

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2014.07.002

· 论 著 ·

肺炎克雷伯菌 16S rRNA 甲基化酶耐药基因研究

叶春枚^{1,2}, 刘文恩¹

(1 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2 长沙市中医医院(长沙市第八医院), 湖南 长沙 410001)

[摘要] 目的 了解肺炎克雷伯菌对氨基糖苷类抗生素的敏感性及其 16S rRNA 甲基化酶检出情况。方法 收集中南大学湘雅医院 2009 年 1—7 月非重复肺炎克雷伯菌 96 株, 采用琼脂稀释法对庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素的最低抑菌浓度(MIC)进行检测; 聚合酶链反应(PCR)扩增 16S rRNA 甲基化酶基因 *armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *npmA*。结果 肺炎克雷伯菌对阿米卡星、庆大霉素及妥布霉素的 MIC₅₀ 分别为 256 μg/mL、512 μg/mL 和 512 μg/mL; MIC₉₀ 均为 >512 μg/mL; 耐药率分别为 21.88%、63.54%、41.67%。68 株(70.83%)菌至少对 1 种药物耐药, 21 株(21.88%)菌对 3 种药物均耐药。22 株(22.92%)菌 *armA* 基因扩增阳性, 未扩增到 *rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *npmA* 基因; 22 株 *armA* 阳性菌株中, 17 株(77.27%)对 3 种氨基糖苷类抗生素均耐药。*armA* 阳性株与 *armA* (FJ410928.1) 基因序列同源率为 100%。结论 携带 *armA* 型 16S rRNA 甲基化酶基因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; 16S rRNA 甲基化酶; 聚合酶链反应; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R378.99⁺6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)07-0389-04

Drug resistance genes of 16S rRNA methylase in *Klebsiella pneumoniae*

YE Chun-mei^{1,2}, LIU Wen-en¹ (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 Traditional Chinese Medicine Hospital of Changsha/Eighth Hospital of Changsha, Changsha 410001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) to aminoglycosides and detection of 16S rRNA methylase genes in *K. pneumoniae*. **Methods** Ninety-six non-repetitive clinical *K. pneumoniae* isolates were collected from Xiangya hospital of Central South University from January to July 2009, minimal inhibitory concentrations (MICs) of gentamycin, amikacin and tobramycin were determined by agar dilution method; genotype of 16S rRNA methylase genes (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *npmA*) were detected by polymerase chain reaction(PCR). **Results** MIC₅₀ of amikacin, gentamycin and tobramycin was 256 μg/mL, 512 μg/mL and 512 μg/mL respectively; and MIC₉₀ were all >512 μg/mL; antimicrobial resistance rate was 21.88%, 63.54%, and 41.67% respectively. 68 isolates (70.83%) were resistant to at least one kind of antimicrobial agent, 21 isolates (21.88%) were resistant to three kinds of antimicrobial agents. 22 isolates (22.92%) carried *armA*, but *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* and *npmA* were not detected; of 22 isolates harboring *armA* 16S rRNA methylase genes, 17 (77.27%) were highly resistant to gentamicin, amikacin and tobramycin, the homology of *armA* positive isolate and *armA* (FJ410928.1) was 100%. **Conclusion** *armA* 16S rRNA methylase gene harbored in *K. pneumoniae* plays an important role in aminoglycoside resistance.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; 16S rRNA methylase; polymerase chain reaction; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2014, 13(7):389-392]

自 20 世纪 40 年代发现氨基糖苷类药物以来, 其对大多数革兰阳性菌、革兰阴性菌抗菌作用较强。

[收稿日期] 2014-03-12

[作者简介] 叶春枚(1973-), 女(汉族), 湖南省澧县人, 副主任技师, 主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 刘文恩 E-mail: liuwenen@gmail.com

