

· 实验室研究 ·

肺炎克雷伯菌临床分离株中出现 16S rRNA 甲基化酶基因 *rmtB*

黄支密 康祖煌 储秋菊 单浩 熊春林 邹玉秀 夏守慧 秦玲

【摘要】 目的 了解临床分离肺炎克雷伯菌中 16S rRNA 甲基化酶基因、氨基糖苷类修饰酶 (AMEs) 基因存在状况及其遗传学背景。方法 在 2005 年 9 月至 2006 年 4 月间从住院患者中分离 25 株肺炎克雷伯菌, 采用聚合酶链反应及序列分析的方法分析 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因 (*armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *npmA*)、6 种 AMEs 基因 [*aac*(3)-I、*aac*(3)-II、*aac*(6')-I、*aac*(6')-II、*ant*(3')-I、*ant*(2')-I]、3 类整合子 (I、II、III 类) 遗传标记整合酶基因 (*intI1*、*intI2*、*intI3*)、汞离子还原酶基因 *merA* (为转座子 Tn21 和 Tn501 共同的遗传标记)、*tnpA* 基因 (为转座子 Tn1、Tn2、Tn3 和 Tn1000 共同的遗传标记)。结果 25 株中, 有 5 种基因 *rmtB*、*aac*(3)-II、*aac*(6')-I、*ant*(3')-I、*intI1* 阳性, 阳性株数 (%) 分别为 15 株 (60.0%)、1 株 (4.0%)、12 株 (48.0%)、15 株 (60.0%)、24 株 (96.0%), 其余 12 种基因均阴性; 6 种 AMEs 基因总阳性率为 84.0% (21/25)。结论 临床分离的肺炎克雷伯菌中 *rmtB* 基因和 AMEs 基因阳性率均较高, 在肺炎克雷伯菌中检出 *rmtB* 基因为中国大陆地区首次报道。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; 16S rRNA 甲基化酶; 基因

Emergence of 16S rRNA methylase gene *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates from the inpatients in Zhejiang province, China HUANG Zhi-mi*, MI Zu-huang, CHU Qiu-ju, SHAN Hao, XIONG Chun-lin, ZOU Yu-xiu, XIA Shou-hui, QIN Ling. *Microbiology Laboratory, the 98th Hospital of People's Liberation Army, Huzhou 313000, China

【Abstract】 Objective To investigate the presence and genetic background of 16S rRNA methylase gene and Aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) genes in *Klebsiella pneumoniae* isolated from the People's Liberation Army 98th Hospital, Huzhou district, Zhejiang province, China. **Methods** 25 strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated from the inpatients between September, 2005 and April, 2006. 6 kinds of 16S rRNA methylase gene (including *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* and *npmA*), 6 kinds of AMEs genes [including *aac*(3)-I, *aac*(3)-II, *aac*(6')-I, *aac*(6')-II, *ant*(3')-I and *ant*(2')-I], *intI1*, *intI2*, *intI3*, mercuric reductase gene *merA* (*merA* gene were the collective genetic markers of transposons of Tn21 and Tn501) and *tnpA* (*tnpA* gene were the collective genetic markers of transposons of Tn1, Tn2, Tn3 and Tn1000) were analyzed by PCR and verified by DNA sequencing. **Results** In 25 strains of *Klebsiella pneumoniae*, the positive rate of genes of *rmtB*, *aac*(3)-II, *aac*(6')-I, *ant*(3')-I and *intI1* were 60.0% (15/25), 4.0% (1/25), 48.0% (12/25), 60.0% (15/25) and 96.0% (24/25), respectively. The rest 12 kinds of genes were all tested negative. The total positive rate of 6 kinds of AMEs gene was 84.0% (21/25). **Conclusion** There were very high positive rate on both genes of *rmtB* and AMEs genotypes in *Klebsiella pneumoniae* isolated from inpatients, and this was the first report of the emergence of 16S rRNA methylase gene *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* identified in Zhejiang province, China.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; 16S rRNA methylase; Gene

肺炎克雷伯菌是医院感染的常见病原菌, 对包括氨基糖苷类、广谱β-内酰胺类、氟喹诺酮类在内的常用抗菌药物呈现多重耐药性日趋严重, 甚至出现对碳青霉烯类抗生素耐药的临床分离株, 导致抗菌

