

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.028

医院感染嗜麦芽窄食单胞菌的分子分型研究*

宋惠珠¹ 李青青² 潘瑞琳² 徐玉妹² 耿先龙^{2Δ}

(南京医科大学附属无锡人民医院 1 药剂科; 2 医学检验科 江苏 无锡 214023)

摘要 目的: 对医院感染分离的嗜麦芽窄食单胞菌进行耐药谱和分子分型研究分析, 为制订合理的感染控制方案提供依据。**方法:** 对临床分离的 42 株嗜麦芽窄食单胞菌用质谱仪进行鉴定并分析其耐药表型, 根据其头孢他啶、复方新诺明、左氧氟沙星、米诺环素及头孢吡肟 5 种抗生素的药敏结果的不同分组, 药敏结果相同的菌株分为一型, 药敏结果不同的分为另一型; 采用 PFGE 对其做分子分型分析。**结果:** 42 株嗜麦芽窄食单胞菌分为 6 个不同的耐药表型; 对 42 个菌株做 PFGE 电泳, 共得到 A-D 4 个基因型。**结论:** 嗜麦芽窄食单胞菌耐药谱特征和 PFGE 分型检测结果对抗生素选择性治疗有很好的指导作用。

关键词: 嗜麦芽窄食单胞菌; 感染; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R927.1; R197.323.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)11-2125-04

Molecular Typing of *Stenotrophomonas maltophilia* in a Hospital*

SONG Hui-zhu¹, LI Qing-qing², PAN Rui-lin², XU Yu-mei², GENG Xian-long^{2Δ}

(1 Department of Pharmacy, 2 Department of Clinical Laboratory,

Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu, 214023, China)

ABSTRACT Objective: To study and analyze the drug resistance spectrum and molecular typing of *Stenotrophomonas maltophilia* in hospital infection, so as to provide basis for making reasonable infection control plan. **Methods:** 42 strains of clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* were identified by mass spectrometer and their drug resistance phenotypes were analyzed. According to the different groups of drug sensitivity results of five antibiotics, ceftazidime, compound neoformamine, levofloxacin, minocycline and cefepime, the strains with the same drug sensitivity results were divided into one type and the strains with different drug sensitivity results were divided into another type; PFGE was used for molecular typing Analysis. **Results:** 42 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* were divided into 6 types. 42 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* were analyzed by PFGE and 4 genotypes of A-D were obtained. **Conclusions:** The characteristics of drug resistance spectrum and PFGE typing of *Stenotrophomonas maltophilia* are very useful for the selective treatment of antibiotics.

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*; Infection; Pulsed field gel electrophoresis

Chinese Library Classification(CLC): R927.1; R197.323.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)11-2125-04

前言

嗜麦芽窄食单胞菌广泛存在于自然界中, 该菌可引起伤口感染、泌尿道、呼吸道及腹膜炎等多种感染; 嗜麦芽窄食单胞菌存在多重耐药机制, 是致病性较强的革兰阴性非发酵细菌之一^[1,2]。由于其高致病及多重耐药特征, 使其抗感染的治疗更加困难^[3-5]。本研究将通过嗜麦芽窄食单胞菌的耐药谱与 PFGE 技术结合分析, 对 2019 年 10-12 月无锡市人民医院分离的 42 株嗜麦芽窄食单胞菌进行耐药图谱分析和分子分型检测, 结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 2019 年 10-12 月无锡市人民医院住院患者分离

的 42 株嗜麦芽窄食单胞菌。

1.1.2 主要仪器与试剂 VITEK MS 质谱仪购于法国 BioMerieux 公司; 蛋白酶 K 购于美国 Amresco 公司; 凝胶成像仪购于美国 BIO-RAD 公司; DYY-10C 型电泳仪购于北京六一仪器厂。限制性核酸内切酶 *Sma* I 购于上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 嗜麦芽窄食单胞菌鉴定和药物敏感性试验 42 株嗜麦芽窄食单胞菌均按 VITEK MS 质谱仪进行细菌鉴定, 并对 42 株菌株通过 compact2 药敏仪和手工 KB 法进行 5 种抗生素药敏试验。5 种抗生素分别为: 头孢他啶、复方新诺明、左氧氟沙星、米诺环素及头孢吡肟。操作严格依照说明书和 CLSI 标准进行。质控菌为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.2.2 脉冲场凝胶电泳(PFGE) (1)DNA 胶块(plug)的制备:

