

肺炎克雷伯菌质粒介导的喹诺酮类耐药基因的研究

姜梅杰 包健 孙树玲

【摘要】 目的 研究本地区质粒介导的喹诺酮类耐药基因 $aac(6')-Ib-cr$ 和 qnr 在肺炎克雷伯菌中的发生率及接合子对环丙沙星和左氧氟沙星不同耐药水平的发生机制。方法 筛选 2007 年 7 月~2008 年 12 月本院临床分离的产超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌共 57 株,采用 PCR 法检测 $qnrA$ 、 $qnrB$ 、 $qnrS$ 和 $aac(6')-Ib$ 阳性菌株并对部分菌株进行测序。以大肠埃希菌 J53 为受体菌,通过接合试验从 $aac(6')-Ib-cr$ 和(或) qnr 阳性菌株中获得接合子,采用 E-test 方法测定菌株的药敏情况。结果 所分离的 57 株肺炎克雷伯菌中 $aac(6')-Ib$ 基因阳性菌 12 株,经测序全部为 $aac(6')-Ib-cr$ 基因,阳性检出率为 21.1%; qnr 基因阳性菌 25 株(43.9%),其中 3 株(5.3%)含 $qnrA$ 基因,21 株(36.8%)含 $qnrB$ 基因,20 株(35.1%)含 $qnrS$ 基因; $aac(6')-Ib-cr$ 、 $qnrA$ 、 $qnrB$ 和 $qnrS$ 均阳性菌共 3 株(5.3%), $qnrB$ 和 $qnrS$ 均阳性菌共 13 株(22.8%)。本研究中共有 14 株菌株接合试验获得成功,环丙沙星和左氧氟沙星对接合子的最低抑菌浓度(MIC)范围分别为 0.25~0.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.25~1 $\mu\text{g/ml}$;接合子与受体菌的 MIC 值比较结果显示,环丙沙星耐药性提高了 31~63 倍,左氧氟沙星耐药性提高了 17~63 倍。结论 本地区产超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌质粒介导的喹诺酮类耐药基因 $aac(6')-Ib-cr$ 和 qnr 携带率很高,部分菌株的喹诺酮类抗菌药物 MIC 值升高与喹诺酮类耐药基因 $aac(6')-Ib-cr$ 和(或) qnr 有关。

【关键词】 肺炎克雷伯菌;喹诺酮类;耐药; $aac(6')-Ib-cr$ 基因; qnr 基因

***Klebsiella pneumoniae* plasmid-mediated quinolone resistance gene** JIANG Mei-jie, BAO Jian, SUN Shu-ling. Central Hospital of Tai'an, Tai'an 271000, China
Corresponding author: JIANG Mei-jie, Email: xtingw@126.com

【Abstract】 Objective To observe the incidence of plasmid-mediated quinolone resistance gene $aac(6')-Ib-cr$ and qnr in *Klebsiella pneumoniae* and to study on the mechanism of integron mediated different resistance levels to ciprofloxacin and levofloxacin. **Methods** Total of 57 strains of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum β -lactam enzyme were selected from our hospital during July 2007 to December 2008. The $qnrA$, $qnrB$, $qnrS$ and $aac(6')-Ib$ -positive strains were detected by PCR and some of the strains were sequenced. Zygote were obtained from $aac(6')-Ib-cr$ and (or) qnr positive strains by conjugation test, with *Escherichia coli* J53 as the recipient strain. Susceptibility of strains were determined by E-test method. **Results** Among the 57 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 12 strains were $aac(6')-Ib$ gene positive which accounted for 21.1% and were all $aac(6')-Ib-cr$ gene detected by sequence analysis. There were 25 strains with qnr gene positive which accounted for 43.9%, 3 strains of which contained $qnrA$ gene (5.3%), 21 strains contained $qnrB$ gene (36.8%), 20 strains contained $qnrS$ gene (35.1%). Total of 3 strains (5.3%) were detected containing $aac(6')-Ib-cr$, $qnrA$, $qnrB$ and $qnrS$, 13 strains (22.8%) were both $qnrB$ and $qnrS$ positive. Conjugation test were successful in 14 strains. The transconjugant showed 31-63 fold and 17-63 fold increased in the MICs of ciprofloxacin and levofloxacin, respectively, compared with the recipient. **Conclusions** There were high carrier rate of plasmid mediated quinolone resistance gene $aac(6')-Ib-cr$ and qnr of producing extended spectrum β -lactam enzyme *Klebsiella pneumoniae* in this region. The quinolone resistance gene $aac(6')-Ib-cr$ and (or) qnr may contribute to the increased MICs of quinolone antibacterial drugs in some strains.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.06.018