细菌对其的主要耐药机制:(1)外膜通透性降低和内膜转运异常,药物摄入减少,药物在细菌胞内积聚减少;(2)细菌产生针对药物的氨基糖苷类修饰酶(A-MEs),导致抗菌药物失活;(3)药物外排泵的激活和过度表达;(4)氨基糖苷类药物的作用靶位 16S rRNA 基因突变;(5)16S rRNA 甲基化酶。2002 年,日本学者 Yokoyama 等^[1]对 1 株分离自 1997 年的铜绿假单胞菌研究发现,其对临床常用的所有氨基糖苷类抗生素均高度耐药,而介导这种耐药的是一种 16S rRNA 甲基化酶 *rmtA*。近年来,世界各地学者相继发现其他 5 种 16S rRNA 甲基化酶基因,分别为 *armA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *npmA*^[2-6];从动物分离的大肠埃希菌中,发现 1 种新的甲基化酶基因 *RmtE*。甲基化酶修饰的是所有氨基糖苷类药物共同作用的位点,一旦发生修饰,氨基糖苷类抗生素均将失去作用。为了解本院肺炎克雷伯菌对氨基糖苷类抗生素的敏感性,及 16S rRNA 甲基化酶检出情况,本研究收集中南大学湘雅医院分离的肺炎克雷伯菌 96 株,应用琼脂稀释法进行庆大霉素、阿米卡星及妥布霉素最低抑菌浓度(MIC)检测,应用聚合酶链反应(PCR)进行 *armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*、*npmA* 基因扩增,现将结果报告如下。

1 材料与方法

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—7 月住院患者临床标本分离的非重复肺炎克雷伯菌 96 株。临床菌株保存于脱脂牛奶管中,置于 -70℃ 冰箱保存。(2)质控菌株:肺炎克雷伯菌 ATCC 700603,来源于中国菌种保存中心,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。

1.1.3 仪器和试剂 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;ABI3700 自动测序仪进行测序。Master Mix

PCR 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;16S rRNA 甲基化酶基因引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,DNA Marker I (100—600 bp)购自北京天根生化科技有限公司;EB 替代品染料,购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养鉴定及药敏试验 根据《全国临床检验操作规程》(第 3 版)常规方法培养肺炎克雷伯菌。所有菌株采用法国生物梅里埃公司的全自动微生物鉴定系统 VITEK-2 细菌鉴定仪革兰阴性菌 GN 卡进行鉴定,AST GN-13 卡进行药敏分析。

1.2.2 MIC 的检测 采用琼脂稀释法,按照美国临床实验室标准化协会(CLSI) 2009 年标准进行 3 种氨基糖苷类抗生素的 MIC 测定。

1.2.3 16S rRNA 甲基化酶基因 采用 PCR 扩增 16S rRNA 甲基化酶基因,引物序列参照文献^[7],由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应体系为 50 μL。DNA 模板 2 μL,2 × Master MIX 25 μL (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 250 μmol/L dNTP each, 0.05 U polymerase, dd H₂O, 其他稳定剂和增强剂), 10 μmol/L 引物各 2 μL,灭菌双蒸馏水补足 50 μL。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 47℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。

1.2.4 序列分析 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果提交网站(www.ncbi.nlm.nih.gov)进行比对。

2 结果

2.1 肺炎克雷伯菌对 3 种氨基糖苷类抗生素的 MIC 肺炎克雷伯菌对阿米卡星、庆大霉素及妥布霉素的 MIC₅₀ 分别为 256 μg/mL、512 μg/mL 和 512 μg/mL; MIC₉₀ 均 > 512 μg/mL; 耐药率分别为 21.88%、63.54%、41.67%。见表 2。68 株(70.83%)菌至少对 1 种药物耐药,21 株(21.88%)菌对 3 种药物均耐药。

