

[19] Roberts WL,Safar-Pour S,De BK,et al. Effects of hemoglobin C and S traits on glyhemoglobin measurements by eleven methods [J]. Clin Chem,2005,51(4):776-778.

[20] Bry L,Chen PC,Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glyhemoglobin[J]. Clin Chem,2001,47(2):153-163.

[21] 梁劲松,李生. 化学发光法检测糖化血红蛋白的实验评价[J]. 江西医学检验,2003,21(6):503.

[22] 贺岩,罗梅. 金标法测定糖化血红蛋白的方法学比较[J]. 中国医疗前沿,2007,2(13):101-102.

[23] 王冬环,张传宝,陈文祥,等. 应重视糖化血红蛋白测定技术及量值溯源[J]. 中华检验医学杂志,2008,3(9):965-968.

[24] 肖弘,王敏,李小盛. 酶化学法测定糖化血红蛋白性能的验证[J]. 检验医学与临床,2011,8(12):1450-1454.

[25] Panteghini M,John WG. Implementation of haemoglobin A1c results traceable to the IFCC reference system;the way forward[J]. Clin Chem Lab Med,2007,45(8):942-944.

[26] Hoelzel W,Weykamp C,Jeppsson JO,et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden;a method-comparison study[J]. Clin Chem,2004,50(1):166-174.

[27] Weykamp C,John WG,Mosca A,et al. The IFCC reference measurement system for HbA1c: a 6-years progress report [J]. Clin Chem,2008,54(2):240-248.

(收稿日期:2011-12-25)

嗜麦芽窄食单胞菌的耐药机制研究进展*

吴春燕¹综述,赵擎宇²审校

(中山大学:1. 中山医学院;2. 肿瘤防治中心,广州 510060)

关键词:嗜麦芽窄食单胞菌; 耐药机制; 医院感染
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 08. 030 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)08-0956-03

嗜麦芽窄食单胞菌(Sm)广泛存在于自然界,存在于各类液体、塑料物质表面和患者的体表,也是医院中常见的条件致病菌,在侵入操作和患者免疫力下降后极易引起下呼吸道感染、心内膜炎、脑膜炎、皮肤组织感染、尿道感染等,随着抗生素的广泛应用,Sm 成为具有易感因素患者院内感染的重要致病菌之一^[1-2]。Sm 的耐药机制极为复杂,针对 Sm 感染的复杂性,检验工作者应予足够的重视。

1 Sm 的生物学性状

在自然界中 Sm 生长在土壤、水、植物和动物身上,1958 年首先从口腔肿瘤患者咽拭子中分离发现,被命名为嗜麦芽假单胞菌,1981 年曾被划归属于黄单胞属;但 1993 年有学者将其从黄单胞属划为另一新菌属,被命名为嗜麦芽窄食单胞菌^[2-3]。Sm 是专性需氧的革兰阴性杆菌,有芽孢,有丛鞭毛,血平板培养物有很强的氨味,呈 β 溶血;在琼脂平板上,菌落呈针尖状,无色或灰黄色,中央凸起。该菌能产生硝酸盐还原酶、赖氨酸脱羧酶和降解脂肪的酶类。Sm 营养谱有限,对葡萄糖只能缓慢利用,但能快速分解麦芽糖而产酸。以 16S rRNA 测序可以从自然界和临床分离获得的 Sm 分为 3 个种群,包括以 K279a 为代表的 A 群,以 N531 为代表的 B 群,以 675a 为代表的 C 群^[4]。临床分离株主要是具有高度同源性的 A 群和具有更多异质性的 B 群。

Sm 的毒性不强,有一些菌株甚至被应用于生物技术,如生物去污、生物降解以及生物防治^[5]。而该菌致病性与其产生的酶类和黏附能力有关^[1]。酶类(包括蛋白酶、脂肪酶、弹性蛋白酶等)能引起局部组织损伤以及出血;菌毛使菌体具有强大的黏附能力,能黏附在塑料物质表面以及上皮细胞,增加感染的概率;菌体的生物膜能抵抗吞噬作用和耐受抗生素。这些致病作用与可扩散的信号因子(DSF)有关。

