

铜绿假单胞菌对喹诺酮药物质粒基因的研究*

罗史科, 刘鲜花, 朱平安, 樊春卉 (深圳市盐田区人民医院检验科, 广东深圳 518081)

摘要:目的 探讨铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物的耐药质粒与周围共生菌耐药质粒染色体相互转移的关系。方法 收集深圳市第七人民医院2011年1月~2013年12月481份各种样品培养出的铜绿假单胞菌31例,药敏实验结果对喹诺酮耐药的15例为研究对象,运用质粒转化、提取实验证实其耐药质粒的存在,PCR扩增、基因序列分析,与周围共生菌耐药质粒的基因序列比对。结果 铜绿假单胞菌耐药株的耐药质粒与周围共生菌质粒发现有相同基因序列(χ^2 检验, $\chi^2 = 1.207, P < 0.01$)。结论 耐药质粒能在不同种属细菌之间传递。

关键词:铜绿假单胞菌;喹诺酮;质粒;基因

中图分类号:R378.991;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)01-039-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.011

Research on *Pseudomonas Aeruginosa* Quinolone-resistant Plasmid Genes

LUO Shi-ke, LIU Xian-hua, ZHU Ping-an, FAN Chun-hui (Departement of Clinic Laboratory, Shenzhen Yantian Area People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518081, China)

Abstract: Objective *Pseudomonas aeruginosa* resistance to quinolones and around symbiotic bacteria resistant plasmids each chromosome metastasis. **Methods** 481 samples was collected from the Seventh People's Hospital of Shenzhen since January 2011 to December 2013, and it cultured *Pseudomonas aeruginosa* 31 cases, susceptibility testing confirmed 15 cases of quinolone-resistant as the research object, using plasmid transformation, pick up experiments confirmed the presence of the resistance plasmid, PCR amplification, gene sequence analysis, and gene sequences surrounding the symbiotic bacteria resistant plasmids as a same. **Results** The same gene sequence of plasmid was found between drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the surrounding symbiotic bacteria [$\chi^2 = 1.207, P < 0.01$]. **Conclusion** Resistance plasmids could be transferred between different species of bacteria.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; quinolone; plasmid; gene

近年来铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*,以下简称PA)耐药菌株的不断出现,给院内感染的防治、临床感染病人的治疗和预防感染性疾病的复发带来了很大的困难。喹诺酮类药物是疗效突出的药物^[1]之一。10多年临床应用后,PA菌对喹诺酮一代(萘啶酸、吡咯酸)和二代“沙星”类表现耐药性相当普遍^[2]。对喹诺酮类一代、二代耐药率平均接近50%^[3]。质粒(plasmid)是一种染色体外稳定的遗传因子,具有自主复制和转录耐药性的能力^[4]。因此研究PA耐药质粒的基因并测序与共生菌耐药性的关系对合理使用抗生素药物具有一定医学上的意义。

1 材料和方法

1.1 样品来源 2012年1月~2013年12月本院各科送检细菌培养合格样品,共481份。

1.2 主要试剂 血培养皿、普通琼脂培养皿,PA菌标准菌株ATCC27853(由深圳北大医院检验科刘小平主任惠赠),萘啶酸、环丙沙星药敏纸片,质粒提取试剂(深圳雅瑞尔科技公司提供),引物[上海Introvigen(英骏)公司生产合成]。

1.3 主要仪器设备 DNA自动加热循环器(perkin elmer cetus. USA);紫外线分析仪,epp 偏振照相机,酶标分光光度计TOSOH,微型、水平和垂直电泳仪,MPRA4I,高速冷冻离心机,真空干燥机,培养摇床,超低温冰箱,法国梅里埃细菌鉴定仪。

1.4 方法

1.4.1 PA菌的获取:481份细菌培养样品接种于血培养皿,挑取单个菌落经细菌鉴定仪鉴定为PA菌,均与标准菌株ATCC27853比对,共获得31份PA菌样品。

1.4.2 耐喹诺酮药物PA菌株的挑选:用K-B(Kirby-Bauer)纸片琼脂扩散法进行。根据CLSI抗菌药物敏感性实验执行标准^[5]判断敏感(S)、中介(I)、耐药(R)。把31份PA菌用萘啶酸、环丙沙星纸片药敏实验后获得耐药PA菌株15份。15份耐药PA菌则为备用菌,用2ml EP管(塑料带盖离心管)加甘油保存备用菌迅速放入-80℃。

