

• 论 著 •

肺炎克雷伯菌中 qnr 基因检测

聂大平[△], 李瑞华, 邹梦雪

(大连医科大学附属二院检验科 116027)

摘要:目的 了解质粒介导的喹诺酮类耐药基因 qnr 在肺炎克雷伯菌中流行及与 ESBLs 及对环丙沙星耐药的相关性。方法 纸片扩散法检测药物敏感性, 双纸片协同试验检测 ESBLs。PCR 方法检测 qnr 基因。结果 62 株非重复的肺炎克雷伯菌中, ESBLs 阳性率为 75.8% (47/62), 环丙沙星敏感率为 45.2% (28/62), qnr 总阳性率为 53.2% (42/62)。单纯 qnrA 阳性 5 株 (8%), qnrB9 株 (14.5%), qnrS10 株 (16.1%)。同时 2 种 qnr 基因阳性 9 株 (14.5%), qnrA 和 qnrB 基因阳性 1 株 (1.6%), qnrA 和 qnrS 基因 3 株 (4.8%), qnrB 和 qnrS 基因 5 株 (8%)。在环丙沙星耐药株和敏感株中, qnr 基因的阳性率分别为 58.8% (20/34) 和 46.7% (13/28)。在 ESBLs 阳性菌株和阴性菌中, qnr 的阳性率分别为 68% (32/47) 和 6.6% (1/15)。结论 qnr 基因主要分布在产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌, 与环丙沙星耐药与否无相关。

关键词:克雷伯菌, 肺炎; 环丙沙星; β 内酰胺酶类; qnr 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0281-02

Detection of qnr genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Nie Daping, Li Ruihua, Zou Mengxue

(Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract: Objective To investigate the prevalence of qnr genes (qnrA, qnrB and qnrS) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and their relationship with ESBLs and ciprofloxacin resistance. **Methods** Antibiotic susceptibility and ESBLs were detected by Kirby-Bauer test and double paper synergy test respectively. qnr genes were detected by PCR. **Results** Of 62 strains, the ESBLs positive rate was 75.8% (47/62), the sensitive rate to ciprofloxacin was 45.2% (28/62), the positive rate of qnr genes were 53.2% (33/62), including 8% (5/62) single with qnrA gene, 14.5% (9/62) single with qnrB gene and 16.1% (10/62) single with qnrS gene. 9 strains were confirmed to carry two qnr genes, including 1.6% (1/62) with qnrA and qnrB, 4.8% (3/62) with qnrA and qnrS and 8% (5/62) with qnrB and qnrS. Among strains, sensitive or resistant to ciprofloxacin, the positive rate of qnr genes was 58.8% (20/34) and 46.7% (13/28) respectively, and 68% (32/47) and 6.6% (1/15) respectively in strains producing or not producing ESBLs. **Conclusion** Qnr genes were mainly in strains producing ESBLs. There might not be relationship between qnr genes and ciprofloxacin resistance.

Key words: *klebsiella pneumoniae*; ciprofloxacin; beta-lactamases; qnr gene

以往认为细菌对喹诺酮类耐药机制仅为染色体介导的靶位改变、外膜通透性的改变及外排泵过表达。但自 1998 年, Martinez-Martinez^[1] 首现一株多重耐药肺炎克雷伯菌中发现由质粒介导喹诺酮耐药基因 qnrA 后, qnrB、qnrC 及 qnrS 相继在大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、奇异变形杆菌和福氏志贺菌中被发现, 作为喹诺酮耐药新机制且 qnr 基因所在的质粒可同时携带 ESBLs、ampC 基因和整合子等可移动遗传元件, 易导致多重耐药而受到关注。本研究对在大连医科大学附属二院 2010 年 3~11 月临床分离 62 株肺炎克雷伯菌进行 qnrA、qnrB 和 qnrS 基因检测, 了解该基因在环丙沙星耐药株和敏感株中及 ESBLs 阳性株和阴性株的流行情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 61 株肺炎克雷伯菌和 1 株产酸克雷伯菌来源于大连医科大学附属二院 2010 年 3~11 月临床分离的非重复标本, 其中痰液 53 株、咽拭子 3 株、分泌物 2 株、尿液 1 株、血液 1 株、腹水 1 株及穿刺液 1 株。肺炎克雷伯菌 UAB1 为本室保存。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2 试剂与仪器 2×Taq PCR Master Mix、DNA Marker 及 3 对 qnr 引物均购自大连宝物工程有限公司。琼脂糖购自上海 GENE 科技有限公司。药敏纸片购自 OXIOD 公司。DNA

扩增仪购自 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 药敏性试验 纸片扩散法, 判断标准为 CLSI2010 标准^[2]。

