

• 论 著 •

gyrA 和 *parC* 介导的铜绿假单胞菌对环丙沙星耐药机制研究*

邱 红¹, 胡礼仪^{2△}, 彭 涛¹, 刘兴晖¹, 李 毅¹

(1. 湖北医药学院附属东风医院检验部, 湖北十堰 442008; 2. 江苏省沭阳县人民医院检验科 223600)

摘 要:目的 了解十堰地区耐氟喹诺酮类铜绿假单胞菌(PA)的药敏情况及 *gyrA* 和 *parC* 基因突变情况。方法 用 Vitek 32 对 110 株 PA 进行鉴定和药敏检测, 对临床常用抗生素的药敏情况进行分析, 琼脂稀释法测定 60 株耐环丙沙星(CIP)的 PA 对 CIP 的最低抑菌浓度(MIC), 限制性长度多态性分析法(PCR-RFLP)检测耐 CIP 的 PA *gyrA* 和 *parC* 基因突变情况。结果 耐药菌株对哌拉西林/他唑巴坦的敏感率最高(68.3%)。在 60 株耐 CIP 的 PA 中有 42 株(70.0%)耐药菌株发生 *gyrA* 基因的 83 位点突变, 密码子发生 ACC→ATC 改变, 编码 83 位氨基酸的碱基发生突变 Thr→Ile(ACC→ATC), 有 38 株(63.3%)耐药菌株发生 *parC* 基因 87 位点突变 Ser→Leu(TCG→TTG), 同时发生两种突变的共 36 株(60.0%)。结论 耐氟喹诺酮类 PA 对临床常用抗生素的敏感性降低, 并呈多重耐药, 药物作用靶位 *gyrA* 和 *parC* 的基因突变为其耐氟喹诺酮类药物的主要机制。

关键词:假单胞菌, 铜绿; 抗药性; 喹诺酮类; 基因; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)08-0831-03

Mechanism of *gyrA* and *parC* mediated ciprofloxacin resistance in pseudomonas aeruginosa*

Qiu Hong¹, Hu Liyi^{2△}, Peng Tao¹, Liu Xinghui¹, Li Yi¹

(1. Department of Laboratory, the Dongfeng Hospital of Hubei Medical University, Shiyan, Hubei 442008, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Shuyang, Jiangsu 223600, China)

Abstract: Objective To explore the drug sensitivity and the *gyrA* and *parC* gene mutation of quinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in Shiyan district. **Methods** Identification and the drug resistance of 110 strains PA were performed and detected by Vitek 32 system. Agar dilution and PCR-RFLP were used to detect the minimum inhibitory concentrations (MIC) of PA to ciprofloxacin(CIP) and the mutation of *gyrA* and *parC* in 60 CIP resistant PA strains, respectively. **Results** CIP resistant PA strains were most sensitive to piperacillin/tazobactam (68.3%). Among the 60 CIP resistant PA strains, C83T mutation in *gyrA* gene, inducing Thr→Ile amino acid mutation, were detected in 42 CIP resistant PA strains(70.0%) and C87T mutation in *parC* gene, inducing Ser→Leu mutation, were detected in 42(70.0%) and 38(63.3%) strains, respectively, and the two mutations were both detected in 36(60.0%) strains. **Conclusion** The sensitivity of quinolones resistant PA to common clinically used antibiotics have been decreased, with multi-drug resistance detected. The mechanism of fluoroquinolones resistance of PA could be due to the mutations of *gyrA* and *parC* gene, encoding the target sites of fluoroquinolones.

Key words: *pseudomonas aeruginosa*; resistance, drug; quinolones; genes; mutation

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)为临床常见条件致病菌, 是引起院内感染的主要病原菌之一。近年来, 随着β-内酰胺类抗生素、免疫抑制剂等的广泛应用, 由该菌引起的院内感染率及其对抗生素的耐药率呈逐年上升趋势, 临床治疗日趋困难^[1-2]。氟喹诺酮类抗生素是临床治疗 PA 感染的主要药物, 环丙沙星(CIP)对革兰阴性杆菌的体外抗菌活性最高, 但随着该类药物的广泛应用, PA 对氟喹诺酮类药物尤其是 CIP 的耐药率不断上升^[3]。本研究旨在了解十堰地区耐氟喹诺酮类 PA 的耐药情况, 为指导临床合理用药提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 110 株 PA 于 2005 年 1 月至 2007 年 12 月在湖北医药学院附属东风医院的临床及门诊标本中分离, 其中 60 株为 CIP 耐药菌株, 50 株为 CIP 敏感菌株, 排除同一患者重复菌株。标本来自痰 76 株、分泌物 11 株、尿液 10 株、血液 6 株、其他标本 7 株。质控菌株为 PA ATCC 27853。Vitek 32 全自动微生物鉴定和药敏系统、鉴定卡 GN、药敏卡 AST-