2 嗜麦芽窄食单胞菌的耐药机制

2.1 膜屏障 Sm 具有天然的低渗透性外膜,对很多抗生素有天然耐药性。生物膜使 Sm 拥有动力特征,经过 2 h 的体外孵育,菌落能快速黏附聚苯乙烯。有研究指出,Sm 的膜孔蛋白直径与大肠杆菌的一样,但由于膜孔蛋白拷贝数少,其通透性只有大肠杆菌的 3%~5%;加上受到抗生素的刺激后,菌体还可以通过改变膜孔蛋白的结构或者减少打开的数量使通透性进一步降低,产生获得性耐药^[6]。

生物膜的调节机制具有多样性。氨基糖苷类抗生素温度依赖的耐药性与外膜上面脂多糖的 O 侧链改变或者脂多糖的磷酸含量降低有关;而外膜上的微孔蛋白常有丢失或基因突变造成的缺失与对碳青霉烯类的天然耐药有关^[6]。金属阳离子 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 等对细胞膜有稳定作用而增强其耐药性,而金属螯合剂 EDTA 或者枸橼酸盐等能破坏细菌外膜中的金属阳离子从而扭转耐药性。

2.2 抑制抗生素活性的各种酶类

2.2.1 β-内酰胺酶 Sm 对 β-内酰胺类药物的耐药机制主要是表达 β-内酰胺酶,Sm 至少产生 2 种 β-内酰胺酶,即 L1 和 L2 型金属 β-内酰胺酶(简称 L1 和 L2)。L1 是四聚体,相对分子质量是 118×10³,具有 2 个 Zn²⁺ 活性位点,能水解青霉素类、头孢菌素、β-内酰胺酶抑制剂和大多数碳青霉烯类;L2 是二聚体,相对分子质量是 57×10³,具有丝氨酸的活性位点,主要水解头孢菌素和单环类抗生素^[7]。β-内酰胺酶属于染色体酶,其中 L1 有 5 个基因型,L2 有 4 个基因型,另外有研究者发现了携带编码 L2 基因的质粒^[8]。β-内酰胺酶基础表达量低的菌群对 β-内酰胺类抗生素的敏感性是最高的,而 β-内酰胺类抗生素的选择压力能使 L1 和 L2 基因快速进化^[7-8]。

β-内酰胺酶调控因子 AmpR 的激活对于 L1、L2 的诱导和

* 基金项目:中山大学医教科研基金资助项目(医教 2011-41 号)。

过度表达有非常重要的作用,尤其在没有任何诱导剂的情况下。Okazaki 和 Avison^[9]用临床最典型的分离株分析 blaL1 和 blaL2 的上游基因序列,发现在 blaL2 上游的一个开放阅读框可能编码一个传统的 AmpR 型 β -内酰胺酶调控因子。用亚胺培南诱导后菌体的 ampR 基因在 405 位的鸟嘌呤变成腺嘌呤,使 AmpR135 位上的天冬氨酸突变成天冬酰胺酸, AmpR 因而激活,上调 L1、L2 的表达。

L1 和 L2 的调控机制是否协同目前没有统一说法。一方面, L1 和 L2 都可以通过 β -内酰胺类抗生素的诱导产生,表示两种酶的产生有一个共同的调控系统;另一方面,一部分突变株是有高水平的 L1 或 L2 的表达量而另外的 L2 或 L1 则是可以被诱导产生,表示 L1 和 L2 的表达分别有一个调控系统^[9]。有研究者用头孢西丁诱导产生耐药的菌株,再用美罗培南作为 L1 特异性底物,用头孢他啶作为 L2 特异性底物测试耐药菌 L1 和 L2 的活性,同时测量 L1 和 L2 的转录水平, Sm 株被分为 3 群: A 群有高水平 L1 基础表达量, L2 可以被诱导大量产生; B 群有高水平 L2 基础表达量, L1 可以被诱导大量产生; C 群则是有高水平 L1 和 L2 的基础表达量。分析 A 群和 B 群的突变频率是 10^{-7} , 提示了 L1、L2 的表达不完全协同, 但是 C 群的突变频率是 10^{-9} , 提示 L1、L2 的表达调控机制中有重叠部分^[8]。

2.2.2 氨基糖苷类钝化酶 氨基糖苷类钝化酶主要是氨基糖苷类修饰酶、N-乙酰转移酶和 O-核苷转移酶。有研究发现 Sm 染色体上存在 aac(6')-I z 基因, 并证实其编码的乙酰转移酶能将氨基糖苷类抗生素的游离氨基乙酰化从而降低菌株对西索米星、青霉素和妥布霉素的敏感性^[10]。