感染治疗相当困难^[1,2]。氨基糖苷类抗生素通过与细菌 30S 核糖体的 16S rRNA 亚单位结合, 导致读码错误, 干扰蛋白质合成从而阻止细菌生长^[3], 并有破坏细菌细胞膜完整性的作用, 系静止期杀菌剂。革兰阴性杆菌对氨基糖苷类抗生素产生(交叉)耐药的主要机制除了菌株产生一种或多种针对抗生素的氨基糖苷类修饰酶 (aminoglycoside modifying

作者单位: 313000 湖州, 解放军第九十八医院检验科 (黄支密、储秋菊、单浩、熊春林、邹玉秀、夏守慧); 无锡市克隆遗传技术研究所 (康祖煌、秦玲)

enzymes, AMEs)外,在近年来的研究中又发现了另一种新的重要耐药机制,即细菌通过编码产生一类特殊的 16S rRNA 甲基化酶如 *ArmA*^[4-6]、*RmtA*^[7]、*RmtB*^[5,8,9]、*RmtC*^[10]、*RmtD*^[11] 和 *NpmA*^[12] 而保护氨基糖苷类抗生素的主要作用靶位 16S rRNA,引起几乎对所有氨基糖苷类抗生素耐药,并引起高度关注。我国台湾地区及比利时、巴西已在肺炎克雷伯菌中发现 16S rRNA 甲基化酶基因 *arma*^[5,13]、*rmtB*^[5]、*rmtD*^[14]。16S rRNA 甲基化酶基因与 AMEs 基因一样,均可由可移动遗传元件如质粒、整合子介导,能水平传播。为了解临床分离的肺炎克雷伯菌中 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因(*arma*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *npmA*)、AMEs 基因和整合子存在状况及其遗传学背景,采用分子生物学技术进行了研究。

材料与方法

1. 菌株来源及鉴定:25 株试验菌株均分离自解放军第九十八医院 2005 年 9 月至 2006 年 4 月住院患者送检的 25 份标本,分别来自痰液 15 份,尿液 4 份,创伤伤口分泌物 3 份,咽拭子、静脉血、脑脊液各 1 份。25 株菌分别来自 6 个病区,其中 18 株分离自创伤患者送检的不同种类标本:痰液 8 份,尿液 4 份,创伤伤口分泌物 3 份,咽拭子、静脉血、脑脊液各 1 份。采用法国 BioMérieux 公司 API 20 E 系统鉴定菌种。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、大肠埃希菌 ATCC35218(由浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所俞云松教授惠赠)、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

2. 药敏试验:系微量肉汤法。采用 BioMérieux 公司产品 ATB[®]G-5 药敏试验板,共测试 20 种抗菌药物,分别为阿莫西林(AMO)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、哌拉西林(PIC)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、替卡西林(TIC)、替卡西林/克拉维酸(TCC)、头孢噻吩(CFT)、头孢西丁(CXT)、头孢唑肟(CXM)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MER)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、妥布霉素(TOB)、奈替米星(NET)、复方新诺明(TSU)、环丙沙星(CIP)。根据(CLSI)/NCCLS(2005 年版)标准规定的临界值判定药敏结果^[15]。

3. ESBLs 表型确证试验:参照文献[15]进行。药敏纸片头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟、

头孢噻肟/克拉维酸为 OXOID 公司产品, M-H 琼脂为 BioMérieux 公司产品。

4. 细菌处理:采用蛋白酶 K 消化法制备 DNA 扩增模板。挑纯培养菌落置入 0.5 ml 离心管内(内预置 200 ng/ml 蛋白酶 K 溶液 200 μl),56℃ 水浴 2 h,改 95℃ 水浴 10 min,加入 Chelex-100 40 μl,离心(15 000 r/min)30 s。上清液即为基因检测的模板液,-20℃ 冰箱保存备用。

