

• 论 著 •

产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌中检出 $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ 型基因*丁秋蕾¹, 杨小娜¹, 梅志琴³, 赵建宏^{2△}, 时东彦², 霍卫池¹

(1. 河北省石家庄市中心医院检验科 050011; 2. 河北医科大学第二医院检验科, 石家庄 050000;

3. 河北省石家庄市传染病医院检验科 050012)

摘要:目的 了解质粒介导的喹诺酮耐药基因在产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌的耐药特点及耐药机制。方法 用纸片扩散法检测 59 株产 ESBLs 的大肠埃希菌对 11 种抗生素的敏感性, 采用聚合酶链反应(PCR)检测 qnrA 、 qnrB 和 qnrS 、 qnrC 、 $\text{aac}(6')\text{-I b}$ 及 qepA 基因, 并对扩增阳性基因 qnrB 、 $\text{aac}(6')\text{-I b}$ 测序后进行 BLAST 比对分析。结果 59 株产超广谱 β -内酰胺酶的大肠埃希菌共检出 qnrB 3 株(5.1%)、 $\text{aac}(6')\text{-I b}$ 22 株(37.3%), qnrB 经测序证实为 qnrB4 , $\text{aac}(6')\text{-I b}$ 经测序证实为 $\text{aac}(6')\text{-I b-cr}$ 型 1 株(1.7%)和 $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ 型 3 株(5.1%)。结论 大肠埃希菌多重耐药机制与产超广谱 β -内酰胺酶及携带 qnrB4 、 $\text{aac}(6')\text{-I b}$ 和 $\text{aac}(6')\text{-I b-cr}$ 基因有关; 本研究是国内首次从大肠埃希菌中检出 $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ 型基因。

关键词: 大肠杆菌; 超广谱 β -内酰胺酶; $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ 型基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2046-03

 $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ type gene could be detected in *Escherichia coli* isolates producing extended spectrum β -lactamaseDing Qiulei¹, Yang Xiaona¹, Mei Zhiqin³, Zhao Jianhong^{2△}, Shi Dongyan², Huo Weichi¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Shijiazhuang Central Hospital, Shijiazhuang 050011, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

3. Department of Clinical Laboratory, Shijiazhuang Infection Disease Hospital, Shijiazhuang 050012, China)

Abstract: **Objective** To elucidate the influence of quinolone resistance gene, mediated by plasmids, on the characteristics and mechanism of drug resistance in *Escherichia coli* (E. coli) producing extended spectrum β -lactamase (ESBLs). **Methods** The susceptibility of 59 strains of E. coli to 11 kinds of antibiotics was detected by disc diffusion (K-B method). Drug resistance genes, including qnrA , qnrB , qnrS , qnrC , $\text{aac}(6')\text{-I b}$ and qepA were identified by polymerase chain reaction (PCR) and confirmed by sequencing and BLAST analysis. **Results** Among the 59 strains of E. coli, 5.1% (3/59) were positive with qnrB gene, 37.3% (22/59) with $\text{aac}(6')\text{-I b}$. The qnrB genes were confirmed to be qnrB4 , $\text{aac}(6')\text{-I b}$ gene were confirmed to be $\text{aac}(6')\text{-I b-cr}$ type for 1 strain and $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ type for 3 strains, by sequencing. **Conclusion** The mechanisms of this multi-drug resistance in E. coli were related to the production of ESBLs and the exist of qnrB4 , $\text{aac}(6')\text{-I b}$ and $\text{aac}(6')\text{-I b-cr}$ type genes. This study was the first report that $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ type gene could be detected in E. coli.