1.3.2 细菌 DNA 模板制备 采用煮沸法提取细菌基因组 DNA。挑取 37 °C 培养 24 h 后数个菌落于有 300 μ L 生理盐水 EP 管中, 调菌液为 5 个麦氏浊度, 5 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 加 300 μ L 无菌蒸馏水, 煮沸 10 min, 快速冷却, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为 DNA 模板。

1.3.3 引物设计 参照文献^[3-5], 引物序列见表 1。

1.3.4 PCR 扩增目的基因 PCR 反应体系总体积 25 μ L, 其中上、下游引物各 1 μ L, 模板 4 μ L, 反应液 12.5 μ L, 蒸馏水 6.5 μ L。肺炎克雷伯菌 UAB1 作为 qnrA 阳性对照, 阴性对照为蒸馏水。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 53 °C 45 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物 7 μ L 上样, 2% 琼脂糖凝胶电泳中电泳 30 min, BIO-RAD 凝胶成像系统观察并扫描成像, PCR 阳性产物送宝生物公司进行 DNA 测序。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理。计算 qnrA、qnrB 和 qnrS 基因在肺炎克雷伯菌环丙沙星敏感株和

[△] 通讯作者, E-mail: wsw2703@163.com。

耐药株及在 ESBLs 阳性株和阴性株中的检出率,采用 χ^2 检验 进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 qnr 基因引物序列

引物名称	Gene	引物序列	扩增长度(bp)
qnrA	qnrA1~A6	5'-AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG-3'	580
		5'-TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC-3'	
qnrB	qnrB1~B6	5-GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG-3'	469
		5'-ACG ATG CCT GTA GTT GTC CC-3'	
qnrS	qnrS1~S2	5'-CGC TGG ATA GGA ACG AAC-3'	345
		5'-GAA GAC GCC TGA GGG TAA-3'	

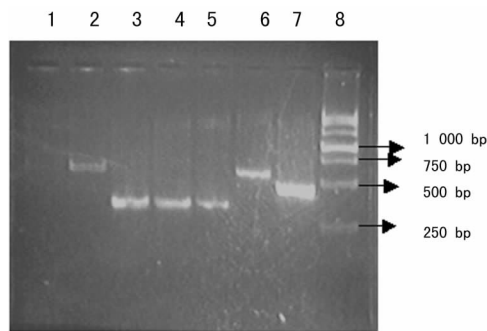
2 结 果

2.1 肺炎克雷伯菌中产 ESBLs 及对环丙沙星的耐药情况

62 株非重复肺炎克雷伯菌中,对环丙沙星敏感率为 45.2% (28/62),耐药率为 54.8% (34/62)。ESBLs 阳性率 75.8% (47/62),ESBLs 阴性率为 24.2% (15/62)。

2.2 qnr 基因的阳性率及与环丙沙星耐药、产 ESBLs 的关系

62 株肺炎克雷伯菌中 33 株菌中检出 qnr 基因,阳性率为 53.2% (33/62)。单纯 qnrA 5 株 (8.1%),qnrB 9 株 (14.5%),qnrS 10 株 (16.1%)。同时含 2 种 qnr 基因 9 株 (14.5%),其中 qnrA 和 qnrB 基因 1 株 (1.6%),qnrA 和 qnrS 基因 9 株 (14.5%),qnrB 和 qnrS 基因 5 株 (8%)。随机取 qnrA,qnrB 基因阳性产物各 1 株,qnrS 基因阳性产物 3 株及 1 株 UAB1 阳性对照和阴性对照与 Marker 进行比对,见图 1。随机选送 qnrA,qnrB 和 qnrS 基因的测序结果经 GenBank 网上同源比较,分别与 AY70235、DQ35241 和 AB187515 的同源性为 100%。在环丙沙星耐药菌株中,qnr 基因阳性率为 58.8% (20/34),在环丙沙星敏感菌株中,阳性率为 46.7% (13/28)。在 ESBLs 阳性菌株中,阳性率为 68.1% (32/47);在 ESBLs 阴性菌株中,阳性率为 6.6% (1/15)。



1: 阴性对照; 2: UAB1; 3、4、5: qnrS; 6: qnrA; 7: qnrB; 8: DNA Marker;

图 1 qnr 基因电泳图

2.3 统计学处理 经 χ^2 检验,qnr 基因在环丙沙星敏感菌株

与耐药菌株中检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.947, P > 0.05$)。经 χ^2 检验,qnr 基因在 ESBLs 阳性株与 ESBLs 阴性株中检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 17.22, P < 0.01$)。

3 讨 论

国内肺炎克雷伯菌中 qnr 基因的流行情况各不相同,福州肺炎克雷伯菌中 qnrB 检出率为 11.9%,武汉 qnrS 为 18.9%,成都 qnrA,qnrB 总阳性率为 59.3%,并有含 2 种 qnr 基因的菌株存在^[6-8]。本文 62 株肺炎克雷伯菌中,qnr 基因阳性率为