5. 耐药基因检测:均采用 PCR 法^[9]。共检测 17 种基因,分别为:6 种 16S rRNA 甲基化酶基因(*arma*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *npmA*)、6 种氨基糖苷类修饰酶(AMEs)基因 [*aac*(3)-I、*aac*(3)-II、*aac*(6′)-I、*aac*(6′)-II、*ant*(3′)-I、*ant*(2′)-I]、3 类整合子(I、II、III 类)遗传标记整合酶基因(*intI1*、*intI2*、*intI3*)、汞离子还原酶基因 *merA*(为转座子 Tn21 和 Tn501 共同的遗传标记)、*tnpA* 基因(为转座子 Tn1、Tn2、Tn3 和 Tn1000 共同的遗传标记)。根据 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中已发布的各型基因序列设计引物,引物序列及产物长度见表 1 及文献[9,16]。耐药基因检测试剂盒、阳性对照及 DNA Marker 均由无锡市克隆遗传技术研究所提供。纯水为阴性对照。

表1 靶基因 PCR 引物序列及产物长度

靶基因	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
<i>npmA</i>	P1: TTGGGTACTGGAGACGGTAG	421
	P2: CAGCTTTGTATTGTTTCGCTC	
<i>aac</i> (3)-I	P1: ACCTACTCCCAACATCAGCC	169
	P2: ATATAGATCTCACTACGCGC	
<i>aac</i> (3)-II	P1: ACTGTGATGGGATACGCGTC	237
	P2: CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	
<i>aac</i> (6′)-I	P1: TATGAGTGGCTAAATCGA	394
	P2: CCCGCTTCTCGTAGCA	
<i>aac</i> (6′)-II	P1: TTCATGTCCGCGAGCACCCC	178
	P2: GACTCTCCGCCATCGCTCT	
<i>ant</i> (3′)-I	P1: TGATTGTCTGGTTACGGTGAC	284
	P2: CGCTATGTTCTCTTGTCTTTG	
<i>ant</i> (2′)-I	P1: GAGCGAAAATCTGCCGCTCTGG	320
	P2: CTGTTACAACGGACTGGCCGC	
<i>intI1</i>	P1: CCGAGGATGCGAACCACCTC	373
	P2: CCGCCACTGGCCGTTACCA	
<i>intI2</i>	P1: CACGGATATGCGACAAAAAGGT	789
	P2: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	
<i>intI3</i>	P1: GCCTCCGCGAGCGACTTTCAG	433
	P2: GATGCTGCCAGGGCGCTCG	
<i>merA</i>	P1: GACCAGCCGAGTTCGTCTA	462
	P2: GCAGCA(G/C)GAAAGCTGCTTCA	
<i>tnpA</i>	P1: CGCCAGTCTTGATGAGCCGG	444
	P2: TTGGCGTTCGGTCCGGCAA	

6. 序列测定及分析:对部分扩增阳性基因 PCR 产物经纯化后用美国 ABI 公司 3730 型自动 DNA 序列分析仪进行序列测定(正反向测序),所测序列采用 GenBank 中的 BLAST 程序进行同源性分析,并将基因核酸序列登录于 GenBank。

结 果

1. 药敏试验:由表 2 可见,本组菌株多重耐药性非常严重,仅对 IPM 和 MER 全部敏感,对 TIC 均耐药,对 4 种氨基糖苷类抗生素 AMK、GEN、TOB 和 NET 的耐药率为 68.0%~80.0%(表 2)。