* 基金项目: 无锡市医院管理中心科技发展基金项目(YGM1001)

作者简介: 宋惠珠(1976-), 女, 本科, 副主任药师, 主要研究方向: 药事管理, E-mail: song-huizhu@163.com

Δ 通讯作者: 耿先龙, E-mail: 36371445@qq.com

(收稿日期: 2020-10-27 接受日期: 2020-11-21)

挑取嗜麦芽窄食单胞菌单个菌落,均匀混合于 TEN 溶液中,10000 r/min(离心半径 5 cm)离心 5 min,再加入 0.5 mL EC 液进行混匀。测混合液的 A600 值,调整 A600 值保持在 5.8~6.3 之间。取 500 μ L 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 5 min,加入等量的 1.8% Seakem 金琼脂糖放于 56 $^{\circ}$ C 孵箱中使其融合成胶块。

(2)Sma I 酶切和电泳:取 10 μ L 蛋白酶 K 加入已制备好的 DNA 胶块中,置 45 $^{\circ}$ C 条件下孵育 12 h;每个含嗜麦芽窄食单胞菌 DNA 胶块再加入限制性核酸内切酶 Sma I 3 μ L,25 $^{\circ}$ C 12 h,然后进行脉冲场电泳。电泳条件条件:0.5 $\times$ TBE,6 V/cm,1% (PFC) Agarose,14 $^{\circ}$ C。电泳 20 h 后进行 EB 染色,用系统用自带成像设备获取 PFGE 的电泳图象。

(3)PFGE 电泳:按照美国 CDC 推荐的标准判读嗜麦芽窄食单胞菌菌株同源性^[9];PFGE 电泳图谱条带完全一致的为一个基因型;同一基因型的不同亚型则有 1~3 个电泳条带的不同;PFGE 电泳图谱有 4~6 个电泳条带的不同为有相近关系;

图谱电泳条带有 7 个以上不同的为无亲缘关系。PFGE 基因型分型原则是随机选择不同字母,如按照 A、B、C 等的字母顺序分型。

(4)院感分析:在医院住院患者中,在某个科室内很短的时间内发生 3 例或以上的院内感染现象称为医院感染暴发。本研究对 42 株嗜麦芽窄食单胞菌结合 PFGE 技术进行回顾性院感分析。

2 结果

2.1 嗜麦芽窄食单胞菌耐药谱分型结果

42 株嗜麦芽窄食单胞菌对头孢他啶、复方新诺明、左氧氟沙星、米诺环素、头孢吡肟的耐药率分别为 23.8%、28.6%、4.8%、4.8%、76.2%。根据对 5 种抗生素的药敏差异性将药敏结果完全相同的嗜麦芽窄食单胞菌分为一型,药敏结果不同的分为另一型,共将 42 株嗜麦芽窄食单胞菌分为 6 个型(表 1)。

表 1 42 株嗜麦芽窄食单胞菌的耐药谱分型结果

Table 1 Typing results of drug resistance spectrum of 42 strains of *Stenotrophomonas maltophilia*

Type	LVX	CAZ	MH	SXT	FEP	Number of bacteria	Strain number
1	S	S	S	S	R	12	1, 6, 9, 10, 11, 14, 19, 33, 34, 35, 36, 37
2	S	S	S	R	R	7	3, 5, 38, 22, 17, 21, 41
3	R	R	R	R	R	5	13, 16, 39, 40, 42
4	S	S	S	S	R	11	2, 4, 7, 8, 12, 15, 18, 20, 25, 26, 32
5	S	R	S	S	S	5	23, 24, 27, 28, 29
6	S	S	S	S	S	2	30, 31

Note: CAZ is ceftazidime; Sxt is cotrimoxazole; LVX is levofloxacin; MH is minocycline; FEP is cefepime