1.4.3 PA菌质粒的提取^[6] 取出备用PA菌株放入增菌液过夜,增菌后PA菌提取质粒。按碱裂解细菌、离心吸附柱结合DNA、洗去杂质,提取质

* 基金项目:深圳市盐田区产业发展资金,项目编号:2012[深盐产纪]5号。

作者简介:罗史科(1967-),男,本科,副主任技师,从事分子生物学工作,研究方向:耐药菌基因,Tel:0755-25215354, E-mail:luoshike@163.com。

粒DNA,提取的质粒光密度比值($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$)在1.8~2.0之间。平均每毫升过夜培养的细菌提取的质粒有3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (正常情况下是2~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

1.4.4 质粒、染色体DNA的PCR扩增、序列分析及核酸杂交

1.4.4.1 引物设计合成:依据GenBank提供的基因序列,使用Primer Premier 5设计针对各喹诺酮耐药基因(PMQR)基因变异体的共有序列的通用引物 qnrA-F: ATCTCTCACGCCACCGTATG, qnrA-R: GATCATCACGGGTTAGGTCA; qnrB-F: ACGATGTATGGTAGCCGTAA, qnrB-R: GATCGTGTCTGCCAGATTGG; qnrS-F: AC-GACATCGATCGGCTGCGT, qnrS-R: TAGCTGTGCACGCTTGAGGC; qnrC-F: GAGTTGTACATATTGAGTCG, qnrC-R: CACCTACGCATGTATAGTCA; qnrD-F: CGAGACAATCTACGCGAATA, qnrD-R: AGCATGCTGAGCGCATGCTA; aac(6')-Ib-F: TTGCGATGCTCTATGAGTCGCTA, aac(6')-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT; qepA-F: AACTGCTTGACCCCGTATAT, qepA-R: GTCTACGCCATGGACCTCAC依照多重PCR的要求优化反应条件,用于扩展目的基因。合成的引物临用前稀释,将装有引物的EP管5 000 r/min离心1 min,加入少量的去离子水,使引物浓度为10 $\mu\text{mol}/\text{L}$,分装后置于-20℃保存待用。

1.4.4.2 PMQR基因的PCR扩增与测序:耐药PA菌筛选喹诺酮耐药基因质粒,进行多重PCR反应, qnrA/qnrB/qnrS/qnrC/qnrD的反应体系(50 μl)如下: Premix Ex Taq 25 μl ; qnrA, qnrB, qnrS, qnrC, qnrD上下游引物各1 μl ; DNA模板4 μl , 水11 μl ; PCR反应条件为94℃预变性5 min, 94℃变性45 s, 53℃退火45 s, 72℃延伸60 s, 共35个循环,最后72℃延伸10 min。

1.4.4.3 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物:称取1.20 g琼脂粉放入三角烧瓶中,加入0.5×TBE缓冲液100 ml,微波炉加热至完全熔化,取出冷却至58℃左右,加入EB母液(10 mg/ml)至终浓度为0.5 mg/ml,缓慢倒入模具中。凝固后将内槽和着凝胶一起放入电泳槽,负极与上样孔在同一侧。加入缓冲液0.5×TBE盖过凝胶表面。取10×Loading Buffer 2 μl 与18 μl PCR产物混匀,加到凝胶板上样孔内,另外选一孔加入6 μl dp1000Marker。用100V直流电源电泳40 min,当溴酚蓝染料泳动至距离凝胶前沿2 cm处停止电泳,取出凝胶用紫外投射仪内看结果并拍摄照片。

1.4.4.4 序列比对与分析:序列测序委托深圳华大基因公司完成测序结果使用Chromas, DNASTar, VectorNT1Suite8等软件进行查看及序列校正拼接,借助NCBI-BLAST程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与GenBank数据库比对分析,明确基因亚型、有无突变、突变位点及由此导致的氨基酸改变。

1.4.5 数据统计分析与图表制作:使用Microsoft Excel 2007对实验数据进行统计和图表制作。使用SPSS1.30进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qnrA, qnrC, qnrD, qnrS, qepA基因PCR扩增未出现阳性结果。

