

肺炎克雷伯菌氨基糖苷类修饰酶耐药基因研究

叶春枚^{1,2} 刘文恩¹

1 中南大学湘雅医院 长沙 410008;2 长沙市中医医院(市八医院) 长沙 410001

摘要:目的 检测肺炎克雷伯菌氨基糖苷类修饰酶的分布,探讨肺炎克雷伯菌对氨基糖苷类药物耐药机制。**方法** 收集中南大学湘雅医院 2009 年 1 月至 2009 年 7 月间非重复肺炎克雷伯菌 96 株,所有菌株采用法国梅里埃公司的全自动微生物鉴定系统 VITEK -2 的革兰阴性菌 GN 卡鉴定和 AST GN-13 卡进行药敏分析。采用 PCR 法对氨基糖苷类修饰酶基因 *aac(3)-I*、*aac(6')-Ib*、*ant(3'')-I*、*aph(3')-VIa* 进行检测。**结果** 经 PCR 扩增及测序分析,96 株肺炎克雷伯菌中有 18.8% 的菌株携带 *aac(3)-I* 基因(18/96)、57.3% 的菌株携带 *aac(6')-Ib* 基因(55/96)、3.1% 的菌株携带 *ant(3'')-I* 基因(3/96),未扩增出 *aph(3')-VI* 基因。**结论** 在湖南地区发现 *aac(3)-I*、*aac(6')-Ib*、*ant(3'')-I* 型氨基糖苷类修饰酶基因,氨基糖苷类修饰酶基因以 *aac(6')-Ib* 为主。是肺炎克雷伯菌对氨基糖苷类药物高水平耐药的主要机制之一。

关键词:肺炎克雷伯菌,氨基糖苷类修饰酶,PCR

Study on drug resistance genes of aminoglycosides modifying enzymes among *Klebsiella pneumoniae*

YE chun-mei^{1,2}, LIU wen-en¹

1 Xiangya Hospital of Central South University Changsha 410008;2 The traditional hospital of Changsha(the eighth hospital of Changsha).Changsha 410001

Abstract:Objective To investigate the drug resistance and detect aminoglycosides modifying enzymes in *Klebsiella pneumoniae* from Xiangya Hospital of Central South

Corresponding author: LIU wen-en Email: liuwenen@gmail.com

通讯作者:刘文恩 Email: liuwenen@gmail.com

作者简介:叶春枚,女 出生年月:1973.8 民族:汉族,籍贯:湖南省澧县,职称:副主任技师,研究方向:细菌的耐药机制分析

University. **Methods** 96 non-repetitive clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* strains were collected from Xiangya hospitals of Central South University in January 2009 to July 2009. aminoglycosides modifying enzymes (aac(3)- I 、aac(6')- I b、ant(3'')- I 、 aph(3')-VIa) was detected by PCR.. **Result** Among aminoglycosides modifying enzymes isolates of *Klebsiella pneumoniae* through PCR amplification,aac(3)- I 、aac(6')- I b and ant(3'')- I isolates accounted for 18.8%、57.3% and 3.1% respectively.aac(6')- I b is the most common genotype.The prevalence of aac(6')- I b in ciprofloxacin-resistant and susceptible Isolates were 79.1% (19/24) and 50% (36/72) . Through Chi-Square Tests , the difference was statistically significant ($\chi^2=6.26$, $P<0.05$) . **Conclusion** aac(3)- I 、aac(6')- I b、ant(3'')- I aminoglycosides modifying enzymes had emerged for the first time in Human Province , aac(6')- I b is the most common genotype. It may play an important role in Aminoglycosides resistance.