53.2%,其中单纯 qnrA 阳性率 8.1% (5/62),qnrB 14.5% (9/62),qnrS 16.1% (10/62),9 株菌含 2 种 qnr 基因。表明本院由质粒介导的喹诺酮类耐药基因 qnrA,qnrB 和 qnrS 广泛分布于肺炎克雷伯菌中。qnr 基因编码产生的 qnr 蛋白能保护喹诺酮类药物主要靶点 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV,使细菌对其敏感性降低,这种敏感性降低通常达不到耐药的折点,既单纯 qnr 基因存在不足以使细菌耐药,但有证据显示 qnr 基因阳性菌株对喹诺酮类其他耐药机制(如靶位的改变)具有协同作用,在喹诺酮类药物选择压力下容易发生染色体突变而产生高水平耐药^[9-10]。本文结果显示 qnr 基因检出与环丙沙星敏感与否无相关(46.7%和 58.8%, $P > 0.05$),在 28 株环丙沙星敏感菌中,qnr 阳性有 13 株,表明 qnr 介导的是对喹诺酮低水平耐药,但这部分菌若处于喹诺酮类药物选择压力下,容易产生高水平耐药。因此对环丙沙星敏感菌筛查 qnr 基因更有临床意义。

本文产 ESBLs 菌中 qnr 基因阳性率 (68.1%) 远高于非产 ESBLs 菌中的阳性率 (6.6%),与文献报道一致,这是因为 qnr 基因常与 CTX-M,SHV 和 DHA-1 等 ESBLs,ampC 基因和 I 类整合子位于同一质粒,它们可在不同菌株和不同菌种间迅速进行水平转移,使细菌获得多重耐药的可能性更大,并使耐药传播途径更为复杂^[4,8]。因此,了解 qnr 基因在细菌中流行,有助于了解细菌对喹诺酮耐药性机制及传播途径,避免其使得院内感染大范围流行。

综上所述,qnr 基因主要分布在产 ESBLs 肺炎克雷伯菌中,与环丙沙星耐药与否没有相关性,对含 qnr 基因环丙沙星敏感细菌的感染,应避免使用喹诺酮,防止由 qnr 基因诱导产生对喹诺酮高水平耐药。

参考文献

[1] Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid[J]. Lancet,1998,351(9105):797-799.
 [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100-S20-U 2010 [S]. Wayne,PA:CLSI,2010.
 [3] Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates[J]. J Antimicrob Chemother,2007,60(2):394-397.
 [4] 韩晨曦,王爱华,杨永弘,等. 儿科临床分离株中质粒介导喹诺酮类药物耐药基因 qnr 在产 ESBLs 或 ampC 酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中的流行[J]. 中国感染和化疗杂志,2009,9(6):430-435.
 [5] 钟涛,许伟,徐元宏. 临床分离枸橼酸杆菌 qnr 基(下转第 284 页)

4 组(见表 1), 各组患儿 EBV-DNA 阳性率分别为 21.05%、40.91%、65.71%、50.00%, 小于 1 岁的低龄患儿与其他患儿组差异有统计学意义($P < 0.05$)。就诊当日 EBV-IgM 阳性率分别为 5.26%、9.09%、5.71%、5.00%, 2~3 岁组与其他组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。具体数据见表 1。

表 1 不同年龄组两种方法 EBV 检测阳性率比较

组别	n	EBV-IgM		EBV-DNA	
		阳性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阳性率(%)
≤1	171	9	5.26	36	21.05
2~3	396	36	9.09	162	40.91
4~7	315	18	5.71	207	65.71
8~16	180	9	5.00	90	50.00

3 讨 论

EBV 是疱疹病毒科 γ 亚科中唯一能引起人类感染的淋巴滤泡病毒^[4], 也是最早被确定的人类肿瘤病毒。EBV 为 DNA 病毒, 它有 A 和 B 2 个血清型, 中国以前一种为多见^[5]。该病毒具有嗜 B 淋巴细胞的特性, 所以最先感染成熟 B 细胞, 但 B 细胞并不支持病毒复制而成为“储藏库”。继之 T 淋巴细胞出现强反应, 导致炎症介质高水平分泌, 出现 T 淋巴细胞分化异常, 从而产生异常细胞免疫应答, 这也是临床表现呈多样性的基础^[6]。