其他氨基糖苷类钝化酶还可以使游离羟基磷酸化、核苷化从而降低抗生素的活性。有实验还发现氨基糖苷类的磷酸转移酶可以提高 Sm 对卡那霉素、青霉素和巴龙霉素最低抑菌浓度(MIC)。当编码磷酸转移酶 APH(3')-II c 的基因表达受到干扰时, 这些药物的 MIC 下降, 可见 aph(3')-II c 在磷酸转移酶表达中的重要作用, aph(3')-II c 在不同种群中有异质性^[3]。

实际上, Sm 对氨基糖苷类的耐药机制包括天然与获得性的机制, 除钝化酶外, 还有温度依赖的外膜通透性变化, 多药外排泵以及受体结构的改变等。

2.3 外排泵 多药外排系统是 Sm 天然多重耐药的最重要机制, 可以使该菌耐受几乎所有类型的抗生素。已被发现的外排系统主要包括 SmeABC、SmeDEF、SmeJKL 和 SmeYZ 等^[11]。

2.3.1 SmeDEF 外排泵 SmeDEF 由融合蛋白 SmeD、内膜蛋白 SmeE 和外膜蛋白 SmeF 组成。SmeDEF 基因分为 3 个开放阅读框: SmeD 基因长 1 184 bp, 编码细胞周质连接蛋白或融合蛋白; 属于耐药节结化细胞分化家族序列的 SmeE 基因长 3 122 bp, 编码内膜蛋白; 序列异质性较大的 SmeF 基因长 1 400 bp, 编码外膜蛋白^[11]。

SmeDEF 基因的表达主要受 SmeT 转录抑制蛋白的调控, 另外, 位于 SmeD 上游的启动子和 IS 分子的嵌入也能影响其表达。SmeT 功能失活的突变或者任何阻碍 SmeT 抑制蛋白与 SmeD 基因连接的突变都会导致 SmeDEF 基因的过度表达, 使 Sm 产生耐药性。SmeT 基因位于其调控的 SmeDEF 基因的互补 DNA 上游, 其长度比其他家族成员短, 但是在末端有扩展的序列^[12]。转录抑制蛋白 SmeT 属于 TetR 家族, 该家族的成员在 N 末端和 C 末端都有标志性的螺旋-转角-螺旋 DNA 结合框架, 与 SmeDFE 启动子区域的连接, 通过占位性的干扰影响 RNA 聚合酶活性从而抑制 SmeDEF 基因的转录^[11-12]。

针对 SmeDEF 的调控机制, 有学者建议从 SmeT 效应器入手调控 SmeDEF 的表达^[12]。三氯生作为效应器与 SmeT 相结合, 上调 SmeDEF 基因表达的机制包括修改 SmeT 的荧光光谱, 与 SmeT 形成稳定的复合物, SmeT 从原来的 DNA-SmeT 复合物上面脱离, 并使 SmeDEF 的负性调控减少, 从而提高 SmeDEF 的转录产物。因此三氯生对 Sm 的灭菌作用具有两面性, 表现在三氯生或抗生素单独使用能抑制细菌的生长繁殖, 但两者共同使用时, 能使细菌大量繁殖而其中大部分是耐药菌^[13]。

不同菌群的外排泵表达效应不一样。有研究者在其诱导突变株 D457 的过程中发现, SmeT 的过度表达会使上升的 SmeDEF 产物逐渐下降, 相反, SmeT 活性降低导致 SmeDEF 的过度表达, 从而诱导出 D457R 耐药菌株。有趣的是, 同样是 SmeT 的活性降低, 在 ULA-511 菌株中只是稍微提高了小部分抗生素的 MIC。通过对 16S rRNA 的分析, 发现 D457 菌株属于 B 群而 ULA-511 菌株属于 A 群。A 群菌株中的 SmeDEF 过度表达会诱导 SmeT 基因发生突变、激活使 SmeT 的表达上升, 对 A 群菌株耐药性调节有负反馈作用, 导致其耐药表型不一致^[4]。