表 1 16S rRNA 甲基化酶 PCR 扩增引物

Table 1 PCR primer sequences of 16S rRNA methylase genes

Gene	Primer sequence(5'—3')	Length of products (bp)
<i>armA</i>	GGGGTCTTACTATTCTG TTCCCTTCTCCTTTC	503
<i>rmtA</i>	CCTAGCGTCCATCCTTTCCTC AGCGATATCCAACACACGATGG	846
<i>rmtB</i>	ATGAACATCAACGATGCCCTC TTATCCATTCTTTTTTATCAAGTATAT	769
<i>rmtC</i>	AGTGTATGAAAAATGTCTGG GGTGTGTTAGAATTTGCCTT	1 198
<i>rmtD</i>	GGGCTGAATCCTGTCTACCTCG GGTTCTCGCCAGTATTTC	741
<i>npmA</i>	AGCACTTTCATACTGACG AATTTGTCTTATTAGC	978

表 2 96 株肺炎克雷伯菌对 3 种氨基糖苷类抗生素的 MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Table 2 MICs of three kinds of aminoglycosides to 96 *K. pneumoniae* isolates($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Antimicrobial agent	Breakpoint of susceptibility	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range of MIC	Drug-resistant rate(%)
Amikacin	S \leq 16,R \geq 64	256	>512	0.5~1 024	21.88
Gentamycin	S \leq 4,R \geq 16	512	>512	2~1 024	63.54
Tobramycin	S \leq 4,R \geq 16	512	>512	0.5~1 024	41.67

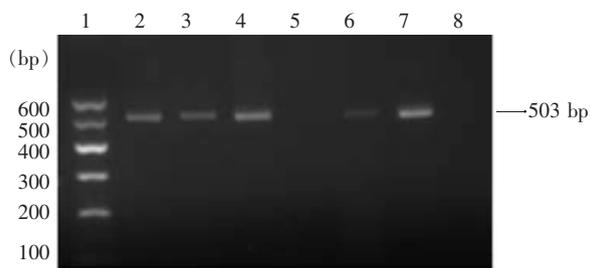
2.2 16 S rRNA 甲基化酶基因扩增结果 对 96 株肺炎克雷伯菌进行 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因 (*armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *npmA*) 检测, 其中 22 株 (22.92%) *armA* 基因扩增阳性, 未扩增到 *rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 和 *npmA* 基因。扩增产物电泳图见图 1。

(FJ410928.1) 基因序列同源性为 100%。

3 讨论

16S rRNA 甲基化酶通过甲基化 16S rRNA A 位点的某个或某几个碱基, 使氨基糖苷类药物不能与其作用靶点相结合, 从而导致细菌对氨基糖苷类药物高水平耐药^[8]。最早从 1997 年分离的铜绿假单胞菌中发现 16S rRNA 甲基化酶, 其对临床所有氨基糖苷类抗生素高水平耐药, 基因分析结果显示, 这种高水平耐药是由 *rmtA* 介导的。随后又在黏质沙雷菌中发现了甲基化酶 *rmtB*, *rmtC* 在奇异变形杆菌中被鉴别^[4], 2007 年从铜绿假单胞菌中发现了 *rmtD* 16S rRNA 甲基化酶^[5], *armA* 基因最初在波兰 1 株弗劳地柠檬酸杆菌中检出 (基因登录号为 AF5504150)。

研究^[9]表明, 北美洲主要以 *armA* 和 *rmtB* 为主, 欧洲以 *armA* 为主, 拉丁美洲以 *rmtD* 为主; 我国主要类型是 *armA* 和 *rmtB*^[10-11]。俞云松等^[12]在亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌中发现 *armA*; 潘韵峰等^[13]调查了国内 6 个省市 25 家医院分离的鲍曼不动杆菌, 发现 *armA* 基因阳性率高达 47.7%。2004 年, 我国台湾地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 *armA* 和 *rmtB* 的阳性率仅有 0.4% 和 0.04%。本研究仅扩增出 16S rRNA 甲基化酶 *armA* 基因, 阳



1: DNA Marker I (100—600 bp); 2—4, 6—7: Positive results; 5: Negative result; 8: Negative control

图 1 *armA* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of PCR amplification of *armA* gene

