

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):458-467; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

多重耐药大肠杆菌耐药基因与整合子遗传标记基因间的相关性

韩冬青, 黄俊伟, 尚忠波, 徐荣, 楼永良*, 陈秀枢*

温州医学院检验医学院与生命科学学院, 微生态学研究所, 温州 325000

摘要:【目的】对多重耐药大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 临床株的 β -内酰胺酶类 (β -lactamases, BLs) 和氨基糖苷钝化酶类 (aminoglycoside modifying enzymes, AMEs) 耐药基因与 I-III 类整合子遗传标记基因之间的相关性进行研究。【方法】采用 VITEK-GNS 药敏卡测定 136 株 *E. coli* 对 14 种抗菌素的敏感性; 纸片扩散法确认超广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs) 产酶株; PCR 法检测 BLs、AMEs 相关耐药基因及 I-III 类整合子遗传标记基因; 接合传递试验和质粒提取对 16S rRNA 甲基化酶基因进行初步定位。【结果】136 株多重耐药的 *E. coli* ESBLs 产生率高达 70.59% (96/136), 产酶株对氨苄西林、庆大霉素、妥布霉素、亚胺培南和哌拉西林/他唑巴坦以外的其余 9 种抗菌素的耐药率显著高于非产酶株 ($P < 0.05$)。BLs 耐药基因总检出率为 96.32% (131/136), 1 株外膜通道蛋白 *oprD₂* 基因缺失, AMEs 耐药基因总检出率为 100% (136/136), I 类整合子遗传标记基因 *qacE Δ 1-sul1* 的检出率为 94.12% (128/136), 未检出 II 类与 III 类整合子基因。BLs 基因和 AMEs 基因与 *qacE Δ 1-sul1* 遗传标记基因的同时携带率分别为 90.44% (123/136) 和 94.12% (128/136), 两类同时携带率之间的差异不具统计学意义 ($P > 0.05$), 上述两类耐药基因与 *qacE Δ 1-sul1* 遗传标记基因的三者同时携带率为 90.44% (123/136)。此外, 还检出 16S rRNA 甲基化酶基因 12 株 (8.82%), 其中, *armA* 与 *rmtB* 的检出率分别为 2.21% 和 7.35%, 未检出 *rmtA*、*rmtC* 和 *rmtD*。接合试验与质粒图谱结果初步表明: *armA* 和 *rmtB* 编码基因位于约 23 kb 的质粒上, 其耐药质粒在同种菌间的传递率高达 83.3% (10/12)。【结论】多重耐药 *E. coli* 临床株的 BLs 基因、AMEs 基因与 *qacE Δ 1-sul1* 遗传标记基因三者同时携带率高达 90.44%, 表明多重耐药的形成在三者间具有密切的相关性; 实验结果还显示: *E. coli* 临床株的多重耐药性形成和传播与 II 和 III 类整合子基因无关。另外, 16S rRNA 甲基化酶基因携带率为 8.82% (*armA* 2.21% 和 *rmtB* 7.35%), 并初步证明 *armA* 和 *rmtB* 编码基因位于约 23 kb 的质粒上, 其耐药质粒在同种菌间的传递率高达 83.3% (10/12)。

关键词: 大肠埃希菌, 多重耐药, β -内酰胺酶, 氨基糖苷钝化酶, 整合子

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0458-10

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 是临床重要的条件致病菌, 近年来, *E. coli* 对 β -内酰胺类和氨基糖苷类等常用抗菌素的多重耐药现象日趋严重。相关研究表明, β -内酰胺酶 (β -lactamases, BLs) 与氨基糖

苷钝化酶 (aminoglycoside modifying enzymes, AMEs) 的产生是导致其耐药性的主要机制, 且屡见报告^[1-3], 另外, 外膜通道蛋白 *oprD₂* 基因的缺失及 16S rRNA 甲基化酶的产生也是导致该菌对上述抗

基金项目: 国家“863 计划” (2003AA215072)

* 通信作者。陈秀枢, Tel/Fax: +86-871-5369161, E-mail: bull_chen@126.com; 楼永良, Tel/Fax: +86-577-86699200, E-mail: lyl@wzmc.net

作者简介: 韩冬青 (1981-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事临床抗生素耐药研究。E-mail: handongqing1122@163.com

收稿日期: 2010-09-06; 修回日期: 2010-12-08

菌素耐药性形成与传播的重要因素^[4-5]。而且, BLs 和 AMEs 基因的种类多样且频现变异,尤其是多重耐药现象的传播与蔓延,已引起学术界和社会公众的广泛关注^[6-7]。本研究以多重耐药 *E. coli* 临床株为研究对象,对涉及 BLs 的 12 种耐药基因、外膜通道蛋白 oprD₂ 基因、AMEs 相关的 13 种耐药基因、16S rRNA 甲基化酶相关的 5 种耐药基因,以及导致耐药基因在同种菌或不同菌属间传播并形成多重耐药性的 I-III 类整合子遗传标记基因进行比较全面的检测与评价,旨在对多重耐药 *E. coli* 临床株的耐药表型、耐药基因携带特点与传播效率、及其与整合子遗传标记基因之间的相关性进行研究。报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:从温州医学院附属第一医院微生物科 2004 年 1 月 - 2008 年 12 月间收集的 2000 余株革兰阴性菌临床株中筛检出 136 株多重耐药的 *E. coli*。标本来源分别为:尿液 65 株、痰液 19 株、血液 9 株、脓液 13 株、引流液 11 株、创面 6 株、腹水 3 株、胆汁 2 株、导管液 2 株、脑脊液 1 株及其他 5 株。全部菌株均经 VITEK-60 全自动微生物鉴定系统重复鉴定确认。大肠埃希菌 ATCC25922 与肺炎克雷伯杆菌 ATCC700603 作为药敏试验质控菌。

