

· 基础论著 ·

产质粒介导 AmpC 酶大肠埃希菌 耐药分析及相关机制

王谦 陈燕 程君 王迎迎 叶英 李家斌

【摘要】 目的 了解安徽省 35 所医院自临床分离的 402 株大肠埃希菌产质粒介导 AmpC 酶及对常用抗菌药物的耐药情况,揭示其相关耐药机制,以指导临床合理用药。**方法** 以三维试验筛选产 AmpC 酶株;多重 PCR 检测产质粒介导 AmpC 酶菌株,对产质粒介导 AmpC 酶菌株用 PCR 方法检测超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)基因、I 类整合子基因盒插入序列和主动外排系统 *acrAB-tolC* 基因。**结果** 检出产质粒介导 AmpC 酶菌株 28 株(7.0%),其中两株经测序比对证实为新的质粒 *ampC* 基因型。产酶菌株对常用抗菌药物,除亚胺培南、美罗培南都敏感外,对其他大多数抗菌药物耐药率均高于非产酶株。28 株产酶菌株中有 23 株表现为多重耐药,20 株检测出各型 ESBLs 基因,21 株扩增出 I 类整合子基因盒插入序列,20 株主动外排系统 *acrAB-tolC* 基因阳性。**结论** 产质粒介导 AmpC 酶大肠埃希菌对临床常用抗菌药物的耐药率均较高,多重耐药现象普遍,同时存在多种耐药机制,其中以产生灭活酶和 I 类整合子介导的耐药机制为主。对产酶菌株临床经验用药可选用碳青霉烯类、阿米卡星、四代头孢菌素类抗菌药物。

【关键词】 AmpC 酶;大肠埃希菌;耐药

Resistance and associated resistance mechanism of *Escherichia coli* producing plasmid-mediated AmpC β -lactamases WANG Qian, CHEN Yan, CHENG Jun, WANG Ying-ying, YE Ying, LI Jia-bin. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China
Corresponding author: LI Jia-bin, Email: lijiaabin948@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the production and resistance of plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) and analyze their associated resistance mechanism and guide rational use of antibiotics. **Methods** Three-dimensional extract test was adopted to detect AmpC β -lactamases. The plasmid-mediated AmpC β -lactamases were detected by multiplex PCR. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) gene, inserted gene cassettes of class 1 integrons and active efflux system *acrAB-tolC* gene were amplified by PCR. **Results** Among the 402

基金项目:国家自然科学基金项目(30571654);安徽省自然科学基金项目(070413110)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院感染病科

通讯作者:李家斌 Email:lijiaabin948@sohu.com

isolates collected, 28 (7.0%) produced plasmid-mediated AmpC β -lactamases. DNA sequence analysis confirmed that 2 were novel ampC genes. The resistant rates of AmpC β -lactamase-producing strains against most kinds of antibiotics were higher than the unproducing strains. They were all sensitive to imipenem and meropenem. Among the 28 strains, 23 were multiple-drug resistance, 20 were determined as ESBLs gene positive, 21 as class 1 integrons sequence, and 20 as acrAB-tolC gene. **Conclusions** The resistance rates of AmpC β -lactamase-producing *E. coli* against most kinds of antibiotics reach a high level. The AmpC producers are multiple-drug resistance and there may be several resistance mechanisms, in which class 1 integrons and production of AmpC and ESBLs were the main ones. Carbopenems, amikacin and fourth cephalosporins should be chosen in clinical empirical medication.

