

• 论 著 •

质粒介导的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐喹诺酮类药物的研究

孙康德,冯志磊,虞中敏,唐毅,陈福祥

(上海交通大学医学院附属第九人民医院检验科 200011)

摘要:目的 研究质粒介导的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的流行情况及其对喹诺酮类药物耐药的作用。方法 采用聚合酶链反应(PCR)对大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的 qnr 基因进行筛选,用实验证明 qnr 基因可以通过质粒介导并在细菌之间传递。结果 在 145 株大肠埃希菌和 125 株肺炎克雷伯菌中共检出 16 株细菌携带 qnr 基因,其中 12 株为大肠埃希菌,4 株肺炎克雷伯菌。16 株 qnr 基因阳性菌株均为产超广谱内酰胺酶(ESBLs)菌株且呈多重耐药性。结论 共检出 16 株细菌携带 qnr 基因,其阳性率为 5.9%,大肠埃希菌阳性率高于肺炎克雷伯菌。qnr 基因可以通过质粒介导,从供体菌接合转移至受体菌,且 qnr 在接合子中较稳定。

关键词:肠致病性大肠杆菌; 克雷伯菌,肺炎; 喹诺酮类; 基因; 接合试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)06-0635-03

Study on plasmid-mediated quinolone resistance mechanism of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Sun Dekang, Feng Zhilei, Yu Zhongmin, Tang yi, Chen Fuxiang

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

Abstract: **Objective** To study the prevalence and the important role of recently discovered plasmid-mediated quinolone resistance in the development of quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** The qnr genes were screened by PCR in clinical isolates of 145 strains of *Escherichia coli* and 125 strains of *Klebsiella pneumoniae*. The qnr genes were transferred between bacteria by plasmid-mediated, which was testified by conjugation test. **Results** Of 145 strains of *Escherichia coli* and 125 strains of *Klebsiella pneumoniae*, the qnr genes were detected in 16 isolates, which including 12 strains of *Escherichia coli* and 4 strains of *Klebsiella pneumoniae*. 16 strains with qnr gene were ESBLs producing and multidrug-resistance. **Conclusion** There were 16 strains with qnr gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, and its positive rate was 5.9%. The positive rate in *Escherichia coli* was higher than that of *Klebsiella pneumoniae*. The qnr genes were transferred from donor bacterium to receptor bacterium by plasmid-mediated, and qnr genes could be kept stable in conjugation bacterium.

Key words: enteropathogenic *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; quinolones; genes; conjugation test

氟喹诺酮类药物为广谱全合成抗生素,广泛用于各种感染性疾病的治疗。近年来细菌对氟喹诺酮类药物的耐药呈上升趋势,耐药菌谱也日益扩大,严重影响其疗效和临床应用^[1]。细菌对氟喹诺酮类药物的耐药性主要是细菌染色体基因突变,其不具有水平传播性。迄今为止,只有美国、中国和韩国等少数国家发现该基因,且局限在大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌等中^[2-4]。本研究通过临床分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌进行 qnr(quinolone resistance)基因筛查,以了解质粒介导耐药在喹诺酮类耐药性形成的作用及传播机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 145 株大肠埃希菌和 125 株肺炎克雷伯菌来自 2006 年 1 月至 2008 年 1 月上海 4 家教学医院临床住院患者标本分离的菌株,所有细菌均选择患者的初次分离株,均为环丙沙星耐药株,主要来自痰液、尿液、分泌物、血液、脓液等标本。质控菌株(大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603)购自上海市临床检验中心。qnr 基因阳性对照菌株 E12 和受体菌 *E. coli* J53 均由上海华山医院抗生素研究所惠赠。

1.2 仪器与试剂 血琼脂平板、中国蓝平板、巧克力平板(购自上海市临床检验中心)。LB 液体培养基、TSA 培养基、琼脂稀释法含抗菌药物琼脂平皿(自配),抗生素纸片头孢他啶、头孢噻肟、头孢他啶+棒酸、头孢噻肟+棒酸(英国 OXOID 公

司),仪器鉴定系统为法国生物梅里埃 VITEK 全自动细菌鉴定仪。SK2072 PCR 扩增试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)、T3 Thermocycler PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司)、Tanon 2500 凝胶成像系统(天能科技上海有限公司)。

1.3 引物序列 据美国国立生物信息中心(NCBI)已发布的 qnr 基因序列及相关参考文献[5]设计引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司负责合成。P1(F):5'-GGC CAT GGA TAT TAT TGA TAA-3'; P2(R):5'-GGA TCC GGG CAG CAC TAT TAC TCC-3'(661 bp)。

