

· 实验室研究 ·

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

黄支密 单浩 糜祖煌 杨海燕 仵蕾 储秋菊 秦玲

【摘要】 目的 了解临床分离的 40 株阴沟肠杆菌中 16S rRNA 甲基化酶基因及氨基糖苷类修饰酶(AMEs)基因存在状况。**方法** 在 2003 年 9 月至 2004 年 11 月从解放军第 98 医院住院患者中分离 40 株阴沟肠杆菌,采用聚合酶链反应(PCR)及序列分析的方法分析 5 种 16S rRNA 甲基化酶基因(*armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC* 和 *rmtD*)和 9 种 AMEs 基因[*aac*(3)-I、*aac*(3)-II、*aac*(3)-III、*aac*(3)-IV、*aac*(6')-I b、*aac*(6')-II、*ant*(3'')-I、*ant*(2'')-I 和 *aph*(3')-VI]。**结果** 40 株阴沟肠杆菌中,6 种基因 *rmtB*、*aac*(3)-II、*aac*(6')-I b、*ant*(3'')-I、*ant*(2'')-I 和 *aph*(3')-VI 的阳性株数分别为 5 株(12.5%)、11 株(27.5%)、29 株(72.5%)、13 株(32.5%)、2 株(5.0%)和 2 株(5.0%);其余 8 种基因均阴性;AMEs 基因总阳性率为 85.0%(34/40)。对 29 株 *aac*(6')-I b 基因 PCR 阳性产物进行测序,证实有 7 株(24.1%)单独携带 *aac*(6')-I b-cr 双功能酶基因(GenBank: EF375620、EU159121),18 株(62.1%)单独携带 *aac*(6')-I b-Suzhou(苏州型, EU085533),3 株(10.3%)同时携带 *aac*(6')-I b-Suzhou 及 *aac*(6')-I b-cr 2 种亚型,仅 1 株(3.4%)为 *aac*(6')-I b 经典型。**结论** 临床分离的 40 株阴沟肠杆菌中 16S rRNA 甲基化酶基因阳性率较低而 AMEs 基因阳性率很高,至少存在 5 种 AMEs 基因。

【关键词】 阴沟肠杆菌; 16S rRNA 甲基化酶; 氨基糖苷类修饰酶; 基因

Analysis on 16S rRNA methylase genes and aminoglycoside modifying enzymes genes in *Enterobacter cloacae* in China HUANG Zhi-mi*, SHAN Hao, MI Zu-huang, YANG Hai-yan, WU Lei, CHU Qiu-ju, QIN Ling. *Microbiology Laboratory, the 98th Hospital of People's Liberation Army, Huzhou 313000, China

【Abstract】 Objective To investigate the 16S rRNA methylase genes and Aminoglycoside modifying enzymes(AMEs) genes in *Enterobacter cloacae* isolated from the People's Liberation Army 98th Hospital, Huzhou district, Zhejiang province, China. **Methods** 40 strains of *Enterobacter cloacae* were isolated from the inpatients between September, 2003 and November, 2004. 5 kinds of 16S rRNA methylase gene (including *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* and *rmtD*) and 9 kinds of AMEs gene [including *aac*(3)-I, *aac*(3)-II, *aac*(3)-III, *aac*(3)-IV, *aac*(6')-I b, *aac*(6')-II, *ant*(3'')-I, *ant*(2'')-I and *aph*(3')-VI] were analyzed by PCR and verified by DNA sequencing. **Results** In 40 strains of *Enterobacter cloacae*, the positive rates of genes of *rmtB*, *aac*(3)-II, *aac*(6')-I b, *ant*(3'')-I, *ant*(2'')-I and *aph*(3')-VI were 12.5%(5/40), 27.5%(11/40), 72.5%(29/40), 32.5%(13/40), 5.0%(2/40) and 5.0%(2/40), respectively. 8 kinds of the rest of genes were all tested negative. The total positive rate of AMEs gene was 85.0%(34/40). Among 29 strains of *Enterobacter cloacae* that the *aac*(6')-I b gene was positive, through PCR and verification by DNA sequencing, 7 strains(24.1%) were confirmed to take the *aac*(6')-I b-cr (the GenBank register number: EF375620, EU159121) alone, 18 strains(62.1%) were confirmed to take the *aac*(6')-I b-Suzhou (EU085533) alone, 3 strains(10.3%) were confirmed to take both *aac*(6')-I b-Suzhou and *aac*(6')-I b-cr while only 1(3.4%) was *aac*(6')-I b (the classical type). **Conclusion** There was lower positive rate of 16S rRNA methylase gene but very high AMEs genotypes in *Enterobacter cloacae* isolated from inpatients and the finding of *rmtB* gene was reported for the first time in the world. At least 5 kinds of AMEs gene existed in *Enterobacter cloacae* were isolated and they were the new host of both gene of *aac*(6')-I b-cr and *aac*(6')-I b-Suzhou, with *aac*(6')-I b-Suzhou gene was the predominance subtype in *aac*(6')-I b.

