

# 肺炎克雷伯菌质粒介导的喹诺酮类耐药基因 $aac(6')-Ib-cr$ 的研究

姜梅杰 李玉臣 张福森

**【摘要】 目的** 调查本院临床所分离的产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌中质粒介导的  $aac(6')-Ib-cr$  基因的存在情况,为临床预防感染及合理使用抗菌药物提供依据。**方法** 收集 2007 年 7 月~2008 年 12 月本院临床分离的产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌共 57 株,采用 PCR 技术检测  $aac(6')-Ib$  基因,并对阳性菌株进行测序。以大肠埃希菌 J53 为受体菌,通过接合试验从  $aac(6')-Ib-cr$  阳性菌株中获得的接合子,采用 E-test 方法测定菌株的药敏情况。**结果** 57 株肺炎克雷伯菌中,  $aac(6')-Ib$  基因阳性菌共 12 株,经测序全部为  $aac(6')-Ib-cr$  基因,阳性率为 21.1%。 $aac(6')-Ib-cr$  基因阳性肺炎克雷伯菌中 6 株接合试验获得成功。环丙沙星对接合子的 MIC 值均为 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ,左氧氟沙星对接合子的 MIC 值均为 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ;接合子与受体菌 MIC 值比较,环丙沙星和左氧氟沙星的耐药性分别提高了 63 倍和 17 倍。**结论** 本院产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌质粒介导的喹诺酮类耐药基因  $aac(6')-Ib-cr$  携带率很高,临床上应加强喹诺酮类耐药基因的检测,以避免产  $aac(6')-Ib-cr$  基因菌株感染的暴发流行。

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

**Investigation on plasmid mediated quinolone resistance gene  $aac(6')-Ib-cr$**  JIANG Mei-jie, LI Yu-chen, ZHANG Fu-sen. Central Hospital of Tai'an, Tai'an 271000, China  
Corresponding author: ZHANG Fu-sen, Email: lcuzhangfusen@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the prevalence of plasmid mediated quinolone resistance gene  $aac(6')-Ib-cr$  in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from our hospital, thus to guide the infection prevention and rational application of antibiotics in clinical practice. **Methods** Total of 57 clinical isolates of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* were collected from July 2007 to December 2008.  $aac(6')-Ib-cr$  gene was detected by PCR and the positive strains were then sequenced. As the receptor bacteria, *Escherichia coli* J53 received zygote from  $aac(6')-Ib-cr$ -positive bacteria by conjugation experiment and drug sensitivity was done by E-test. **Results** Among the 57 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 12 (21.1%) were  $aac(6')-Ib-cr$  positive. Among the  $aac(6')-Ib-cr$ -positive *Klebsiella pneumoniae*, conjugation experiment was successful in 6 stains, and MIC of ciprofloxacin and levofloxacin to zygote were 0.25  $\mu\text{g/ml}$  and 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Compared MIC values of zygote with receptor bacteria, drug resistance of ciprofloxacin and levofloxacin increased by 63 times and 17 times, respectively. **Conclusions** Presence rate of plasmid-mediated quinolone resistance gene  $aac(6')-Ib-cr$  in *Klebsiella pneumoniae* is rather high in our hospital, and detection of quinolone resistance gene should be strengthened to prevent outbreak of  $aac(6')-Ib-cr$  producing stains infection.

**【Key words】** *Klebsiella pneumoniae*; Quinolones; Drug resistance;  $aac(6')-Ib-cr$  gene

近年来,喹诺酮类抗菌药物已在临床抗感染治疗中广泛使用,甚至有滥用趋势,肺炎克雷伯菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药率逐年升高,过去对喹诺酮类抗菌药物的耐药认为是由染色体介导、靶位改变

及主动外排所致<sup>[1]</sup>,最近发现喹诺酮类药物的耐药性也可由质粒介导所致<sup>[2-3]</sup>。质粒介导的喹诺酮类耐药基因  $aac(6')-Ib-cr$  与染色体介导的耐药基因不同<sup>[4]</sup>,因此,质粒介导的喹诺酮类耐药性已引起科研工作者和医务人员的高度重视。 $aac(6')-Ib-cr$  本质上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和诺氟沙星,使其抗菌活性下降<sup>[5]</sup>。本研究对 57 株产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌进行  $aac(6')-Ib-cr$  基

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.05.013

作者单位:271000 泰安市,山东省泰安市中心医院检验科(姜梅杰、李玉臣),ICU 重症监护病房(张福森)

通讯作者:张福森,Email:lcuzhangfusen@126.com

因的检测,以期调查质粒介导的喹诺酮类耐药基因 *aac(6')-Ib-cr* 在本院产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌中的存在情况,为临床预防感染及合理使用抗菌药物提供一定的依据。

## 资料与方法

### 一、菌株来源

57 株产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌分离自 2007 年 7 月~2008 年 12 月本院临床所收集的痰液、分泌物、血液和胸腹水等标本。