咽拭子标本的 DNA 检测阳性率很高。在本实验中, 每个年龄段的 DNA 检出率都明显高于血清学 IgM 的检出率, 说明 EBV 是条件致病病毒, 一般情况下它可以寄生在咽喉部位, 咽部上皮细胞上有 EB 病毒受体^[6], 当机体免疫力下降或进行一些创伤性治疗时, 病毒会乘机侵入血液系统, 进而通过血液循环播散至全身, 可累及全身各器官系统。这也说明了 EBV 感染最早发生的部位是咽部。因此, 咽部上皮细胞内 EBV 的复制比血液中 VCA-IgM 出现的要早^[7], 检测咽拭子 EBV-DNA 以确诊小儿 EBV 感染可以比血清学检测更早给临床提供诊断依据。

分析 EBV 抗体特点, VCA-IgM 抗体在 EBV 感染早期即出现, 但数周后消失, 是急性 EBV 感染可靠标志^[8]。但是, 由于小儿的免疫系统还未完善, 病毒进入机体内, 很难像成人一样刺激机体产生相应的能够达到检测下限的病毒抗体, 即 EBV 的 VCA-IgM 即使在小儿体内产生, 但是其产生量有限, 无法用 ELISA 等方法检测出来^[9]。因此, 在 1 062 例患儿中 EBV-IgM 仅检出了 72 例, 阳性率 6.78%, 远远低于 DNA 的 495 例(46.61%) ($P < 0.01$), 这与其他相关报道基本一致^[9]。

另在不同年龄段中, ≤1 岁组和 8~16 岁组不仅病例数最少, 而且 EBV-IgM 阳性例数也少, 分析可能与研究者选取的研究对象有关。也有可能是因为随着年龄的增长, 患儿的自我防御渐强, 在病毒感染初期即已用药, 使之还没有机会进入血液循环。2~7 岁小儿患病数多, 感染率也高, 这个阶段正是大多数儿童好动的年龄, 群体生活更为病毒的播散提供了方便。因此, 须重视公共卫生工作, 做好个人防护, 从而减少被感染率。

EB 病毒 DNA 阳性率在各年龄段各不相同, 且随着年龄的增长有所增加, 感染率由 ≤1 岁年龄组的 21.05% 上升到 4~7 岁组的 65.71%。可能是由于儿童感染 EBV 后, 病毒可长期潜伏体内, 而在一定条件下病毒又在咽部复制所致。这也说明不同年龄段的儿童由于免疫系统发育处于不同阶段, 对 EBV 感染的免疫应答也可能存在差异。这种差异与免疫系统发育之间的关系其临床意义还有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 梁贤明, 张忠英, 黄如欣. EB 病毒潜伏膜蛋白和肿瘤的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(1): 54-56.
- [2] Gan YY, Hu R, Chai D, et al. Distribution of Epstein-Barr virus antigenic sites on the carboxyl terminal end of ribonucleotide reductase against nasopharyngeal carcinoma serum antibodies using an immunoabsorption method[J]. J Med Virol, 1999, 59(2): 385-396.
- [3] 李玉兰, 王琳. 儿童 EB 病毒感染的实验室诊断[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(23): 3468-3469.
- [4] 易世红, 苏盈盈, 张国梁. EB 病毒检测及 EB 病毒感染相关疾病的分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1): 26-27.
- [5] 胡亚美, 江载芳, 诸福棠. 实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 821.
- [6] Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B-cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus[J]. Nat Med, 2002, 8(6): 594-599.
- [7] 胡兴文, 周小勤. 儿童患者 EB 病毒感染状况分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 369-371.
- [8] 庄国华, 李标. EB 病毒两种实验室检测方法对比分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(13): 1762-1764.
- [9] Paramita DK, Fachiroh J, Artama WT, et al. Native early antigen of Epstein-Barr virus, a promising antigen for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. J Med Virol, 2007, 79(11): 1710-1721.

(收稿日期: 2011-10-09)

(上接第 282 页)

因型检测[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(2): 261-265.

- [6] 李娟, 李从荣, 黄俊, 等. 肺炎克雷伯菌中质粒介导喹诺酮类耐药基因 qnr 的流行现状及耐药特征[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(4): 28-29.
- [7] 杨滨, 孔祥圣. 产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌与大肠埃希菌 qnrB 基因的检测[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(24): 3945-3946.
- [8] 马晓波, 吕晓菊, 陈慧莉, 等. 肠杆菌科细菌喹诺酮耐药基因 qnrB 的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(2): 114-119.
- [9] Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-enco-

ded quinolone resistance protein Qnr with Escherichia coli DNA gyrase[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(7): 118-125.

- [10] Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, et al. In vitro effect of qnrA1, qnrB1 and qnrS1 genes on fluoroquinolone activity against isogenic escherichia coli isolates with mutations in gyrA and parC[J]. Antimicrob Agents Chemther, 2011, 55(3): 1266-1269.

(收稿日期: 2011-10-09)