

# 喹乙醇耐药基因 *oqxAB* 的发现与流行

陈 祥, 殷嘉浚, 焦新安

**摘要:** 喹乙醇是一种喹噁啉-N1, N4-二氧化物, 作为动物生长促进剂而被广泛使用, 曾被认为是一种相对安全的抗菌药物。随着该药物在养殖业中的长期使用, 其耐药问题也逐步被认识。2003年从丹麦猪粪中分离出一株大肠杆菌, 含有介导喹乙醇耐药的接合型质粒pOLA52。次年研究发现质粒pOLA52携带外排泵基因*oqxAB*, 不仅介导喹乙醇耐药, 还能降低细菌对氯霉素、喹诺酮类药物的敏感性。因此, 2009年*oqxAB*基因也被归为一种质粒介导的喹诺酮类药物耐药(Plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR)基因。本文对喹乙醇耐药基因*oqxAB*的发现与流行做一综述。

**关键词:** 喹乙醇; *oqxAB*; 质粒介导的喹诺酮类药物耐药性

中图分类号: Q931; R978.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2013)12-1208-04

## Origin and prevalence of olaquindox resistance determinant *oqxAB*

CHEN Xiang, YIN Jia-jun, JIAO Xin-an

(Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis / Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**ABSTRACT:** The quinoxaline-di-N-oxide olaquindox has been widely used as a growth promoter in food animal, which has been considered as a relatively safe antimicrobial agent. Since the agent has been used in the aquaculture for a long time, antimicrobial resistance problem has become increasingly serious. In 2003, a conjugative plasmid, pOLA52, conferring resistance to olaquindox was isolated from *Escherichia coli* of porcine origin from Denmark. The OqxAB efflux pump reduced susceptibility towards chloramphenicol and quinolones. Because the OqxAB efflux pump reduced susceptibility towards quinolones, it was recognized as a plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinant in 2009. Until now, the data on the epidemiology and resistance mechanism of OqxAB were limited. This review was focused on the origin and prevalence of olaquindox resistance determinant *oqxAB*.

**KEY WORDS:** olaquindox; *oqxAB*; plasmid-mediated quinolone resistance

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31001079), the National Programs for High Technology Research and Development of China (No. 2012AA101601-6), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

Corresponding author: Jiao Xin-an, Email:jiao@yzu.edu.cn

喹噁啉-N1, N4-二氧化物(Quinoxaline-N, N-dioxides)是上世纪50年代发现的具有抗菌活性的先导化合物, 70年代起国内外把喹噁啉类化合物用作动物生长促进剂, 其主要包括喹乙醇(Olaquindox)、乙酰甲喹(Mequindox)、喹烯酮(Quinocone)、喹赛多(Cyadox)、卡巴氧(Carbadox)和喹胺

醇等, 研究表明该类化合物具有提高饲料效率、促进动物生长和广谱抗菌的作用, 是一类较好的非营养性药物饲料添加剂, 抗菌活性是它们具有促生长作用的基础<sup>[1]</sup>。

喹乙醇又称喹酰胺醇, 商品名为倍育诺、快育灵, 为上世纪70年代德国拜尔研究合成的饲料添加剂, 我国于1981年成功合成了喹乙醇。喹乙醇通过抑制细菌DNA的合成, 进而起到抑制细菌生长的效果<sup>[2]</sup>, 曾被认为是一种相对安全的抗菌药物。随着该类药物的长期使用, 其耐药问题也越来越被重视。2003年, 从猪粪中分离出一株大肠杆菌, 发现

