

• 论 著 •

变性高效液相色谱法检测鲍曼不动杆菌喹诺酮耐药基因突变

吴 旋¹, 伍严安²

(1. 福建医科大学省立临床医学院, 福州 350001; 2. 福建省立医院, 福州 350001)

摘 要:目的 通过运用变性高效液相色谱(DHPLC),研究鲍曼不动杆菌耐药表型与其染色体上 gyrA 和 parC 基因突变的关系。方法 采用微量肉汤稀释法测定左氧氟沙星和加替沙星对 90 株临床分离鲍曼不动杆菌的最低抑菌浓度(MIC);采用基因外序列进行同源性分析,PCR 扩增鲍曼不动杆菌的 gyrA 和 parC 基因,对 PCR 产物进行 DHPLC 检测及 DNA 测序。结果 90 株鲍曼不动杆菌中,对左氧氟沙星和加替沙星耐药率分别为 63.3%和 60.0%;同源性分析可分成 9 种基因型,90 株扩增出了 343 bp 的 gyrA 基因和 327bp 的 parC 基因产物。9 种基因型中,3 种表型耐药的基因型 PCR 产物经 DHPLC 检测均出现异常双峰或者多峰。测序证实 gyrA 基因存在 83 位 Ser→Leu 突变,parC 基因在 80 位同样出现 Ser→Leu 突变,同时 parC 基因还存在多个位点的同义突变;敏感株运用 DHPLC 检测只出现单峰,测序未发现突变。结论 运用 DHPLC 检测可以快速发现细菌耐药基因的突变,鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物的耐药与 gyrA 和 parC 基因的高频突变相关。

关键词:鲍氏不动杆菌; 喹诺酮类; 色谱法,高效液相; DNA 促旋酶; DNA 拓扑异构酶Ⅳ; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.008 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)04-0448-03

Detecting gene mutations of quinolone resistant Acinetobacter baumannii by denaturing high-performance liquid chromatography

Wu Xuan¹, Wu Yanan²

(1. Department of Laboratory, the Second Affiliated People Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China, 350003; 2. Fujian Provincial Hospital, Fujian medical university, Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Objective** To study the relations of resistance phenotype of Acinetobacter baumannii and gene mutations of gyrA and parC on the chromosomes by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). **Methods** Micro broth dilution was used to determine the minimum inhibitory concentrations(MIC) of Levofloxacin and Moxifloxacin of 90 Acinetobacter baumannii isolated from the clinical specimens; Gene homology was analyzed by repetitive extragenic palindrome. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the gyrA and parC. The PCR products were analysed by DHPLC and sequencing. **Results** The resistance of Levofloxacin and Moxifloxacin was 63.3% and 60.0% in the 90 Acinetobacter baumannii. There were nine genotypes in the clinical isolates. Ninety had the expect sizes of 343bp of gyrA and 327bp of parC. Three out of nine genotypes, which were drug resistant, were all found abnormal elution peaks (two or three peaks) by DHPLC. The result of DNA sequencing demonstrated that mutations in gyrA gene that resulted in amino acid substitutions of Ser83→Leu and in parC that resulted in Ser80→Leu. And there were some synonymous mutations in parC gene. All the drug susceptible ones showed single peak, and the results of sequencing had no mutation. **Conclusion** Detecting gene mutations was rapid by DHPLC. And Resistance among quinolone resistant Acinetobacter baumannii strains is related with high frequency mutations in the gyrA and parC genes.

Key words: acinetobacter baumannii; quinolones; chromatography, high performance liquid; gyrase DNA; DNA topoisomerase Ⅳ; mutation

近年来,鲍曼不动杆菌的院内感染日益增多,并迅速发展成为多重耐药的条件致病菌。细菌对喹诺酮类药物的耐药机制较为复杂,其中喹诺酮类药物耐药决定区(QRDR)相应基因(gyrA 和 parC)的突变,导致喹诺酮类药物作用的拓扑异构酶Ⅱ和拓扑异构酶Ⅳ发生突变是产生耐药的重要途径。本研究选择近年来兴起的变性高效液相色谱(DHPLC)快速检测鲍曼不动杆菌的喹诺酮耐药基因。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)菌株来源:2007 年 12 月至 2008 年 4 月从福建省立医院各类临床标本中分离的 90 株鲍曼不动杆菌。菌种均经 Vitek-2 细菌鉴定和药敏分析仪(法国生物梅里埃公司)鉴定确认。(2)抗菌剂:左氧氟沙星(LEV)购自第一制药北京有限公司,批号 H20010782,浓度 0.3 g/100 mL,加替沙星(GAT)江苏润邦药业有限公司,批号 H20040707,浓度 0.2 g/