Key words:*Klebsiella pneumoniae*, aminoglycosides modifying enzymes, PCR

克雷伯氏菌属为周围环境及人呼吸道的常居菌群，也是常见的机会致病菌。其中以肺炎克雷伯菌最为多见，它广泛的分布在水、土壤、环境及动物体内，能引起婴儿的严重肠炎，亦致肺炎、脑膜炎、败血症、外伤感染及成人的医源性尿道感染。随着抗生素的广泛使用，肺炎克雷伯菌的分离率和耐药性逐渐增加 [1,2]。

多重耐药革兰杆菌对氨基糖苷类抗生素耐药机制较复杂，对氨基糖苷类抗菌药物的耐药机制主要有细菌产生针对药物的氨基糖苷类修饰酶(AMEs)，导致抗菌药物失活等[3]，为研究肺炎克雷伯菌的耐药性及耐药机制，笔者对临床分离的 96 株肺炎克雷伯菌进行氨基糖苷类修饰酶耐药基因检测，现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源：（1）临床菌株：收集中南大学湘雅医院 2009 年 1 月至 2009 年 7 月住院病人临床标本中分离的非重复肺炎克雷伯菌 96 株。保存于脱脂牛奶管中，放于-70℃冰箱。（2）质控菌株：肺炎克雷伯菌 ATCC700603 来

自中国菌种保存中心,主要用于质量控制。

1.1.2 抗菌药物：庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星购自中国药品生物制品检定所。

采用琼脂稀释法对肺炎克雷伯菌进行三种氨基糖苷类抗菌药物最低抑菌浓度（MIC）的测定，按照美国临床实验室标准化委员会(*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) 2009 年标准操作。

1.1.3 试剂：MasterMixPCR 扩增试剂购自北京天根生化科技有限公司。琼脂培养基和脱脂牛奶粉购自英国 OXOID 公司。氨基糖苷类修饰酶基因引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。DNA Marker I(100-600bp)购自北京天根生化科技有限公司。EB 替代品染料购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.1.4 仪器：HABAID PCR 扩增仪购自英国 HABAID 公司、DYY-III-5 型电泳仪购自北京市六一仪器厂、VITEK-2 细菌鉴定仪购自法国生物梅里埃公司、YS2-H 显微镜购自日本 Nikon 公司、GDS-8000 凝胶成像系统购自美国 UVP 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养鉴定及药敏：肺炎克雷伯菌培养根据《全国临床检验操作规程》第三版常规方法进行。所有菌株采用法国梅里埃公司的全自动微生物鉴定系统 VITEK-2 的革兰阴性菌 GN 卡鉴定和 AST GN-13 卡进行药敏分析。

1.2.2 氨基糖苷类修饰酶基因 PCR 扩增:引物序列参照文献^[4]获得，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列见表 1。PCR 为 50μl；DNA 模板 2μl,2×MasterMIX25μl(10mM) Tris-HCL(PH8.3),50mM KCl,1.5mM MgCL₂,250uM dNTP each,0.05U Polymerase/μl,dd H₂O，其他稳定剂和增强剂), 10μmmol/l 引物各 2μl,灭菌双蒸馏水补足 50μl。PCR 扩增条件：95℃预变性 5 分钟，然后 94℃变性 30s, 47℃退火 30 s，72℃延伸 1 分钟，35 个循环，最后 72℃延伸 5 分钟。

1.2.3 PCR 产物测序：由上海生工生物工程有限公司应用 ABI3700 自动测序仪分别进行测序，测序结果提交网站（www.ncbi.nlm.nih.gov）进行比对。

表 1 氨基糖苷类修饰酶 PCR 扩增引物序列和目的产物长度

基因名称	引物序列	产物长度
------	------	------

aac(3)- I	5'ACCTACTCCCAACATCAGCC3'	158bp
	5'ATATAGATCTCACTACGCGC 3'	
aac(6')- I b	5'ACCTACTCCCAACATCAGCC 3'	395bp
	5'ATATAGATCTCACTACGCGC3'	
ant(3'')- I -	5'TGATTTGCTGGTTACGGTGAC3'	284bp
	5'CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG3'	
aph(3')-VIa	5'ATACAGAGACCACCATACAGT	234bp
	3'	
	5'GGACAATCAATAATAGCAAT3'	