Key words: *Escherichia coli*; extended-spectrum beta-lactamases; $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ gene

大肠埃希菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药机制主要通过靶位的改变(旋转酶或异构酶的突变)、膜通透性降低、主动外排机制, 这些机制均由染色体介导, 不会发生耐药基因的水平传播。但是, 自 1998 年质粒介导的喹诺酮类药物耐药(plasmid mediated quinolone resistance, PMQR)基因(qnr 基因)的发现。使人们对喹诺酮类药物耐药有了新的认识^[1]。 qnr 基因由质粒所携带, 可以在同种或不同细菌之间发生水平传播, 引起细菌耐药性的快速、广泛传播。由于整合子、转座子等的作用, 耐药质粒可同时携带多种耐药基因, 导致多重耐药, 临床治疗更为困难^[1-3]。产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的产生是大肠埃希菌的主要耐药机制, 多项研究表明, 产 ESBLs 菌株对喹诺酮类药物的耐药可通过质粒传播。为此本组对 59 株产 ESBLs 大肠埃希菌进行了 PMQR 基因 [qnrA 、 qnrB 、 qnrS 、 qnrC 、 qepA 、 $\text{aac}(6')\text{-I b-cr}$] 检测, 并首次在大肠埃希菌中检出了 $\text{aac}(6')\text{-I b-suzhou}$ 型基因, 现分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 59 株产 ESBLs 大肠埃希菌来自于国家科技部医学微生物资源标准化整理、整合及共享试点项目——临床微生物子课题(河北医科大学第二医院保存, 项目编号为 2005DKA21202-6), 菌株采用法国生物梅里埃公司的 API20E 进行鉴定, 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、ATCC35218 和铜绿假单胞菌 ATCC27853, 购自卫生部临床检验中心。

1.2 药敏纸片 所用药敏纸片亚胺培南为英国 Oxoid 公司产品; 氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢唑啉、头孢呋辛、头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟/头孢噻肟-克拉维酸、头孢哌酮/舒巴坦、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星均为北京天坛公司产品。

1.3 仪器与试剂 PCR 扩增仪、凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司, M-H 琼脂培养基为英国 Oxoid 公司产品, PCR 相关试剂由大连宝生物工程有限公司提供, API20E 鉴定条由法

* 基金项目: 石家庄市科技计划项目(10146603)。△ 通讯作者, E-mail: zhaojh_2002@yahoo.com。

国生物梅里埃公司生产。

1.4 药敏试验及 ESBLs 菌株的检测 药敏试验采用 K-B 法，产 ESBLs 菌株检测采用头孢他啶和头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟和头孢噻肟/克拉维酸纸片做确证试验。两者均按临床实验室标准化委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2008 年标准进行结果判断^[4]。

表 1 引物序列

基因类型	引物序列	产物长度(bp)	退火温度(℃)	参考文献
qnrA	P1 5'-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3'	516	52	[5]
	P2 5'-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA-3'			
qnrB	P1 5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3'	469	55	[5]
	P2 5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3'			
qnrS	P1 5'-ACGACATTTCGTCAACTGCAA-3'	417	53	[5]
	P2 5'-TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'			
qnrC	P1 5'-GGGTTGTACATTTATTGAATC-3'	531	50	[6]
	P2 5'-TCCACTTTACGAGGTTCT-3'			
aac(6')- I b	P1 5'-ATGACTGAGCATGACCTTGC-3'	519	57	[7]
	P2 5'-TTAGGCATCACTGCGTGTTTC-3'			
qepA	P1 -CGGCGGCGTGTTGCTGGAGTTCTT-3'	548	50	[8]
	P2 5'-CCGACAGGCCACGACGAGGATGC-3			

1.6 序列测定 aac(6')- I b 及 qnrB 基因扩增阳性 PCR 产物经纯化后，由上海生工生物工程技术有限公司采用 ABI PRISM 3730XL 自动 DNA 序列分析仪进行序列测定，所测序列采用 GenBank 中的 BLAST 程序进行同源性分析。

2 结 果

2.1 基因检测结果 59 株产 ESBLs 大肠埃希菌中检出了 qnrB、aac(6')- I b 基因，未检出 qnrA、qnrC、qnrS、qepA 基因。

2.2 阳性基因序列分析结果 对 qnrB 基因 PCR 产物进行测序，与 GenBank 登录号为 DQ303921 (qnrB4) 的序列一致。对 aac(6')- I b 基因 PCR 产物进行测序，证实 1 株为 aac(6')- I b-cr 型，与 GenBank 登录号为 EF375620 的序列一致；3 株为