GN10(法国生物梅里埃公司), 药敏纸片(中国生物制品检定所)。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 标本采用常规分离培养, 用 Vitek 32 对菌株进行鉴定和药敏检测, 抗生素包括有阿米卡星、庆大霉素、氨曲南、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、亚胺培南、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦共 9 种。参照美国临床和实验室标准化协会(the clinical and laboratory standards institute, CLSI)方法, 采用二倍琼脂稀释法进行最低抑菌浓度(MIC)的测定; 制备含不同浓度单纯 CIP 的 MH 琼脂平板。菌液以比浊仪调整浓度至 0.5 麦氏浊度, 采用手工方法, 接种于 MH 平板, 35℃ 孵育 20 h 观察结果; 结果判断按 CLSI 2005 年标准。以 ATCC 27853 和 ATCC 25922 进行质量控制。

1.2.2 主要试剂 细菌 DNA 提取试剂盒、三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)、Taq DNA 聚合酶(Promega 公司), 琼脂糖(Gibco 公司), PCR 产物纯化试剂盒(Roche 公司), 限制性内切酶

* 基金项目:湖北省十堰市科技局资助项目(NO. 20060570)。△ 通讯作者, E-mail: hlyhyh@163.com。

Sac II、*Hinf* I (MBI 公司),引物(上海生工生物工程有限公司)。

1.2.3 聚合酶链反应(PCR)

1.2.3.1 PA DNA 的提取 参照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3.2 引物设计 按参考文献[4]设计引物,均由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列			
基因	引物名称	序列	产物大小
<i>gyrA</i>	上游引物	5'-ACCGCCGTGTGCTTTATC-3'	350 bp
	下游引物	5'-CCAGCAGGTTGGAATCTT-3'	
<i>parC</i>	上游引物	5'-TCCAAGCAAGAAGTCG-3'	227 bp
	下游引物	5'-AGCAGCACCTCGGAATAG-3'	

1.2.3.3 PCR 反应条件 94℃预变性 4 min,94℃变性 30 s,52℃(*gyrA*)/55℃(*parC*)退火 30 s,72℃延伸 1 min,72℃延伸 10 min,35 个循环。产物于-20℃保存。取 PCR 产物 5 μL,加上样缓冲液 1 μL,于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察结果,证实扩增片段大小。

1.2.4 聚合酶链反应-限制性长度多态性分析(PCR-RFLP)

PCR 产物 10 μL,10×T 缓冲液 2 μL,酶(*Sac* II 或 *Hinf* I)1 μL,0.1%牛血清蛋白(BSA) 2 μL,反应总体积 20 μL,37℃反应 2 h 后,加反应终止液终止反应,凝胶电泳分析结果。

1.3 统计学处理 采用四格表进行 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 对抗生素的耐药性 110 株 PA 对临床常用抗生素的敏感情况,见表 2。

2.2 PCR-RFLP 以标准质控菌株进行 PCR 扩增和酶切分析,经 PCR 扩增的 *gyrA* 的为 350 bp 基因片段,未突变时片段上有 *Sac* II 酶切位点,经限制性内切酶酶切后出现 232 bp 和 118 bp 两个片段,若密码子发生 ACC→ATC 改变,编码 83 位氨基酸的碱基发生突变 Thr→Ile,正好位于 *Sac* II 的酶切位点处,则位点丧失,酶切后仍为一个 350 bp 片段;*parC* 的 PCR 扩增产物为 227 bp 基因片段,其中含有一个 *Hinf* I 的酶切位点,位于 *parC* 基因序列 64 bp,若编码 64 位氨基酸的碱基未发生突变,扩增产物酶切后可产生 163 bp 和 64 bp 两个基因片段,若 87 位点碱基发生 Ser→Leu 突变,酶切后仍为 227 bp 一个基因片段。

