

• 基础实验研究 •

# 大肠埃希菌对氟喹诺酮类的质粒介导耐药机制研究

蒋 杰<sup>1</sup>, 胡大春<sup>2△</sup>, 赵晓丽<sup>2</sup>

(1. 云南省临床检验中心, 昆明 650032; 2. 云南省昆明市第一人民医院检验科 650011)

**摘要:**目的 了解近年来发现的质粒介导耐药机制在临床分离大肠埃希菌中对氟喹诺酮类耐药所起的作用。方法 用 MIC 琼脂稀释法筛选耐左氧氟沙星大肠埃希菌; 采用聚合酶链反应对 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB*、*aac(6′)-Ib* 基因进行扩增, 并进行 PCR 扩增产物直接双向测序。用接合实验了解是否存在水平传播的氟喹诺酮耐药性传播机制。结果 90 株耐氟喹诺酮类大肠埃希菌中 7 株检出 *aac(6′)-Ib-cr* 基因, 未检出 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB* 基因。78 株符合供体菌标准的大肠埃希菌中有 2 株接合成功, 接合率 2.6%。结论 该地区存在质粒介导的氟喹诺酮类耐药性的水平传播。

**关键词:** 肠致病性大肠杆菌; 喹诺酮类; 质粒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)10-1073-02

## Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*

Jiang Jie<sup>1</sup>, Hu Dachun<sup>2△</sup>, Zhao Xiaoli<sup>2</sup>

(1. Clinical Laboratory Center of Yunnan Province, Kunming 650032, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Kunming, Yunnan 650011, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the importance of recently discovered plasmid-mediated resistance in the development of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* (E. coli). **Methods** Strains of E. coli resistant to levofloxacin were selected by Kirby-Bauer disk diffusion method, and the *qnrA*, *qnrS*, *qnrB* and *aac(6′)-Ib* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced by forward and reverse sequencing. Conjugation test was used to determine the plasmid-mediated fluoroquinolone-resistance. **Results** The *aac(6′)-Ib-cr* gene were detected in 7 of 90 isolates of E. coli and the *qnrA*, *qnrS* and *qnrB* genes were not found. In 78 strains of E. coli, coincident with the criterion of donor bacterial, 2 strains were found with transconjugants and the conjugation rate was 2.6%. **Conclusion** There should be plasmid-mediated fluoroquinolone-resistance genes in the isolates of E. coli and the horizontally transferable elements of fluoroquinolones-resistance in this hospital.

**Key words:** *Escherichia coli*; fluoroquinolone resistance; plasmid

以往认为细菌对氟喹诺酮类的耐药是由染色体突变所致, 但细菌对氟喹诺酮类的耐药性在某些地区(如中国)的上升迅速, 推测可能有质粒介导耐药机制的参与<sup>[1]</sup>。1998 年 Martinez-Martinez 等<sup>[2]</sup>自 1 株肺炎克雷伯菌临床分离株中获得 1 个耐药质粒, 将该质粒转移至其他细菌时, 细菌对氟喹诺酮类的最低抑菌浓度上升 4~16 倍, 这提示存在质粒介导耐药。随后, 耐药基因被克隆出来, 命名为 *qnr*(由于之后又发现更多的 *qnr* 类似的基因, 故命名为 *qnrA*)。在对 *qnrA* 研究的同时, *qnrS*、*qnrB* 相继被发现<sup>[3]</sup>。氟喹诺酮类为全合成药物, 人们一直认为灭活酶不能破坏其结构, 即不被灭活酶水解。然而最近研究显示, 由质粒携带的 1 个氨基糖苷乙酰转移酶的变异基因 *aac(6′)-Ib-cr* 可使细菌对环丙沙星及诺氟沙星的 MIC 上升 4 倍<sup>[4]</sup>。此外, 该基因尚可与 *qnrA* 基因由同一个质粒携带, 使氟喹诺酮类的 MIC 进一步上升, 在氟喹诺酮类耐药性形成中也起了重要作用。本研究通过检测 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB*、*aac(6′)-Ib* 基因, 探索本地质粒介导的氟喹诺酮耐药机制, 用接合实验了解是否存在水平传播的氟喹诺酮耐药性传播机制。