1.1.2 主要试剂和仪器:庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星标准品购自中国药品生物制品检定所;药敏纸片购自英国 OXOID 公司;ExTaq 酶、DNA 纯化回收试剂盒、DNA Marker 和质粒小量提取试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司;VITEK-60 全自动微生物分析仪购自法国生物梅里埃公司;凝胶成像分析系统 (Gene Genius) 购自英国 Syngene 公司;PCR 仪 (MyCycler TM) 购自美国 BIO-RAD 公司。

1.1.3 引物:PCR 扩增引物序列见表 1。

表 1 耐药基因 PCR 扩增引物

Table 1 Primers used for PCR amplifications of resistance genes

genes	sequence(5'→3')	product /bp	GenBank accession No. or reference
<i>β</i> -lactamase genes			
TEM	P1: AGGAAGAGTATGATTCAACA P2: CTCGTCGTTTGGTATGGC	535	[8]
SHV	P1: GGTATGCGTTATATTAATC P2: TTAGCGTTGCCAGTGCTC	867	[9]
CTX-M	P1: CGCTTTGCGATGTGCAG P2: ACCGCGATATCGTTGGT	550	[10]
OXA -10	P1: GTCTTTC (A/G) AGTAGGGCATT P2: GATTTTCTTAGCGGCAACTTA	822	[8]
PER	P1: AGTCAGCGGCTTAGATA P2: CGTATGAAAAGGACAATC	978	[8]
VEB	P1: GCGGTAATTTAACCAGA P2: GCCTATGAGCCAGTGTT	961	[8]
GES	P1: ATGCGCTTCATTCACGCAC P2: CTATTTGTCCGTGCTCAGG	846	[8]
CARB	P1: AAAGCAGATCTTGTGACCTATTC P2: TCAGCGGACTGTGATGTATAAAC	588	[8]
IMP	P1: GAAGCGTTTATGTTTCATAC P2: GTAAGTTTCAAGAGTGATGC	587	[8]
VIM	P1: ATTCCGGTCCG (A/G) GAGGTCCG P2: GAGCAAGTCTAGACCGCCCG	633	[8]
DHA	P1: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT P2: CCGTACGCATACTGGCTTGC	405	[8]
PSE	P1: AATGGCAATCAGCGCTTC P2: GCGCGACTGTGATGTATA	700	[10]
outer membrane protein gene			
oprD2	P1: GCGCATCTCCAAGACCATG P2: GCCACGCGATTTGACGGAG	193	[8]
aminoglycoside modifying enzyme genes			
aac (3) - I	P1: ACCTACTCCCAACATCAGCC P2: ATATAGATCTCACTACGCCG	169	[11]

续表 1

genes	sequence(5'→3')	product /bp	GenBank accession No. or reference
aac (3)-II	P1: ACTGTGATGGGATACGCGTC P2: CTCGGTCAGCGTTTCAGCTA	237	[11]
aac (3)-III	P1: CACAAGAACGTGGTCGGCTA P2: AACAGGTAAGCATCCGCATC	185	[11]
aac (3)-IV	P1: CTTCAGGATGGCAAGTTGGT P2: TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	286	[11]
aac (6')-I	P1: TATGAGTGGCTAAATCGA P2: CCGGCTTCTCGTAGCA	394	[11]
aac (6')-II	P1: TTCATGTCCGGAGCACCCC P2: GACTCTTCGGCCATCGCTCT	178	[11]
aac (6') / aph(2'')	P1: CCAAGAGCAATAAGGGCATA P2: CACTATCATAACCACCTACCG	220	[11]
aph(3')-III	P1: GCCGATGTGGATTGGGAAAA P2: GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	292	[11]
aph(3')-VI	P1: ATACAGAGACCACCATAACAGT P2: GGACAATCAATAATAGCAAT	234	[11]
ant (3'')-I	P1: TGATTTGCTGGTTACGGTGAC P2: CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	284	[11]
ant (2'')-I	P1: GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG P2: CTGTTACAACGGACTGGCCGC	320	[11]
ant (4',4'')	P1: GCAAGGACCGACAACATTTT P2: TGGCACAGATGGTCATAACC	165	[11]
ant (6)-I	P1: ACTGGCTTAATCAATTTGGG P2: GCCTTTCGGCCACCTCACCG	597	[11]
16S rRNA methylase genes			
armA	P1: ATGGATAAGAATGATGTTGTTAAG P2: TTATTCTGAAATCCACTAGTAATTA	774	[12]
rmtA	P1: CCTAGCGTCCATCCTTTCTC P2: AGCGATATCCAACACACGATGG	315	[12]
rmtB	P1: ATGAACATCAACGATGCCCTC P2: TTATCCATTCTTTTTTATCAAGTATA T	756	[12]
rmtC	P1: ATGAAAACCAACGATAATTATC P2: TTACAATCTCGATACGATAAAAATAC	846	[12]
rmtD	P1: ATGAGCGAACTGAAGGAAAAACTGCT P2: TCATTTTCGTTTCAGCACGTA AACAG	744	[12]
genetic marker genes of integrons			
qacEΔI-sulI	P1: TAGCGAGGGCTTTACTAAGC P2: ATTCAGAATGCCGAACACCG	300	[8]
Int2	P1: ATGACGGTAAGGGTGGGA P2: GCTGGAGGGAAGACAAAC	202	HM043577
int3	P1: GCCTGTTCTGGGTGTTTCC P2: CCGTGTAGATCATCGTCGTCT	258	AY219651

