

· 论 著 ·

PMQR 与耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌喹诺酮耐药机制的关系

冯霞¹, 刘小云¹, 许晶晶^{2△}

(徐州医科大学附属医院: 1. 中心实验室; 2. 检验科, 江苏 徐州 221002)

[摘要] **目的** 分析质粒介导的喹诺酮耐药基因(PMQR)在耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)中的分布,探讨喹诺酮类药物的耐药机制。**方法** 收集 2021 年 7 月至 2022 年 9 月该院临床分离非重复的 43 株 CRE 菌株,采用全自动微生物分析系统进行菌株鉴定和药敏试验,聚合酶链反应(PCR)技术检测 PMQR、碳青霉烯酶和 β 内酰胺酶耐药基因,进行 CRE 菌株的喹诺酮耐药机制分析。**结果** 31 株耐碳青霉烯类大肠杆菌对喹诺酮类药物的耐药率为 93.55%~96.77%。12 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对喹诺酮类药物的耐药率为 66.67%~83.33%。43 株 CRE 对 β 内酰胺酶阻滞剂类药物的耐药率均在 79.07%~100.00%;对多黏菌素和替加环素 100.00%敏感。对氨基糖苷类的阿米卡星和妥布霉素耐药率较低。43 株 CRE 中,88.37%携带有 1 个或 2 个 PMQR,其中 $acc(6')Ib-cr$ 检出率为 83.72%, $qnrS$ 检出率为 69.77%, $qnrB$ 检出率为 2.33%,没有检测到 $qnrA$ 和 $qepA$ 。碳青霉烯酶耐药基因以 NDM(88.97%)和 KPC(32.56%)为主。 β 内酰胺酶耐药基因以 SHV(83.23%)和 CTX-M15(67.57%)为主。**结论** PMQR 在 CRE 菌株中的检出率很高,与 CRE 的喹诺酮类药物耐药机制有关,可能与 NDM、KPC、CTX-M15 共同作用导致多药耐药。

[关键词] 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌; 质粒介导; 喹诺酮耐药基因; 耐药机制

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.23.004 中图法分类号:R738

文章编号:1009-5519(2023)23-3977-05

文献标识码:A

The relationship between PMQR and mechanism of carbapenem-resistant enterobacteriaceae to quinolones

FENG Xia¹, LIU Xiaoyun¹, XU Jingjing^{2△}

(1. Central Laboratory; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Jiangsu, Xuzhou 221002, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the distribution of plasmid-mediated quinolone resistance gene (PMQR) in carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE), and to explore the mechanism of quinolone resistance. **Methods** A total of 43 non-repetitive CRE strains isolated from the hospital from July 2021 to September 2022 were collected. The automatic microbial analysis system was used for strain identification and drug sensitivity test. The PMQR, carbapenemase and β -lactamase resistance genes were detected by polymerase chain reaction (PCR), and the quinolone resistance mechanism of CRE strains was analyzed. **Results** The drug resistant rates of 31 strains of carbapenem-resistant *Escherichia coli* to quinolones were 93.55%–96.77%. The drug resistant rates of 12 strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to quinolones were 66.67%–83.33%. The drug resistant rates of 43 CRE strains to β -lactamase blockers were 79.07%–100.00%. It was 100.00% sensitive to polycyclin and tigacycline. The drug resistant rates of amikacin and tobramycin to polymyxin and tigeacycline and aminoglycosides were low. Among the 43 CRE strains, 88.37% carried one or two PMQRs, of which the detection rate of $acc(6')Ib-cr$ was 83.72%, the detection rate of $qnrS$ was 69.77%, the detection rate of $qnrB$ was 2.33%, and $qnrA$ and $qepA$ were not detected. Carbapenemase resistance genes were mainly NDM(88.97%) and KPC(32.56%). β -lactamase resistance genes were mainly SHV(83.23%) and CTX-M15(67.57%). **Conclusion** The detection rate of PMQR in CRE strains is high, which is related to the quinolone resistance mechanism of CRE, and may lead to multidrug resistance with the combined action of NDM, KPC and CTX-M15.