2.3 肺炎克雷伯菌耐药基因型和表型比较 22 株 *armA* 阳性菌株中, 17 株 (77.27%) 对 3 种氨基糖苷类抗生素均耐药。

2.4 序列分析 随机选取一份阳性标本, 将 PCR 扩增产物纯化后送测序, 所得序列与基因库已知序列进行对比分析, 结果显示 *armA* 阳性株与 *armA*

性率 22.92%，与以往报道的我国主要类型为 *armA* 相符，但是不同国家、不同地区阳性率不同。22 株 *armA* 阳性菌株中，17 株 (77.27%) 对 3 种氨基糖苷类抗生素均耐药。主要原因为 16S rRNA 甲基化酶能保护细菌的 30S 核糖体 16S rRNA 不被氨基糖苷类药物结合，导致对 3 种氨基糖苷类药物高水平耐药。16S rRNA 甲基化酶基因的检出率高，可能是因为质粒在病房内、医院间传播，以及临床不合理使用抗菌药物及抗菌药物选择性压力所致^[14]。

armA 基因位于一个大质粒上，*armA* 与 *ant3'*、*sull* 和 *dfrXII* 基因 (分别介导链霉素、大观霉素、磺胺类抗菌药物的耐药) 位于同一个整合子上，*armA* 是复合转座子 Tn1548 的一部分。Tn1548 和编码超广谱 β -内酰胺酶 CTX-M-3 的基因位于同一个质粒上，这些遗传环境的结构表明，16S rRNA 遗传基因被携带可转移的大质粒的移动遗传因素介导^[15]。我们未进行质粒抽取和转化及分子杂交，有待下一步进行研究。

以往药学工作者通过改造氨基糖苷类药物的结构，提高药物的抗菌作用，从而开发新药。16S rRNA 甲基化酶编码基因介导氨基糖苷类抗生素高水平耐药，该基因的检出，使得通过改造氨基糖苷类药物的结构开发新药的方式受阻。因此，16S rRNA 甲基化酶所致的氨基糖苷类药物耐药应引起微生物学家、药学工作者，乃至全社会的关注。

[参 考 文 献]

- [1] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1888 - 1893.
- [2] Galimand M, Sabtcheva S, Coruvalin P, et al. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 2949 - 2953.
- [3] Lee H, Yong D, Yun J H, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase mediated highly amikacin resistant isolates in Korea [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2006, 56(3): 305 - 312.
- [4] 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 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(1): 178 - 184.
- [5] Doi Y, de Oliveira Garcia D, 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 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(3): 852 - 856.
- [6] Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, *NpmA*, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(12): 4401 - 4409.
- [7] Ma L, Lin C J, Chen J H, et al. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(1): 104 - 111.
- [8] Wu Q, Zhang Y, Han L, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Shanghai, China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 27(1): 271 - 272.
- [9] Yamane K, Rossi F, Goreth M G, et al. 16S ribosomal RNA methylase *RmtD* produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(3): 746 - 747.
- [10] Wu C M, Wang Y, Cao X Y, et al. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from chickens in China [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63(2): 408 - 411.
- [11] Yu F Y, Wang L, Pan J, et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of *rmtB* and *armA* genes in the same isolate [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 64(1): 57 - 63.
- [12] Yu Y S, Zhou H, Yang Q, et al. Widespread occurrence of aminoglycoside resistance due to *armA* methylase in imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60(2): 454 - 455.
- [13] 潘韵峰, 周华, 周志慧, 等. 16S rRNA 甲基化酶基因在鲍曼不动杆菌中的分布 [J]. *中华传染病杂志*, 2007, 25(10): 593 - 596.
- [14] Wu Q, Liu Q, Han L, et al. Plasmids mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 and *armA* 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in carbapenem resistant *Enterobacter cloacae* in China [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2006, 66(3): 326 - 328.
- [15] Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(7): 2464 - 2469.

(本文编辑: 左双燕)