1.2 药物敏感试验

采用 VITEK-GNS 药敏卡测定 136 株大肠埃希菌对 14 种抗菌素的敏感性,按 VITEK AMS 规定的方法进行,药物包括氨苄西林 (AMP)、头孢他啶 (CAZ)、头孢曲松 (CRO)、头孢唑啉 (CFZ)、氨苄西林/舒巴坦 (SAM)、哌拉西林/他唑巴坦 (TZP)、亚胺培南 (IPM)、环丙沙星 (CIP)、左旋氧氟沙星 (LVX)、复方新诺明 (SXT)、氨基糖苷类 (ATM)、庆大霉

素 (GEN)、妥布霉素 (TOB) 和 AMK (阿米卡星)。药敏试验结果参照 CLSI2009 版标准判断。

1.3 菌株 ESBLs 检测

采用头孢他啶及头孢他啶/克拉维酸,头孢噻肟及头孢噻肟/克拉维酸药敏纸片组合法检测 ESBLs 产酶株,上述药敏纸片贴于涂布受试菌的 MH 平皿上,纸片间距 ≥ 24 mm,35℃ 孵育 24 h 后测量抑菌环,任一组药物抑菌环的直径相差 ≥ 5 mm 时,判断

为 ESBLs 阳性菌株。大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC700603 作为药敏质控菌。

1.4 PCR 模板制备

采用蛋白酶 K 消化法提取细菌基因组 DNA 作为 PCR 模板。挑取经纯培养的 3 - 5 个菌落至 0.5 mL 的 EP 管中(内含 200 ng/mL 的蛋白酶 K 溶液 200 μ L), 56 $^{\circ}$ C 水浴 2h, 改置 95 $^{\circ}$ C 水浴中灭活 10 min, 再冰浴 5 min, 21920 \times g 离心 30 s。上清即为基因检测模板, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 耐药基因与 I - III 类整合子遗传标记基因检测

均采用 PCR 法进行基因检测, 靶基因 PCR 扩增体系均为: 采用 20 μ L 反应体系, 扩增条件、(PCR 产物长度 > 500 bp) 为: 93 $^{\circ}$ C 2 min; 93 $^{\circ}$ C 60s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。当 PCR 产物长度 < 500 bp 时, 除变性、退火为 30 s 外, 其他条件相同。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析与确认, 其纯化产物送大连 TaKaRa 公司测序, 测序结果与 GenBank 已登录的序列比对。

1.6 16S rRNA 甲基化酶阳性菌株的接合传递与质粒提取

以 16S rRNA 甲基化酶阳性菌株为供体菌, 以耐叠氮化钠的大肠埃希菌 J53 为受体菌, 进行接合

传递试验, 具体方法参照文献[13]进行。按照大连 TaKaRa 公司质粒小量提取试剂盒说明书提取 16S rRNA 甲基化酶基因阳性菌株和接合子的质粒, 并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测质粒特征。

2 结果

2.1 药敏试验与 ESBLs 检测结果

本组 136 株 *E. coli* 菌耐药性表型特征是对 AMP、CRO、SAM、CIP、SXT、GEN 等 3 类以上抗菌素同时耐药(亦是定义其多重耐药的依据), 其中, 除对 AMP 和 TOB 100% 耐药以外, 对其他 12 种抗生素的耐药率由高到低依次为: GEN 99.26%、SXT 90.44%、LVX 89.70%、CIP 88.24%、CFZ 82.35%、ATM 79.41%、CRO 78.68%、SAM 76.47%、CAZ 69.85%、AMK 28.67%、TZP 7.35% 和 IPM 0.74%。ESBLs 的检测结果: 产酶株 96 (96/136, 70.59%), 非产酶株 40 (40/136, 29.41%)。耐药性表型结果显示: 产酶组和非产酶组对 AMP、GEN、TOB、IMP 及 TZP 的耐药率不具统计学差异 ($P > 0.05$), 而对其余 9 种抗菌素的耐药率, 产酶组显著高于非产酶组 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 ESBLs 产酶株和非产酶株的 *E. coli* 对 14 种抗生素的耐药率 (%)