[Key words] Carbapenem-resistant enterobacteriaceae; Plasmid-mediated; Quinolone resistance gene; Mechanism

耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的广泛分布是对公共健康的巨大威胁,CRE 的感染往往存在多药耐药,给临床抗感染治疗带来很大困难,对喹诺酮类抗菌药物的耐药是其中很常见的一种。喹诺酮类抗菌药物自问世以来,在肠杆菌科细菌感染的治疗中被频繁用到,也因此产生了比较普遍的耐药。关于喹诺酮类抗菌药物耐药机制的研究已经有很多报道,但是关于 CRE 对喹诺酮类药物的耐药机制报道并不多见。本研究通过分析质粒介导的喹诺酮耐药基因(PMQR)在 CRE 中的分布,探讨相关的耐药机制,为临床合理使用该类抗菌药物提供可靠的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2021 年 7 月至 2022 年 9 月本院临床分离非重复的 43 株 CRE 菌株,入选标准为对亚胺培南或美罗培南至少一种耐药。本研究涉及的标本均为临床标本的二次利用,不涉及医学伦理方面的问题。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2 仪器与试剂 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析系统(法国生物梅里埃公司);聚合酶链反应(PCR)扩增仪 ProFlex4483636(Applied Biosystems);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像分析系统 GenoSens1880(上海勤翔科学仪器有限公司);基因扩

增引物由上海捷瑞生物公司合成。2X Taq PCR MasterMix(VICMED),100 bp DNA Ladder[天根生化科技(北京)有限公司]。

1.3 药敏试验 采用 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析系统进行药敏试验和菌株鉴定,药敏试验结果参照临床和实验室标准化协会(CLSI)2021 年的标准判断。

1.4 细菌 DNA 制备 煮沸法:取适量菌落加入 100 μL 无菌双蒸水,充分混匀后 100 °C 煮沸 15 min,迅速放冰浴 10 min,冷却后 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,-20 °C 保存备用。

1.5 基因检测 PMQR 有 qnrA、qnrB、qnrS、qepA、acc(6')Ib-cr;碳青霉烯酶耐药基因有 KPC、NDM、IMP;β 内酰胺酶耐药基因有 CTX-M15、SHV。应用 PCR 技术扩增,引物序列见表 1,设计参考文献[1-3]。反应体系及反应条件:反应体系总体积 25 μL,mix-Taq 12.5 μL,模板 2 μL,上下游引物各 1 μL,双蒸水 8.5 μL;95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s(退火温度见表 1),72 °C 延伸 60 s,35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物分析:1.5% 琼脂糖电泳,凝胶成像分析系统分析拍照。产物送上海生工生物工程有限公司测序鉴定。

表 1 PCR 引物序列长度及退火温度

基因名称	引物序列(5'-3')	引物长度(bp)	退火温度(°C)
qnrA	F:ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516	53
	R:GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
qnrB	F:ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469	53
	R:GATCGTGAAAGCCAGAAAGG		
qnrS	F:ACGACATTCGTCAACTGCAA	417	53
	R:TAAATTGGCACCCGTAGGC		
qepA	F:AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	596	53
	R:GTCTACGCATGGACCTCAC		
acc(6')Ib-cr	F:TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	56
	R:CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
KPC	F:ATGTCACTGTATCGCCGTCTA	882	56
	R:TACTGCCCGTTGACGCCCAA		
NDM	F:GAAGCTGAGCACCGCATTAG	758	59
	R:GGGCCGTATGAGTGATTGC		
IMP	F:CTACGCAGCAGAGTCTTTG	587	53
	R:AACCAGTTTTGCCTTACCAT		
CTX-M15	F:CACACGTGGAATTTAGGGACT	995	56
	R:GCCGTCTAAGGCGATAAACA		
SHV	F:AAGATCCACTATCGCCAGCAG	230	59
	R:ATTCAGTTCGGTTCCAGCGG		

1.6 统计学处理 应用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分比表示,组间差异性比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏试验 收集到的 43 株 CRE 包括 31 株耐碳青霉烯类大肠杆菌(CRECO),12 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)。另外收集非 CRE 大肠杆菌 6 株和肺炎克雷伯菌 6 株作为对照分析。31 株 CRECO 对环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率均为 96.77%,对诺氟沙星和莫西沙星的耐药率均为 93.55%。12 株 CRKP 对环丙沙星的耐药率为 83.33%,对左氧氟沙星、诺氟沙星、莫西沙星的耐药率均为 66.67%。CRECO、CRKP 均对多黏菌素和替加环素 100.00%敏感。见表 2。43 株 CRE 对 β 内酰胺酶阻滞剂类药物的耐药率很高,其中对氨曲南耐药率为 79.07%,对其他 β 内酰胺酶阻滞剂类药物耐药率均在 94.59%~100.00%;对复方磺胺甲噁唑片耐药率为 88.37%;对氨基糖苷类的阿米卡星耐药率为 44.19%,对妥布霉素耐药率为 55.82%。非 CRE 的 6 株大肠杆菌和 6 株肺炎克雷伯菌对上述药物均敏感。