国家自然科学基金(No. 31001079); 863计划(No. 2012AA101601-6)和江苏高校优势学科建设工程重点项目联合资助

通讯作者: 焦新安, Email:jiao@yzu.edu.cn

作者单位: 扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009

了介导喹乙醇耐药的接合型质粒,命名为 pOLA52<sup>[3]</sup>。次年,研究发现喹乙醇耐药是由 pOLA52 携带的外排泵基因 *oqxAB* (*olaquindox* resistance) 介导, *oqxAB* 操纵子由 *oqxA* 和 *oqxB* 组成<sup>[4]</sup>。*oqxAB* 属于首次被发现的质粒介导的耐药结节分化家族(Resistance nodulation division family, RND 家族),编码多重耐药外排泵,表达依赖于 TolC 外膜蛋白,介导喹乙醇耐药,同时可以降低细菌对氯霉素、喹诺酮类药物、杀虫剂的敏感性,如萘啶酸、环丙沙星、诺氟沙星、三氯生、氯己定等<sup>[5-6]</sup>。Norman 等(2008)完成了对 pOLA52 质粒的测序,质粒大小为 51 602 bp,属于 IncX1 型质粒,包括 68 个假定基因<sup>[6]</sup>。RND 家族多重耐药外排泵存在于多种细菌中,革兰氏阴性细菌中主要位于染色体,能够将细胞质中不需要的化合物通过细胞膜运输到细胞外<sup>[7]</sup>。因 *oqxAB* 可以降低细菌对喹诺酮类药物的敏感性,近年来 *oqxAB* 也被归为质粒介导的喹诺酮类药物耐药(Plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR)基因的新成员<sup>[8]</sup>。质粒编码的耐药基因亦越来越引起关注。

## 1 喹乙醇耐药基因 *oqxAB* 的由来

自从上世纪 70 年代投入使用喹乙醇后,丹麦等研究发现一些农场动物中分离到喹乙醇耐药性大肠杆菌,且在养猪业中使用喹乙醇,会导致细菌对喹乙醇耐药性增加<sup>[9]</sup>。2003 年 Sørensen 等从使用喹乙醇作为饲料添加剂的农场猪粪中,分离出一株大肠杆菌,能在 100 μg/mL 喹乙醇的 LB 平板上生长。且此分离株对氨苄西林、卡那霉素、氯霉素、呋喃妥因、链霉素、喹乙醇、磺胺甲基异噁唑、甲氧苄氨嘧啶和卡巴氧均耐药,对阿布拉霉素、环丙沙星、粘菌素 E、庆大霉素、萘啶酸和四环素敏感。将此分离株作为供体菌,大肠杆菌 CSH26 作为受体菌,通过接合转移获得接合子。该接合子对氨苄西林(MIC>32 μg/mL)、氯霉素(MIC=64 μg/mL)、喹乙醇(MIC=128 μg/mL)耐药,对呋喃妥因中度耐药,对卡那霉素、链霉素、磺胺甲基异噁唑、甲氧苄氨嘧啶等敏感。接合子仅含一个大小为 52 kb 的质粒,并将此质粒命名为 pOLA52<sup>[3]</sup>。

*Apa*L I 消化 pOLA52 质粒,消化后片段连接到 pLOW2 上的 *Apa*L I 位点。仅有一株插入片段为 6 kb 的重组菌,能在 64 μg/mL 喹乙醇的 LB 平板上生长。此片段包含两个开放阅读框 *oqxA* 和 *oqxB*,分别编码 391 和 1 050 个氨基酸。OqxA 和 OqxB 分别与细菌耐药结节分化家族外排泵(AcrA

和 AcrB, MexE 和 MexF, MexX 和 MexY)同源性高。大肠杆菌是发现主动外排泵最多的一种细菌,在大肠杆菌中发现存在 EmrAB、EmrE、AcrAB 等 50 多种外排泵,虽然有些外排泵的功能还未确定,但是它们所排出的共同底物是乙啡啶<sup>[10]</sup>, *oqxAB* 菌株具有 H<sup>+</sup> 依赖乙啡啶外排能力。外膜蛋白是 RND 家族外排泵起作用的关键,如 OprM 或者 TolC,在大肠杆菌中,外排泵 OqxAB 的表达依赖于 TolC 外膜蛋白,证实其属于 RND 家族外排泵<sup>[4]</sup>。