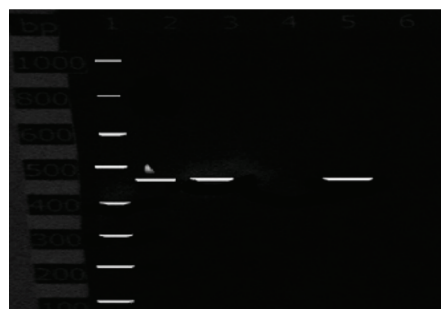
2.2 aac(6')-Ib引物扩增产物的电泳结果 见图1。11株扩增出目的片段557 bp。



1:DNA Marker 16:阳性对照 17:阴性对照

图1 aac(6')-Ib引物扩增产物的电泳结果

2.3 qnrB引物扩增产物的电泳结果 见图2。2株扩增出目的片段465 bp。



1:DNA Marker 5:阳性对照 6:阴性对照

图2 qnrB引物扩增产物的电泳结果

2.4 PA菌质粒基因aac(6')-Ib, qnrB的测序及与周围同生菌质粒比对结果 见表1,图3,图4。

表1 13株PA菌耐喹诺酮质粒测序有4株与周围同生菌质粒相同

PA质粒	类型	Genbank accession number	χ^2 值	P值
aac(6')-Ib	8株经典型	GU250440	13.2	<0.05
	1株突变型	FJ619241	7.3	<0.05
qnrB	2株阴沟杆菌相同型	EF376520	6.4	<0.05
	2株肺炎克雷伯相同型	EF523819	4.9	<0.05

PA菌质粒与阴沟杆菌质粒(EF376520)比对如下:

qb EF375620.1 *Enterobactax cloacas* ominclyxoside acetylcransferase aac(6')-Ib-cr

(aac(6')-Ib-cr) gene, complete cds

Length=519

Score = 861 bits(466), Expect=0.0

Identities = 466/466(100%), Gaps=0/466(0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 1   GCTCTATGAG TGGCTAAATC GATCTCATAT CGTCGAGTGG TGGGGCGGAG AAGAAGCACG 60
Sbjct 24   GCTCTATGAG TGGCTAAATC GATCTCATAT CGTCGAGTGG TGGGGCGGAG AAGAAGCACG 83
Query 61   CCCGACACTT GCTGACGTAC AGGAACAGTA CTTGCCAAGC GTTTTAGCGC AAGAGTCCGT 120
Sbjct 84   CCCGACACTT GCTGACGTAC AGGAACAGTA CTTGCCAAGC GTTTTAGCGC AAGAGTCCGT 143
Query 121  CACTCCATAC ATTGCAATGC TGAATGGAGA GCCGATTGGG TATGCCCAGT CGTACGTTGC 180
Sbjct 144  CACTCCATAC ATTGCAATGC TGAATGGAGA GCCGATTGGG TATGCCCAGT CGTACGTTGC 203
Query 181  TCTTGGAAGC GGGGACGGAC GGTGGGAAGA AGAAACCGAT CCAGGAGTAC GCGGAATAGA 240
Sbjct 204  TCTTGGAAGC GGGGACGGAC GGTGGGAAGA AGAAACCGAT CCAGGAGTAC GCGGAATAGA 263
Query 241  CCAGTTACTG GCGAATGCAT CACAACCTGGG CAAAGGCTTG GGAACCAAGC TGGTTCGAGC 300
Sbjct 264  CCAGTTACTG GCGAATGCAT CACAACCTGGG CAAAGGCTTG GGAACCAAGC TGGTTCGAGC 323
Query 301  TCTGGTTGAG TTGCTGTTCA ATGATCCCGA GGTACCAAG ATCCAAACGG ACCCGTCGCC 360
Sbjct 324  TCTGGTTGAG TTGCTGTTCA ATGATCCCGA TGCACCAAG ATCCAAACGG ACCCGTCGCC 383
Query 361  GAGCAACTTG CGAGCGATCC GATGCTACGA GAAAGCGGGG TTTGAGAGGC AAGGTACCGT 420
Sbjct 384  GAGCAACTTG CGAGCGATCC GATGCTACCA GAAGCGGGG TTTGAGAGGC AAGGTACCGT 443
Query 421  AACCACCCCA TATGGTCCAG CCGTGTACAT GGTTCAAACA CGCCAG 466
Sbjct 444  AACCACCCCA TATGGTCCAG CCGTGTACAT GGTTCAAACA CGCCAG 489

```

图3 PA菌质粒 aac(6')-Ib 的序列与阴沟杆菌比对结果完全相同

PA菌质粒基因与肺炎克雷伯菌的质粒(EF523819)完全一致, 比对如下:

qb EF523819.1 *klebsiella pneumoniae* strain EX05006382 plasmid pWCH-IM1 QnrB6 (qnrB6) gene, complete cds

Length=691

Score=859 bits(465), Expect= 0.0

Identities=465/465(100%), Gaps=0/465(0%)

Strand=plus/plus