1.4 鉴定方法与药敏判定 采用全自动细菌鉴定仪 VITEK 系统对感染的细菌作鉴定及用药敏卡 MIC 法做药敏试验。

1.5 产超广谱内酰胺酶检测方法 在 VITEK 32 型全自动细菌分析系统上检测。同时将菌株用头孢他啶、头孢他啶+棒酸及头孢噻肟、头孢噻肟+棒酸做纸片法确证试验。

1.6 采用 PCR 进行 qnr 基因筛选

1.6.1 细菌 DNA 的粗提方法(煮沸法) 将收集到的菌株接种于接种半固体培养基中,4℃冰箱保存备用。活化时,挑取菌株于 M-H 琼脂平板,35℃,18~24 h 孵育。用无菌棉签挑取 M-H 平板上 3~4 个菌落,置于含有 1 mL 无菌双蒸水的微量离心管中混匀,于 100℃沸水锅中煮沸 15 min,冷却后,5 000 r/min,5 min,离心半径 8 cm。吸取上清液(含细菌 DNA)150 μL 于 0.5 mL 微量离心管中,4℃保存。

1.6.2 PCR 50 μ L 反应体系: MgCl₂ (3 mmol/L) 和 dNTP (0.2 mmol/L) 均为 5 μ L; Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 1 μ L; 2 \times PCR Buffer 14 μ L; 引物 (1 μ mol/L) 4 μ L; DNA 模板 (100 μ g/L) 5 μ L; 双蒸水 16 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min 延伸。

1.7 质粒结合试验

1.7.1 受体菌和供体菌的来源 Ecoli J53(耐叠氮钠)由上海华山医院抗生素研究所惠赠。供体菌在 145 株大肠埃希菌和 125 株肺炎克雷伯菌中检出的 16 株细菌。

1.7.2 质粒结合实验 菌株的复苏、活化、接合、筛选。

2 结 果

2.1 在 145 株大肠埃希菌和 125 株肺炎克雷伯菌中共检出 16 株细菌携带 qnr 基因, 其中 12 株为大肠埃希菌, 4 株肺炎克

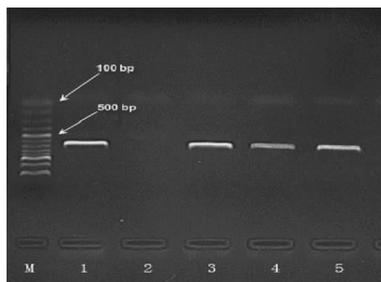
雷伯菌。16 株 qnr 基因阳性菌株均为产 ESBLs, 且呈多重耐药菌株, 对亚胺培南均敏感; 对青霉素类、头孢菌素类、单酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类均耐药; 对呋喃妥因、特治星部分菌株敏感。

2.2 qnr 基因的检测 16 株 qnr 基因阳性菌株见图 1。

2.3 质粒结合试验 在 10 倍稀释的加有叠氮钠和氯霉素 TSA 的选择性平板上, 14 株供体菌的接合子均有菌落生长, 在 100、1 000 倍稀释的加有叠氮钠和氯霉素 TSA 的选择性平板上, 14 株供体菌的接合子均无菌落生长, 在接种受体菌和供体菌对照的 TSA 平板上均无菌落生长。14 株 qnr 基因阳性菌株对抗生素的 MIC 值均有 10~30 倍以上的提高, 即接合菌对所选的抗生素的 MIC 值比受体菌均有很大的提高, 比供体菌低。提示 14 株 qnr 基因阳性菌株的接合试验成功, 2 株接合试验失败。见表 1。

表 1 受体菌、供体菌和接合菌对抗生素的耐药情况

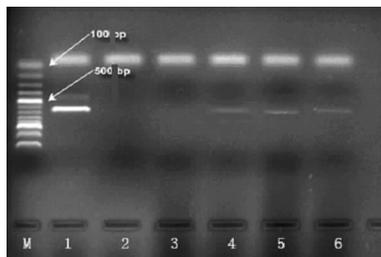
项目		MIC(μ g/mL)								
		CIP	AMP	GEN	CTX	FEP	SXT	SMZ	TMP	CHL
受体菌	Ecoli J53	<0.08	2	0.125	0.125	1	0.5	16	0.125	4
供体菌	Ecoli 26	64~128	\geq 256	16~32	\geq 256	64~128	\geq 512	\geq 512	\geq 256	64~128
	Kpn 25	32~64	\geq 256~512	16~32	64~256	64~128	\geq 512	\geq 512	\geq 256	64~256
接合菌	Ecoli 26	1~2	\geq 256	1~2	8~16	16~32	\geq 512	\geq 512	\geq 256	4~8
	Kpn 25	0.5~1	\geq 256~512	1~2	2~8	16~32	\geq 512	\geq 512	\geq 256	4~32