2 结果

2.1 氨基糖苷类抗菌药物敏感性结果

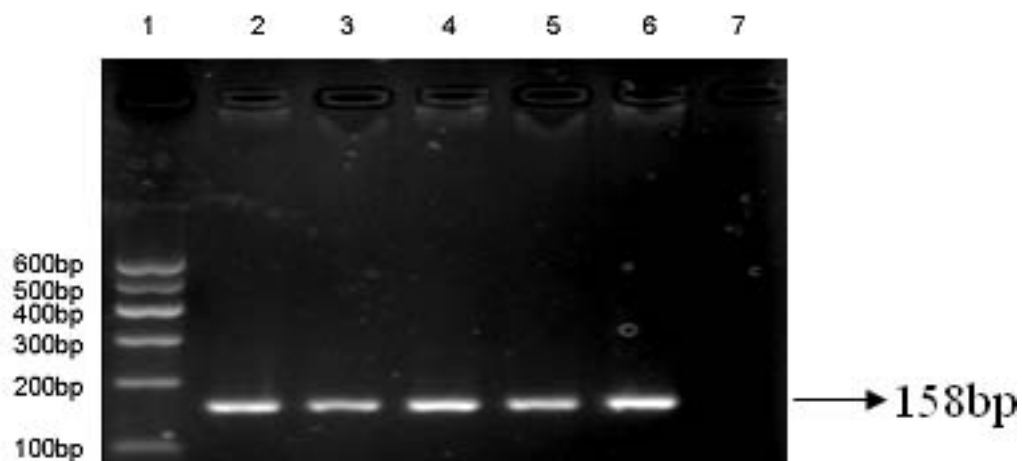
通过琼脂稀释法对三种氨基糖苷类药物的 MIC 检测，结果显示阿米卡星、庆大霉素及妥布霉素的 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 分别为 256μg/ml 和>512μg/ml、512μg/ml 和>512μg/ml、512μg/ml 和>512μg/ml，其耐药率分别是 21.9%，63.5%，41.7%。见表 2。

表 2 96 株肺炎克雷伯菌对三种氨基糖苷类抗菌药物的 MICs 结果(μg/ml)

抗菌药物名称	敏感折点	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC 范围	耐药率%
阿米卡星	S≤16, R≥64	256	>512	0.5~1024	21.9%
庆大霉素	S≤4, R≥16	512	>512	2~1024	63.5%
妥布霉素	S≤4, R≥16	512	>512	0.5~1024	41.7%