100 mL;M-H、肉汤培养基购于 Oxoid 公司。(3)仪器:Vitek-2 细菌鉴定和药敏分析仪(法国生物梅里埃公司),TC-25/H 型基因扩增仪(杭州博日科技有限公司),凝胶成像系统(UVItect-limited),WAVE 系统—3500 型分析仪(美国环球基因公司)。4)其他试剂:Chelex100(BIORAD 公司),dNTP、TaqDNA 聚合酶、DL-2000(天根生物科技有限公司)。

1.2 方法 (1)药物敏感试验:采用微量肉汤稀释法测定左氧氟沙星和加替沙星的最小抑菌浓度(MIC)。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。MIC 结果判定按 NCCLS/CLSI M100-S17 标准执行。(2)DNA 提取:平板培养细菌用 0.45% 无菌生理盐水配制为 1×10^8 cfu/mL 菌液(0.5 麦氏单位),取 1 mL 置于 1.5 mL 的离心管中,离心半径 8 cm,8 000 r/min 4 ℃ 离心 5 min,弃上清液。细菌沉淀中加入 5% Chelex100 溶液(0.15 g Chelex100 加入 3 mL 的医用注射水)20 μ L,涡旋振荡

混匀,100℃水浴 10 min,立即冰浴 1 min,室温下 12 000 r/min 离心 10 min,上清液作为 DNA 模板,-20℃保存备用。(3)同源性分析:采用基因外重复回文序列(repetitive extragenic palin,REP)引物对鲍曼不动杆菌进行分子分型^[1]。REP 引物序列为 REP1 5'-GCG CCG ICA TCA GGC-3';REP2 5'-ACG TCT TAT CAG GCC TAC-3'^[2]。引物由 Takara 公司合成。反应体系 25 μL,其中 dNTP(200 μmol/L) 2 μL,10×buffer 2.5 μL,引物 REP1、REP2(10 μmol/L)各 1 μL,Taq 聚合酶(5 U/L)0.125 μL,模板 2 μL,用超纯水补足体积至 25 μL。反应条件为 95℃预变性 5 min;94℃1 min,40℃1 min,65℃8 min,扩增 35 个循环;最后 65℃延伸 16 min,扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 90 min。(4)PCR 扩增 gyrA 和 parC 基因:引物设计参考文献^[3],扩增片段覆盖了各自的 QRDR。gyrA 基因引物,上游 5'-AAA TCT GCC CGT GTC GTT GGT-3',下游 5'-GCC ATA CCT ACG GCG ATA CC-3';parC 基因引物,上游 5'-AAA CCT GTT CAG CGC CGC ATT-3',下游 5'-AAA GTT GTC TTG CCA TTC ACT-3';反应体系 25 μL,其中 dNTP(200 μmol/L) 2 μL,10×buffer 2.5 μL,引物(10 μmol/L)1 μL,Taq 聚合酶(5 U/L)0.125 μL,模板 1 μL,用超纯水补足体积至 25 μL。反应条件为 95℃预变性 5 min;94℃1 min,55℃1 min,72℃1 min,扩增 30 个循环;最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后在紫外凝胶成像系统下观察结果。(5)DNA 杂交:PCR 产物与等量野生型 PCR 产物混合,取 3~5 μL 混合产物,置 95℃变性 5 min,然后以 0.1℃/s 的速度降温到 25℃,形成异源双链^[4]。(6)DHPLC 分析:缓冲液 A 为 0.1 mol/L 醋酸三乙胺,缓冲液 B 为 0.1 mol/L 醋酸三乙胺和 25% 乙腈,A 与 B 的比例由 WAVE 系统自动调节,流速 0.9 mL/min,洗脱的 DNA 双链于 260 nm 进行紫外吸收检测。(7)测序:选取 DHPLC 阳性株且非同一基因型(同源性分析的基因型结果)样本进行测序,测序由 Invitrogen 公司完成,结果在 GenBank 数据库中进行比对。

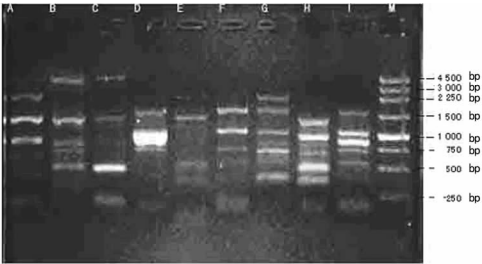
2 结 果

2.1 鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物体外抗菌活性比较,见表 1。

抗菌剂	MIC 范围(mg/L)	敏感	中介	耐药	耐药率(%)
LEV	0.125~128	25	8	57	63.3
GAT	0.125~128	25	11	54	60.0