表 2 铜绿假单胞菌 CIP 耐药株与敏感株对 9 种抗生素的敏感情况[n(%)]						
抗菌剂	敏感株(n=50)			耐药株(n=60)		
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药
阿米卡星	45(90.0)	2(4.0)	3(6.0)	38(63.3)	9(15.0)	13(21.7)
庆大霉素	42(84.0)	1(2.0)	7(14.0)	20(33.3)	6(10.0)	34(56.7)
头孢他啶	15(30.0)	3(6.0)	32(64.0)	11(18.3)	18(30.0)	31(51.7)
头孢噻肟	7(14.0)	8(16.0)	35(70.0)	2(3.3)	1(1.7)	57(95.0)
头孢吡肟	40(80.0)	5(10.0)	5(10.0)	18(30.0)	15(25.0)	27(45.0)
氨曲南	24(48.0)	14(28.0)	12(24.0)	3(5.0)	23(38.3)	34(56.7)
亚胺培南	48(96.0)	0(0.0)	2(4.0)	26(43.3)	7(11.7)	27(45.0)
哌拉西林	45(90.0)	0(0.0)	5(10.0)	32(53.3)	0(0.0)	28(46.7)
哌拉西林/他唑巴坦	45(90.0)	1(2.0)	4(8.0)	41(68.3)	0(0.0)	19(31.7)

3 讨 论

PA 是常见的条件致病菌,对大多数抗菌剂呈现固有或获得性多重耐药,其耐药率在逐年升高。本资料显示 CIP 耐药株对哌拉西林/他唑巴坦的敏感率最高,为 68.3%;对头孢噻肟的敏感率最低,只有 3.3%,这为治疗 PA 感染提供参考依据;CIP 敏感株对亚胺培南的敏感率最高,为 96.0%。另外,耐药株对抗生素的敏感率大于 50.0%的只有 3 种,而敏感株对抗生素的敏感率大于 50.0%的有 6 种;耐药菌株对所监测的 9 种抗生素的敏感率均低于敏感菌株。对于氟喹诺酮类耐药 PA 的感染治疗,可选择哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星、哌拉西林等药物。

PA 对氟喹诺酮类药物的耐药机制比较复杂,其中 DNA 旋转酶 A 亚单位基因(*gyrA*)和拓扑异构酶Ⅳ的 C 亚单位基因(*parC*)发生突变是其产生耐药性的重要途径^[5-7]。DNA 旋转酶 A 亚基是氟喹诺酮药物的作用靶位,它发生基因突变导

致氟喹诺酮类药物耐药。氟喹诺酮类药物耐药决定区为 N 端核苷酸序列为 199~318(编码氨基酸的 67~106)的区间,是 *gyrA* 基因突变的位点最集中的区域,且在编码氨基酸 83 位点(Thr)上的碱基最容易发生突变。本研究 60 株耐 CIP 的 PA 中 Thr 发生突变的 42 株(70.0%),*gyrA* 基因密码子发生 ACC→ATC 改变,编码的氨基酸 Thr→Ile,与报道一致^[8-10]。*parC* 编码拓扑异构酶Ⅳ,负责 DNA 的断裂和重接,在 DNA 复制后期姐妹染色体分离过程中起重要作用,是细菌复制过程中所必需的酶。研究表明,*parC* 的突变以第 80 位氨基酸最常见,并且 *parC* 的突变通常同时伴随 *gyrA* 变异,从而导致细菌对氟喹诺酮类的耐药性增强^[11-12]。本研究结果显示,有 38 株(63.3%)耐药菌株发生 *parC* 基因 87 位点突变 Ser→Leu(TCG→TTG),同时发生两种突变的共 36 株(60.0%),这也证实了上述观点。另外还有部分菌株没有检测到这两种突变,可能是因为 PA 耐氟喹诺酮类药物的耐药机制除了基因突变

外还有其他的耐药机制存在^[13-14],但它的主要机制为药物作用靶位的改变、主动外排机制增强等,而临床上分离出来的菌株经常存在多重耐药机制。

综上所述,治疗耐氟喹诺酮类药物 PA 引起的感染,应禁止无指征滥用抗生素,且其耐药机制十分复杂,有待进一步研究。从流行病学观点来看,高度重视临床分离耐氟喹诺酮类药物 PA 的耐药性和突变方式,进一步阐明其 *gyrA* 和 *parC* 突变与氟喹诺酮类药物耐药性的关系,将对研制有效治疗耐氟喹诺酮类药物 PA 的新型药物具有重要意义。

参考文献

[1] 蓝锴,陈茶.生物膜与铜绿假单胞菌耐药相关性研究进展[J].国际检验医学杂志,2007,28(10):942-944.