Table 2 Prevalence of resistance to 14 antibiotics (%) among ESBLs-producing and non-producing isolates

antibiotics	ESBLs-producing isolates (96)		ESBLs-non-producing isolates (40)		X^2	P
	number of isolates	prevalence /%	number of isolates	prevalence /%		
AMP	96	100.00	40	100.00	—	—
CRO	96	100.00	11	27.50	86.96	<0.05
CFZ	95	98.96	17	42.50	56.45	<0.05
CAZ	88	91.67	7	17.50	76.99	<0.05
ATM	94	97.92	14	35.00	75.81	<0.05
SAM	79	82.29	25	62.50	13.11	<0.05
TZP	5	5.21	4	10.00	1.42	>0.05
IPM	1	1.04	0	0.00	0.42	>0.05
GEN	96	100.00	39	97.50	2.42	>0.05
TOB	96	100.00	40	100.00	—	—
AMK	35	36.46	4	10.00	14.03	<0.05
CIP	91	94.79	29	72.50	13.52	<0.05
LVX	91	94.79	31	77.50	9.14	<0.05
SXT	90	93.75	33	82.50	4.13	<0.05

2.2 耐药基因检测结果

受试菌中, β -内酰胺酶类、氨基糖苷钝化酶类相关耐药基因与 I 类整合子遗传标记基因 *qacE Δ I-sulI* 的阳性率分别为 96.32% (131/136)、100% (136/136) 和 94.12% (128/136), 但是, 未检出 II、

III 类整合子基因。其中, 131 株 β -内酰胺酶基因阳性菌中, TEM、CTX-M、DHA 和 VIM 基因检出率分别为 90.44%、58.09%、8.82% 和 4.41%, 并检出 1 株外膜通道蛋白 *oprD₂* 基因缺失菌株, 值得注意的是未检出 SHV、OXA、PER、VEB、GES、CARB、IMP 和

PSE 耐药基因;实验结果的另一特点是 136 株受试菌均检出 AMEs 基因,除未检出 *aph(3')*-VI 基因外,其余 12 种 AMEs 相关基因均有检出,其检出率范围为 2.21% - 97.79%,其中,检出率较高的基因型依次为:*aac(3)*-II 97.79% (133/136)、*aac(6')*-I 91.92% (125/136)、*ant(2'')*-I 80.88% (110/136) 和 *ant(3'')*-I 58.82% (80/136);另外,在 12 株 16S rRNA 甲基化酶基因阳性 (8.82%) 菌株中,*armA* 与 *rmtB* 的检出率分别为 2.21% 和 7.35%,未检出 *rmtA*、*rmtC*、*rmtD*;值得关注的是 *qacEΔ1-sul1* 遗传标记基因检出率为 94.12% (128/136)。*qacEΔ1-sul1*、*armA* 和 *rmtB* 的 PCR 产物经测序并与 GenBank 已登录的序列比对,结果一致(注册号分别为:AB117519、EF158300、GQ856539)。

基因检测结果显示:在 136 株菌中,有 58.09%

(79/136) 的菌株同时携带 2 种或 2 种以上的 BLs 相关耐药基因,其中以 TEM 与 CTX-M 的共存为主,占 52.94% (72/136);而同时携带 2 种或 2 种以上 AMEs 相关耐药基因的菌株占 98.53% (134/136),其中,同时携带 *aac(3)*-II、*aac(6')*-I、*ant(2'')*-I 和 *ant(3'')*-I 4 种基因的菌株为 44.85% (61/136),占绝对优势;另外,结果还表明 TEM、CTX-M、*aac(3)*-II、*aac(6')*-I、*ant(3'')*-I、*ant(2'')*-I 和 *qacEΔ1-sul1* 的共存占 11.03% (15/136);TEM、*aac(3)*-II、*aac(6')*-I、*ant(3'')*-I、*ant(2'')*-I 和 *qacE Δ1-sul1* 的共存占 8.09% (11/136);TEM、CTX-M、*aac(3)*-II、*aac(6')*-I、*ant(2'')*-I 和 *qacEΔ1-sul1* 的共存占 8.09% (11/136)。上述 3 种多基因共存的总检出率为 27.21% (37/136),结果见表 3。

表 3 136 株大肠埃希菌 β-内酰胺酶、氨基糖苷钝化酶及整合子遗传标记基因型检测结果

Table 3 Patterns and frequencies of genotypes of β-lactamase, aminoglycoside modifying enzyme and genetic marker of integrons in 136 *E. coli* isolates

groups	β-lactamase genes				aminoglycoside modifying enzyme genes											genetic marker genes of integrons	number of isolates	prevalence /%		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	G	K	L	M	N	O				P	Q
1	+	+				+				+			+	+				+	15	11.03
2	+					+				+			+	+				+	11	8.09
3	+	+				+				+			+					+	11	8.09
4	+					+		+		+			+					+	4	2.94
5	+					+							+	+				+	3	2.21
6	+	+		+		+				+			+	+				+	3	2.21
7	+					+				+			+	+				+	3	2.21
8	+					+		+		+								+	3	2.21
9	+	+				+				+			+					+	3	2.21
10	+					+				+								+	3	2.21
11	+	+				+				+								+	2	1.47
12		+				+				+			+	+				+	2	1.47
13	+	+				+				+			+					+	2	1.47
14	+	+				+				+	+		+	+				+	2	1.47
15	+	+	+			+				+			+					+	2	1.47
16	+	+		+		+				+			+					+	2	1.47
17	+	+				+				+			+	+				+	2	1.47
other* +	The detected genotypes were not displayed																62	45.59		

A: TEM, B: CTX-M, C: VIM, D: DHA, E: *aac(3)*-I, F: *aac(3)*-II, G: *aac(3)*-III, H: *aac(3)*-IV, I: *aac(6')*-I, J: *aac(6')*-II, K: *aph(3')*-III, L: *ant(3'')*-I, M: *ant(2'')*-I, N: *ant(6)*-I, O: *aac(6')* / *aph(2'')*, P: *ant(4',4'')*, Q: *qacEΔ1-sul1*. * This group covered all the remaining 62 strains that carried different resistant genotype separately. Among them, 38 strains carried TEM and CTX-M while 21 strains carrying *aac(3)*-II, *aac(6')*-I, *ant(3'')*-I and *ant(2'')*-I concurrently. However, each isolate showed a characteristic pattern and frequency of the genotype which was not shared by all other strains.