【Key words】 *Enterobacter cloacae*; 16S rRNA methylase; Aminoglycoside modifying enzymes; Genes

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^[1]。传统观点认为,细菌对此类抗生素产生耐药性的主要机制有 3 种:一是细菌产生一种或多种针对抗生素的氨基糖苷类修饰酶(AMEs),二是核糖体结合位点的改变,三是细胞壁渗透性改变或细胞内转运异常。其中以产生 AMEs 最为重要。直到 2002 年,在临床致病菌中,一种新的耐药机制被发现,即细菌通过编码产生一类特殊的 16S rRNA 甲基化酶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,并且可在人和动物的致病菌间传播^[2,3]。本文采用分子生物学技术对临床分离的阴沟肠杆菌中 16S rRNA 甲基化酶基因和 AMEs 基因分布情况进行了研究。

材料与方法

1. 菌株来源及鉴定:40 株试验菌株均分离自解放军第 98 医院 2003 年 9 月至 2004 年 11 月住院患者送检的各种标本:创伤伤口分泌物 17 份、痰液 13 份、烧伤创面分泌物 4 份、窦道分泌物、脓液、溃疡分泌物、静脉血、静脉导管尖端、脑脊液标本各 1 份。用生物-梅里埃公司 API 20 E 鉴定菌种。标准菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。

2. 药敏试验:系微量肉汤法。采用生物-梅里埃公司产品 ATB[®] G-5 药敏试验板,共测试 20 种抗菌药物: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)、头孢呋肟(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)。

3. 耐药基因检测:均为聚合酶链反应(PCR)方法。采用蛋白酶 K 消化法制备 DNA 扩增模板^[4]。共检测 14 种基因:5 种 16S rRNA 甲基化酶基因(*armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC* 和 *rmtD*)和 9 种 AMEs 基因[*aac*(3)-I、*aac*(3)-II、*aac*(3)-III、*aac*(3)-IV、*aac*(6′)-I b、*aac*(6′)-II、*ant*(3′)-I、*ant*(2′)-I、*aph*(3′)-VI]。根据 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中已发布的各型基因序列设计引物,

其中 *armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *aac*(6′)-I b 基因引物序列及产物长度见表 1,其余 8 种基因引物序列及产物长度见文献[5]。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。各种靶基因 PCR 扩增体系均为:每反应体系 P1、P2 引物各 0.5 μmmol/L, dNTPs 各 200 mmol/L, KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl (pH 值 9.0) 10 mmol/L, NP₄₀ 0.5%, BSA 0.02% (wt/vol), Taq DNA pol 1 U。总反应体积 20 μl(其中模板液 5 μl)。PCR 扩增产物 > 500 bp 热循环参数均为:93℃ 预变性 2 min,然后 93℃ 60 s → 55℃ 60 s → 72℃ 60 s,循环 35 周期,最后 72℃ 延长 5 min。PCR 扩增产物 < 500 bp 热循环参数均为:93℃ 预变性 2 min,然后 93℃ 30 s → 55℃ 30 s → 72℃ 60 s,循环 35 周期,最后 72℃ 延长 5 min。于 PE9600 基因扩增仪扩增。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外凝胶电泳成像仪下观察,并记录结果。