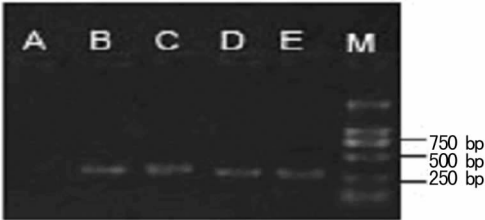
2.2 同源性分析结果 临床分离的鲍曼不动杆菌分成 9 种基因型,见图 1。90 株的鲍曼不动杆菌可以分成 9 种基因型(A~I),具体如图 1 示,共检出 A 型 3 株、B 型 40 株、C 型 22 株、D 型 5 株、E 型 8 株、F 型 2 株、G 型 2 株、H 型 7 株、I 型 2 株;C 型分为 3 种亚型,分别为 C1 型 12 株、C2 型 5 株、C3 型 5 株;H 型分为 2 种亚型,分别为 H1 型 4 株、H2 型 3 株。在 9 种基因型中,A、B、C 为表型耐药菌株(药敏结果中介也归为表型耐药),其余为表型敏感株。

2.3 PCR 产物电泳结果 90 株鲍曼不动杆菌临床分离株中,均扩增出 343 bp 的 gyrA 基因产物及 327 bp 的 parC 基因产物* 见图 2。这 2 个产物均覆盖了各自的 QRDR。



PCR 扩增条带位置完全相同为同一基因型;主条带位置相同,副带相差 1~3 条者为亚型;不满足上述条件者为不同的基因型。

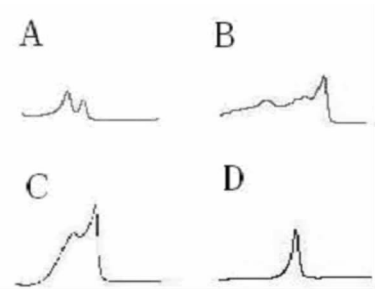
图 1 鲍曼不动杆菌的同源性分析结果



图中 A 为生理盐水做阴性对照;B、C 为 gyrA 基因 PCR 产物;D、E 为 parC 基因 PCR 产物。

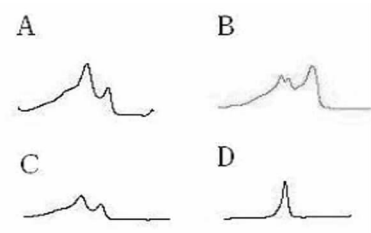
图 2 gyrA 和 parC 基因 PCR 产物电泳图

2.4 DHPLC 分析结果 见图 3、4。在 9 种基因型中,A、B、C 3 种基因型运用 DHPLC 检测 gyrA 和 parC 基因均出现异常双峰或者多峰,而其余基因型只出现单峰。



图中 A、B、C 为表型耐药株 gyrA 基因 DHPLC 图谱,D 为表型敏感株。

图 3 gyrA 基因的 DHPLC 图谱



图中 A、B、C 为表型耐药株 parC 基因 DHPLC 图谱,D 为敏感株。

图 4 parC 基因的 DHPLC 图谱

2.5 测序结果 A、B、C 3 种基因型测序均存在突变位点,其中 gyrA 基因中编码 83 位氨基酸的密码子 TCA 中的 C→T,导致编码的氨基酸由丝氨酸(Ser)变为亮氨酸(Leu);parC 基因中编码 80 位氨基酸的密码子 TCG 中的 C→T,导致 Ser→Leu 突变。A、B、C 3 种基因型的 parC 基因测序还存在多个位点的同义突变。而表型敏感株 gyrA 和 parC 基因测序均未发生突变。

3 讨 论

喹诺酮类药物作为治疗鲍曼不动杆菌感染的抗菌剂之一,在临床已应用多年,具有良好的体外抗菌活性和组织渗透性等优点^[5]。本试验分别选用第三代、第四代喹诺酮类药物,结果显示分离菌株对喹诺酮类药物耐药率为 63.3%和 60.0%,但二者位于敏感范围内的菌株数相同,提示细菌对第四代喹诺酮类药物的耐药情况已经接近第三代喹诺酮类药物,值得临床密切关注。

鲍曼不动杆菌是重要的医院感染病原菌之一。同源性分析结果显示其中以 B 型数目明显高于其他类型,表明本院可能存在某一基因型鲍曼不动杆菌的感染流行,估计该型菌株可能以克隆株的形式播散。另外,同一基因型中不同亚型的耐药表型存在差异,而有些非同一基因的菌株出现了相同的表型,这种差异可能是由于抗菌剂的选择压力所致。

细菌对喹诺酮类药物耐药机制非常复杂,包括了染色体基因突变、整合子、灭活酶、钝化酶等。其中 QRDR 相应基因(*gyrA* 和 *parC*)的突变,导致喹诺酮类药物作用的拓扑异构酶Ⅱ和拓扑异构酶Ⅳ发生突变是产生耐药的重要途径。国内外报道的不动杆菌 *gyrA* 基因突变位点主要集中在 N 端核苷酸序列为 199~318 (编码氨基酸的 67~106)的区间内,并发现编码氨基酸 83 位点上的碱基突变最为频繁。*parC* 基因的此区域与 *gyrA* 有同源性,主要突变发生在 80 位氨基酸处^[6-7]。试验中 3 种表型耐药株的测序结果 *gyrA* 和 *parC* 均分别在 83 位和 80 位氨基酸发生突变,提示目前这 2 个位点依然是最常见的突变位点。