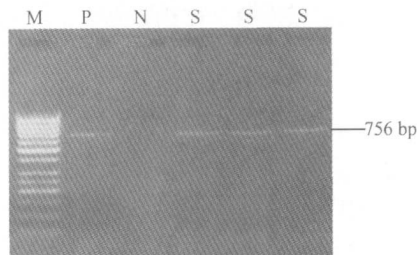
表 2 25 株肺炎克雷伯菌对 20 种抗菌药物的敏感性

抗菌药物	敏感		中介		耐药	
	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)
AMK	8	32.0	0	0.0	17	68.0
GEN	5	20.0	0	0.0	20	80.0
TOB	5	20.0	0	0.0	20	80.0
NET	6	24.0	0	0.0	19	76.0
AMO	0	0.0	1	4.0	24	96.0
AMC	5	20.0	11	44.0	9	36.0
PIC	2	8.0	0	0.0	23	92.0
TZP	12	48.0	0	0.0	13	52.0
TIC	0	0.0	0	0.0	25	100.0
TCC	2	8.0	0	0.0	23	92.0
CFT	3	12.0	0	0.0	22	88.0
CXT	17	68.0	0	0.0	8	32.0
CXM	5	20.0	0	0.0	20	80.0
CTX	6	24.0	7	28.0	12	48.0
CAZ	12	48.0	3	12.0	10	40.0
FEP	19	76.0	5	20.0	1	4.0
IPM	25	100.0	0	0.0	0	0.0
MER	25	100.0	0	0.0	0	0.0
TSU	10	40.0	0	0.0	15	60.0
CIP	4	16.0	0	0.0	21	84.0

2. ESBLs 表型确证试验:ESBLs 阳性 14 株、阴性 5 株,其余 6 株不确定(经 PCR 检测,此 6 株 Amp C β -内酰胺酶基因 *bla*_{DHA} 均阳性,可能产质粒 Amp C 酶)。

3. 基因检测:①各种基因阳性率:25 株中共计检出 5 种基因 *rmtB*、*aac*(3)-II、*aac*(6')-I、*ant*(3')-I、*intI1*,阳性株数(阳性率%)分别为 15 株(60.0%)、1 株(4.0%)、12 株(48.0%)、15 株(60.0%)、24 株(96.0%),而其余 12 种基因 *armA*、*rmtA*、*rmtC*、*rmtD*、*npmA*、*aac*(3)-I、*aac*(6')-II、*ant*(2')-I、*intI2*、*intI3*、*merA* 和 *tnpA*

均阴性。6 种 16S rRNA 甲基化酶基因仅 *rmtB* 阳性;6 种 AMEs 基因总阳性率为 84.0%(21/25)。图 1 为部分菌株 *rmtB* 基因 PCR 扩增产物电泳图。②菌株基因检出情况:各菌株基因阳性数 1~4 种不等。7 株同时 4 种基因阳性 [*rmtB*、*aac*(6')-I、*ant*(3')-I、*intI1*]、8 株同时 3 种基因阳性、6 株同时 2 种基因阳性、3 株 1 种基因阳性(*intI1*)、其余 1 株未检出任何上述基因。③氨基糖苷类抗生素敏感性与 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因检测结果相关情况:17 株对 4 种氨基糖苷类抗生素均耐药的菌株中有 15 株 *rmtB* 基因阳性,其余 2 株(3 号、17 号菌株)6 种 16S rRNA 甲基化酶基因均阴性。其余对 AMK 敏感的 10 株中 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因均阴性。4 种氨基糖苷类抗生素 AMK、GEN、TOB、NET 表型与 16S rRNA 甲基化酶基因型“符合率”分别为 92.0%(23/25)、80.0%(20/25)、80.0%(20/25)、84.0%(21/25),以 AMK 最高。④6 种 16S rRNA 甲基化酶基因与 I 类整合子相关情况:15 株 *rmtB* 基因阳性菌株中均存在 I 类整合子,即 24 株存在 I 类整合子菌株中有 15 株 *rmtB* 基因阳性而其余 5 种 16S rRNA 甲基化酶基因均阴性。⑤4 种氨基糖苷类抗生素敏感性及 17 种耐药相关基因检测结果:见表 3。



注:M:分子质量标准,由上而下分别为 1000、900、800、700、600、500、400、300、250、200、150、100、50 bp;P:阳性对照;N:阴性对照;S:标本阳性

图 1 *rmtB* 基因 PCR 产物电泳图

4. 序列分析:本研究从 15 株 *rmtB* 基因 PCR 阳性的菌株中任选 5 株进行测序,*rmtB* 基因共测得 756 个核苷酸,经 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov)程序同源性分析,与 GenBank 中 *rmtB* 基因序列(GenBank 注册号:EU213261)一致,确认为 *rmtB* 型,其中 4 号(原始编号:HZ12593 号)菌株 *rmtB* 基因完整 CDS 全长 756 bp 已登录 GenBank,注册号为 EU529985。