2.2 CR-KPN 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型

42 株嗜麦芽窄食单胞菌均可进行 PFGE 基因分型,得到 A-D 等共 4 个 PFGE 基因型(图 1,表 2)。通过回顾性统计,当

PFGE 的基因型相同或是其亚型时,其耐药表型的符合率能达到 85%。

表 2 42 株嗜麦芽窄食单胞菌的的 PFGE 分型结果

Table 2 PFGE typing results of *Stenotrophomonas maltophilia*

PFGE type	Number of bacteria	Strain number
A	19	1, 6, 9, 10, 11, 14, 19, 33, 34, 35, 36, 37, 3, 5, 38, 22, 17, 21, 41
B	11	2, 4, 7, 8, 12, 15, 18, 20, 25, 26, 32
C	7	23, 24, 27, 28, 29, 30, 31
D	5	13, 16, 39, 40, 42

2.3 院内感染分析

本研究中,A 型的 19 株嗜麦芽窄食单胞菌菌株均在(2019 年 10 月)一个月收集(表 3),表明存在严重的院内感染暴发流行。

3 讨论

在住院患者常见的细菌感染中革兰阴性细菌占多数,而嗜麦芽窄食单胞菌在医院感染常见的革兰阴性菌中占据一定的地位;其为条件致病菌,在糖尿病、高血压、肿瘤、移植患者等免疫力低下状况下,易发感染^[3]。嗜麦芽窄食单胞菌具有对多种抗

生素耐药和产毒素的特性,使其能长期在医院各种环境内存活,从而对住院患者造成嗜麦芽窄食单胞菌的院内感染,其院内感染严重影响患者预后^[7-9]。从理论上说,嗜麦芽窄食单胞菌分子分型一致,其耐药谱表型相同;但是耐药谱相同,分子分型不一定相同。因此,掌握医院感染的嗜麦芽窄食单胞菌的耐药谱及其分子分型特征对患者治疗和院感控制具有重要的作用。

本研究中,42 株嗜麦芽窄食单胞菌对头孢他啶、复方新诺明、左氧氟沙星、米诺环素、头孢吡肟的耐药率分别为 23.8%、28.6%、4.8%、4.8%、76.2%。根据耐药图谱特征共将它们分为 6 个型别。体外药敏结果表明,抗生素选择左氧氟沙星和米诺环

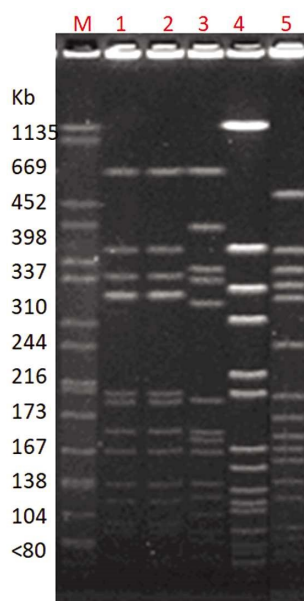


图1 部分嗜麦芽窄食单胞菌菌株的 PFGE 分型结果

注: M 泳道为 Marker, 1~5 泳道的基因型分别为: A、A、B、C、D.

Fig.1 PFGE typing results of some narrow-eating maltophilic Strains.

Note: Lane M, DNA marker; Lane 1-5, the genotypes A, A, B, C and D

素较为理想。

细菌的分子生物学分型技术主要包括了核糖体分型、

PFGE 分型、序列分型及多位点序列分型技术等,其中核糖体分型技术高效、简便,缺点是设备要求和费用高;序列分型和多位点序列分型技术简单易行重复性好,缺点它是主要针对进化比较慢的位点,而对耐药基因或质粒这些高突变的位点其分辨率不是很好。而 PFGE 分型技术是细菌分子分型的 "金标准",其解析度清晰,并能完整系统理清细菌种属和进化体系^[10-12]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、志贺菌、沙门菌等临床常见菌可以利用 PFGE 分型技术来分析它们的耐药性、分子分型及感染状况^[13-28]。这极大的扩展了 PFGE 分子分型技术在细菌临床研究上方面的应用模式。本研究将嗜麦芽窄食单胞菌医院感染爆发感染期间收集的 42 株菌株分为 A、B、C 和 D 4 个基因型别,即使在感染暴发的 3 个月内,嗜麦芽窄食单胞菌的 PFGE 基因分型结果相差仍较大,其同源性不高,这和其他多重耐药菌院内感染暴发多为同一基因型水平传播有很大的不同。这可能由于患者住院前本身已处于嗜麦芽窄食单胞菌携带状态,当其处于多种并发症等免疫力低下状况下,易发感染。但是需要说明的是,A 型的 19 株嗜麦芽窄食单胞菌菌株在很短的时间收集的,这表明存在嗜麦芽窄食单胞菌院内感染暴发。当通知院感部门处理后一个星期,A 型基因型在后期就消失了。从而更进一步的证明了在医院感染暴发期间对嗜麦芽窄食单胞菌进行 PFGE 分型的重要作用。