DHPLC 是一种新的高通量筛选 DNA 序列变异的新技术,这一技术最先由美国 Stanford 大学 Oefner 创立,其原理是采用离子对反向高效液相色谱法分离并检测异源双链^[8]。Hannachi 等^[9]运用 DHPLC 技术检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌所编码的对喹诺酮类抗菌剂耐药的基因,是最早成功地把 DHPLC 运用于细菌耐药方面的研究。William 等^[10]通过不同谱系 39 种细菌进行 DHPLC 检测,成功地把 DHPLC 应用于细菌菌种的鉴定。作为一种新的筛查耐药基因突变的方法,其具有灵敏度高、操作简便、直观等优点,对于发生突变的基因(无论是突变位点已知还是未知),哪怕只有 1 个碱基的错配,也能在图谱中直观地反映出来。但由于其不能确定碱基的改变是真正的突变还是基因多态性,因此仍需测序证实。本研究中我们运用 DHPLC 检测筛查鲍曼不动杆菌耐药基因(*gyrA* 和 *parC*)的突变,其中表型耐药株均出现异常双峰或者多峰,

而表型敏感株只出现单峰,经测序证实表型耐药株中存在突变位点。这与有关文献报道 DNA 片段在 198~732 bp 时,DH-PLC 的灵敏性和准确性为 92%~100%相符^[11],可见 DHPLC 在检测耐药基因突变方面具有其特有的高灵敏性,加上其耗时短,费用少,因此在临床上具有广泛的应用前景。

参考文献

[1] 钱雪琴,张军,沈芳. Chelex-100 法和碱性裂解法提取细菌 DNA 的比较[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(8):1565-1566.

[2] Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn, et al. Multicenter Study Using Standardized Protocols and Reagents for Evaluation of Reproducibility of PCR-Based. Fingerprinting of *Acinetobacter* spp [J]. J Clin Microbo,1997,35(12):3071-3077.

[3] Lee JK, Lee YS, Park YK, et al. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea[J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(7): 647-653.

[4] Xu L, Evans J, Ling T, et al. Rapid Genotyping of CTX-M Extended-Spectrum-Lactamases by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(4):1446-1454.

[5] 马静. 喹诺酮类药物的合理应用[J]. 现代中西医结合杂志,2008, 19(8):1039-1040.

[6] 刘丁,练向群,王政,等. 耐环丙沙星鲍曼不动杆菌 *gyrA* 和 *parC* 突变模式分析[J]. 中国感染控制杂志,2008,7(1):12-14.

[7] 史伟峰,王玉月,郑为平,等. 多重耐药性鲍曼不动杆菌耐药基因及菌株聚类分析[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(5):390-392.

[8] Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography(DHPLC)[J]. Am J Hum Genet,1995,7(Suppl):226.

[9] Hannachi-M'zali F, Ambler JE, Taylor CF, et al. Examination of single and multiple mutations involved in resistance to quinolones in *Staphylococcus aureus* by a combination of PCR and denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)[J]. J Antimicrob Chemother,2002,50(5):649-655.

[10] William H, Dadid S, Erik H, et al. Denaturing HPLC for identifying bacteria[J]. Biotechniques,2002,33(8):386-391.

[11] 张晓燕,刘朝晖. 变性高效液相色谱技术在细菌耐药基因检测中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(8):743-745.

(收稿日期:2010-05-04)

(上接第 447 页)

[6] Lanchared JL, Hernandez ML. Recurrent Vaginal Candidiasis changes in etiopathogenical patterns[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2000,71(1):29-35.

[7] De repentigny, Phaneuf L M. Gastrointestion colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* intact and immune-compromised mice[J]. Infect Immun,2002,60(12):4907-4912.

[8] 汤俊峰. 李小霞. 叶芬. 137 株真菌的鉴定及药敏分析[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(07):108-110.

[9] Sobel JD, Zervos M, Reed BD, et al. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from with complicated candida vaginitis: clinical implications[J]. Antimicrob Agents Chemother,2003,47(1):34-38.

[10] 冯佩英,陆春,朱国兴,等. 复发性阴道念珠菌病念珠菌的菌种及药敏分析[J]. 临床皮肤科杂志,2005,34(4):215-216.

[11] 中华妇产科学分会感染性疾病协作组. 外阴阴道念珠菌病诊治规范(草案)[J]. 中华妇产科杂志,2004,39(2):430-431.

(收稿日期:2010-05-04)