2.3.2 SmeABC 以前有学者认为 SmeA 和 SmeB 不大可能出现在临床耐药株中, 而外膜上的 SmeC 会通过一个不知名的外排泵相互作用在临床耐药中起一定的作用, 但 SmeABC 的过度表达可以增强 Sm 对 β -内酰胺酶类、氨基糖苷类和部分喹诺酮类抗生素的耐药性^[14-15]。

2.4 Qnr 决定簇与喹诺酮耐药 Sm 对喹诺酮的耐药性主要与 SmQnr 和 SmtcrA 有关。Sanchez 等^[7]首次报道染色体编码的 SmQnr 能诱导喹诺酮作用的旋转酶和拓扑异构酶 IV 突变从而使菌体耐受药物。通过研究基因修饰产生的耐药株, 发现 SmQnr 有以下规律: 质粒编码的 SmQnr 含量是高水平的, 而且比染色体编码的高且不受菌体染色体上是否有 SmQnr 基因存在的影响; SmQnr 的表达水平可以通过抗生素的选择压力上调^[16]。

SmQnrR 是 Smqnr 和 SmtcrA 连续基因的抑制子, SmQnrR 对 SmQnr-SmtcrA 操纵子表达有负性调控作用, SmqnrR 的失活使喹诺酮和四环素的 MIC 上升^[17]。

2.5 I 类整合子与基因转移 整合子能使耐药基因在不同的细菌间高效快速传播, 这种机制在临床革兰阴性菌中广泛存在。临床分离 Sm 的基因分析和药敏试验, 发现 I 类整合子的阳性率是 13.33%^[18]。已经有实验证实复方新诺明的耐药性是由 sul 基因编码或者通过基因漂移获得^[19]。整合子-基因盒系统的可移动基因元件能获得和整合其他细菌的耐药基因, 提高了控制 Sm 感染的难度。

3 Sm 的耐药趋势

作为多重耐药菌, Sm 对 β -内酰胺酶类和氨基糖苷类抗生素天然耐药, 同时对 β -内酰胺酶抑制剂、喹诺酮类、四环素类、大环内酯类都有一定的耐药性。从时间上看, Sm 的耐药性呈上升趋势, 李胜岐和曲丹^[20]对 2001~2006 年检出 158 株 Sm 的分析显示该菌对磺胺类(复方磺胺甲噁唑)和喹诺酮类(左氧氟沙星和环丙沙星)的耐药率较低, 对青霉素类(氨苄西林)、头孢菌素类(头孢克洛)和四环素几乎完全耐药。张志明和孙海英^[21]对 2006~2008 年 45 株单胞菌的分析显示, 对 3 种喹诺酮以及复方新诺明的耐药率较低但已有轻度上升。从不同地区看, Sm 的耐药性具有一定的差异, 李冬和王爽^[22]的耐药性分析显示, 2005~2008 年 Sm 对庆大霉素头的耐药率在 70%

以上,而 β -内酰胺酶抑制剂头孢哌酮/舒巴坦和哌拉西林/他唑巴坦的耐药率远远高于同时期其他研究者的报道。

4 Sm 临床感染的防治

作为条件致病菌,Sm 已成为医院感染常见病原菌而受到重视,治疗难点在于其多重耐药机制。Sm 毒性不强,在治疗原发病时往往被忽视,滥用广谱抗生素能使由创性开口侵入的菌株被诱导出强大的耐药性,导致预后不良。另外,有高龄、患有严重基础疾病、免疫缺陷、长期留住 ICU 等高危因素的患者极易并发包括 Sm 在内的多重感染,给治疗带来困难^[23]。针对 Sm 感染的复杂性,应合理使用抗生素和重视医护工作中的无菌操作。

目前复方新诺明仍然是治疗 Sm 感染的最有效药物。虽然过敏反应、逐渐上升的耐药性以及个体差异导致的药物耐受性差,使其临床使用受到限制^[24]。有争议但值得一提的是,有报道表明脱敏后继续用复方新诺明仍能取得良好疗效^[25]。当复方新诺明耐药或者过敏时,可使用喹诺酮或带 β -内酰胺酶抑制剂的 β -内酰胺类抗生素,尤其对于分泌 L2 的菌株效果更佳。还有方案推荐使用环丙沙星、头孢他啶、替加西林/克拉维酸等单用或者与其他抗生素联合使用,也是很好的治疗方案。