### 二、菌株鉴定及药敏试验

采用法国梅里埃 ATB 细菌鉴定仪鉴定菌种,用 E-test 条测定 *aac(6')-Ib-cr* 基因阳性且接合试验获得成功的菌株及接合子对环丙沙星、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等抗菌药物的敏感性。并根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)2006 年版标准进行抗菌药物敏感性判读。

### 三、耐药基因检测

采用 PCR 技术进行耐药基因检测,采用煮沸法制备 DNA,引物设计参照文献<sup>[6]</sup>。*aac(6')-Ib*-上游引物:5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3', *aac(6')-Ib*-下游引物:5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT-3'。产物长度为 482 bp。反应条件:94℃变性 45 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 60 s, 35 个循环。产物于 2% 含溴化乙锭的琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定,采用凝胶成像系统观察结果。

## 四、DNA 测序

*aac(6')-Ib* 阳性基因 PCR 产物由上海桑尼公司进行测序,测序结果于 GenBank 网上进行比对查询。

## 结 果

### 一、*aac(6')-Ib-cr* 基因检测结果

所分离的 57 株肺炎克雷伯菌中有 12 株 PCR 扩增出 *aac(6')-Ib* 基因目标片段(见图 1),经测序全部为 *aac(6')-Ib-cr* 基因,阳性检出率为 21.1% (见图 2)。

### 二、质粒接合试验结果

12 株 *aac(6')-Ib* 基因阳性的肺炎克雷伯菌中有 6 株接合成功。E-test 法测定左氧氟沙星等药物对供体菌、受体菌和接合子的 MIC 值,见表 1。

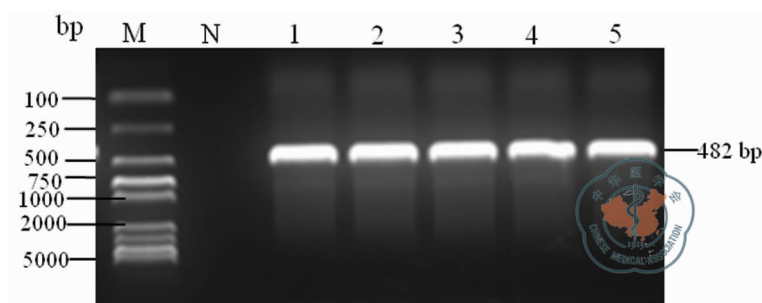
## 讨 论

喹诺酮类药物是临床上常用的抗菌药物之一,由于该类抗菌药物的广泛应用,近年来,本院临床分离的肺炎克雷伯菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药率逐年上升。已有报道显示,引起肺炎克雷伯菌对喹诺酮类抗菌药物耐药的主要机制是由于此类抗菌药物作用靶位的改变、外膜通透性降低和细菌外排泵系统过度表达<sup>[1]</sup>。1998 年, Martinez-Martinez 等<sup>[2]</sup>于美国阿拉巴马州首次发现 1 株临床分离的含质粒介导的喹诺酮类耐药基因的肺炎克雷伯菌,发现该菌可引起水平传播。因此,质粒介导的喹诺酮类抗菌药物的耐药机制引起了研究者和医务人员的广泛关注。

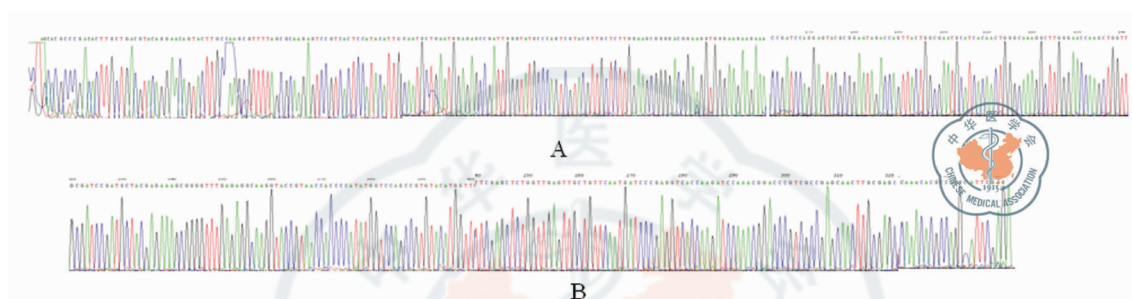
表 1 9 种抗菌药物对供体菌、受体菌和接合子的 MIC 值 ( $\mu\text{g/ml}$ )