2.3 16S rRNA 甲基化酶阳性菌株的接合传递与质粒提取结果

在检出的 12 株 16S rRNA 甲基化酶阳性菌株中,有 10 株菌通过接合试验成功地将 16S rRNA 甲

基化酶基因传递给受体菌,接合传递成功率高达 83.3% (10/12),其中 1 株为 *armA* 阳性株,9 株为 *rmtB* 阳性株。质粒图谱显示:12 株阳性供体菌都具有大小为 0.6 - 27.8 kb、数量为 2 - 9 个不等的质

粒,但是,其共性是都含有约 23 kb 的质粒(图 1-A);提取 10 株接合子的质粒与对应的供体菌质粒进行基因图谱比对发现,除第 5、6 和 11 号菌株携带多个质粒外(与供体菌携带质粒相近),其余菌株只含有 1 个 23 kb 大小的质粒(图 1-B)。

基因与 I 类整合子基因之间的相关性结果为: AMEs、BLs 耐药基因与 I 类整合子遗传标记基因 *qacEΔ1-sulI* 的同时携带率分别为 94.12% (128/136) 和 90.44% (123/136),二者之间不具统计学差异($P > 0.05$);而上述 3 类基因的同时携带率亦为 90.44% (123/136)。表 4 为显示的结果。II 和 III 类整合子基因阳性对照 PCR 产物电泳见图 2,该结果证明:本实验中用于 II 类和 III 类整合子基因检测的引物具有预期的特异性和灵敏度。

表 4 AMEs 和 BLs 耐药基因与 *qacEΔ1-sulI* 遗传标记基因的同时携带率 (n = 136)

Table 4 The co-existence prevalence of AMEs genes, BLs genes and *qacEΔ1-sulI*

genes	number of positive isolates	<i>qacEΔ1-sulI</i> (+)	prevalence /%
AMEs genes	136	128	94.12
BLs genes	131	123	90.44
AMEs and BLs genes	131	123	90.44

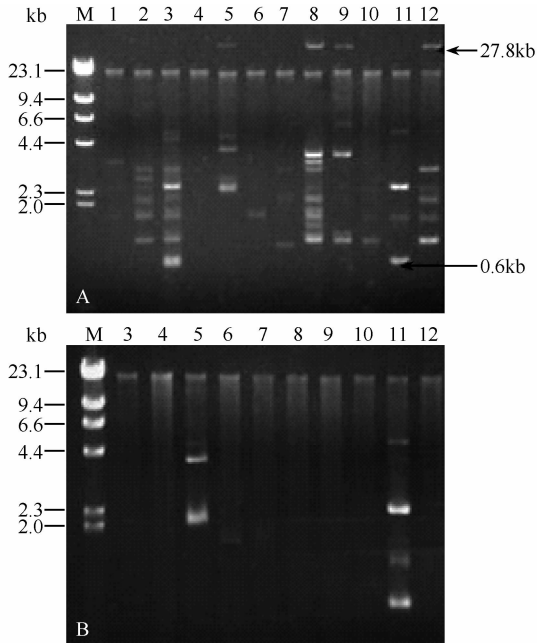


图 1 12 株供体菌 (A) 和 10 株接合子 (B) 质粒图谱

Fig. 1 Plasmids isolated from 12 donor strains (A) and 10 conjugants (B). M: Marker; Fig. 1-A: 1: isolate carrying *armA* and *rmtB*; 2-3: isolates carrying *armA*; 4-12: isolates carrying *rmtB*; Fig. 1-B: 3: isolates carrying *armA*; 4-12: carrying *rmtB*.

2.4 BLs 和 AMEs 基因与 I - III 类遗传标记基因的相关性

在本组实验中, I 类整合子遗传标记基因 *qacEΔ1-sulI* 的阳性率为 94.12% (128/136),但是,未检出 II、III 类整合子基因。其中, AMEs、BLs 耐药

3 讨论

近年来,多重耐药的 *E. coli* 已成为医院内感染的重要病原菌,其对各种常用抗菌药物的普遍耐药性已经引起学术界和社会各界的高度重视,尤其是最近报告 *E. coli* 临床株的新型广谱耐药机制如 NDM-1 (新型金属 β -内酰胺酶) 已经引起世界范围的关注^[6-7]。在本组 136 株多重耐药的 *E. coli* 中,其耐药性表型特点是:都表现出对 AMP、CRO、SAM、CIP、SXT、GEN 等 3 类以上抗菌素的同时耐药现象,并显示出对绝大部分 β -内酰胺类、氨基糖苷类及喹诺酮类等常用抗菌药物的较高或普遍耐药性,尤其值得注意的是,对称之为广谱复方耐酶抗菌