表 2 CRECO 与 CRKP 对临床常用抗菌药物的药敏试验结果 (%)

药物名称	CRECO(n=31)			CRKP(n=12)		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
阿莫西林/克拉维酸	93.55	3.23	3.23	100.00	0	0
哌拉西林/他唑巴坦	96.77	3.23	0	100.00	0	0
头孢他啶	100.00	0	0	100.00	0	0
头孢曲松	100.00	0	0	100.00	0	0
头孢吡肟	100.00	0	0	100.00	0	0
氨曲南	77.42	0	22.58	83.33	0	16.67
阿米卡星	48.39	0	51.61	33.33	0	66.67
妥布霉素	64.52	12.90	22.58	33.33	33.33	33.33
复方磺胺甲噁唑片	90.32	0	9.68	83.33	0	16.67
环丙沙星	96.77	0	3.22	83.33	0	16.67
左氧氟沙星	96.77	0	3.22	66.67	16.67	16.67
诺氟沙星	93.55	3.22	3.22	66.67	0	33.33
莫西沙星	93.55	3.22	3.22	66.67	0	33.33
亚胺培南	100.00	0	0	100.00	0	0
美罗培南	100.00	0	0	100.00	0	0
替加环素	0	0	100.00	0	0	100.00
多黏菌素	0	0	100.00	0	0	100.00

2.2 PMQR 的检测 43 株 CRE 中,88.37%携带有 1 个或 2 个 PMQR,其中 acc(6')Ib-cr 检出率为

83.72%,qnrS 检出率为 69.77%,qnrB 检出率为 2.33%,没有检测到 qnrA 和 qepA。PMQR 在 CRECO 与 CRKP 中的分布见表 3。部分 PMQR 扩增结果见图 1。

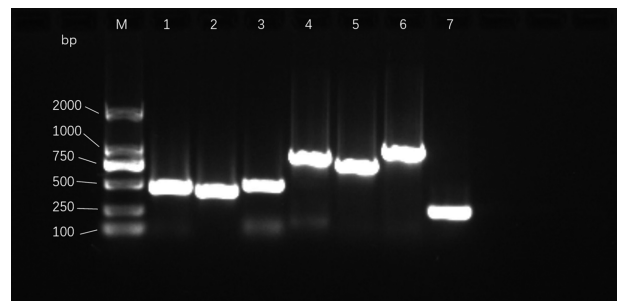
表 3 PMQR 在 43 株 CRE 中的分布情况

PMQR	CRECO(n=31)		CRKP(n=12)	
	阳性 (n)	阳性率 (%)	阳性 (n)	阳性率 (%)
qnrB	0	0	0	0
qnrS	2	6.45	0	0
acc(6')Ib-cr	8	25.81	0	0
qnrB+qnrS+acc(6')Ib-cr	0	0	1	8.33
qnrS+acc(6')Ib-cr	17	54.84	10	83.33
总阳性	27	87.10	11	91.67

43 株 CRE 中,对喹诺酮敏感的 CRE 株仅 3 例,且 100.00%携带 qnrS 和 acc(6')Ib-cr 基因,因此对喹诺酮敏感 CRE 的 PMQR 检出率不低于喹诺酮耐药 CRE,见表 4。

2.3 碳青霉烯酶耐药基因和 β 内酰胺酶耐药基因的检测 43 株 CRE 中碳青霉烯酶耐药基因检测情况:KPC 总体检出率为 32.56%,其中 CRECO 为 19.35%,CRKP 为 66.67%,CRECO 与 CRKP 中的 KPC 检出率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);NDM 总体检出率为 88.97%,CRECO 和 CRKP 的 NDM 检出率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);没有检测到 IMP 基因。 β 内酰胺酶耐药基因检测情况:CTX-M15 检出率为 67.57%,SHV 检出率为 83.23%,CRECO 和 CRKP 中的 CTX-M15 和 SHV 检出率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。部分耐药基因扩增结果见图 1。

非 CRE 的 6 株大肠杆菌和 6 株肺炎克雷伯菌中的 qnrS 检出率为 19.37%,acc(6')Ib-cr 检出率为 15.78%,未检出 qnrB、qnrA 和 qepA。SHV 检出率均为 20.6%,未检出 NDM、KPC、IMP 和 CTX-M15。