表3 25株肺炎克雷伯菌对4种氨基糖苷类抗生素敏感性及其17种耐药相关基因检测结果

菌株 序号	氨基糖苷类				靶 基 因																	
	AMK	GEN	TOB	NET	<i>armA</i>	<i>rmt</i>				<i>npmA</i>	<i>aac</i>				<i>ant</i>		<i>intI</i>			<i>merA</i>	<i>tnpA</i>	
						A	B	C	D		(3)-I	(3)-II	(6')-I	(6')-II	(3'')-I	(2'')-I	1	2	3			
1	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
4	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
5	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
7	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8	S	R	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
9	S	R	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
11	S	S	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
13	S	R	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
14	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
15	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
16	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
17	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
18	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
19	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
20	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
21	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
22	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
23	S	S	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24	S	S	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
25	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

讨 论

革兰阴性杆菌对氨基糖苷类抗生素耐药的主要机制是通过产生 AMEs^[16]、细菌 16S rRNA 甲基化酶^[6,9,17]和氨基糖苷类药物作用靶位 16S rRNA 基因(16S rDNA)突变而致^[18],其中 AMEs 国内已有较多关注^[16,19]。16S rRNA 甲基化酶是介导高水平氨基糖苷类抗生素耐药的一类酶,能使氨基糖苷类抗生素的主要作用靶位 16S rRNA 甲基化,使药物无法结合到细菌 16S rRNA,导致对临床上常用的几乎所有氨基糖苷类抗生素(除链霉素外)高水平耐药。世界各地已从临床致病菌中发现 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因 *armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*、*npmA*, 分别编码 ArmA、RmtA、RmtB、RmtC、RmtD 和 NpmA 这 6 种甲基化酶^[4,12]。已在肺炎克雷伯菌中发现数种 16S rRNA 甲基化酶基因,如 2005 年我国台湾地区报道了两家医院 *armA*、*rmtB* 基因阳性大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌造成的院内感染^[5],在 35 株(肺炎克雷伯菌 21 株、大肠埃希菌 14 株)对 AMK 高水平耐药(琼脂稀释法, MICs >256 mg/L)菌中,肺炎克雷伯菌有 16 株 *armA* 阳性、5 株 *rmtB* 阳性,大肠埃希菌有 12 株

armA 阳性、2 株 *rmtB* 阳性,在 46 株对 AMK 的 MICs 在 16~64 mg/L 之间的大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌中, *armA* 和 *rmtB* 均阴性[其中一家医院(the National Cheng Kung University Hospital)的 1624 株不重复连续分离的肺炎克雷伯菌中, *armA* 和 *rmtB* 的流行率(prevalence rates)分别为 0.9% 和 0.3%]。2007 年比利时报道 2000-2005 年间从临床分离的肺炎克雷伯菌中发现 *armA* 基因^[13],最近巴西在该菌中发现了 *rmtD* 基因^[14],日本也在该菌中检出 *armA* 基因,但阳性率很低^[20]。

本研究所检出的 *rmtB* 基因于 2004 年在日本黏质沙雷菌中首次发现^[8],比利时学者在大肠埃希菌中发现了 *rmtB* 基因^[13]。2007 年 Chen 等^[17]在广州对从猪直肠拭子样品分离到 152 株肠杆菌科细菌进行 *rmtA*、*rmtB*、*armA* 和 *rmtC* 4 种基因检测,结果有 49 株(32%) *rmtB* 基因阳性,包括 48 株大肠埃希菌和 1 株阴沟肠杆菌。我们则在 2003 年 9 月至 2004 年 11 月间自临床分离的阴沟肠杆菌中发现了 *rmtB* 基因,阳性率为 12.5% (5/40)^[9]。

迄今为止,我国大陆地区有关肺炎克雷伯菌 16S rRNA 甲基化酶基因流行分布情况尚未见公开报道。本研究对临床分离的一组时间跨度达 8 个

月、共 25 株肺炎克雷伯菌进行 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因检测,发现仅 1 种基因 *rmtB* 阳性,但阳性率高达 60.0% (15/25),并且此 15 株均对 4 种氨基糖苷类抗生素耐药,而未检出已在其他国家、地区发现的基因 *arma*^[5,13,20] 和 *rmtD*^[14],也未检出另外 3 种基因 *rmtA*、*rmtC* 和 *npmA*, 值得注意。