## 2 喹乙醇耐药基因 *oqxAB* 的序列分析

2008 年, Norman 等测序并注释多重耐药质粒 pOLA52,其全长为 51 602 bp,由 68 个假定基因组成。酶切图谱与 2003 年分析的酶切图类似<sup>[3]</sup>。pOLA52 中 21 kb 遗传区域由一个复合体组成,其它部分是编码氨苄西林耐药的 Tn3 转座子片段。质粒上 RND 家族外排泵 *oqxAB* 和 3 型菌毛结构(*mrkABCDF*)分别编码多重耐药和生物被膜,*oqxAB* 和 *mrkABCDF* 分别与来源于肺炎克雷伯菌的两个复合转座子(Tn6010 和 Tn6011)同源。Norman 等将 pOLA52 归为 IncX1 不相容类群质粒,IncX1 质粒在肠杆菌科中流行率较高。pOLA52 质粒接合转移区域与具有典型特征 IncX2 类质粒 R6K 的同源物 IncX1 相似。IncX2 类质粒 R6K 没有 TA 系统,与之相比,IncX1 质粒存在额外质粒稳定基因区,IncX1 质粒的流行程度超过 IncX2<sup>[6]</sup>。与质粒 pOLA52 不同,2010 年 Zhao 等 13 株接合子中, *oqxAB* 与 IS26 相连,且位于广宿主范围 IncF 类质粒<sup>[11]</sup>。*oqxAB* 位于转座子 Tn6010 上,协同其它耐药基因一起水平转移,并促进这些耐药基因被选择出来,给临床细菌性疾病的治疗带来更严重的威胁<sup>[11]</sup>。

肺炎克雷伯菌 ATCC2799(*oqxA* 基础水平表达)、ATCC700603(*oqxA* 过表达)和不同临床分离株的 *oqxA* 启动区域(TTGCAC-35, TACAAT-10 和周边序列)相同,但是 *oqxA* 转录水平却不同。所有菌株此序列与肺炎克雷伯菌 MGH78578(GenBank 登录号:NC009648)相同。因此,*oqxA* 表达水平的增加不是假定启动子的突变引起的,而是由不确定调控元件调节的<sup>[12]</sup>。近来发现,AraC 类转录调控元件家族的整体调控元件如 *ramA*、*rarA* 和 GntR 类调控元件的局部调控元件 *oqxR*,分别调节 *oqxAB* 外排泵表达增加或者降低<sup>[13-14]</sup>。与 pOLA52<sup>[9]</sup> 推论不同,虽然所有包含编码 OqxAB 的菌株都为 IS26 阳性,但是此插入序列和 *oqxA* 转录水

平没有线性关系。

### 3 喹乙醇耐药基因 *oqxAB* 的流行病学

目前对于 *oqxAB* 基因的研究较少,全球流行病学资料相对匮乏。Hansen 等 1995—1998 年分离自丹麦、瑞士的猪源大肠杆菌中,1.8%(10/556)对喹乙醇 MIC 值 $\geqslant$ 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,且其中 9 株含有 *oqxAB* 基因<sup>[15]</sup>。Kim 等在 1998—2006 年韩国临床血液分离的人源菌株中,0.4%(1/261)大肠杆菌、4.6%(3/65)阴沟肠杆菌和 74.1%(100/135)肺炎克雷伯菌含有 *oqxAB* 基因<sup>[12]</sup>。Park 等在 2006—2008 年韩国人源临床分离株中,*oqxA* 在产 ESBL 大肠杆菌和肺炎克雷伯菌中的检出率分别为 11.5%(12/104)和 14.4%(15/104),但大肠杆菌中没有同时检测到 *oqxA* 和 *oqxB*,肺炎克雷伯菌中 *oqxAB* 的检出率为 24.4%(10/41)<sup>[16]</sup>。Rodríguez-Martínez 等在 114 株人源临床产 ESBL 肺炎克雷伯菌中,*oqxA* 和 *oqxB* 的检出率分别为 76% 和 75%<sup>[17]</sup>。

