/103)。本研究同时检测 I 类整合子的 5'CS 和 3'CS,发现嗜麦芽窄食单胞菌 I 类整合子阳性株占 13.33%(8/60)。本次实验设计了 2 组引物,分别针对整合子的 5'和 3'端保守序列进行双重检测,以降低漏检概率。仅以 5'和 3'端保守序列 PCR 扩增为依据确定整合子的存在,可能会出现漏检情况。因为近来不少报道<sup>[9]</sup>指出有部分 I 类整合子的 3'端保守序列是不完整甚至是缺失的,而这类整合子在耐药基因盒 PCR 扩增中会出现假阴性情况。本研究结果表明,I 类整合子的出现提高了嗜麦芽窄食单胞菌的耐药性,但是其所带基因盒的类型仍需深入研究。

整合子—基因盒系统是新的可移动基因元件,

能捕获和整合细菌的耐药基因,是细菌多重耐药和传播的主要内在机制。抗菌药物的选择压力是导致细菌耐药性存在、发展的主要客观因素,因此整合子—基因盒的出现向临床治疗多重耐药菌提出了严峻的挑战。

#### [参考文献]

- [1] Lockhart S R, Abramson M A, Beekmann S E, et al. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli as causes of infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004[J]. J Clin Microbiol, 2007, 22(3): 1124 - 1138.
- [2] Correia M, Boavida F, Grosso F, et al. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47 (9): 2838 - 2843.
- [3] Maguire A J, Brown D F, Gray J J, et al. Rapid screening technique for class 1 integrons in Enterobacteriaceae and non-fermenting gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 1022 - 1029.
- [4] Toleman M A, Bennett P M, Bennett D M, et al. Global emergence of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(4): 559 - 565.
- [5] Toleman M A, Bennett P M, Bennett D M, et al. Global emergence of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(4): 559 - 565.
- [6] 邓笑伟,刘长庭,李天智,等.嗜麦芽窄食单胞菌中 II 类整合酶基因的发现及意义[J].中华医院感染学杂志,2007,17(9): 1061 - 1063.
- [7] 凌华志,李涛,徐元宏,等.假单胞菌属细菌中整合子的分布及其可转移耐药性研究[J].临床检验杂志,2007,25(1): 10 - 12.
- [8] Lin-Li Chang, Hui-Hui Lin, Chung-Yu, et al. Increased incidence of class 1 integrons in trimethoprim/sulfamethoxazole resistant clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59: 1038 - 1045.
- [9] Yu H S, Lee J C, Kang H Y, et al. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last twodecades [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41 (12): 5429.

欢迎投稿

欢迎订阅