有关肺炎克雷伯菌 AMEs 基因研究报道较多,国内已发现了多种基因如 *aac(3)-II*、*aac(6')-I b*、*ant(3'')-I*,与氨基糖苷类抗生素耐药关系较密切^[19]。编码 AMEs 的基因已有 30 余种,但在肠杆菌科中较为常见的为本研究中所检测的 6 种。1 种 AMEs 可导致 1 至数种氨基糖苷类抗生活性下降或使其失活,此即为交叉耐药性。如 AAC(3)-II 可使耐药菌对 GEN、TOB、NET、地贝卡星、卡那霉素耐药,AAC(6')-I 可使耐药菌对卡那霉素、卡那霉素 B、新霉素耐药;ANT(3'')-I 可使耐药菌对链霉素、大观霉素耐药^[21,22]。

本研究结果表明,本组肺炎克雷伯菌中至少存在 3 种 AMEs 基因,且 *aac(6')-I*、*ant(3'')-I* 阳性率较高,但也不排除存在其他基因如 *aph(3')-VI*^[9,22] 之可能。由 AMEs 底物特异性(抗性谱)得知,AAC(6')-I、ANT(3'')-I 的主要作用底物不是本研究中受试的 4 种氨基糖苷类抗生素^[21]。由表 3 得知,在 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因均阴性的 10 株中,对 4 种氨基糖苷类抗生素全部耐药、2 种耐药、1 种耐药、均敏感的分别有 2 株、2 株、4 株、2 株,此 10 株中有 8 株对 AMK 敏感。本组菌株对 4 种氨基糖苷类抗生素耐药率以 AMK 最低为 68.0% (17/25),耐药表型与 16S rRNA 甲基化酶基因型“符合率”以 AMK 最高为 92.0% (23/25),结合 AMEs 基因检测结果提示本组菌株携带 16S rRNA 甲基化酶基因(*rmtB*)应该是对 4 种氨基糖苷类抗生素(尤其是对 AMK)耐药重要原因。

近年来在对细菌耐药机制的探讨过程中,整合子(integron)系统对细菌的耐药调控机制备受关注^[23,24],已发现的整合子有 6 类。在这一耐药机制中,I 类整合子最常见并起着非常重要的作用,5'保守端有编码整合酶的 *intI1* 基因(1009 bp)及启动子,其整合酶是含有 337 个氨基酸的蛋白,3'末端为耐消毒剂 and 磺胺基因(*qacEΔ1-sul1*)。已在肺炎克雷伯菌中发现了多种整合子,如 I 类整合子^[25,26]、同时携带 I 类和 II 类整合子^[27],可介导多重耐药。对 3 类整合子(I、II、III 类)遗传标记整合酶基因

(*intI1*、*intI2*、*intI3*)及 2 种转座子遗传标记(*merA*、*tnpA*)分析表明,*intI1* 基因阳性率极高(96.0%)而 *intI2*、*intI3*、*merA* 和 *tnpA* 基因均阴性,提示本组菌株普遍存在 I 类整合子,但不含 II 类及 III 类整合子、6 种转座子(Tn21、Tn501、Tn1、Tn2、Tn3 和 Tn1000)。据此推断本组菌株携带的 *rmtB* 基因和 3 种 AMEs 基因可能位于 I 类整合子上,有待于证实。

近年来,大量文献报道细菌中的整合子^[23,24]和转座子^[24,28,29]可携带各种耐药基因、介导多重耐药。整合子本身并不能移动,但是,它们常作为转座子的一部分在转座子中出现,或与插入序列相连。整合子能插在染色体上,也可借助可移动性质粒在同种细菌、不同种细菌间播散。这样,潜在移动的质粒就为耐药基因盒的转移和传播提供方法和途径。整合子存在方式和传播方式的灵活性为细菌耐药性,甚至是多重耐药性传播加速提供了便利条件。