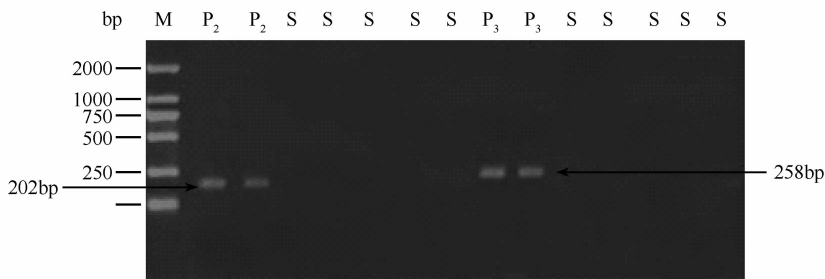


图 2 II 类和 III 类整合子标记基因 PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products for Class II and III integrons. M: Marker; P₂: positive control for Class II integronase; P₃: positive control for Class III integronase; S: sample.

素的氨苄西林/舒巴坦(SAM)耐药率高达76.47%(104/136),对哌拉西林/他唑巴坦(TZP)耐药率7.35%(10/136),同时,还检出1例亚胺培南(IPM)耐药株。而这些对广谱耐酶抗菌素的耐药株是否携带NDM-1基因,尚待进一步研究。

在本组实验菌株中,值得注意的是共检出 β -内酰胺酶(BLs)相关基因阳性菌131株,检出率高达96.32%(131/136),其中TEM、CTX-M、DHA和VIM检出率分别为90.44%(123/136)、58.09%(79/136)、8.82%(12/136)和4.41%(6/136),而未检出SHV、OXA、PER、VEB、GES、CARB、IMP和PSE,该结果与国内一些地区和东南亚一些国家报告的趋势相近^[14-18],即,在*E. coli*菌株中BLs相关耐药基因以TEM和CTX-M为主,亦存在一定的差异性,尤其是在SHV的检出方面,我们未检出SHV,而台湾地区则以SHV与CTX-M为主^[19],该结果初步表明耐药基因型与标本来源和地区差异有关。另外,还检出ESBLs产酶菌96株(70.59%、96/136),亦与文献^[18]报告的77.0%相近,但是,明显高于Basak S等于2009年报道的*E. coli*的ESBLs产酶率为41.3%^[20],显著地高于北美和欧洲一些国家的产酶率,且在ESBLs基因型流行趋势方面也存在较大的差异性,如加拿大以SHV型和CTX-M型ESBLs为主,美国以SHV型为主,极少有关产CTX-M型ESBLs菌株的报道^[21],在欧洲这3种类型的ESBLs都普遍存在,且CTX-M型有趋向于占主导的趋势^[22],而本组的研究结果显示,96株产酶菌以TEM和CTX-M型ESBLs为主,与2010年姚蔚等报告的以SHV型的存在为主的结果有一定的差异^[23]。实验还证实ESBLs产酶株对AMP、GEN、TOB、IMP和TZP以外的其余9种抗菌素的耐药率显著高于非产酶株($P < 0.05$)。

氨基糖苷钝化酶(Aminoglycoside modifying enzymes, AMEs)主要包括:使该类药物分子中游离氨基乙酰化的乙酰转移酶(Aminoglycoside acetyltransferases, AAC)、使游离羟基磷酸化的磷酸转移酶(Aminoglycoside phosphotransferases, APH)和游离羟基核苷化的核苷转移酶(Aminoglycoside nucleotidyltransferases, ANT),而这3类酶家族都具有若干同工酶,其总数已高达50种以上^[24]。近年来,关于16S rRNA甲基化酶的耐药机制也受到重视,该酶主要是使菌体内的药物作用靶位—30S核

糖体的16S rRNA亚单位甲基化,导致药物无法与16S rRNA结合而耐药,其耐药特征是对绝大部分的氨基糖苷类药物呈现高水平耐药, MIC可高达512-1024 mg/L,目前,已经陆续在革兰阴性菌中发现了*armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*和*npmA*6种16S rRNA甲基化酶基因,能分别编码相对应的6种甲基化酶^[5,25-28]。本组实验菌株的AMEs相关耐药基因检出率为100%,除*aph(3')-VI*未检出外,其他12种AMEs编码基因均有检出,检出率范围为2.21%-97.79%,其中,以*aac(3)-II*(97.79%)、*aac(6')-I*(91.92%)、*ant(2'')-I*(80.88%)和*ant(3'')-I*(58.82%)的检出率居高,另外,还检出16S rRNA甲基化酶基因携带菌12株(8.82%),明显高于Wu Q等于2009年报告的在*E. coli*中的检出率3.3%^[5],其中,*armA*和*rmtB*的检出率分别为2.21%与7.35%,即呈现出*rmtB*是16S rRNA甲基化酶的优势基因,并检出1株同时携带*armA*和*rmtB*两种基因菌株,未检出*rmtA*、*rmtC*和*rmtD*。鉴于16S rRNA甲基化酶是一种相对新型的耐药机制,且在*E. coli*临床株中的携带率尚不高^[5],故,我们对其进行接合试验,结果:12株阳性供体菌中,有10株成功地将16S rRNA甲基化酶基因传递给受体菌(耐叠氮化钠的大肠埃希菌J53),其传递率高达83.3%(10/12),并初步认定该基因位于约23kb的质粒上,这种同种菌间的高传递率结果提示,对这种耐药机制的认识、流行性监控和预防是有重要意义的。