M 为 100 bp DNA 标记; 1 为 qnr 阳性对照菌株; 2 为阴性对照菌株; 3、4、5 为大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 qnr 阳性菌株。

图 1 qnr 基因扩增产物电泳图

2.4 接合菌中 qnr 基因的检测 对 14 株接合菌进行 qnr 基因扩增的试验, 均在 661 bp 处检测出阳性条带。证实 qnr 基因通过质粒介导, 从供体菌接合转移至受体菌。见图 2。



M 为 100 bp DNA 标记(从下至上依次为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1k、1.1k、1.2k); 1 为 qnr 阳性对照菌株; 2 为阴性对照菌株; 3 为大肠埃希菌 J53 受体菌; 4、5、6 为大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌阳性菌株。

图 1 接合菌 qnr 基因扩增产物电泳图

2.5 qnr 基因在接合菌中的稳定性 在连续培养 3 d 中, 用纸片扩散法检测环丙沙星的结果均为敏感, 抑菌圈大小保持不变, 均在 30 mm 左右, 与接合试验中用环丙沙星纸片筛选含药的 TSA 培养基上生长的接合子的抑菌圈大小一致, 即 14 株接合子均未丢失环丙沙星耐药性, 提示 qnr 在接合子中是较稳定的。

3 讨 论

目前, 已知细菌对氟喹诺酮类药物的主要耐药机制为: (1) 靶位基因 II 型拓扑异构酶即 DNA 促旋酶基因 (gyrA、gyrB) 和拓扑异构酶 IV 基因 (parC、parE) 突变, 导致 DNA 促旋酶和拓扑异构酶 IV 的结构、构象发生变化, 使药物不能与酶 DNA 的复合物稳定结合^[6]。(2) 细菌膜通透性的降低和膜上药物主动外排泵的激活, 使细菌体内药物蓄积浓度低于有效浓度^[6]。(3) 质粒上 qnr 基因座介导细菌对氟喹诺酮耐药, 其中 (1) 和 (2) 耐药机制由染色体介导引起, 不具有水平传播性。最近, Martinez 等^[7]发现了 1 个可编码喹诺酮耐药的三重耐药基因 qnr, qnr 基因是由可接合质粒介导的喹诺酮类耐药基因, 其作用机制是其编码的蛋白质对喹诺酮类药物靶位点的保护, 从而导致药物治疗失效。虽然 qnr 基因介导低水平喹诺酮类耐药的报道不多, 其检出率也较低, 但由于 qnr 基因位于可移动性遗传元件质粒或整合子上, 可在不同菌株和不同菌种间传播。本研究在 145 株大肠埃希菌和 125 株肺炎克雷伯菌中共检出 16 株细菌携带 qnr 基因, 阳性率为 5.9%, 其中 12 株为大肠埃希菌 (8.3%), 4 株肺炎克雷伯菌 (3.2%), 与 5 年前文献报道的数据比较有所提高, 这可能与喹诺酮类耐药在临床上应用逐年上升有关, 16 株 qnr 基因阳性菌株均为产 ESBLs 菌且呈多重耐药性。据文献报道, 含有 qnr 质粒的 pMG252 包含 ESBLs 的基因, 表明在喹诺酮耐药和 ESBLs 之间差异有统计学意义

且呈显著相关性^[8],在有其他喹诺酮耐药机制的菌株中(如外膜孔道蛋白丢失),qnr 基因的存在能使喹诺酮的耐药性达到很高的水平。

本组通过对上海 4 家教学医院所收集的菌株进行 qnr 基因检测以及接合试验与其稳定性试验的研究,发现细菌对喹诺酮类药物的耐药性除文献报道的染色体基因介导外,还可通过质粒携带的基因介导产生,从供体菌接合转移至受体菌,且 qnr 在接合子中是较稳定的。相对于染色体,质粒所带的耐药基因更易于水平传播,可以跨种属广泛传递,是临床上耐药性快速变迁的主要原因之一。细菌所含质粒在一定的时空内相对稳定,且具有地区特异性,国内外均有相关的研究和报道^[9]。qnr 基因的出现,表明了 1 个危险的信号:随着抗菌药物的广泛应用,细菌的耐药性也逐步向更加复杂、多重耐药的方向发展。qnr 基因研究的临床意义在于其可在不同细菌中迅速水平传播,导致医院内甚至更大范围的流行而不利感染的控制^[10-11]。qnr 基因常与其他多种耐药基因共同整合在一起,从而缩小了临床治疗相关细菌感染时选药或联合用药的空间。因此,临床应重视 qnr 基因的检测和掌握本地区 qnr 基因的存在情况,并采取积极措施进行预防和控制质粒介导的喹诺酮耐药菌株的播散。