```

Query 1   TGATCGTGAA AGCCAGAAAG GGTGCAATTT TAGTCGTGCG ATGCTGAAAG ATGCCATTTT 60
Sbjct 174   TGATCGTGAA AGCCAGAAAG GGTGCAATTT TAGTCGTGCG ATGCTGAAAG ATGCCATTTT 233
Query 61   TAAAAGCTGT GATTTATCCA TGGCGGATTT TCGCAATGCC AGTGCGCTGG GCATTGAAAT 120
Sbjct 234   TAAAAGCTGT GATTTATCCA TGGCGGATTT TCGCAATGCC AGTGCGCTGG GCATTGAAAT 293
Query 121  TCGCCACTGC CGCGCACAAG GCGCAGATTT CCGCGGCGCA AGCTTTATGA ATATGATCAC 180
Sbjct 294   TCGCCACTGC CGCGCACAAG GCGCAGATTT CCGCGGCGCA AGCTTTATGA ATATGATCAC 353
Query 181  CACGCGCACC TGGTTTTGTA GCGCATATAT CACGAATACC AATCTAAGCT ACGCCAATTT 240
Sbjct 354   CACGCGCACC TGGTTTTGTA GCGCATATAT CACGAATACC AATCTAAGCT ACGCCAATTT 413
Query 241  TTCGAAAGTC GTGTTGGAAG AGTGTGAGCT GTGGGAAAAC CGTTGGATGG GTGCCCAGGT 300
Sbjct 414   TTCGAAAGTC GTGTTGGAAG AGTGTGAGCT GTGGGAAAAC CGTTGGATGG GTGCCCAGGT 473
Query 301  ACTGGGCGCG ACGTTCAGTG GTTCAGATCT CTCCGGCGGC GAGTTTTCGA CTTTCGACTG 360
Sbjct 474   ACTGGGCGCG ACGTTCAGTG GTTCAGATCT CTCCGGCGGC GAGTTTTCGA CTTTCGACTG 533
Query 361  GCGAGCAGCG AACTTCACAC ATTGCGATCT GACCAATTCG GAGTTGGGTG ACTTAGATAT 420
Sbjct 534   GCGAGCAGCG AACTTCACAC ATTGCGATCT GACCAATTCG GAGTTGGGTG ACTTAGATAT 593
Query 421  TCGGGGCGTT GATTTACAAG GCGTTAAGCT GGACAACCTAC CAGGC 465
Sbjct 594   TCGGGGCGTT GATTTACAAG GCGTTAAGCT GGACAACCTAC CAGGC 633

```

图4 PA菌质粒 qnrB 基因序列与肺炎克雷伯菌质粒比对结果完全相同

3 讨论 本课题通过研究铜绿假单胞菌(PA菌)耐喹诺酮药物物质粒基因并测序,发现PA的耐药质粒基因序列与部分细菌耐药质粒序列相同,证明细

菌之间的耐药质粒基因具有传递性。喹诺酮耐药决定区^[7]是目前公认PA菌改变药物作用的靶位(DNA促旋酶和拓扑异构酶)突变后 (下转45页)

- Chen SW, Zhang DZ, Wu SM, et al. Generalized infection of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in patients with gastroduodenal diseases[J]. Chin J Gastroenterol, 2001, 6(1): 20-23.
- [9] Lazebnik LB, Tsaregorodtseva TM, Serova TI, et al. Antibodies to *Helicobacter pylori* in gastric diseases[J]. Ter Arkh, 2006, 78(2): 15-19.
- [10] Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34 000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000, 97(13): 7533-7538.
- [11] Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, et al. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and oipA gene switch status[J]. J Clin Micro, 2004, 42(5): 2279-2281.
- [12] Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, et al. Comparing genomes of *Helicobacter pylori* strains from the high-altitude desert of Ladakh, India[J]. J Clin Micro, 2005, 43(4): 1538-1545.
- [13] Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HM, et al. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production[J]. Gastroenterology, 2002, 123(2): 414-424.

收稿日期: 2014-12-19

修回日期: 2015-01-06