### 1 材料与与方法

**1.1 菌株** 本市第一人民医院住院及门诊感染患者送检的各类标本中分离得到大肠埃希菌 104 株, 排除同一患者同一部位重复分离的菌株。全部菌株按照《全国临床检验操作规程》<sup>2</sup> 版常规培养分离。菌株采用 BD BBL Crystal ENF 鉴定系统鉴定到种。

### 1.2 方法

**1.2.1 药敏实验** 采用 MIC 琼脂稀释法检测 104 株大肠埃

希菌对左氧氟沙星的耐药表型, 判断标准均按照美国 NCCLS 2008 年规定进行, 以敏感(S)、中介(I)、耐药(R)报告结果。以大肠埃希菌(ATCC35922)为质控菌株。

**1.2.2 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB*、*aac(6′)-Ib* 基因扩增** 碱裂解法试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司提供)提取细菌 DNA, 参考文献<sup>[3-6]</sup>设计 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB*、*aac(6′)-Ib* 基因的 PCR 引物。各 PCR 引物序列及扩增片段长度见表 1, 由北京奥科生物技术有限公司合成。

表 1 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB*、*aac(6′)-Ib-cr* 基因 PCR 引物序列

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)
<i>qnrA</i>	5'-GCA AGA GGA TTT CTC ACG CC-3'	201
	5'-AAA GAC AGA CGG CAG GCC T-3'	
<i>qnrS</i>	5'-AGT GAT CTC ACC TTC ACC GC-3'	550
	5'-CAG GCT GCA ATT TTG ATA CC-3'	
<i>qnrB</i>	5'-ATG ACG CCA TTA CTG TAT AA	581
	5'-GAT CGC AAT GTG TGA AGT TT	
<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	5'-TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA	482
	5'-CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT	

采用 Biometra PCR 扩增仪扩增, PCR 反应体积共 25  $\mu$ L, 包括 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L、 $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L 1.5  $\mu$ L、dNTP (200  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ L、Taq DNA polymerase 1.0 U、引物 (50 pmol) 0.5  $\mu$ L、灭菌去离子水 14.5  $\mu$ L, 样品 DNA 5  $\mu$ L, 总体积 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: (1) *qnrA* 热循环参数: 94  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 40 s, 58  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s, 34 个循环; 延伸 10 min。(2) *qnrS*

△ 通讯作者, E-mail: hudach@163.net.

热循环参数:94 °C 4 min;94 °C 45 s,48 °C 45 s,72 °C 45 s,30 个循环;延伸 10 min。(3)*qnrB* 热循环参数:94 °C 4 min;94 °C 45 s,53 °C 45 s,72 °C 1 min,32 个循环;延伸 10 min;*aac(6′)-Ib-cr* 热循环参数:94 °C 4 min;94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 45 s,34 个循环;延伸 10 min。用高保真 Tag 酶分别进行基因扩增,扩增产物送上海生工生物技术有限公司纯化,采用双脱氧链末端终止法,用 3730 自动测序仪进行正、反向测序,所得序列用 DNAMAN 软件进行各序列间的比较,并在 GenBank 上查询对比。

**1.3 接合实验** 经药敏实验筛选耐氟喹诺酮类大肠埃希菌 90 株,分别用含 150 mg/L 利福平、8 mg/L 左氧氟沙星抗菌剂的 MH 平皿,筛选对利福平敏感、同时对左氧氟沙星耐药的临床分离大肠埃希菌作为供体菌。受体菌为耐利福平大肠埃希菌 C600,为北京协和医院检验科惠赠。将受体菌和供体菌分别用 LB 液体培养基 35 °C 振荡培养 4 h。调整菌液浓度至 3 MacFarrand,按 1:4(受体菌:供体菌)比例混合菌液,35 °C 静止培养 4 h。以离心半径 8 cm,3 800 r/min 离心 2 min,取沉淀,用含 150 mg/L 利福平和 8 mg/L 左氧氟沙星的 MH 培养基筛选接合子。