菌株	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
Kp1	> 32	16	> 256	64	32	6	1024	> 1024	0.500
J53 Kp1	0.500	0.25	128	32	16	2	64	256	0.125
Kp2	> 32	> 32	64	2	2	4	128	256	0.125
J53 Kp2	0.500	0.250	32	1	1	2	32	128	0.125
Kp3	24	8	64	128	2	256	64	256	0.500
J53 Kp3	0.500	0.250	16	32	0.500	32	32	256	0.250
Kp4	> 32	> 32	> 256	> 256	24	> 256	256	1024	0.125
J53 Kp4	0.500	0.250	128	24	4	64	64	512	0.125
Kp5	> 32	> 32	> 256	128	64	> 256	32	128	0.500
J53 Kp5	0.500	0.250	64	4	1	6	8	64	0.250
Kp6	> 32	32	> 256	2	2	4	6	256	0.125
J53 Kp6	0.500	0.250	128	1	0.500	3	4	64	0.125
J53	0.008	0.016	0.032	0.250	0.016	2	0.500	0.500	0.125

注:受体菌:J53;供体菌:Kp1、Kp2、Kp3、Kp4、Kp5、Kp6;接合子:J53 Kp1、J53 Kp2、J53 Kp3、J53 Kp4、J53 Kp5、J53 Kp6

图1  $aac(6')$ -Ib 基因部分 PCR 电泳图

注: N: 阴性对照 ATCC25922; 1~5: 阳性菌株; M: 标准带

图2  $aac(6')$ -Ib-cr 基因测序图注: A 和 B 为  $aac(6')$ -Ib 基因阳性 PCR 产物测序图

我国上海、安徽、广东、天津和北京等地已有质粒介导的喹诺酮类耐药基因的相关研究报道。本研究分离的 57 株对头孢噻肟耐药且产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌进行  $aac(6')$ -Ib-cr 基因检测, 结果发现本院临床分离的产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌阳性率很高, 且以 CTX-M 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶为主。本研究筛选的肺炎克雷伯菌中,  $aac(6')$ -Ib-cr 的阳性率为 21.1% (12/57), 高于张雪青等<sup>[7]</sup>在 60 株大肠埃希菌临床分离株  $aac(6')$ -Ib-cr 基因的检测率。提示本院临床分离的产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌中质粒介导的喹诺酮类耐药基因  $aac(6')$ -Ib-cr 检出率很高。

本研究根据  $aac(6')$ -Ib-cr 基因检测与药敏试验结果, 发现含  $aac(6')$ -Ib-cr 基因肺炎克雷伯菌的接合子与其受体菌相比, 环丙沙星耐药性提高倍数显著高于左氧氟沙星。已有研究发现,  $aac(6')$ -Ib-cr 是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, 进而使环丙沙星的 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, 含普通型  $aac(6')$ -Ib 酶不能使细菌对环丙沙星 MIC 发生改变<sup>[8]</sup>。有报道称  $aac(6')$ -Ib-cr 基因的存在与环丙沙星是否耐药无关, 环丙沙星耐药株和环丙沙星敏感株具有相似的阳性率<sup>[5]</sup>。本研究结果显示  $aac(6')$ -Ib-cr 基因阳性的肺炎克雷伯

菌对环丙沙星和左氧氟沙星均耐药, 提示  $aac(6')$ -Ib-cr 基因的存在可能与环丙沙星的耐药无关。已有报道显示  $aac(6')$ -Ib-cr 基因对氨基糖苷类的亲和力远远大于氟喹诺酮类<sup>[9]</sup>, 氨基糖苷类钝化酶  $aac(6')$ -Ib 对氨基糖苷类抗菌药物耐药有关的报道较多<sup>[10-11]</sup>, 但  $aac(6')$ -Ib-cr 基因对氨基糖苷类抗菌药物的作用报道较少。

综上所述, 临床中产超广谱  $\beta$ -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 携带率很高, 临床微生物室应加强喹诺酮类耐药基因的检测, 同时应加强消毒隔离措施, 从而预防与控制耐药菌株的暴发流行。

## 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 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.
- 7 张雪青, 陈增强, 陈俐丽, 等. 大肠埃希菌临床分离株 *aac*(6')-Ib-cr 基因的检测. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(7):1266-1268.
  - 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 孙攀, 殷瑜, 陈代杰. *aac*(6')-Ib-cr 介导的喹诺酮类新耐药机制研究进展. *生命科学*, 2009, 21(4):584-588.
  - 10 秦雯, 胡大春, 楚青. 产 ESBLs 大肠埃希菌氨基糖苷类钝化酶基因 *aac*(6')-Ib' 的检测. *中国医疗前沿*, 2009, 4(13):17-19.
  - 11 陈洁, 王卫华, 汪丽, 等. 大肠埃希菌中同时发现携带 *aac*(6')-Ib 及 *aac*(6')-Ib-Cr 氨基糖苷类修饰酶基因. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(6):1064-1067.

(收稿日期:2011-07-26)

(本文编辑:孙荣华)

姜梅杰, 李玉臣, 张福森. 肺炎克雷伯菌质粒介导的喹诺酮类耐药基因 *aac*(6')-Ib-cr 的研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2012, 6(5):426-429.