【Key words】 AmpC β -lactamases; *Escherichia coli*; Resistance

随着抗菌药物特别是第三代头孢菌素如头孢曲松、头孢噻肟、头孢他啶等在临床上的广泛应用,大肠埃希菌(*E. coli*)作为医院感染的重要致病菌,继产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)之后,又出现了质粒介导的 AmpC 酶,其水解底物范围更广,耐药菌株往往同时携带氨基糖苷类、喹诺酮类、氯霉素、磺胺类等抗菌药物耐药基因,可同时存在多种耐药机制,常呈现多重耐药的特点^[1],给临床抗感染治疗带来困难。本研究通过对安徽省 35 所医院临床分离的 *E. coli* 中产质粒介导 AmpC 酶菌株进行耐药性和相关耐药机制检测,探讨了 *E. coli* 中质粒介导 AmpC 酶菌株在安徽省的流行现状以及可能存在的耐药机制,以指导临床合理用药。

材料和方法

一、菌株

菌株来源:安徽省细菌耐药性监控中心收集安徽省 35 所医院住院和门诊患者的各种临床送检标本,无重复分离株,全部菌株均由美国 DADE 公司的自动鉴定系统(Microscan WalkAway-40)鉴定。质控菌株为 *E. coli* ATCC25922、*E. cloacae* 029M、*E. coli* SHV-5、*E. coli* TEM-26、*E. coli* CIX-M-14、*E. coli* OXA-1。

二、试剂

Mueller-Hinton 琼脂由英国 OXOID 公司提供,受试抗菌药物共 12 种,分别是:哌拉西林由齐鲁制药公司提供;哌拉西林-他唑巴坦由美国 Wyeth-Ayerst 公司提供;头孢西丁由海南海药公司海口制药厂提供;头孢他啶由葛兰素史克制药苏州公司提供;头孢噻肟由华北制药凯瑞特公司提供;头孢曲松由中诺药业公司提供;头孢吡肟由中美上海施贵宝制药公司提供;亚胺培南由杭州默沙东制药有限公司提供;美罗培南由日本住友制药株式会社提供;阿米卡星由上海旭东海普药业公司提供;环丙沙星由广州南新制药有限公司提供;左氧氟沙星由江苏豪森药业股份有限公司提供。

三、药敏试验

采用 MH 琼脂倍比稀释法进行药物敏感试验,药敏判断依据 2005 年 CLSI 推荐的标准^[2]。

(一)产质粒介导 AmpC 酶菌株的检测

1. 产 AmpC 酶菌株的筛选:按 Thomson 等^[3]所描述的方法培养细菌及获得菌体沉淀,并采用超声脉冲破碎法提取细菌菌液,所得菌液于 4℃ 10 000 r/min 离心 20 min 后提取上清液备用。三维试验按标准纸片扩散法进行,将 0.5 麦氏单位浓度 *E. coli* ATCC25922 菌液均匀涂布于 MH 琼脂平皿,取 30 μg 头孢西丁纸片(英国 OXOID 公司)置于平皿中心,用消毒刀片从离纸片边缘 5 mm 处幅射性地由里向外切割四道 15 mm 狭缝,分别加入 40 μl 试验菌株、阳性对照、阴性对照菌株的酶提取物,35℃ 过夜培养,狭缝与抑菌环交接处若出现扩大生长区域,为三维试验阳性。

2. 质粒提取:采用碱裂解法小量提取质粒^[4]。

3. 多重 PCR 扩增质粒介导 AmpC 酶基因及产物测序:引物序列参照 Pérez-Pérez 等^[5]的方法,6 对引物及相应扩增片段长度见表 1。PCR 扩增体系:总体积 50 μl,10 × PCR 缓冲液,0.2 mmol/L dNTP,1.25 U Taq DNA 聚合酶,0.6 μmol/L 的引物 MOXMF、MOXMR、CITMF、CITMR、DHAMF 和 DHAMR;0.5 μmol/L 的 ACCMF、ACCMR、EBCMF、EBCMR;0.4 μmol/L 的 FOXMF 和 FOXMR,100 ng 模板(分别用总 DNA 和质粒提取物),按反应条件 94℃ 预变性 3 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,25 个循环,再 72℃ 延伸 7 min,用德国 Biometra 公司的 T-radiant DNA 扩增仪进行扩增。电泳分离出阳性条带以后,再用 6 对单一引物分别对该模板进行 PCR 反应。以阴沟肠杆菌 29M 模板为阳性对照,*E. coli* ATCC25992 为阴性对照,蒸馏水代替模板作为空白对照。PCR 产物在含 0.5 μg/mL EB 的 1% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像分析系统进行 DNA 片段大小分析。PCR 产物送大连宝生物工程有限公司纯化测序。