在多种抗菌素应用选择压力下,携带多种、不同耐药基因的多重耐药菌株越来越引起人们的关注。表3结果显示,有58.09%的菌株同时携带2种或2种以上的BLs耐药基因,其中,以TEM与CTX-M的共存为优势共存,占52.94%,该结果不仅说明在*E. coli*菌株中BLs相关耐药基因以TEM和CTX-M为主^[14-18],亦表明这2种基因的共存也是其流行趋势之一;而同时携带2种或2种以上AMEs耐药基因的菌株占98.53%,其中,尤其值得注意的是,*aac(3)-II*、*aac(6')-I*、*ant(2'')-I*和*ant(3'')-I*4种基因的共存占44.85%,该结果表明多重耐药菌株可同时携带多个AMEs耐药基因并呈现出多个基因优势共存现象。结果还显示TEM、CTX-M、*aac(3)-II*、*aac(6')-I*、*ant(3'')-I*、*ant(2'')-I*和*qacE Δ I-sul1*的共存占11.03%;TEM、*aac(3)-II*、*aac(6')*-

I、*ant* (3")- I、*ant* (2")- I 和 *qacEΔI-sull* 的共存占 8.09% ; TEM、CTX-M、*aac* (3)- II、*aac* (6')- I、*ant* (2")- I 和 *qacEΔI-sull* 的共存占 8.09% ,其总检出率为 27.21% ,该结果表明多重耐药菌株携带不同类别的耐药基因具有优势组合模式,这些优势组合模式是否会进一步传播和蔓延值得重视。

整合子(integron)是一系列遗传元件构成的能够识别和捕获移动性基因盒的位点特异性重组系统。包括位点特异性重组功能的基因决定簇,在整合酶的作用下识别并俘获或删除移动性基因盒,且在位于整合子上游的启动子作用下得以表达,并通过结合性质粒、转座子、整合型噬菌体在同种和不同种菌属间传播,所以,整合子是细菌尤其是革兰阴性菌多重耐药迅速传播的重要原因^[29],目前,将其分为 I - III类,尤以 I 类整合子为常见^[30,31]。在本组实验菌株中,检出 I 类整合子 *qacEΔI-sull* 阳性菌 128 株,检出率高达 94.12% ,未检出 II 类和 III 类整合子基因,其中, I 类整合子 *qacEΔI-sull* 基因, AMEs 和 BLs 相关基因的同时携带率为 90.44% ,该结果表明 I 类整合子与 AMEs、BLs 相关耐药基因及其多重耐药性之间具有的密切的相关性。同时,鉴于 *qacEΔI-sull* 基因能够介导细菌对磺胺类药物、多种消毒剂包括对季胺类(苯扎溴铵、苯扎氯铵、度米芬)、双胍类(氯己定)等的耐药性,因此,该结果对院内感染的控制与强化常规消毒措施等亦具有参考价值。

参考文献

- [1] Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, Pascual A. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain; second nationwide study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(8): 2840-2845.
- [2] O'Keefe A, Hutton TA, Schifferli DM, Rankin SC. First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolates from dogs and cats in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(8): 3489-3492.
- [3] Huang ZM, Shan H, Mi ZH, Yang HY, Wu L, Chu QJ, Qin L. Analysis on 16S rRNA methylase genes and aminoglycoside modifying enzymes genes in *Enterobacter cloacae* in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2008, 29(4): 369-373.
- [4] Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, Livermore DM, Woodford N. Efflux pumps, OprD porin, AmpC β-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, 54(5): 2219-2224.
- [5] Wu Q, Zhang Y, Han L, Sun J, Ni Y. Plasmid-Mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(1): 271-272.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase - United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2010, 59(24): 750.
- [7] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson Andrew, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(8): 597-602.
- [8] 明德松, 庄建良, 苏智军, 张志珊, 谢尊金. 全耐铜绿假单胞菌 40 种耐药相关基因的研究. *中华医院感染学杂志 (Chinese Journal of Nosocomiology)*, 2009, 19(23): 3160-3163.
- [9] Kim MH, Lee HJ, Park KS, Suh JT. Molecular characteristics of extended-spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the prevalence of qnr in extended-spectrum β-lactamase isolates in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Medical Journal*, 2010, 51(5): 768-774.
- [10] Lee S, Park YJ, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, Kang MW. Prevalence of Ambler class A and D β-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 56(5): 122-127.
- [11] 糜祖煌, 陆亚华. 氨基糖苷类修饰酶及其基因检测. *现代实用医学 (Modern Practical Medicine)*, 2004, 16(1): 13-14.
- [12] 林宁, 孙海平, 糜祖煌. 多重耐药大肠埃希菌 16S rRNA 甲基化酶、氨基糖苷类修饰酶基因研究. *中国*