总之,针对 Sm 的感染,目前仍缺乏特异的抗生素指导用药,也缺乏标准化的敏感试验,以及在每一种抗生素使用过程中的临床指征。为了有效预防感染,应当定期针对高危患者进行细菌筛检,并且根据鉴别诊断指导临床用药^[26]。

参考文献

- [1] Nyser O, Matějková J. *Stenotrophomonas maltophilia* significant contemporary hospital pathogen review [J]. *Folia Microbiol*, 2010, 3(55): 286-294.
- [2] Looney WJ. *Stenotrophomonas maltophilia* in hospital-acquired infection[J]. *Br J Biomed Sci*, 2005, 3(62): 145-154.
- [3] Okazaki A, Avison MB. Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(1): 359-360.
- [4] Gould VC, Avison MB. SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships. [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57(6): 1070-1076.
- [5] Savini V, Catavittello C, Aloisio M, et al. Chloramphenicol and rifampin may be the only options against *Stenotrophomonas maltophilia*. A tale of a colonized bladder device in a patient with myelofibrosis[J]. *Infez Med*, 2010, 18(3): 193-197.
- [6] 陈群, 方小龙. 嗜麦芽窄食单胞菌的耐药机制研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(1): 49-51.
- [7] Sanchez MB, Hernandez A, Martinez JL. *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance [J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(6): 655-660.
- [8] Gould VC, Okazaki A, Avison MB. β -Lactam resistance and β -lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having defined phylogenetic relationships [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57(2): 199-203.
- [9] Okazaki A, Avison MB. Induction of L1 and L2 beta-lactamase production in *Stenotrophomonas maltophilia* is dependent on an AmpR-type regulator [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(4): 1525-1528.

- [10] Li XZ, Zhang L, McKay GA. Role of the acetyltransferase AAC(6')-Izmodifying enzyme in aminoglycoside resistance in *S. maltophilia* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(4): 803-811.
- [11] Alonso JK, Morales A, Escalante G. Overexpression of the multi-drug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 53(3): 432-434.
- [12] Hernandez A, Mate MJ, Sanchez-Diaz PC. Structural and functional analysis of SmeT, the Repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(21): 14428-14438.
- [13] Ruiz FM, Martínez JL. The Binding of Triclosan to SmeT, the Repressor of the multidrug efflux pump Smedef, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(6): 1002-1011.
- [14] CrosSman LC, Gould VC, Dow JM. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organoSm heavily shielded by drug resistance determinants [J]. *Genome Biol*, 2008, 9(4): 74-79.
- [15] Li XZ, Zhang L, Poole K. SmeC, an outer membrane multi-drug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(2): 333-343.
- [16] Sanchez MB, Martinez JL. SmQnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(1): 580-581.
- [17] Chang YC, Tsai MJ, Huang YW. SmQnrR, a DeoR-type transcriptional regulator, negatively regulates the expression of Smqnr and SmtcrA in *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 5(66): 1024-1028.
- [18] 时东彦, 李仲兴, 赵建宏. 嗜麦芽窄食单胞菌 I 类整合子的分布及其耐药谱型 [J]. *中国感染控制杂志*, 2009, 8(1): 33-36.
- [19] Toleman MA, Bennet PM, Bennet DMC, 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.
- [20] 李胜岐, 曲丹. 某院 2001~2006 年嗜麦芽窄食单胞菌的临床分布及耐药性监测 [J]. *中国感染控制杂志*, 2009, 8(1): 51-52.
- [21] 张志明, 孙海英. 医院获得性嗜麦芽窄食单胞菌耐药性分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(6): 611-612.
- [22] 李冬, 王爽. 2005~2008 年嗜麦芽窄食单胞菌的耐药性变迁 [J]. *微生物学杂志*, 2010, 30(3): 93-95.
- [23] Paez JIG, Costa SF. Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review [J]. *J Hosp Infect*, 2008, 70(2): 101-108.
- [24] Falagas ME, Valkimadi PE, Huang YT, et al. Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(5): 889-894.
- [25] Yilmaz M, Celik AF, Mert A. Successfully treated nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia following desensitization to trimethoprim-sulfamethoxazole [J]. *J Infect Chemother*, 2007, 13(2): 122-123.
- [26] Nicodemo AC, Paez JI. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007, 26(4): 229-237.