表 1 扩增质粒 ampC 基因的引物序列

目的基因	引物	引物序列(从左到右为 5' 到 3')	扩增片段长度(bp)	核苷酸位置(bp)	GenBank 登录号
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 ~ 11	MOXMF	GCTGCTCAAGGACACAGGAT	520	358-378	D13304
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGCTGC		877-856	
LAT-1 ~ 4, CMY-2 ~ 7, BIL-1	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	478-498	X78117
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		939-919	
DHA-1, DHA-2	DHAMF	AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405	1244-1265	Y16410
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		1648-1628	
ACC	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	861-881	AJ133121
	ACCMR	TTGCGCGCAATCATCCCTAGC		1206-1186	
MIR-1T, ACT-1	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	1115-1135	M37839
	EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		1416-1396	
FOX-1 ~ 5b	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	1475-1496	X77455
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		1664-1644	

(二) 产质粒介导 AmpC 酶菌株其他耐药机制的检测

1. ESBLs 基因的扩增: 扩增 SHV 型 ESBLs 基因的引物序列参见文献[6], 扩增 TEM 型, CTX-M 型和 OXA 型 ESBLs 基因的引物序列均是按照 GenBank 提供的模板, 在全编码基因的上下游分别设计引物, 引物序列详见表 2。PCR 扩增体系: 总体积为 50 μ l, 含 10 \times PCR 缓冲液, 0.2 mmol/L dNTP, 引物各 0.1 mmol/L, 1.25 U Taq DNA 聚合酶, 100 ng DNA 模板。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 32 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。标准产酶株 *E. coli* SHV-5, *E. coli* TEM-26, *E. coli* CIX-M-14, *E. coli* OXA-1 为阳性对照。 *E. coli* ATCC25992 为阴性对照, 蒸馏水代替模板作为空白对照, PCR 产物送大连宝生物工程有限公司纯化测序。

表 2 扩增 ESBLs 基因的引物序列

基因名称	引物序列(从左到右为 5' 到 3')	产物长度(bp)
SHV	P1: GCCCGGGTTATTCTTATTGTGCGC P2: TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA	1115
TEM	P1: TTAGACGTCAGGTGGCACTT P2: GGACCGAGTTACCAATGCT	1009
CTX-M	P1: ATGGTTAAAAAATCACTGCGCC P2: TCCCGACGGCTTTCCGCCCTT	833
OXA	P1: TTTTCTGTGTTTGGGTTTT P2: TTCTTGGCTTTTATGCTTG	519

2. I 类整合子基因盒插入序列的扩增: PCR 引物序列参见文献[7]。PCR 扩增体系: 总体积为 50 μ l, 含 10 \times PCR 缓冲液, 0.2 mmol/L dNTP, 引物各 0.1 mmol/L, 1.25 U Taq DNA 聚合酶, 100 ng DNA 模板。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, PCR 产物在含 0.5 μ g/mL EB 的 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像分析系统进行 DNA 片段大小分析。PCR 产物送大连宝生物工程有限公司纯化测序。

3. *acrAB-tolC* 基因的扩增: PCR 引物序列参照文献^[8,9], PCR 扩增体系: 总体积为 50 μ l, 含 10 \times PCR 缓冲液, 0.2 mmol/L dNTP, 引物各 0.1 mmol/L, 1.25 U Taq DNA 聚合酶, 100 ng DNA 模板。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在含 0.5 μ g/mL EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 用天能凝胶成像分析系统进行 DNA 片段大小分析。