然而在我国,细菌中 *oqxAB* 阳性率却高得多。Zhao 等报道,在广东 2002 年农场猪、鸡、工人及环境等来源 172 株大肠杆菌中,*oqxAB* 基因检测率为 39%(67/172),其中动物来源为 39.8%(39/98),人源为 30.3%(10/33),环境源为 43.9%(18/41),且 *oqxAB* 基因由 43~115 kb 大小不等的可转移质粒携带<sup>[11]</sup>。田伟等在 2007—2009 年分离自广东 655 株分离自猪、牛、鸭和鸡源大肠杆菌中,*oqxAB* 的阳性率分别为 49.3%(108/219)、47.5%(19/40)、60.5%(124/205)和 12.6%(24/191),总阳性率为 42.0%(275/655)<sup>[18]</sup>。2002—2010 年分离自广东 495 株动物源大肠杆菌中,*oqxAB* 在猪源和禽源大肠杆菌中阳性率分别为 44.6% 和 41.4%<sup>[19]</sup>。2010 年分离自广东佛山、东莞等养殖场猪和禽类(鸭、鹅、鸡)大肠杆菌中,*oqxA* 和 *oqxB* 阳性率分别为 44.8% 和 48.9%<sup>[20]</sup>。Wang 等 2009 年分离自北京、上海、广东、成都、重庆 5 个不同区域 6 个动物园 206 株大肠杆菌中,产 ESBL 大肠杆菌 *oqxAB* 的检出率为 45%(n=29),不产 ESBL 大肠杆菌检出率为 1.4%(n=2)<sup>[21]</sup>。Yuan 等从 2010 年采集自上海人的临床样品中,136 株大肠杆菌 *oqxAB* 的检出率为 6.6%,154 株肺炎克雷伯菌全部检出 *oqxAB*<sup>[22]</sup>。Chen 等在 1993—2010 年分离的 1 022 株大肠杆菌中,20.2% 的菌株携带 *oqxAB*,在宠物、鸡、鹅、鸭、牛、人、猪和环境来源的大肠杆菌中,*oqxAB* 检出率分别为 0%、19.8%、7.5%、9.1%、0%、5.2%、51.0% 和 20.5%,动物源菌株中 *oqxAB* 检出率为

27.0%(181/671)显著高于人源菌株(5.2%,16/307),猪源菌株中的阳性率(51.0%)显著高于禽源菌株(18.4%),并且在 1994 年分离的鸡源菌株中检测到 *oqxAB*<sup>[23]</sup>。与动物、环境等来源大肠杆菌相比,人源临床分离株中 *oqxAB* 检出率要低得多,但是肺炎克雷伯菌中的 *oqxAB* 检测率一直处于较高水平,有些甚至达到了 100%。*oqxAB* 在中国明显高于其它国家及在猪源菌株的高检出率,是否可能与喹乙醇等在猪饲养过程中作为生长促进剂的大量使用和不规范使用有一定的关系,有待深入研究。

### 参考文献:

- Cao SZ, Zhang L, Liang JP, et al. Progress of study on the special-toxicology of quinoxaline-1, 4-dioxide-type antibacterial and growth-promoting agents[J]. Prog Vet Med, 2011, 22(2): 17-20. (in Chinese)
- 曹随忠, 张力, 梁剑平, 等. 喹噁啉-1, 4-二氧化物类抗菌促生长剂特殊毒理学研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 22(2): 17-20.
- Suter W, Rosselet A, Knüsel F. Mode of action of quindoxin and substituted quinoxaline-di-N-oxides on *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1978, 13(5): 770-783. DOI: 10.1128/AAC.13.5.770
- Sørensen AH, Hansen LH, Johannessen E, et al. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquindox[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(2): 798-799. DOI: 10.1128/AAC.47.2.798-799.2003
- Hansen LH, Johannessen E, Burmølle M, et al. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3332-3337. DOI: 10.1128/AAC.48.9.3332-3337.2004
- Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, et al. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(1): 145-147. DOI: 10.1093/jac/dkm167
- Norman A, Hansen LH, She Q, et al. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux[J]. Plasmid, 2008, 60(1): 59-74. DOI: 10.1016/j.plasmid.2008.03.003
- Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes[J]. Mol Microbiol, 2000, 37(2): 219-225. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01926.x
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(4): 664-689. DOI: 10.1128/CMR.00016-09
- Hedges AJ, Linton AH. Olaquindox resistance in the coliform flora of pigs and their environment: an ecological study[J]. J Appl Bacteriol, 1988, 64(5): 429-443. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb05100.x
- Mine T, Morita Y, Kataoka A, et al. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(12): 4153-4157. DOI: 10.1128/AAC.47.12.4153-4157.2003