表1 6种靶基因 PCR 引物序列及产物长度^a

靶基因	引物序列(5′~3′)	产物长度(bp)
<i>rmtA</i>	P1:CCTAGCGTCCATCCTTTCCTC	315
	P2:AGCGATATCCAACACACGATGG	
<i>rmtB</i>	P1:ATGAACATCAACGATGCCCTC	756
	P2:TTATCCATCTCTTTTATCAAGTATAT	
<i>rmtC</i>	P1:ATGAAAACCAACGATAATTATC	846
	P2:TTACAATCTCGATACGATAAAATAC	
<i>rmtD</i>	P1:ATGAGCGAAGTGAAGAAAACTGCT	744
	P2:TCATTTTCGTTTCAGCAGCTAAAACAG	
<i>armA</i>	P1:ATGGAATAAGATGATGTTGTTAAG	774
	P2:TTATTTCTGAAATCCACTAGTAATTA	
<i>aac</i> (6′)-Ib ^b	P1:ATGACTGAGCATGACCTTGC	519
	P2:TTAGGCATCACTGCGTGTTC	

注:^a PCR 引物由糜祖煌根据 2007 年 8 月 30 日之前已在 www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide 登录各基因及其亚型序列的保守区域完成设计;^b *aac*(6′)-I b 基因家族全长基因扩增与测序引物,阳性基因测序为“PCR 直接全自动荧光法双向测序”(在美国 ABI 公司 3730 型仪上进行)

4. 序列测定及分析:对扩增阳性的全部 *aac*(6′)-I b 基因及其他扩增阳性的部分基因 PCR 产物经纯化后用 ABI 自动 DNA 序列分析仪进行序列测定(双向测序),所测序列采用 GenBank 中的 BLAST 程序进行同源性分析,并将部分基因核酸序列登录 GenBank。

结 果

1. 药敏试验结果:40 株阴沟肠杆菌对 4 种氨基糖苷类抗生素的耐药率以 AMK 最低但也达到 42.5%,而 GEN、TOB 和 NET 的耐药率均很高达 75.0%~82.5%;碳青霉烯类抗生素 IPM 和 MER 均无耐药;FEP 的耐药率较低为 17.5%、但中介率较高达 32.5%;AMO、AMC、CFT、CXT 均耐药;其余 9 种的耐药率在 67.5%~85.0%之间。结果表明本组菌株多重耐药性、对氨基糖苷类及β-内酰胺类抗生素的交叉耐药性均很严重(表 2)。

表2 40 株阴沟肠杆菌对 20 种抗菌药物的敏感性

抗菌 药物	敏感		中介		耐药	
	株数	百分比 (%)	株数	百分比 (%)	株数	百分比 (%)
AMO	0	0.0	0	0.0	40	100.0
AMC	0	0.0	0	0.0	40	100.0
PIC	7	17.5	0	0.0	33	82.5
TZP	12	30.0	0	0.0	28	70.0
TIC	6	15.0	0	0.0	34	85.0
TCC	8	20.0	0	0.0	32	80.0
CFT	0	0.0	0	0.0	40	100.0
CXT	0	0.0	0	0.0	40	100.0
CXM	7	17.5	0	0.0	33	82.5
CTX	9	22.5	4	10.0	27	67.5
CAZ	7	17.5	1	2.5	32	80.0
FEP	20	50.0	13	32.5	7	17.5
IPM	40	100.0	0	0.0	0	0.0
MER	40	100.0	0	0.0	0	0.0
AMK	23	57.5	0	0.0	17	42.5
GEN	10	25.0	0	0.0	30	75.0
TOB	7	17.5	0	0.0	33	82.5
NET	7	17.5	0	0.0	33	82.5
TSU	10	25.0	0	0.0	30	75.0
CIP	8	20.0	1	2.5	31	77.5