结 果

一、药敏试验结果

28 株产质粒介导 AmpC 酶细菌和 374 株非产酶细菌药物敏感结果见表 3, 产酶株除对亚胺培南、美罗培南完全敏感, 对头孢吡肟 (71.4%)、阿米卡星 (78.6%) 较为敏感外, 对头孢西丁、头孢曲松、头孢噻肟、哌拉西林等抗菌药物耐药率均较高 ($\geq 60\%$)。28 株产酶菌中有 23 株同时对青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、喹诺酮类抗菌药物中的两类或两类以上耐药, 表现为多重耐药 (多重

耐药定义为:同时对两类或两类以上抗菌药物耐药^[10])。高产 AmpC 酶菌株的检出率:402 株大肠埃希菌中,139 株(34.6%)耐头孢西丁,其中三维试验阳性 24 株(17.3%,24/139),总阳性率为 6.0%(24/402)。

表 3 28 株产质粒介导 AmpC 酶细菌和 374 株非产酶细菌药物敏感结果

抗菌药物	28 株产酶细菌			374 株非产酶细菌		
	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)
亚胺培南	100	0	0	100	0	0
美罗培南	100	0	0	100	0	0
头孢吡肟	71.4	3.6	25.0	82.1	1.3	16.6
头孢他啶	39.3	10.7	50.0	67.9	8.6	23.5
头孢噻肟	32.1	0	67.9	61.5	0.3	38.2
头孢曲松	28.5	3.6	67.9	37.2	1.6	61.2
哌拉西林-他唑巴坦	42.9	21.4	35.7	82.1	13.9	4.0
哌拉西林	7.2	10.7	82.1	9.6	6.7	83.7
头孢西丁	7.1	0	92.9	67.4	0.2	32.4
阿米卡星	71.4	0	28.6	74.3	1.9	23.8
环丙沙星	53.6	7.1	39.3	28.1	16.3	55.6
左氧氟沙星	50.0	10.7	39.3	64.2	5.0	30.8

二、多重 PCR 分子生物学结果

对 402 株大肠埃希菌质粒 ampC 基因进行多重 PCR 扩增,有 28 株阳性,再分别以提取的质粒为模板用单对引物对阳性株进行 PCR 扩增,结果显示:CIT 阳性 11 株,EBC 阳性 7 株,DHA 阳性 7 株,ACC2 株,MOX1 株,阴性对照和空白对照均未扩增出条带。对 DNA 测序结果进行 BLAST 分析,发现 1 株 CIT 阳性和 1 株 EBC 阳性的 PCR 产物测序结果都是新 ampC 基因型,分别为 CMY 样基因和 MIR 样基因。

三、ESBLs 基因检测结果

28 株产质粒介导 AmpC 酶细菌中,分别检测到 TEM 型 16 株,SHV 型 7 株,CTX-M 型 4 株和 OXA 型 2 株。

四、整合子基因盒插入序列检测结果

28 株产酶菌株中有 21 株 I 类整合子基因盒插入序列阳性,电泳分析发现均含有 650~2000 bp 以上 1~3 种不同大小的整合子扩增片段。抽取部分阳性菌株送测序,测序结果进行 BLAST 分析发现含有:108 bp I 类整合子插入序列,654 bp aar3(编码对利福平耐药基因),690 bp aadA1(编码对四环素耐药基因)和 1009 bp aadA2(编码对氨基糖苷类抗菌药物耐药基因),其中 2000 bp 以上的长片段因测序公司技术限制未得到 DNA 序列。

五、主动外排系统 acrAB-tolC 基因 PCR 扩增结果

28 株产酶菌株中有 20 株检测到片段大小为 1697 bp 的 acrA 表达产物和大小为 510 bp 的 acrB 表达产物,有 8 株检测到片段大小为 1633 bp 的 tolC 表达产物。28 株产酶菌分别存在的耐药机制和相关数据见表 4。