基金项目:泰安市科技局引导计划课题(No. 20113066)

作者单位:271000 泰安市,山东省泰安市中心医院检验科(姜梅杰);莱钢集团莱芜矿业有限公司医院外科(包健);莱钢集团有限公司医院(孙树玲)

通讯作者:姜梅杰,Email: xtingw@126.com

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; Quinolones; Resistance; *Aac(6')-Ib-cr* gene; *Qnr* gene

随着喹诺酮类抗菌药物的广泛应用,肺炎克雷伯菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药率逐年升高,已有报道细菌对喹诺酮类抗菌药物耐药是由染色体所介导,因靶位改变及主动外排所致^[1],但近年来发现喹诺酮类的耐药性也可由质粒介导^[2-3]。质粒介导的喹诺酮类耐药基因 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qnr* 与所有染色体介导的耐药基因不同^[4],质粒介导的喹诺酮类抗菌药物的耐药性引起了广泛重视。*aac(6')-Ib-cr* 是一种氨基糖苷乙酰转移酶变异基因,已有报道显示其编码的蛋白能够修饰环丙沙星使环丙沙星抗菌活性下降^[5]。本研究对 57 株产超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌进行 *aac(6')-Ib* 和 *qnr* 基因检测,以探讨 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qnr* 基因在喹诺酮类抗菌药物耐药性形成过程中的作用。

资料与方法

一、菌株来源

本研究筛选出的 57 株产超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌为 2007 年 7 月~2008 年 12 月分离自本院收集的临床病例标本。阴性质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922,接合试验受体菌为大肠埃希菌 J53,由北京协和医院微生物室杨启文大夫惠赠。

二、培养基与试剂

血琼脂培养基、MH 琼脂培养基为英国 Oxoid 公司产品。PCR 检测试剂 *Taq* 酶、Buffer、dNTP 及相关材料均为宝生物工程(大连)有限公司产品;引物由该公司合成,E-test 条为瑞典 AB Biodisk 公司产品。

三、抗菌药物

本研究选取的常用抗菌药物有环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁和亚胺培南。

四、耐药基因的检测及测序

耐药基因检测均采用 PCR 法,引物设计参照文献^[6-7]。所有 *aac(6')-Ib* 阳性基因和部分 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS* 阳性基因 PCR 产物由上海桑尼公司进行测序,测序结果于 GenBank 查询。

五、质粒接合试验

参照文献所报道方法^[8],采用大肠埃希菌 J53 为受体株,临床分离株为供体菌,选择含 150 $\mu\text{g/ml}$ 叠氮钠和头孢噻肟(8 $\mu\text{g/ml}$) MH 琼脂平板上进行筛选。筛选琼脂平板上生长的菌落同时接种含与不含环丙沙星(0.06 $\mu\text{g/ml}$)的 MH 琼脂上,观察喹诺酮类耐药性是否同时转移。

六、药敏试验

对接合试验获得成功的含 *aac(6')-Ib-cr* 和(或) *qnr* 基因的肺炎克雷伯菌及接合子,采用 E-test 法测定环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁和亚胺培南的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

结果

一、*qnr* 基因的检测结果

所分离的 57 株肺炎克雷伯菌中,检出 *qnr* 基因菌株共 25 株(43.9%),其中 3 株(5.3%)含 *qnrA* 基因(图 1),21 株(36.8%)含 *qnrB* 基因(图 2),20 株(35.1%)含 *qnrS* 基因(图 3);*qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS* 同时阳性的菌株共 3 株(5.3%);*qnrB* 和 *qnrS* 同时阳性的菌株共 13 株(22.8%);只含 *qnrB* 基因菌 5 株,只含 *qnrS* 基因菌 4 株。分别取 3 株 *qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS* 基因阳性的菌株进行测序,测序结果分别为 *qnrA1*、*qnrB4* 和 *qnrS1* 基因。

二、*aac(6')-Ib-cr* 基因的检测结果

57 株肺炎克雷伯菌中,有 12 株 *aac(6')-Ib* 基因阳性(图 4),经测序全部为 *aac(6')-Ib-cr* 基因,阳性检出率为 21.1%。*qnr* 和 *aac(6')-Ib-cr* 基因同时阳性菌共 12 株,其中 3 株同时含 *aac(6')-Ib-cr*、*qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS* 基因,9 株同时含 *aac(6')-Ib-cr*、*qnrB* 和 *qnrS* 基因。所有 *aac(6')-Ib-cr* 阳性菌株均含 *qnr* 基因,*aac(6')-Ib-cr*、*qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS* 阳性检出率,见表 1。