1.5 基因检测 根据文献[5-8]的方法由上海生工生物工程有限公司分别合成 qnrA、qnrB、qnrS、qnrC、qepA、aac(6')- I b 基因，按常规方法建立 PCR 体系，扩增所用引物序列、产物长度、PCR 退火温度见表 1。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果出现与阳性对照分子相当的目的片段条带为阳性。

aac(6')- I b-suzhou 型，与 GenBank 登录号为 EF375621 的序列一致，其同源性均大于 99%。291 号菌株同时携带 qnrB4 和 aac(6')- I b-suzhou 型基因。

2.3 PMQR 基因的检出情况 PMQR 基因携带率为 6.8% (4/59)，其中 3 株携带 qnrB4 基因 (3/59, 5.1%)，1 株携带 aac(6')- I b-cr 基因 (1/59, 1.7%)。

2.4 4 株 PMQR 基因阳性株与不同药物的耐药性 4 株 PMQR 基因阳性株中，2012 号对环丙沙星中介，对左氧氟沙星敏感，所有菌株对亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦敏感，对多种抗菌药物耐药。见表 2。

表 2 携带耐药基因的菌株对不同抗菌药物的耐药性

菌株编号	PMQR 基因	氨苄西林	阿莫西林/ 克拉维酸	环丙沙星	左氧氟 沙星	亚胺 培南	头孢哌酮/ 舒巴坦	头孢 唑啉	头孢 呋辛	头孢 他啶	阿米 卡星	庆大 霉素
291	qnrB4	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
2026	qnrB4	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R
2034	qnrB4	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
2012	aac(6')- I b-cr	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R

R: 耐药; I: 中介; S: 敏感。

3 讨 论

1998 年, Martinez 等^[1]报道在肺炎克雷伯菌中发现了 PMQR 基因 qnrA 后, qnrB、qnrC、qnrS、aac(6')- I b-cr、qepA 先后在不同的地区、不同的菌株中部分或单个报道, 并日益成为研究的热点。

本研究中检出了 PMQR 基因 qnrB4 和 aac(6')- I b-cr,

PMQR 基因的携带率为 5.08%, 低于常燕子等^[9]的报道; 本研究中 qnr 基因只检出了 qnrB4 亚型, 其阳性率为 1.70%, 低于上海的报道^[2]; aac(6')- I b-cr 的检出率为 3.38%, 低于张雪青等^[10]的报道。这可能与本组选取 PMQR 基因的种类、菌株数量以及地区差异有关。

qnrC 和 qepA 系近年来发现的质粒介导的喹诺酮类药物

耐药基因。2009 年 Wang 等^[6]从门诊患者尿标本的奇异变形杆菌中利用 pHs10 质粒进行转运的方法检出了 qnrC 基因; qepA 基因是 Yamane 等^[8]于 2007 年报道的另一种可介导细菌耐喹诺酮类的质粒基因,它是通过对亲水性喹诺酮类药物的外排而介导低水平的耐药,黄彬等^[11]在 30 株环丙沙星耐药的大肠埃希菌中检出了 2 株。本研究中未检出 qnrC 和 qepA 基因,这可能与本组选取的样本较小、选用的方法和扩增片段的长度有关。

aac(6′)-I b 为氨基糖苷类修饰酶基因,迄今为止,国内已发现 aac(6′)-I b 的变异基因 4 种亚型:aac(6′)-I b 经典型、aac(6′)-I b-cr 型、aac(6′)-I b-Ningbo 型和 aac(6′)-I b-suzhou 型。2007 年徐卫东等^[12]在国内外首次报道从肺炎克雷伯菌中检出 aac(6′)-I b-suzhou 型基因,2008 年黄支密等^[13]在国内外首次报道从阴沟肠杆菌中检出。本研究中从产 ESBLs 大肠埃希菌中检出了 aac(6′)-I b-suzhou 型基因,证明了大肠埃希菌也是 aac(6′)-I b-suzhou 型基因的宿主。