讨 论

质粒介导的 AmpC 酶是近 10 余年来发现的一种新型 C 类 β -内酰胺酶,此类

酶对第 1 至第 3 代头孢菌素、头霉素、氨基糖苷类耐药,外膜蛋白丢失的菌株甚至出现对碳青霉烯类耐药^[11],本实验药敏结果亦显示:产质粒介导 AmpC 酶菌株除对亚胺培南(100%)、美罗培南(100%)完全敏感,对头孢吡肟(71.4%)、阿米卡星(78.6%)较为敏感外,对头孢西丁、头孢曲松、头孢噻肟、哌拉西林等抗菌药物耐药率均较高($\geq 60\%$),对哌拉西林-他唑巴坦的耐药率显著低于哌拉西林,可能与他唑巴坦对 AmpC 酶的轻度抑制作用有关^[1]。产酶株的检出率为 7.0% (28/402),高于国内的其他文献报道^[12],其中又以 CIT、EBC、DHA 型为主,这与国内的其他文献报道相符^[13]。

本实验从产生灭活酶,主动外排系统和近年来研究较多的整合子三个方面对产质粒介导 AmpC 酶菌株的耐药机制进行了初步研究。

表 4 28 株产酶菌分别存在的耐药机制和相关数据

菌株编号	AmpC	ESBLs				Class I integron	主动外排系统		多重耐药
		TEM	SHV	CTX-M	OXA		acrAB	tolC	
1	+	+		+		+	+	+	+
5	+	+				+			+
22	+	+		+		+	+	+	+
50	+	+	+	+			+		+
68	+	+				+	+	+	+
72	+						+	+	
81	+						+	+	
123	+						+		
129	+					+			+
149	+	+				+	+		+
168	+	+	+		+	+	+		+
203	+					+			+
268	+	+				+	+		+
379	+					+			
384	+	+				+	+		+
388	+	+							+
393	+	+				+	+		+
709	+		+			+			+
773	+	+				+	+		+
784	+		+			+			+
852	+	+				+	+		+
881	+						+		
908	+			+		+	+		+
958	+	+	+			+			+
1169	+		+		+		+	+	+
1176	+	+	+			+	+	+	+
1180	+					+	+	+	+
1439	+	+				+	+		+

注: + 表示阳性

28 株产质粒介导 AmpC 酶大肠埃希菌 ESBLs 的检测结果显示:同时产 AmpC 酶和 ESBLs 及同时产两种或两种以上 ESBLs 菌株的检出率分别为 68% 和 25%。ESBLs 中以产 TEM 型为主,其次为 SHV 和 CTX-M, OXA 型最少。整合子是近年来新发现的一种介导细菌耐药基因转移的转座元件,能介导耐药基因盒在染色体、质粒及转座子之间移动,从而导致耐药菌的传播。迄今为止,在整合子中已发现 60 多种耐药基因盒,其中最常见的是编码对氨基糖苷类抗菌药物耐药的基因

(*aadA*), 编码对磺胺类抗菌药物耐药的基因(*df*r)和编码对氯霉素耐药的基因(*cat*)。在本试验 28 株产酶菌株中 I 类整合子检出率 75% (21/28), 检测到最多的基因盒为 *aadA*, 其编码的氨基糖苷钝化酶基因可导致对氨基糖苷类抗菌药物耐药。以上两种耐药机制的检出率均高于国内其他文献报道^[12,14], 原因可能为: 入选菌株以耐药和多重耐药菌为主; 抗菌药物使用的地区性差异造成; 随时间推移, 检出率有上升趋势。