## 2 结 果

104 株大肠埃希菌中 90 株对左氧氟沙星耐药,耐药率 86.5%。90 株耐氟喹诺酮类大肠埃希菌中,7 株检出 *aac(6′)-Ib-cr* 基因,检出率 7.78%,在 7 株 *aac(6′)-Ib-cr* 基因阳性株中,2 株左氧氟沙星 MIC 为 16 μg/mL,3 株左氧氟沙星 MIC 为 32 μg/mL,2 株左氧氟沙星 MIC 为 64 μg/mL。从耐氟喹诺酮类的大肠埃希菌 90 株中筛选出 78 株对利福平敏感并对左氧氟沙星耐药的菌株进行接合实验,结果有 2 株接合成功,接合率为 2.6%。7 株阳性株中的 2 号菌为接合实验阳性供体菌,其左氧氟沙星 MIC 为 64 μg/mL,并且其接合子检出 *aac(6′)-Ib-cr* 基因,未检出 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB* 基因。

## 3 讨 论

1998 年, Martínez-Martínez 等<sup>[2]</sup>通过对质粒 pMG252 的研究表明质粒具有广泛的宿主,通过接合的方式它可以转移到肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、弗氏柠檬酸杆菌、伤寒沙门菌、铜绿假单胞菌中。随后质粒介导氟喹诺酮耐药基因 *qnr* 被发现。*qnr* 位于 I 类整合子上,整合子中尚携带 *sμL I*、*aac(6′)-Ib*、*aadA2* 及 *bla<sub>OXA-30</sub>* 等基因,分别编码对磺胺类、氨基糖苷类及 β-内酰胺类抗菌剂耐药。王明贵等<sup>[5]</sup>对 *qnr* 阳性的整合子 In36 和 In37 进行了遗传背景研究,发现两者结构从左到右依次为:5′-CS(含 *inti1*)、基因盒区、3′-CS1(含 *qacEΔ1* 和 *sμL I*)、共同区域(含 *orf513*)、特异区域(含 *qnr* 和 *ampR*)、3′-CS2(含 *qacEΔ1*、*sμL I*、*orf5*、*orf6*)、*qnr* 均位于 In4 家族 I 类整合子上,其上游为 *orf513*,下游为 *ampR*(负责调节 *ampC* 的表达)、*qacEΔ1* 和 *sμL I* 基因。*qnr* 编码 1 个由 218 个氨基酸组成的五肽重复结构的蛋白 Qnr,属于五肽重复家族,并且 Qnr 可与 DNA 旋转酶及拓扑异构酶 IV 结合,对氟喹诺酮类作用靶位具有保护作用。在对 *qnrA*(后来发现 *qnrB*、*qnrS*,故 *qnr* 命名为 *qnrA*)研究的同时,另一个质粒介导的氟喹诺酮耐药基因 *qnrS* 被发现,编码的蛋白也为 218 个氨基酸,与 *qnr* 的同源性为 59%。近期又发现了另一个可通过质粒介导的氟喹诺酮耐药基因,此基因与 *qnrA* 的同源性约为 50%,命名为 *qnrB*<sup>[6]</sup>。目前北美地区纽约、洛杉矶等城市已有 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB* 报道<sup>[7]</sup>。在中国,*qnrA* 已在上海、安徽等被发现,对于 *qnrS*、*qnrB* 基因尚未见报道<sup>[8]</sup>。在研究中对 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS* 均进行了检测,但未发现阳性株。联系接合实验结果确实存在质粒介导氟喹诺酮耐药,考虑有可能存在除 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB* 基因