注: M. Marker; 1. qnrB; 2. qnrS; 3. acc(6')Ib-cr; 4. KPC; 5. NDM; 6. CTX-M15; 7. SHV。

图 1 部分耐药基因 PCR 产物电泳图

表 4 PMQR 在 43 株喹诺酮耐药或敏感 CRE 中的分布情况

PMQR	CRECO(n=31)				CRKP(n=12)			
	耐药株	阳性率	敏感株	阳性率	耐药株	阳性率	敏感株	阳性率
	(n=30)	(%)	(n=1)	(%)	(n=10)	(%)	(n=2)	(%)
qnrB	0	0	0	0	1	10.00	0	0
qnrS	18	60.00	1	100.00	9	90.00	2	100.00
acc(6')Ib-cr	24	80.00	1	100.00	9	90.00	2	100.00

3 讨 论

最近几十年来,CRE 流行范围越来越广,而且呈现多药耐药的趋势,这使得临床抗感染治疗的药物选择越来越局限。CRE 通常也对喹诺酮耐药,临床上大肠埃希菌对喹诺酮类药物的耐药很常见,所以研究喹诺酮 CRE 的耐药机制很有必要。本研究着重探讨 PMQR 与 CRE 喹诺酮耐药的的关系。

喹诺酮能够特异性结合革兰阴性菌的拓扑异构酶和螺旋酶,形成喹诺酮-酶-DNA 三元复合物,其可以破坏 DNA,从而抑制细菌复制^[4]。1998 年,PMQR 在美国的 CRKP 中发现。qnr 基因受到研究者关注,因为 qnr 可以编码 qnr 蛋白,保护 DNA 拓扑异构酶和螺旋酶,介导喹诺酮耐药的发生。另外,喹诺酮的耐药机制也包括 acc(6')Ib-cr 介导酶失活,qepA 介导药物泵出上调,gyrA 和 parC 诱导的细菌外膜通透性改变。这些最终会降低药物的敏感性,增加细菌对喹诺酮的抗药性^[4]。

本研究结果显示,CRE 中的 PMQR 检出率为 88.37%,其中氨基糖苷乙酰基转移酶 acc(6')Ib-cr 检出率最高,为 83.72%。有文献报道,CRE 的喹诺酮耐药可能是 acc(6')Ib-cr 介导的^[5],acc(6')Ib-cr 能将特异性底物环丙沙星和诺氟沙星的哌嗪基乙酰化,从而介导这 2 个药物耐药^[6]。acc(6')Ib-cr 还可以诱导氨基糖苷类药物耐药。本研究结果显示,CRE 中的 qnrS 检出率为 69.77%,qnrB 检出率为 2.33%。有文献报道,qnr 基因可以上调 gyrA 和 parC 的突变,从而增加细菌对喹诺酮的抗药性^[7]。本研究中没有检测到 qnrA 和 qepA,提示喹诺酮的耐药机制可能与细菌的泵出功能上调无关。

有文献报道,CRECO 对喹诺酮的耐药性较 CRKP 强^[8],从本研究的耐药数据来看,也支持这一结论,但相应的 PMQR 在 CRKP 中的检出率却不低于 CRECO,提示 CRE 对喹诺酮的耐药机制较复杂,不仅仅取决于 PMQR。本研究也分别分析了喹诺酮耐药 CRE 与喹诺酮敏感 CRE 之间 PMQR 分布情况,没有发现统计学意义。这一结果也可能与对喹诺酮敏感的 CRE 例数太少有关,本研究仅 3 例,1 例 CRECO 和 2 例 CRKP,3 例均检出 acc(6')Ib-cr 和

qnrS 基因,对喹诺酮敏感的原因可能是 3 例均为低龄儿童,既往没有喹诺酮用药史。说明这 3 例 CRE 携带的 PMQR 并非临床喹诺酮用药诱导产生,而是通过质粒水平传播获得。事实上在收集 CRE 菌株的过程中,大多数菌株都呈现包括喹诺酮耐药性在内的多药耐药性,对喹诺酮敏感的 CRE 很难找到。