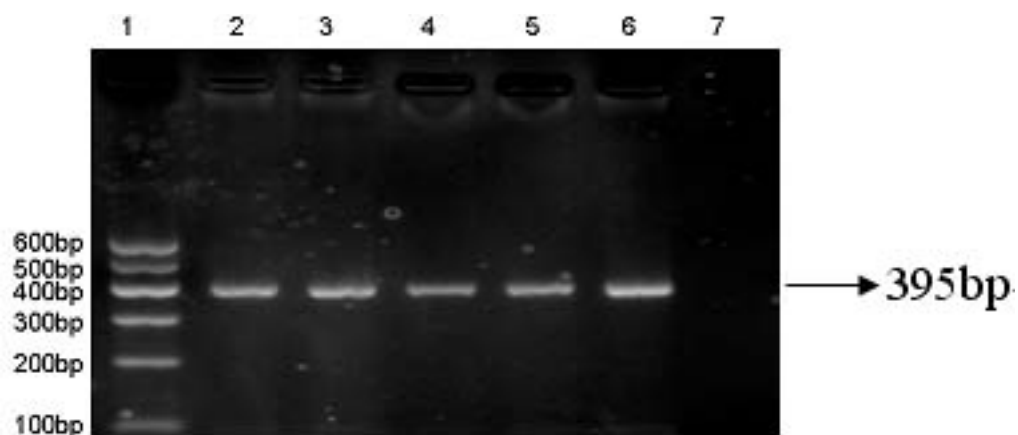
2.2 96 株肺炎克雷伯菌氨基糖苷类修饰酶 AMEs 基因检测结果

96 株肺炎克雷伯菌应用 PCR 方法分别对 aac(3)- I 、aac(6')- I b、ant(3'')- I 和 aph(3'')-VI进行扩增,共获得三种氨基糖苷类修饰酶基因，分别为 18 株（18.8%，18/96） aac(3)- I 、55 株（57.3%，55/96）aac(6')- I 、3 株（3.1%，3/96）ant(3'')- I ，未扩增出 aph(3'')-VI基因。扩增产物电泳结果见图 1、图 2、图 3。耐药基因构成见表 3。共 62 株携带氨基糖苷类修饰酶基因，其中 48 株菌携带一种基因型，14 株菌携带有两种基因型。



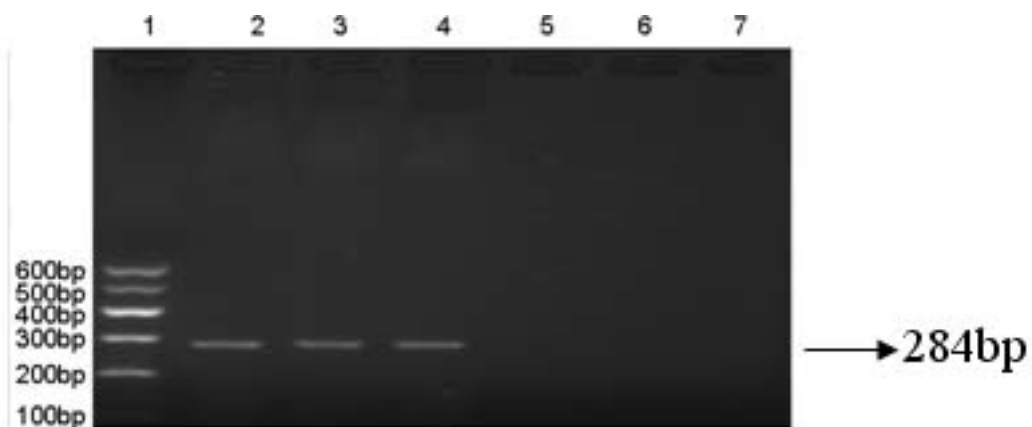
注 1 : DNA Marker I (100-600bp), 2、3、4、5、6 : 为阳性结果 7: 阴性对照

图 1 aac(3)-I 基因的 PCR 产物电泳图



注: 1: DNA Marker I (100-600bp), 2、3、4、5、6: 阳性结果, 7: 阴性对照

图 2 aac(6')-I b 基因的 PCR 产物电泳图



注 1: DNA Marker I (100-600bp), 2、3、4: 阳性结果, 5、6: 阴性结果, 7: 阴性对照

图 3 ant(3'')-I 基因的 PCR 产物电泳图

表 3 氨基糖苷类修饰酶耐药基因构成表

耐药表型	株数	构成比 (%)
aac(3)- I "	18	23.68
aac(6')- I b	55	72.37
ant(3")- I	3	3.95
aph(3")-VI	0	0

3 讨论

氨基糖苷类修饰酶（AMEs）是氨基糖苷类抗生素最主要的耐药机制。AMEs作用于氨基糖苷类抗生素特定的氨基或羟基，使抗生素发生钝化，降低或丧失对靶位核糖体的亲和力，使细菌在抗生素存在的情况下仍能存活^[5]。不同的AMEs识别的抗生素位点也不同，因此每种修饰酶有自己特异性的修饰底物，一般只介导一种或者几种结构相似的抗生素耐药。氨基糖苷类修饰酶为三大类:氨基糖苷乙酰转移酶(AAC)是主要的修饰酶其促使乙酰CoA特定地转移到1, 3, 2', 6'氨基取代位点。氨基糖苷类抗生素与核糖体A位点结合，从而破坏密码子一反密码子解码机制。这样引起了翻译精确度下降，产生了畸形蛋白质。氨基糖苷核苷酸转移酶(ANT)，使游离羟基核苷化。这些酶转移三磷酸核苷部分的单磷酸核苷到抗生素的羟基基团上。氨基糖苷磷酸转移酶(APH)，抗生素的磷酸化明显影响其与核糖体A位点结合能力。APH是一种利用ATP作为第二底物，且能磷酸化所有氨基糖苷类抗生素的羟基酶。