aac(6′)-Ib-cr 基因系 2006 年 Robicsek 等^[14]报道的质粒介导的喹诺酮类药物耐药基因,其本质上是一种普通氨基糖苷类乙酰转移酶基因 aac(6′)-I b 的变体,其编码的蛋白能够修饰喹诺酮类而导致耐药^[15]。国内最早由李智山等^[16]于 2007 年在大肠埃希菌中检出。本研究中携带 aac(6′)-I b-cr 基因的 2012 号菌株表现出对阿米卡星和庆大霉素全部耐药,对环丙沙星中介,对左氧氟沙星敏感,其原因可能是 aac(6′)-I b-cr 对氨基糖苷类的亲和力远远大于氟喹诺酮类,并且对氨基糖苷类的乙酰化作用强于喹诺酮类之故^[17]。

4 株携带 PMQR 基因的菌株中仅 2012 号菌株对环丙沙星中介,对左氧氟沙星敏感,其余 3 株菌对环丙沙星、左氧氟沙星均耐药,这可能是 qnr 基因的低水平表达。因此,对 qnr 检测时应选择喹诺酮类药物耐药与非敏感菌株,以防 qnr 基因低水平表达漏检。

本研究是对临床分离产 ESBLs 大肠埃希菌 PMQR 基因的携带情况及耐药性进行了一部分的研究,检出了 qnrB4、aac(6′)-I b-cr 型基因,并首次在大肠埃希菌中检出了 aac(6′)-I b-suzhou 型基因,其生化特性、生物活性有待于进一步研究。

参考文献

[1] Martinez ML, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance transfertable plasmid[J]. Lancet, 1998, 351(9105): 797-799.

[2] Wang M, Tran JH, Jacoby GA, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli from Shanghai China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(7): 2242-2248.

[3] Mammeri HM, Vande Loo, Poirel L, et al. Emergence of plasmid-

mediated quinolone resistance in Escherichia coli in Europe[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(1): 71-76.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S18 Performance Standards for anti microbial susceptibility testing [S]. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.

[5] Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, et al. qnr Prevalence in Ceftazidime resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(8): 2872-2874.

[6] Wang MH, Qin LG, Xu XG, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 51(4): 1892-1897.

[7] Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, 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.

[8] Yamane KJ, Wachino S, Suzuki K, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, qepA, found in an Escherichia coli clinical isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(9): 3354-3360.

[9] 常燕子, 李巧云, 裴莉佩, 等. 质粒介导的喹诺酮类耐药基因在社区泌尿系感染大肠埃希菌中的分布[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 5(20): 1092-1094.

[10] 张雪青, 陈增强, 陈俐丽. 大肠埃希菌临床分离株 aac(6′)-Ib-cr 基因的检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(7): 1266-1268.

[11] 黄彬, 陈茶, 汤晓丽, 等. 质粒介导的大肠埃希菌对喹诺酮类抗菌耐药机制的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(9): 822-824.

[12] 徐卫东, 徐红星, 糜祖煌, 等. 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌中新的氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 江苏大学学报(医学版), 2007, 17(6): 441-444.

[13] 黄支密, 单浩, 糜祖煌, 等. 阴沟肠杆菌 16SrRNA 甲基化酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(12): 369-373.

[14] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyl transferase[J]. Nat Med, 2006, 12(1): 83-88.

[15] Vetting MW, Park CH, Heged SS, et al. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase aac(6′)-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone active aac(6′)-Ib-cr variant[J]. Biochemistry, 2008, 47(37): 9825-9835.

[16] 李智山, 周乐翔, 赵建忠, 等. 大肠埃希菌新的氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(8): 914-916.

[17] Piout JD, Hossain A, Hanson ND, et al. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by Escherichia coli and Klebsiella spp[J]. Clin Microbiol, 2004, 12(42): 5715-5721.

(收稿日期: 2011-06-19)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数,通常是未知的,一般用希腊字母表示,如 μ 、 σ 、 π 等。描述样本特征的数值为统计量,是已知的或可计算获得的,用英文字母表述,如 S 、 P 等。从总体中随机抽样可获得样本,以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。