- monas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(2): 415-417.
- [11]Zhao J, Chen Z, Chen S, et al. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(10): 4219-4224. DOI: 10.1128/AAC.00139-10
- [12]Kim HB, Wang M, Park CH, et al. *oqxAB* encoding a multi-drug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(8): 3582-3584. DOI: 10.1128/AAC.01574-08
- [13]Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, et al. Characterisation of RarA, a novel AraC-family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(8): 4450-4458. DOI: 10.1128/AAC.00456-12
- [14]Veleba M, Schneiders T. Tigecycline resistance can occur independently of the *ramA* gene in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(8): 4466-4467. DOI: 10.1128/AAC.06224-11
- [15]Hansen LH, Sørensen SJ, Jørgensen HS, et al. The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquindox-resistant *Escherichia coli* in pigs[J]. *Microb Drug Resist*, 2005, 11(4): 378-382. DOI: 10.1089/mdr.2005.11.378
- [16]Park KS, Kim MH, Park TS, et al. Prevalence of the Plasmid-mediated quinolone resistance genes, *aac(6')*-Ib-cr, *qepA*, and *oqxAB* in clinical isolates of extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2012, 42(2): 191-197.
- [17]Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(1): 68-73. DOI: 10.1093/jac/dks377
- [18]Tian W, Zhao JJ, Deng YT, et al. Prevalence of *oqxAB* multi-drug efflux pump in *Escherichia coli* isolated from animals[J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2011, 38(10): 156-159. (in Chinese)
- 田伟,赵静静,邓玉婷,等.动物源大肠杆菌多重耐药外排泵 *oqxAB* 的流行状况调查[J].中国畜牧兽医,2011,38(10): 156-159.
- [19]Liu BT, Liao XP, Yang SS, et al. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals[J]. *J Med Microbiol*, 2012, 61(Pt11): 1591-1599. DOI: 10.1099/jmm.0.043307-0
- [20]Zhuang N, Chen XY, Yue L, et al. Detection of PMQR gene in *Escherichia coli* isolated from animals[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(10): 2052-2057. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2012.10.018 (in Chinese)
- 庄娜,陈雪影,岳磊,等.动物源大肠杆菌 PMQR 基因流行检测[J].中国农业科学,2012,45(10): 2052-2057.
- [21]Wang Y, He T, Han J, et al. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 159(1/2): 53-59. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.03.009
- [22]Yuan J, Xu X, Guo Q, et al. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(7): 1655-1659. DOI: 10.1093/jac/dks086
- [23]Chen X, Zhang W, Pan W, et al. Prevalence of *qnr*, *aac(6')*-Ib-cr, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(6): 3423-3427. DOI: 10.1128/AAC.06191-11

收稿日期:2013-06-17;修回日期:2013-10-18

## (上接第 1207 页)

- [32]Graebing PW, Chib JS, Hubert TD, et al. Metabolism of niclosamide in sediment and water systems[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(19): 5924-5932. DOI: 10.1021/jf0401524
- [33]Frank MP, Graebing P, Chib JS, et al. Effect of soil moisture and sample depth on pesticide photolysis[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(9): 2607-2614. DOI: 10.1021/jf0115746
- [34]Graebing P, Frank M, Chib JS, et al. Effects of fertilizer and soil components on pesticide photolysis[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(25): 7332-7339. DOI: 10.1021/jf020488i
- [35]Dawson VK, Johnson DA, Allen JL. Loss of lampricides by adsorption on bottom sediments[J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1986, 43(8): 1515-1520. DOI: 10.1139/f86-189
- [36]Statham CN, Lech JL. Metabolism of 2',5-Dichloro-4'-Nitro-salicylanilide (Bayer73) in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *J Fish Res Board Can*, 1975, 32(4): 515-522. DOI: 10.1139/f75-063
- [37]Dawson VK, Schreier TM, Boogaard MA, et al. Uptake, metabolism, and elimination of niclosamide by fish[M]. New York: Plenum Publishing Corporation, 1999: 167-176. DOI: 10.1007/978-1-4615-4703-7\_12
- [38]Dawson VK, Schreier TM, Boogaard MA. Rapid loss of lampricide from catfish and rainbow trout following routine treatment[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(23): 6780-6785. DOI: 10.1021/jf020443h
- [39]Brennan P, Johnson D, Rider S, et al. Dermal absorption of niclosamide in rats and minipigs[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 1991, 12(7): 547-556. DOI: 10.1002/bdd.2510120708

收稿日期:2012-12-08;修回日期:2013-05-27