2. 基因检测结果:40 株菌中共计检出 6 种基因,有 34 株(85.0%)至少检出 1 种基因,各菌株基因阳性数 1~4 种不等。①各种基因阳性率:*rmtB*、*aac*(3)-Ⅱ、*aac*(6′)-Ⅰb、*ant*(3′)-Ⅰ、*ant*(2′)-Ⅰ和 *aph*(3′)-Ⅵ 的阳性株数分别为 5(12.5%)、11(27.5%)、29(72.5%)、13(32.5%)、2(5.0%)和 2(5.0%),而 *armA*、*rmtA*、*rmtC*、*rmtD*、*aac*(3)-Ⅰ、*aac*(3)-Ⅲ、*aac*(3)-Ⅳ 和 *aac*(6′)-Ⅱ 均阴性;AMEs 基因总阳性率为 85.0%(34/40)。②菌株基因检出情况:1 株同时 4 种基因阳性、3 株同时 3 种基因阳性、19 株同时 2 种基因阳性、11 株仅 1 种基因阳性、其余 6 株未检出任何 1 种基因。③氨基糖苷类抗生素敏感性与基因检测结果相关情况:33 株对氨基糖苷类抗生素耐药的菌株中有 32 株至少有 1 种基因

阳性;7 株对氨基糖苷类抗生素均敏感菌株中,有 2 株检出 2 种基因,1 株检出 1 种基因,另 4 株未检出基因。耐药表型与基因型总符合率为 90.0%(36/40)。具体见表 3。

3. 序列分析结果:对 29 株 *aac*(6′)-Ⅰb 基因 PCR 阳性产物进行测序,经 BLAST 程序同源性分析,证实有 7 株(24.1%)单独携带 *aac*(6′)-Ⅰb-cr 双功能酶基因,并率先发现阴沟肠杆菌为该基因亚型新宿主,其中 6 株(5、8、12、13、14、32 号菌株)基因完整 CDS 全长 519 bp 核苷酸序列一致,其中 32 号菌株(原始编号为 HZC9205)的 *aac*(6′)-Ⅰb-cr 基因核苷酸序列已登录 GenBank,注册号为 EF375620;另 1 株(2 号菌株,原始编号为 HZ7491)基因核苷酸序列与此 6 株相比,在 CDS 全长 519 bp 的 223 处核苷酸发生无义突变 C→A,其序列也已登录(EU159121)。18 株(62.1%)单独携带 *aac*(6′)-Ⅰb-Suzhou(苏州型),其中 6 号菌株(原始编号为 HZB7687)基因完整 CDS 全长 519 bp 已登录(EU085533)。3 株(10.3%)同时携带 *aac*(6′)-Ⅰb-Suzhou 及 *aac*(6′)-Ⅰb-cr 2 种亚型;仅 1 株(3.4%)为 *aac*(6′)-Ⅰb 经典型。对 2 号菌株 *aac*(3)-Ⅱ 和 *ant*(3′)-Ⅰ 基因 PCR 阳性产物测序,并与 GenBank 中已发布序列做比较,结果一致,其核苷酸序列已登录,注册号分别为 AY663802 和 AY663804。