在大肠埃希菌中主动外排系统以 AcrAB-TolC 系统为主, 其由 AcrA、AcrB 和 TolC 蛋白构成一个三聚体复合物, 在其中央存在一个贯通内外膜的孔道, 是药物外排的最直接途径, 通过复合物构象的改变, 孔道可以定期开放或闭合, 因而能够同时产生针对有机溶剂、染料、去污剂以及多种抗菌药物(如氯霉素、红霉素、四环素等)的高水平多重耐药。在 AcrAB-TolC 系统中 TolC 是一类多功能蛋白, 基因研究证实 TolC 是 AcrAB 实现功能不可或缺的部分, 但由于 TolC 和 AcrAB 分别由不同的启动子启动, 因而存在 TolC 突变和缺失的可能, TolC 突变能完全改变 AcrAB 依赖的大肠埃希菌的耐药表型, 而当 TolC 基因缺失时, 细菌对药物的敏感性将显著增加^[15], 本试验 28 株产酶株中, 有 20 株 AcrAB 基因阳性, 只有 8 株 TolC 基因阳性, 大部分 AcrAB 基因阳性菌存在 TolC 蛋白缺失现象, 说明本研究中大肠埃希菌 AcrAB-TolC 系统多存在功能缺失现象, 不是实验菌株多重耐药产生的主要原因。

从以上可以看出, 产酶菌多同时存在两种或两种以上耐药机制, 且这些菌株多表现为多重耐药, 这就造成耐药机制和耐药表型的关系较为复杂, 一种耐药机制可引起对多种抗菌药物耐药, 如主动外排系统和整合子介导的耐药机制均可引起对氯霉素和氨基糖苷类抗菌药物耐药; 同时一种耐药表型可对应多种耐药机制, 如耐氨基糖苷类抗菌药物可由产生氨基糖苷钝化酶引起亦可因主动外排系统将药物泵出所致。可见, 细菌的耐药机制日趋复杂, 可同时存在多种耐药机制的介入, 使耐药菌表现为多重耐药, 给临床抗菌药物的选择造成很大压力, 因此需采取多种控制对策: 临床医师要严格、合理、规范的使用抗菌药物; 建立全国性或地区性的耐药检测网, 对细菌的耐药性变迁进行及时有效的检测, 以指导临床医师用药, 同时对于部分耐药率较高($\geq 60\%$)的药物要加以限制使用; 研制开发新型抗菌药物, 尤其对于多重耐药菌, 从基因水平研究其多重耐药调节机制, 增加多重耐药调节子抑制基因的表达, 减少耐药调节子正调基因的表达, 将成为解决细菌多重耐药的可行办法。

参 考 文 献

- 1 Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46:1-11.
- 2 Wayne P. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/ NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, America, 2005, 25:1.
- 3 Thomson KS, Mejglo ZA, Pearce GN, et al. 3-Dimensional susceptibility testing of beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Che*

- mother, 1984, 13:45-54.
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold spring Harbor Laboratory Press, America, 1992, 2:19.
 - 5 Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol, 2002, 40:2153-2162.
 - 6 Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, et al. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44:1438-1442.
 - 7 陆坚, 唐英春, 吴本权, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶临床分离株可转移多重耐药分子机制的研究. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26:199-202.
 - 8 Touze T, Eswaran J, Bokma E, et al. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. Mol Microbiol, 2004, 53:697-706.
 - 9 Moreira MA, Oliveira JA, Teixeira LM, et al. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. Vet Microbiol, 2005, 109:75-81.
 - 10 Hofmann J, Cetron MS, Farley MM, et al. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. N Engl J Med, 1995, 333:481-486.
 - 11 Bradford PA, Urban C, Mariano N, et al. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41:563-569.
 - 12 黄长武, 梅雪芬, 李兴绿. 大肠埃希菌 AmpC 酶及 ESBLs 检测与耐药性分析. 中国抗生素杂志, 2005, 30: 686-688.
 - 13 彭少华, 刘素玲, 程文娟, 等. 大肠埃希菌产质粒介导 AmpC 酶现状和基因型研究. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6: 73-76.
 - 14 顾兵, 童明庆, 刘根焰, 等. 整合子介导大肠埃希菌和克雷伯菌多重耐药机制的研究. 中华检验医学杂志, 2006, 29: 725-729.
 - 15 Zgurskaya HI, Nikaido H. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:7190-7195.

(收稿日期:2007-07-12)

(本文编辑:李国力)