- 抗生素杂志 (*Journal of Chinese Antibiotics*), 2008, 33 (9): 536-539.
- [13] 韩玲, 聂大平. 革兰阴性菌中 16S rRNA 甲基化酶基因的检测. 中国感染与化疗杂志 (*Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*), 2009, 9(4): 267-271.
- [14] Zhang Z, Guo X, Zhang Q. Prevalence characterization of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in Zhengzhou. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2009, 23(6): 404-407.
- [15] Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2008, 41(5): 428-432.
- [16] Severin JA, Mertaniasih NM, Kuntaman K, Lestari ES, Purwanta M, Lemmens-Den Toom N, Duerink DO, Hadi U, van Belkum A, Verbrugh HA, Goessens WH. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Surabaya, Indonesia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(3): 465-469.
- [17] Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. *Indian Journal of Medical Research*, 2009, 129(6): 695-700.
- [18] Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(8): 2818-2824.
- [19] Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Shyr JM, Wan JH, Liu YC, Chuang YC, Yang YC, Tsao SM, Wu HH, Wang LS, Lin TP, Wu HM, Chen HM, Wu JJ. Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(5): 1861-1864.
- [20] Basak S, Mallick SK, Bose S. Extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in a rural hospital. *Journal of the Indian Medical Association*, 2009, 107(12): 855-858.
- [21] Bush K. Extended-spectrum b-lactamases in North America, 1987-2006. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, 14 (1): 134-143.
- [22] Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, 14 (1): 144-153.
- [23] 姚蔚, 钱菊娣, 项领, 张寿国, 李劲松. ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯杆菌整合子分布及其与 ESBL 基因关系研究. 中国微生态学杂志 (*Chinese Journal of Microecology*) 2010, 22(6): 509-513.
- [24] Serpersu EH, Ozen C, Wright E. Studies of enzymes that cause resistance to aminoglycosides antibiotics. *Methods in Molecular Medicine*, 2008, 142: 261-271.
- [25] Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Genetic environments of the rmtA gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(6): 2069-2074.
- [26] Folster JP, Rickert R, Barzilay EJ, Whichard JM. Identification of the aminoglycoside Resistance determinants armA and rmtC among *Non-Typhi Salmonella* isolates from humans in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(10): 4563-4564.
- [27] Yamane K, Rossi F, Maria Goreth MA. Barberino, Adams-Haduch JM, Doi Y, Paterson DL. 16S ribosomal RNA methylase RmtD produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61(1): 746-760.
- [28] Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(12): 4401-4409.
- [29] Labbate M, Case RJ, Stokes HW. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 532: 103-125
- [30] Sánchez-Martínez G, Garza-Ramos UJ, Reyna-Flores FL, Gaytán-Martínez J, Lorenzo-Bautista IG, Silva-Sánchez J. In169, a new class I integron that encoded bla (IMP-18) in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Mexico. *Archives of Medical*

Research, 2010, 41(4): 235-239.

nosocomials strains. *Revista médica de Chile*, 2010, 138

[31] Guzmán M, Alonso G. Characterization of the variable region within class I integrons in *Klebsiella pneumoniae*

(3): 322-329.

Co-existence of resistance genes and their association with the genetic marker of integrons among multi-resistant *Escherichia coli* isolates

Dongqing Han, Junwei Huang, Zhongbo Shang, Rong Xu, Yongliang Lou*, Xiushu Chen*

School of Clinical Laboratory and Life Science, Institute of Microecology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

Abstract: [**Objective**] To investigate co-existence of resistance genes (β -lactamases, BLs, and aminoglycoside-modifying enzymes, AMEs) and their association with the genetic marker genes of Class I, II, III integrons carried by multiresistant *Escherichia coli* isolates. [**Methods**] We used VITEK-GNS to determine the susceptibility of 136 isolates to 14 antibiotics, disc agar diffusion test to confirm ESBL-producing isolates, PCR to analyze BLs, AMEs and integrons genes, conjugation and plasmids extraction to locate the methylase genes. [**Results**] We found that 70.59% of the isolates produced ESBLs. They showed stronger resistance against 9 antibiotics than isolates without ESBLs in 14 antibiotics. PCR amplification showed that the positive rate of BLs, AMEs and *qacE Δ 1-sulI* was 96.32%, 100% and 94.12%, respectively, but Class II, III integrons genes were negative. Only one strain was *oprD2* gene negative. 90.44% of the isolates were both positive for BLs and *qacE Δ 1-sulI* genes, and 94.12% for AMEs and *qacE Δ 1-sulI* genes, but there was no statistical significance. 90.44% of the isolates were all positive for the 3 genes. 12 strains carried 16S rRNA methylase genes including *armA* (2.21%), *rmtB* (7.35%) while *rmtA*, *rmtC*, *rmtD* were negative. The conjugation assay and plasmids mapping results showed that the methylase genes were located on the 23 kb plasmid, and the efficiency of transformation was 83.3%. [**Conclusions**] The results suggested that there was a tight correlation between the 3 genes (BLs, AMEs and *qacE Δ 1-sulI*) and the incidences of multi-resistance of *Escherichia coli*, but there was no correlation of the incidence of multi-resistance with Class II, III integrons. 16S rRNA methylase genes harboured plasmids of ~23 kb which transformed other isolates within the same strains efficiently.

Keywords: *Escherichia coli*, multiresistance, Beta-lactamses, aminoglycoside-modifying enzymes, integron

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Program for High Technology Research and Development of China (2003AA215072)

* Corresponding authors. Xiushu Chen, Tel/Fax: +86-871-5369161, E-mail: bull_chen@126.com; Yongliang Lou, Tel/Fax: +86-577-86699200, E-mail:lyl@wzmc.net

Received: 6 September 2010/ Revised: 8 December 2010