表 1 57 株分离菌中 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS* 和 *aac(6')-Ib-cr* 基因阳性检出率 [株(%)]

基因	阳性检出率
<i>qnrB</i>	5(8.8)
<i>qnrS</i>	4(7.0)
<i>qnrB</i> + <i>qnrS</i>	4(7.0)
<i>qnrA</i> + <i>qnrB</i> + <i>qnrS</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	3(5.3)
<i>aac(6')-Ib-cr</i> + <i>qnrB</i> + <i>qnrS</i>	9(15.8)

三、质粒接合试验结果

25 株含 *qnr* 基因的肺炎克雷伯菌中有 14 株接合成功,14 株接合成功的供体菌、受体菌和接合子采用 E-test 法测定对左氧氟沙星等药物的 MIC 值,见表 2。

表2 常见抗菌药物对供体菌、受体菌和接合子的 MIC 值($\mu\text{g/ml}$)

菌株	抗菌药物								
	环丙沙星	左氧氟沙星	头孢噻肟	头孢他啶	头孢吡肟	头孢西丁	阿米卡星	庆大霉素	亚胺培南
K09	> 32	16	> 256	64	32	6	1024	> 1024	0.500
J53K09	0.500	0.250	128	32	16	2	64	256	0.125
K19	0.500	1	> 256	> 256	32	> 256	1024	> 1024	0.250
J53K19	0.250	0.500	128	8	16	3	256	1024	0.125
K35	> 32	> 32	64	2	2	4	128	256	0.125
J53K35	0.500	0.250	32	1	1	2	32	128	0.125
K46	24	8	64	128	2	256	64	256	0.500
J53K46	0.500	0.250	16	32	0.500	32	32	256	0.250
K82	> 32	> 32	> 256	> 256	24	> 256	256	1024	0.125
J53K82	0.500	0.250	128	24	4	64	64	512	0.125
K88	0.500	0.750	> 256	256	128	> 256	4	6	2
J53K88	0.250	0.500	192	48	32	64	2	2	1
K93	> 32	> 32	> 256	128	64	> 256	32	128	0.500
J53K93	0.500	0.25	64	4	1	6	8	64	0.250
K102	> 32	32	> 256	2	2	4	6	256	0.125
J53K102	0.500	0.250	128	1	0.5	3	4	64	0.125
K141	0.750	1.500	> 256	32	16	6	4	64	0.500
J53K141	0.380	0.750	64	8	2	4	2	16	0.125
K152	0.500	1	> 256	64	32	> 256	64	128	0.500
J53K152	0.380	0.750	128	16	8	4	4	32	0.125
K163	0.500	1	> 256	32	24	> 256	512	1024	0.250
J53K163	0.250	0.500	128	16	16	3	256	512	0.125
K184	> 32	24	> 256	> 256	128	> 256	256	512	0.500
J53K184	0.380	0.750	192	3	2	4	4	24	0.125
K186	0.500	1	> 256	> 256	> 256	> 256	512	1024	0.125
J53K186	0.250	0.500	32	1	1	4	4	12	0.125
K195	> 32	> 32	128	64	1	> 256	4	64	0.250
J53K195	0.500	1	64	4	0.380	6	4	16	0.125
J53	0.008	0.016	0.032	0.250	0.016	2	0.500	0.500	0.125

讨 论

肺炎克雷伯菌为本院最常见的病原菌之一。本院耐药监测结果显示,近年来肺炎克雷伯菌检出率一直居于前4位,且产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌阳性率一直较高。由于本院产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的ESBLs基因以CTX-M型为主^[9],且产ESBLs肺炎克雷伯菌对左氧氟沙星和环丙沙星的耐药率很高,故本研究筛选57株对头孢噻肟耐药产超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌进行aac(6')-Ib-cr和qnr基因的研究。qnr和 β -内酰胺酶

的相关性已有报道^[10],因此,本研究对耐头孢噻肟产超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌进行质粒介导的喹诺酮类抗菌药物的研究。