参考文献

- [1] 孙康德,陈福祥,倪语星,等.质粒 qnr 介导的肠杆菌科细菌对喹诺酮类药物耐药机制研究进展[J].中国抗生素杂志,2009,34(1):7-11.
- [2] 王春新,蔡培泉.阴沟肠杆菌喹诺酮类耐药 qnr 基因的发现[J].中华微生物免疫学杂志,2006,2(10):162.
- [3] 李涛,熊自忠.大肠埃希菌和克雷伯菌属细菌 qnr 基因的检测[J].检验医学,2005,20(2):112-114.

- [4] Jin YJ,Hyun JY,Eun SK,et al. Detection of qnr in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2005,49(6):2522-2524.
- [5] Wang MG,John HT,George AJ,et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2003,47(7):2242-2248.
- [6] Oethinger M,kern WV,Sellen-Ritter AS,et al. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2000,44(21):10-13.
- [7] Martinez ML,Pasaul A,Jacob GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid[J]. *Lancet*,1998,351(16):797-799.
- [8] Paterson DL,Mulazimoglu L,Casellas JM,et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia[J]. *Clin Infect Dis*,2000,30(9):473-478.
- [9] 张洁,包其郁.多重耐药性大肠埃希菌质粒谱与 ESBLs 基因型分析[J].中国抗生素杂志,2006,31(4):198-201.
- [10] 孙康德,冯志磊,倪语星,等.上海部分教学医院大肠埃希菌和克雷伯菌的 qnr 基因流行情况调查[J].上海交通大学学报,2007,27(7):883-836.
- [11] Schulisz C,Yen LM,Linh LD,et al. High prevalence of qnrS and qnrA genes among Enterobacteriaceae on an ICU in Ho Chi Minh City Viet Nam[M]. 45th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington D. C, 2005; Abstract LB-22.

(收稿日期:2010-08-10)

(上接第 634 页)

血标本的低、中、高值批内、批间不精密度与 CLIA'88 允许总误差进行比较,分别小于 1/3 CLIA'88 允许总误差,这也符合了本院检验科 ISO15189 实验室管理体系的质量要求。对定值全血质控物进行监测分析,测定值与靶值间进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明 LH-750 准确性较好。LH-750 的 5 个测量指标测定按不确定度的评定程序分析,其不确定度的来源包括受检者的生物因素、标本因素、试剂因素、校准液的影响和操作因素等。但对于医学实验室检测的许多项目,在计算不确定度时,要考虑到影响实验结果的所有分析前因素是不切实际的,必须将所有这些分析前因素降至最低。因此,所有检测项目必须制定标准操作程序,特别是标本的预处理和保存必须标准化。必要时,可拒收不符合标准的样本。如果采集的标本都经过这样的处理,可以不考虑分析前的因素,这将简化不确定度的评定程序^[5]。样品携带物污染率均小于 2%。线性范围较广,基本包涵了临床出现病例的血液细胞数变化,理论值与实测值间相关系数较理想。LH-750 血细胞两种进样模式间偏倚都在仪器允许误差的范围内。LH-750 与 sys-

mex1000i 结果比较,相关系数较好(0.996 6~0.999 9)。

LH-750 全自动血液分析仪各方面性能良好,仪器操作简便、快速、准确、精密可靠,分析参数基本达到其技术指标,全自动分析功能可满足大、中型医院的需求。

参考文献

- [1] 韩冬严. Beckman Coulter HMX 血细胞分析仪性能评价[J]. 检验医学与临床,2008,5(20):1227-1230.
- [2] 王文娟,王佩佩,陈保德,等. LH-750 血液分析仪临床应用评价[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(3):319-321.
- [3] 费中海,李君安,李英,等. LH-750 的性能评价[J]. 中国民康医学,2008,20(7):694-696.
- [4] ICSH. Protocol for evaluation of automated hematology analyzer[J]. *Clin Lab Hematol*,1984,6(4):69.
- [5] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:2.

(收稿日期:2010-08-09)