(上接 41 页)导致酶-DNA 复合物与药物的亲和力降低导致耐药, 已知突变热点是 *gyrA* 第 83 位苏氨酸和第 87 位门冬氨酸^[8]。质粒介导(质粒型) *AmpC* 酶在持续高水平表达时, 其基因可通过转化、接合等方式转移给其他菌种, 使耐药性迅速传播^[9]。2007 年日本学者 Yamane^[10]发现大肠埃希菌有一种质粒介导的外排泵基因 *qepA*, 将克隆有 *qepA* 的质粒转化到大肠埃希菌能把结合子对多种抗菌药物的 MIC 值增加。蒋岗^[11]在曹开源指导下研究了 PA 菌获得耐药质粒的过程, 质粒基因的突变以及把突变的基因稳定地遗传给下一代。不同细菌之间能够通过质粒互换获得耐药性, 同种细菌能够把获得的耐药质粒稳定遗传。因此合理使用抗生素很重要, 不能长时间使用一种抗生素, 一次使用抗生素要敏感足量, 不要在抑菌浓度附近使用, 细菌容易获得突变耐药的质粒。受耐药阳性 PA 菌株量偏少的影响, 并不能开展阻止耐药质粒在细菌之间传递的实验, 需要进一步研究揭开质粒在不同细菌之间如何传递, 只有人类了解传递规律才能有效减少耐药想象。

参考文献:

- [1] 夏昆华, 周 鲁, 郝丽芬. 喹诺酮类抗细菌的研究进展[J]. 国外医学抗生素分册, 2004, 8(3): 138-141.
- Xia KH, Zhou L, Hao LF. Progress quinolone antibiotics[J]. Foreign Medical: The Archives of Antibiotics, 2004, 25(3): 138-141.
- [2] 尚丽霞, 史 颖, 王 栋, 等. 新疆乌苏地区常见病原菌的监测及耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(4): 135-138.
- Shang LX, Shi Y, Wang D. Clinical Monitoring of common pathogens and drug resistance in Wusu of Xinjiang[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(4): 135-138.
- [3] 郑晓林, 廖致红. 铜绿假单胞菌耐药率与抗菌药使用量相关性分析[J]. 中国药师, 2009, 12(4): 457-459.
- Zheng XL, Liao ZH. Correlation between amount of consumption of anti-bacterials and drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. China Pharmacist, 2009, 12(4): 457-459.
- [4] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short protocols in molecular biology[M]. 4th Ed. Current Protocols, 1999: 17-19.
- [5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜, 等. 全国临床检验操作规程[S]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 715-920.
- Ye YW, Wang YS, Shen ZY, et al. National guide to clinical laboratory procedures[S]. 3th Ed. Nanjing: Southeast University Press, 2006: 715-920.
- [6] 李云峰, 邵 国, 苏 燕, 等. 一种简捷的质粒 DNA 提取及纯化方法[J]. 包头医学院学报, 2000, 16(2): 144-146.
- Li YF, Shao G, Su Y, et al. A rapid and easy way of extracting and purification plasmid DNA[J]. J Baotou Medical College, 2000, 16(2): 144-146.
- [7] Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1990, 34(6): 1271-1272.
- [8] Willmott CJ, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37(1): 126-127.
- [9] 李智山, 邓三季, 杨 燕, 等. 铜绿假单胞菌质粒型 *AmpC* 酶 DHA 基因的发现[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(3): 253-255.
- Li ZS, Deng SJ, Yang Y, et al. Detection of plasmid type *AmpC* β -lactamase DNA gene in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2005, 15(3): 253-255.
- [10] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(9): 3354-3360.
- [11] 蒋 岗. PMQR 基因及 *gyrA*, *parC* 基因突变与铜绿假单胞菌对喹诺酮类耐药之间关系的研究[D]. 中山大学硕士学位论文, 2010: 12-13, 22-29.
- Jiang G. Study on the relationship between quinolone resistance and PMQR genes, mutations in *gyrA* and *parC* genes among *Pseudomonas aeruginosa* [D]. Zhongshan University Master's Degree Thesis, 2010: 12-13, 22-29.

收稿日期: 2014-10-16

修回日期: 2014-12-06