国外有关肺炎克雷伯菌AMEs基因研究报道较多，调查显示欧洲肠杆菌的耐药常与AAC(3)- II，AAC(6')- I，ANT(2")有关，研究表明耐药基因型存在地域差异，AAC(3)- II 主要在南非出现，AAC(6')- I 流行很广，Liang C等学者^[6]报道在肺炎克雷伯菌中检出基因主要是aac(3)- II、aac(6') - I b、ant(3")- I 共三种氨基糖苷类修饰酶基因。本研究表明，aac(3)- I、aac(6')- I b、ant(3")- I 为肺炎克雷伯菌主要修饰酶基因型，以AAC(6')- I b占主导地位，本研究检出了aac(3)- I，国内的研究大多未检出aac(3)- I，提示与其他地域在氨基糖苷类修饰酶耐药基因的流行情况存在一定差异。

对96株肺炎克雷伯菌的耐药基因型和耐药表型进行比较发现，在62株耐药基因阳性菌株中，有59株均有至少一种氨基糖苷类耐药。20株未检出耐药基因

的菌株对所有氨基糖苷类药物全部敏感。有17株不能对应，其中未测出氨基糖苷类修饰酶的14菌株对阿米卡星，妥布霉素，庆大霉素有不同程度的耐药，这可能是存在其他耐药机制例如16s rRNA甲基化酶^[7]；可能由其他耐药机制(如外排泵，外膜蛋白)等引起的耐药，也不能排除有新的耐药机制的可能^[8]。另3株测出阳性基因，但三种氨基糖苷类抗菌药物表现为敏感，这可能与AMES基因的表达程度，细菌的产酶量和不同抗菌药物的抗菌活性及其对酶的稳定性差异所致。

综上所述，本研究通过对96株肺炎克雷伯菌的氨基糖苷类修饰酶基因进行检测，掌握了本院分离到的肺炎克雷伯菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药的主要基因型，通过细菌的耐药表型我们可以推测其基因型，同样，我们也可以根据所检测到的基因型推测其耐药表型。因此，加强肺炎克雷伯菌的氨基糖苷类修饰酶基因检测，能够更好地指导本院临床医生选用抗菌药物，控制肺炎克雷伯菌感染。

参考文献:

- [1] 张霞, 张国龙, 张歌等. 肺炎克雷伯菌耐药基因的检测及流行病学研究. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(24): 6001-6003.
- [2] 祝慧华, 姚金元, 董通雨等. 2011 年-2013 年肺炎克雷伯菌医院感染及耐药性分析. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(4): 58-589.
- [3] Shi W F, Jiang J P, Mi Z H . Relationship between antimicrobial resistance and amino glyco side-modifying enzyme gene expressions in *Acinetobacter baumannii* [J]. ChinMed J, 2005, 118(2): 141-145.
- [4] 糜祖煌, 黄支密, 秦玲. 鲍氏不动杆菌耐药性和氨基糖苷类修饰酶基因研究. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(9): 968-971.
- [5] Serpersu EH, Ozen C, Wright E. Studies of enzymes that cause resistance to aminoglycosides antibiotics. Methods Mol Med, 2008, 42:261-271.
- [6] Liang C, Xing B, Yang X, et al. Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance on *Klebsiella pneumonia* in a hospital in China. Int J Clin Exp Med. 2015, 8(1):1381-1385.
- [7] Miró E, Grünbaum F, Gómez L, et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the

plasmids implicated in their diffusion. Microb Drug Resist, 2013, 19(2) :94-99.

[8] 张伍, 周勇军.产ESBLs和AmpC肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性监测.实用预防医学,2013 ,20(4) :470-473.