讨 论

16S rRNA 甲基化酶最早在产生氨基糖苷类抗生素的微生物中被发现,是抗生素产生菌的一种自我防御机制。它最大的特点是对临床上常用的所有氨基糖苷类抗生素(如 GEN、卡那霉素、AMK、TOB、NET、异帕米星、阿贝卡星)表现为高水平耐药性^[2]。本文所检测的 *rmtA*、*armA*、*rmtB*、*rmtC* 和 *rmtD* 是迄今从临床致病菌中发现的 5 种 16S rRNA 甲基化酶基因^[3,6-9]。该类基因均位于接合性质粒上,可在菌株间传播,所编码的 5 种 16S rRNA 甲基化酶均作用于 16S rRNA 氨基糖苷类抗生素结合的作用靶位,通过对其进行甲基化修饰,使得药物与 16S rRNA 亲和力显著下降,从而导致高水平耐药。

有关在阴沟肠杆菌中发现 16S rRNA 甲基化酶基因报道较少。比利时学者在阴沟肠杆菌中发现了 *armA* 基因^[10]。2007 年 Chen 等^[11]在广州对从猪标本(直肠拭子样品)分离到的 1 株阴沟肠杆菌进行

表3 40 株阴沟肠杆菌对 4 种氨基糖苷类抗生素敏感性及其 14 种耐药相关基因检测结果

菌株 序号	氨基糖苷类				基 因										aac (6')- I b	aac (6')- II	ant (3')- I	ant (2'')- I	aph (3')- VI
	AMK	GEN	TOB	NET	armA	rmt				aac(3)									
						A	B	C	D	I	II	III	IV						
1	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-Suzhou ^a	-	-	-	-	
2	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-cr	-	+	-	+	
3	S	S	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
4	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
5	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-cr ^b	-	+	-	-	
6	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
7	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
8	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-cr	-	+	-	-	
9	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
10	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
11	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
12	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-cr	-	+	-	-	
13	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-cr	-	+	-	-	
14	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-cr	-	+	-	-	
15	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou + -cr ^c	-	-	-	-	
16	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
17	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
18	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou + -cr	-	-	-	-	
20	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
21	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou + -cr	-	-	-	-	
22	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
23	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
24	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
27	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
29	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
31	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-cr	-	+	-	+	
33	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
34	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
35	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	+	-	-	
36	S	S	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	经典型	-	+	+	-	
37	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
38	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
39	S	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	-	-	-	
40	S	S	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-Suzhou	-	+	-	-	

注: ^a *aac*(6')-I b-Suzhou(苏州型); ^b *aac*(6')-I b-cr(双功能酶); ^c 菌株同时携带 *aac*(6')-I b-Suzhou 及 *aac*(6')-I b-cr

了 *rmtA*、*rmtB*、*armA* 和 *rmtC* 共 4 种基因检测, 结果发现 *rmtB* 基因阳性。这是率先发现阴沟肠杆菌为 *rmtB* 基因新宿主, 尽管菌株来自动物而非患者。本文检测了 5 种已报道的 16S rRNA 甲基化酶基因, 仅 *rmtB* 基因阳性, 阳性率为 12.5% (5/40)。本研究在阴沟肠杆菌临床分离株中发现 *rmtB* 基因目前国内外尚未见报道。

我们曾就 20 株阴沟肠杆菌(系本文中 1~20 号菌株)对 4 种氨基糖苷类抗生素耐药性与 9 种 AMEs 基因阳性率的相关情况进行了初步分析^[5]。为进一步了解基因分布情况以及耐药机制, 本次研究将菌株数增加到 40 株, 重点了解 *aac*(6')-I b 基因家簇分布情况(并同时检测 5 种 16S rRNA 甲基