表 3 各基因型嗜麦芽窄食单胞菌在不同时间科室分布情况

Table 3 The distribution of each genotype of *Stenotrophomonas maltophilia* in different time sections

genotype	October 8 - October 31, 2019		November 1 - November 30, 2019		December 1 - December 10, 2019	
	Department	Number of bacteria	Department	Number of bacteri	Department	Number of bacter
A	Transplantation center	11				
	infectious Disease Department	5				
	ICU	1				
	Respiratory Medicine	1				
	neurosurgery	1				
B	blood specialty	2	Geriatrics Department	2	infectious Disease Department	2
			neurosurger	2	Transplantation center	1
			ICU	2		
C	Transplantation center	1	Transplantation center	2	Gastroenterology	2
			Department of Cardiology	2		
D			Transplantation center	1	blood specialty	2
			blood specialty	1	Respiratory Medicine	1

从理论上说:细菌的 PFGE 的基因型别相同或相似时,它们的对抗生素耐药类型应该相同或相似。蒋宁等对玉林市婴幼儿腹泻感染的非伤寒沙门菌进行 PFGE 分子分型和耐药性分析研究表明 PFGE 的基因型别和耐药表型高度一致^[29]。这份研究报告就是对这个理论很好的证明。但是还有专家研究表明:阪崎克罗诺杆菌的 PFGE 的基因型别和其细菌耐药表型之间无明显的相关性^[30]。这两份截然不同的研究报告表明:不同的细菌种类之间的 PFGE 的基因型别和其细菌耐药表型存在着高度一致性或者无明显相关性。本研究将耐药表型图谱与 PFGE 分型结合分析,对嗜麦芽窄食单胞菌医院感染期间收集的菌株进行分析研究。当嗜麦芽窄食单胞菌的 PFGE 的基因型相同或是其亚型时,其耐药表型的符合率能达到 85%。这符合了基因型决定表型的耐药机制,从而能进一步预测嗜麦芽窄食单胞菌基因型相同时的感染者抗生素治疗方案选择。因此,通过嗜麦芽窄食单胞菌的 PFGE 分子分型研究,可发现其感染暴发期间各个菌株之间的进化特点和耐药模式特征,从而治疗性抗生素选择治疗提供一定的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Huedo P, Coves X, Daura X, et al. Quorum Sensing Signaling and Quenching in the Multidrug-Resistant Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 24(8): 122
- [2] Trifonova A, Strateva T. *Stenotrophomonas maltophilia*-a low-grade pathogen with numerous virulence factors[J]. *Infect Dis (Lond)*, 2019, 51(3): 168-178
- [3] Singhal L, Kaur P, Gautam V. *Stenotrophomonas maltophilia*: From trivial to grievous[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2017, 35(4): 469-479
- [4] Matson HH, Jones BM, Wagner JL, et al. Growing resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*?[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2019, 76(24): 2004-2005
- [5] Rizek CF, Jonas D, Garcia Paez JJ, et al. Multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*: Description of new MLST profiles and resistance and virulence genes using whole-genome sequencing [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2018, 12(15): 212-214
- [6] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-9
- [7] Shah S, King M, Rose L. Medical Management of Endocarditis Caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: A Case Report[J]. *J Pharm Pract*, 2019, 32(6): 683-686