[2] 郭涛,汤华.铜绿假单胞菌的耐药性及多重耐药机制[J].医学检验与临床,2006,17(1):46-47.

[3] Oudhuis GJ, Verbon A, Hoogkamp-Korstanje JA, et al. Antimicrobial resistance in escherichia coli and pseudomonas aeruginosa from intensive care units in the Netherlands, 1998—2005[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(1): 58-63.

[4] Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi IA, et al. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of pseudomonas aeruginosa isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(8): 2263.

[5] Poole K, Bianco N, Neshat S, et al. Conservation of the multidrug resistance efflux gene *oprM* in pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41: 853-856.

[6] Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, et al. Mutations in *gyrA*,

parC, *mexR* and *nfxB* in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa[J]. Int J Antimicrob Agents, 2003, 21(5): 409-413.

[7] Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, et al. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of pseudomonas aeruginosa isolated from canine infections[J]. Vet Microbiol, 2008, 131(1/2): 164-172.

[8] 吴爱武,蒋月婷,卢启君. CIP 耐药的铜绿假单胞菌两种分子耐药机制关系的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(2): 131-134.

[9] Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, et al. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(5): 414-418.

[10] 李学如,贾文祥,杨春,等.铜绿假单胞菌环丙沙星耐药株Ⅱ类拓扑异构酶基因突变的研究[J].中国抗生素杂志, 2003, 28(3): 155-171.

[11] Schneiders T, Amyess G, Levys B. Role of *acrR* and *ramA* in fluoroquinolone resistance in clinical klebsiella pneumoniae isolates from Singapore[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(9): 2831-2837.

[12] Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, et al. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and resistant clinical isolates of pseudomonas aeruginosa[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(4): 330-336.

[13] 刘蓉,罗必蓉,李明远.铜绿假单胞菌对β-内酰胺类抗生素耐药机制研究进展[J].国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 716-718.

[14] 许宏涛,陶凤蓉,梁玉珍,等.铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究[J].中国感染与化疗杂志, 2007, 7(2): 92-95.

(收稿日期:2010-10-09)

(上接第 830 页)

组进化与生态位适应研究[J].解放军医学杂志, 2004, 29(3): 204-210.

[2] Ratsitorahina M, Chanteau S, Rahalison L, et al. Epidemiological and diagnostic aspects of the outbreak of pneumonic plague in Madagascar[J]. Lancet, 2000, 355(9198): 111-113.

[3] Neubauer H, Sprague LD, Scholz H, et al. Diagnosis of yersinia enterocolitica infections; a review on classical identification techniques and new molecular biological methods[J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2001, 114(1/2): 1-7.

[4] Quenee LE, Cornelius CA, Ciletti NA, et al. Yersinia pestis cafl variants and the limits of plague vaccine protection[J]. Infect Immun, 2008, 76(5): 2025-2036.

[5] Welkos SL, Davis KM, Pitt LM, et al. Studies on the contribution of the F1 capsule-associated plasmid pFra to the virulence of yersinia pestis[J]. Contrib Microbiol Immunol, 1995, 13: 299-305.

[6] Li B, Jiang L, Song Q, et al. Protein microarray for profiling anti-

body responses to yersinia pestis live vaccine[J]. Infect Immun, 2005, 73(6): 3734-3739.

[7] Jokerst JV, Raamanathan A, Christodoulides N, et al. Nano-biochips for high performance multiplexed protein detection determinations of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dot bioconjugate labels[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(12): 3622-3629.

[8] Hong WY, Huang LH, Wang HR, et al. Development of an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay for profiling antibodies against yersinia pestis[J]. J Microbiol Methods, 2010, 83(2): 133-140.

[9] 蔺丽慧,崔玉宝,孔存权,等. Fcy-Der f2 载体构建及融合蛋白表达[J].国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 1-3.

[10] 金伯泉.细胞与分子免疫学实验技术[M].西安:第四军医大学出版社, 2002: 1-6.

(收稿日期:2010-11-08)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数,通常是未知的,一般用希腊字母表示,如 μ 、 σ 、 π 等。描述样本特征的数值为统计量,是已知的或可计算获得的,用英文字母表述,如 S 、 P 等。从总体中随机抽样可获得样本,以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。