鉴于 16S rRNA 甲基化酶基因、AMEs 基因绝大多数位于整合子、质粒^[20]等可移动遗传元件上,因此我们同时对本组菌株检测 3 类整合子(I、II、III 类)遗传标记整合酶基因及 2 种转座子遗传标记基因,以期了解它们在遗传学背景方面是否存在某些关联。本研究结果进一步提示 16S rRNA 甲基化酶基因(*rmtB*)和 AMEs 基因阳性与菌株携带 I 类整合子关系密切,这一点非常有利于此类基因的水平传播。因此控制携带 16S rRNA 甲基化酶基因菌株扩散实属必要,对其加强耐药相关基因分子流行病学研究也具有实际意义。

本组菌株仅检出 1 种 16S rRNA 甲基化酶基因 *rmtB*,并经随机抽样 5 株测序得以证实,阳性率也较高,但未检出已在其他国家、地区发现的基因 *arma*^[5,13,20] 和 *rmtD*^[14],表明国家、地区间临床分离的肺炎克雷伯菌中 16S rRNA 甲基化酶基因流行情况(如基因型别、阳性率等)不尽相同。本研究在肺炎克雷伯菌临床分离株中发现 *rmtB* 基因为我国大陆地区首次报道。

参 考 文 献

- [1] Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, et al. Predictors of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Acquisition among Hospitalized Adults and Effect of Acquisition on Mortality. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(3):1028-1033.
- [2] 张幸国,杜小幸,张嵘,等.发现一株产 KPC-2 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(9):824-826.

- [3] Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44 (12): 3249-3256.
- [4] Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* Due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47 (8): 2565-2571.
- [5] Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54 (6): 1007-1012.
- [6] 潘韵峰, 俞云松, 周华, 等. 亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌 16S rRNA 甲基化酶基因检测及流行菌株分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(1): 34-39.
- [7] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, 2003, 362 (9399): 1888-1893.
- [8] Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 491-496.
- [9] 黄支密, 单浩, 康祖焯, 等. 阴沟肠杆菌 16S rRNA 甲基化酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因研究. *中华流行病学杂志*, 2008, 29 (4): 369-373.
- [10] Wachino J, Yamane K, Shibayama K, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(1): 178-184.
- [11] Doi Y, Garcia DO, Adams J, et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(3): 852-856.
- [12] Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51 (12): 4401-4409.
- [13] Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(3): 459-464.
- [14] Yamane K, Rossi F, Barberino MG, et al. 16S ribosomal RNA methylase RmtD produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(3): 746-747.
- [15] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement. 2005, 25(1): 34-39.
- [16] 黄支密, 康祖焯, 秦玲, 等. 20 株阴沟肠杆菌耐药性及氨基糖苷类修饰酶基因分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(5): 428-431.
- [17] Chen L, Chen ZL, Liu JH, et al. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(5): 880-885.
- [18] 康祖焯. 细菌耐药的分子机制. *临床儿科杂志*, 2005, 23(7): 422-424.
- [19] 周军, 史伟峰, 康祖焯. 肺炎克雷伯菌 β -内酰胺酶、氨基糖苷类修饰酶、氯己定-磺胺耐药基因研究. *中国抗生素杂志*, 2007, 32 (10): 627-630.
- [20] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(4): 642-646.
- [21] 张致平. *微生物药理学*. 北京: 化学工业出版社, 2003: 584-587.
- [22] 陈代杰. *抗菌药物与细菌耐药性*. 上海: 华东理工大学出版社, 2001: 90-102.
- [23] Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1999, 18(11): 761-770.
- [24] Kang SG, Lee DY, Shin SJ, et al. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. *J Vet Sci*, 2005, 6(3): 201-205.
- [25] 王继东, 钱小毛, 康祖焯, 等. 1 株多重耐药肺炎克雷伯菌耐药基因和整合子、转座子遗传标记研究. *微生物与感染*, 2006, 1 (4): 229-232.
- [26] 陆坚, 吴伟元, 吴创鸿, 等. 革兰阴性菌 *qnrA* 基因介导的喹诺酮耐药分子机制研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27 (4): 373-378.
- [27] 李涛, 卢义柱, 凌华志, 等. 肺炎克雷伯菌 II 类整合子的分布及结构分析. *临床输血与检验*, 2007, 9(3): 197-199.
- [28] Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*, 1989, 3(12): 1669-1683.
- [29] Bass L, Liebert CA, Lee MD, et al. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in Avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(12): 2925-2929.

(收稿日期: 2008-04-15)

(本文编辑: 张林东)