化酶基因)。编码 AMEs 的基因分为乙酰转移酶(AAC)、核苷转移酶(ANT)和磷酸转移酶(APH)三大类共计 30 余种, 但在革兰阴性杆菌中常见的为本文所检测的 9 种。国外研究表明^[12], 对 GEN 耐药的阴沟肠杆菌可携带 *aac*(6')-I 基因。本组菌株中三类 AMEs 基因(共 5 种)均有检出, 阳性率较高并居前三位的基因分别为 *aac*(6')-I b (72.5%)、*ant*(3'')-I (32.5%) 和 *aac*(3)-II (27.5%), 但以 *aac*(6')-I b 阳性率最高; 85.0% 菌株(34/40)携带 1~4 种基因。这些耐药相关基因的存在显然与本组菌株对氨基糖苷类抗生素的高(交叉)耐药率密切相关。序列分析表明, *aac*(6')-I b 以 *aac*(6')-I b-Suzhou(苏州型)为主(18/29)。苏州型系 *aac*(6')-

I b 基因家族中一种亚型,由我国学者徐卫东等于 2007 年在肺炎克雷伯菌中发现(EF375621)。

Hooper 的实验小组发现变异的 *acc(6')-I b-cr* 氨基糖苷乙酰转移酶具有更广的底物范围^[13],能修饰灭活氨基糖苷类和喹诺酮类两类化学母体结构各异的药物,被称为双功能酶基因^[14],但该酶对氨基糖苷类的乙酰化作用仍强于喹诺酮类。这种变异酶是 *acc(6')-I b* 仅发生 Trp102Arg 和 Asp179Tyr 两个氨基酸残基改变,介导了对诺氟沙星和环丙沙星的耐药性(MIC 增加 2~4 倍)。在大肠埃希菌表达时该酶未影响细菌对乙酰环丙沙星、恩氟沙星、培氟沙星、左氧氟沙星及 gemifloxacin(吉米沙星)的敏感性。本组有 7 株单独携带 *aac(6')-I b-cr* 基因。值得注意的是,本组有 3 株同时携带 *aac(6')-I b-Suzhou* 和 *aac(6')-I b-cr* 2 种亚型,推测系整合子捕获耐药基因所致。结果表明阴沟肠杆菌为 *aac(6')-I b-cr* 及 *aac(6')-I b-Suzhou* 亚型新宿主。喹诺酮类系全合成药物,其修饰酶的发现具有重要的临床意义,*aac(6')-I b* 的变异基因已有 30 种以上^[13],设计新型喹诺酮药物应该考虑到潜在的酶修饰灭活机制。

由表 3 可见,本组菌株多数基因型与耐药表型结果相符,但也有少数不相符的。如有 3 株(20、28、34 号菌株)基因型阳性而表型敏感。原因可能为,AMEs 基因多数由整合子介导,且一个整合子可携带多个耐药基因^[15];耐药基因盒的表达不仅依赖于启动子的强弱,而且与启动子的距离远近有关;上游基因表达强,下游基因表达弱甚至不表达^[16]。另有 1 株(第 31 号菌株)表型为对 4 种氨基糖苷类抗生素均耐药,但却未检测到任何 1 种基因(其 I 类整合子标志物也为阴性),推断存在其他耐药机制,有待研究。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 潘韵峰,周华,俞云松. 导致高水平氨基糖苷类抗生素耐药的新型 16S rRNA 甲基化酶基因研究进展. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(6):699-701.
- [3] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, 2003, 362(9399):1888-1893.

- [4] 黄支密,糜祖煌,诸葛青云,等. 铜绿假单胞菌亚胺培南及消毒剂耐药相关基因研究. *江西医学检验*, 2005, 23(2):97-100.
- [5] 黄支密,糜祖煌,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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Casin I, Bordon F, Bertin P, et al. Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase variants of the Ib type with altered substrate profile in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(2):209-215.
- [13] 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.
- [14] 黄支密,糜祖煌,王春新,等. 阴沟肠杆菌中发现氨基糖苷类——氟喹诺酮类修饰酶基因 *aac(6')-I b-cr*. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(6):531.
- [15] Hall RM, Collis CM, Kim MJ, et al. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 870(1):68-80.
- [16] Poirel L, Le Thomas I, Naas T, et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(3):622-632.

(收稿日期:2007-10-25)

(本文编辑:尹廉)