- [8] Sun E, Liang G, Wang L, et al. Antimicrobial susceptibility of hospital acquired *Stenotrophomonas maltophilia* isolate biofilms [J]. *Braz J Infect Dis*, 2016, 20(4): 365-373
- [9] Kim HR, Lee D, Eom YB. Anti-biofilm and Anti-Virulence Efficacy of Celastrol Against *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(6): 617-627
- [10] 刘英,王铭,李世军,等. 2009-2015 年贵州省致病性钩端螺旋体分离株 PFGE 分型分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(2): 186-189+198
- [11] 姜照,宋燕,伍海燕,等. 烟台市不同来源副溶血性弧菌的病原学特征及脉冲场凝胶电泳分型分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(8): 877-881
- [12] 王小强,吴守芝,王增国,等. 一起肠炎沙门菌致食物中毒和同期散发腹泻的病原学研究及溯源分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(12): 1122-1125
- [13] 黄梦颖,陈建辉,邱玉锋,等. 福建地区健康人携带德耳卑沙门菌的耐药特征及遗传多样性分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(09): 1046-1052
- [14] 于森,耿英芝,魏彤竹,等. 辽宁省 2018 年食源性金黄色葡萄球菌脉冲场凝胶电泳分子分型及毒力基因的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(08): 2593-2597
- [15] 杨毅,牟文婷,田居灵,等. 住院患儿耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 PFGE 分型及耐药性[J]. *医学动物防制*, 2020, 36(03): 257-260
- [16] 徐淑晖,郭政新. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌分子生物学分型的进展 [J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2019, 36(04): 64-67
- [17] 石奔,赵薇,孙景昱,等. 吉林省致泻大肠埃希氏菌分子分型与耐药性研究[J]. *中国实验诊断学*, 2020, 24(10): 1697-1702
- [18] 朱晓露. 连云区腹泻人群致泄性大肠埃希氏菌感染和分子分型特征分析[J]. *现代预防医学*, 2020, 47(12): 2292-2295
- [19] 刘绮明,袁展红,吴灿权,等. 2012-2018 年中山市集中空调冷却塔水嗜肺军团菌分子分型及分布特征[J]. *公共卫生与预防医学*, 2020, 31(03): 84-89
- [20] 林冬玲,龙一飞,叶依,等. 61 株纹带棒状杆菌耐药表型与分子流行病学[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(19): 2927-2930
- [21] 郝民,王恒伟,邵希凤,等. 北京市朝阳区食物中毒相关金黄色葡萄球菌病原学分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(17): 6246-6250
- [22] 陈君灏,张雯霞,陈晨,等. 肺炎克雷伯菌临床分离株的耐药性与分子流行病学分析[J]. *实用药物与临床*, 2020, 23(07): 650-654
- [23] 李庆雷,王金新,刘鹏,等. 脉冲场凝胶电泳对不同牛舍中大肠杆菌的分析鉴定[J]. *中国乳业*, 2020(05): 51-54
- [24] 徐秋琼,单桂花,彭明益,等. 广州市黄埔区首例韦泰夫雷登沙门氏菌食物中毒事件的溯源检测 [J]. *医学动物防制*, 2020, 36(03): 300-304
- [25] 王鹏,马红梅,李颖,等. 脉冲场凝胶电泳技术对一起聚集事件病原学回顾性分析[J]. *首都公共卫生*, 2019, 13(06): 308-310
- [26] 霍哲,王永全,徐俊,等. 一起肠炎沙门菌引起的食源性疾病的溯源分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(24): 2969-2970+2974
- [27] 杨月莲,李娜,王丽珩,等. 分子分型技术在空肠弯曲菌鉴定中的应用[J]. *预防医学论坛*, 2019, 25(12): 956-959
- [28] 徐艳霞,倪佳,陈建丽,等. 贵阳地区儿童重症监护室肺炎克雷伯菌耐药基因及同源性研究 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2019(22): 1711-1712-1713-1714
- [29] 蒋宁,谭冬梅,刘光武,等. 玉林市婴幼儿腹泻感染非伤寒沙门菌分子分型和耐药情况分析[J]. *职业与健康*, 2020, 36(04): 470-473
- [30] 彭淑萍,李柏生,许桂锋,等. 2018-2019 年茂名市水产品中创伤弧菌的分子特征和耐药性分析[J]. *现代预防医学*, 2020, 47(09): 1703-1707