外的质粒介导氟喹诺酮耐药基因,有待进一步研究证实。

2006 年初,美国学者 Park 等<sup>[9]</sup>发现了不仅对氨基糖苷类药物有修饰作用,而且对氟喹诺酮类药物也有修饰作用的新氨基糖苷类修饰酶 *aac(6′)-Ib-cr* 型。由质粒携带的氨基糖苷乙酰转移酶的变异基因 *aac(6′)-Ib-cr* 可使细菌对环丙沙星及诺氟沙星的 MIC 上升 4 倍,机制为此基因编码的灭活酶可使环丙沙星及诺氟沙星中的氨基“-NH”乙酰化,从而使其抗菌活性下降。在上海分离的 72 株大肠埃希菌中,*aac(6′)-Ib-cr* 基因检出率 51%,说明此变异基因的发生率很高,此外该基因尚可与 *qnrA* 基因由同一个质粒携带,在 7 个 *qnrA* 接合子中,4 个接合子同时含此基因,对环丙沙星的 MIC 为 1~2 mg/L,不含此基因的 3 个接合子的 MIC 仅为 0×125 μg/mL、0×25 mg/L,可见 *aac(6′)-Ib-cr* 与 *qnrA* 基因同时存在可使氟喹诺酮类的 MIC 进一步上升。在本研究中,90 株耐氟喹诺酮类大肠埃希菌中 7 株检出 *aac(6′)-Ib-cr* 基因,存在 *aac(6′)-Ib-cr* 基因的流行,但远低于上海地区。在 7 株 *aac(6′)-Ib-cr* 基因阳性株中,2 株左氧氟沙星 MIC 为 16 μg/mL,3 株左氧氟沙星 MIC 为 32 μg/mL,2 株左氧氟沙星 MIC 为 64 μg/mL。结合接合实验研究结果,7 株阳性株中的 2 号菌为接合实验阳性供体菌,其左氧氟沙星 MIC 为 64 μg/mL,进一步证实了 *aac(6′)-Ib-cr* 与质粒携带的氟喹诺酮类耐药基因同时存在可使其 MIC 进一步上升。此外,2 号接合子亦携带 *aac(6′)-Ib-cr* 基因,说明该基因也可通过接合方式水平传播。本研究中,通过接合实验探索氟喹诺酮类耐药性在大肠埃希菌同种菌株之间的水平传播情况。结果发现 2 株接合子存在不同程度对氟喹诺酮类耐药,即耐药性通过可接合质粒发生了水平传播,但接合率不高,仅为 2.6%。可见本地区确实存在水平传播的氟喹诺酮类耐药机制,但所占比重不大,提示本地区临床分离大肠埃希菌对氟喹诺酮类药物耐药性仅有极少一部分通过质粒介导,其主要耐药机制可能是通过染色体靶位蛋白基因的突变所致,但也不能排除存在非接合质粒介导耐药的可能性。

## 参考文献

- [1] 赵晓丽,胡大春. 大肠埃希菌耐药机制的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(5):438-441.
- [2] Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid[J]. Lancet,1998,351:797-799.
- [3] 陈晓莉,徐元宏. 变形杆菌对喹诺酮耐药机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(12):1114-1116.
- [4] Robicsek A, Strahilevita J, Jacoby GA, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase[J]. Nat Med,2006,12(1):83-88.
- [5] 王明贵,Tran JH, Jacoby GA, 等. 大肠埃希菌临床分离株对喹诺酮类抗菌药的质粒介导耐药[J]. 中国感染与化疗杂志,2006,6(4):217-221.
- [6] Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, et al. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,50(4):1178-1182.
- [7] Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance[J]. Lancet Infect Dis,2006,6(10):629-640.
- [8] 李涛,熊自忠,沈继录,等. 大肠埃希菌与克雷伯菌属细菌 *qnr* 基因的检测[J]. 检验医学,2005,20(2):112-114.
- [9] Park CH, Robicsek A, George A, et al. Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme[J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,50(11):3953-3955.