本研究所筛选的肺炎克雷伯菌中,qnr和aac(6')-Ib-cr基因阳性率分别为43.9%(25/57)和21.1%(12/57),57株肺炎克雷伯菌中,含qnrA基因菌3株,含qnrB基因菌21株,含qnrS基因菌20株;同时含qnr和aac(6')-Ib-cr基因菌12株。由于不同地区用药情况不同,肺炎克雷伯菌产超广谱 β -内酰胺酶阳性率和质粒介导的喹诺酮类耐药基因qnr和aac(6')-Ib-cr阳性率可能存在一定的差异。

本研究检测了14株接合试验获得成功的肺炎克雷伯菌含 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS* 和 *aac(6')-Ib-cr* 基因的情况以及14株接合试验获得成功的供体菌、接合子和受体菌的MIC值,结果显示接合子与受体菌相比,环丙沙星和左氧氟沙星的耐药性分别提高了31~63倍和17~63倍。本研究中仅含 *qnr* 基因的肺炎克雷伯菌经接合试验后获得8个接合子,环丙沙星对接合子的MIC范围为0.25~0.5 $\mu\text{g/ml}$,左氧氟沙星对接合子的MIC范围为0.5~1 $\mu\text{g/ml}$,环丙沙星和左氧氟沙星的耐药性提高倍数基本相同。同时含 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qnr* 基因的肺炎克雷伯菌经接合试验后获得6个接合子,左氧氟沙星对接合子的MIC值均为0.25 $\mu\text{g/ml}$;环丙沙星对接合子的MIC值均为0.5 $\mu\text{g/ml}$,接合子与受体菌相比,环丙沙星耐药性提高倍数高于左氧氟沙星。

已有研究显示,*aac(6')-Ib-cr* 酶可导致氨基糖苷类和喹诺酮类药物失活,*aac(6')-Ib-cr* 通过对哌嗪环上氨基氮原子的乙酰化作用使环丙沙星失活而导致环丙沙星的MIC升高,*aac(6')-Ib-cr* 对左氧氟沙星和莫西沙星等喹诺酮类药物并不起作用^[8]。有报道显示,*aac(6')-Ib-cr* 基因的存在与环丙沙星是否耐药无关,环丙沙星耐药株和敏感株具有相似的阳性率^[5]。本研究12株 *aac(6')-Ib-cr* 基因阳性的肺炎克雷伯菌对环丙沙星均耐药,但含 *aac(6')-Ib-cr* 基因对环丙沙星耐药的肺炎克雷伯菌,同时对左氧氟沙星也耐药,提示 *aac(6')-Ib-cr* 基因的存在可能与环丙沙星的耐药无关。只含 *qnr* 基因的13株肺炎克雷伯菌中31% (4/13) 对环丙沙星耐药,显著低于环丙沙星敏感株。提示 *qnr* 基因可能仅引起喹诺酮类抗菌药物低水平耐药。

综上所述,对肺炎克雷伯菌质粒介导的喹诺酮类耐药基因研究发现,本地区肺炎克雷伯菌中质粒

介导的喹诺酮类耐药基因 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qnr* 携带率较高,应引起足够的重视,同时,应加强预防和控制细菌的耐药性传播,控制喹诺酮类药物在农业及畜牧渔业等方面的应用,从而预防细菌耐药的产生。

参 考 文 献

- 1 Chen FJ, Lo HJ. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J Microbiol Immunol Infect*,2003,36(1):1-9.
- 2 Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*,1998,351(9105):797-799.
- 3 李红,宋诗铎,王玉宝,等. 肠杆菌科临床株质粒介导的喹诺酮类耐药机制的研究. *中华检验医学杂志*,2007,30(11):1257-1259.
- 4 Hran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99(8):5638-5642.
- 5 Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*,2006,12(1):83-88.
- 6 杨虹,王辉,彭黎明,等. 中国九家教学医院肠杆菌科细菌质粒介导的喹诺酮耐药机制研究. *中华检验医学杂志*,2008,31(9):969-974.
- 7 Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, et al. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*,2006,50(11):3953-3955.
- 8 Wang M, Tran JH, Jacoby GA, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*,2003,47(7):2242-2248.
- 9 姜梅杰,冯莉,赵书平,等. 产ESBLs与质粒AmpC酶肺炎克雷伯菌的耐药性及基因型研究. *中华医院感染学杂志*,2008,18(8):1061-1065.
- 10 Robicsek A, Strahilevitz J, Sahn DF, et al. Qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*,2006,50(8):2872-2874.

(收稿日期:2012-08-28)

(本文编辑:孙荣华)

姜梅杰,包健,孙树玲. 肺炎克雷伯菌质粒介导的喹诺酮类耐药基因的研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2012,6(6):594-597.