本研究还观察了 CRE 菌株的碳青霉烯酶耐药基因和 β 内酰胺酶耐药基因的分布情况,发现总体 NDM 检出率高达 88.97%,CRKP 和 CRECO 中的 MDM 检出率无差异。而 KPC 检出率在 CRKP 和 CRECO 差异很大,CRKP 中的 KPC 检出率为 66.67%,明显高于 CRECO 中的 19.35%,未检出 IMP。CTX-M15 的总体检出率达 67.57%。说明本地区 CRE 中以 NDM、CTX-M15 和 KPC 为主,与之前文献报道一致^[3]。NDM 属于金属 β 内酰胺酶,只对多黏菌素和替加环素敏感,与其他碳青霉烯酶耐药基因相比,对公共健康威胁更大。编码碳青霉烯酶的基因通常定位在质粒,这个质粒一般同时携带喹诺酮和氨基糖苷类耐药基因^[9-15],已有很多文献报道在菌株间会发生多种耐药基因的水平共转移^[3,16-18]。本研究中 PMQR 分布结果也佐证了这个结论。值得注意的是,在本研究中的 12 例非 CRE 对照菌株中,qnrS 检出率为 19.37%,acc(6')Ib-cr 检出率为 15.78%,虽然远远低于 CRE,但确实存在。非 CRE 对照菌株中均未检出 NDM、KPC、IMP 和 CTX-M15,对照菌株均对喹诺酮类药物敏感,这也提示与 PMQR 相关的喹诺酮耐药机制可能需要 NDM、KPC 和 CTX-M15 的参与。

本研究在收集标本的过程中,由于各种原因收集的标本例数不是很多,尤其 CRKP 例数较少,统计数据不能完全代表本地区流行病学意义,仅就 PMQR 在 CRE 喹诺酮耐药机制中的角色进行探讨。显然 PMQR 参与了 CRE 喹诺酮耐药机制,而且是与其他耐药基因共同参与,而具体的耐药机制还需要进一步的实验佐证,这也是后续的研究方向。

参考文献

[1] GUILLARD T, MORET H, BRASME L, et al.

- Rapid detection of qnr and qepA plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(2):253-259.
- [2] MEMARIANI M, PEERAYEH S N, SALEHI T Z, et al. Occurrence of SHV, TEM and CTX-M β -lactamase genes among enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea [J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2015, 8(4):15620-15627.
- [3] 周开矿, 邹杨, 毕茹茹, 等. 徐州地区耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌流行病学及耐药机制分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(24):3695-3699.
- [4] CAG Y, CASKURLU H, FAN Y, et al. Resistance mechanisms[J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(17):326-333.
- [5] RUAN R H, DUAN D R, YE Y L, et al. Study on the quinolone resistant mechanisms in *E. coli* isolated from outpatient's urine [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 22:136-137.
- [6] ROBICSEK A, STRAHILEVITZ J, JACOBY G A, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase[J]. *Nat Med*, 2006, 12(1):83-88.
- [7] KIM H B, PARK C H, KIM C J, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a nine-year period[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(2):639-645.
- [8] WANG M, WEI H, ZHAO Y, et al. Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 19(1):86-93.
- [9] GARCIA-FULGUEIRAS V, BADO I, MOTA M I, et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of uruguay[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(8):1725-1729.
- [10] STRAHILEVITZ J, JACOBY G A, HOOPER D C, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(4):664-689.
- [11] SHAHID M, AHMAD N, SAEED N K, et al. Clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates simultaneously harboring blaNDM-1, blaOXA types and qnrS genes from the kingdom of Bahrain: Resistance profile and genetic environment [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:1033305.
- [12] EL-FEKY M, HAMMAD H, HADIYA S. Co-occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* isolates in assiut [J]. *J Med Microbiol*, 2017, 26:1-7.
- [13] AL-AGAMY M H, ALJALLAL A, RADWAN H H, et al. Characterization of carbapenemase, ESBLs and plasmid-mediated quinolone determinants in carbapenem-insensitive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh hospital [J]. *J Infect Public Health*, 2018, 11(1):64-68.
- [14] LIU Y, WAN I G, DENG Q, et al. First description of NDM-1, KPC-2, VIM-2 and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 143(2):376-384.
- [15] HUANG S, DAI W, SUN S, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants among carbapenem non-susceptible enterobacter cloacae [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47636.
- [16] 卢燕芳, 兰芳俊, 陈瑶, 等. 粪便中耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的分子生物学与相关的 β 内酰胺酶特征研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(24):3685-3688.
- [17] FENG J, QIU Y, YIN Z, et al. Coexistence of a novel KPC-2-encoding MDR plasmid and an NDM-1-encoding pNDM-HN380-like plasmid in a clinical isolate of *Citrobacter freundii* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(11):2987-2991.
- [18] CARATTOLI A. Plasmid and the spread of resistance [J]. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303(6/7):298-304.