

## 空肠弯曲杆菌中喹诺酮类抗生素 耐药基因检测与耐药性研究\*

陈云鹏, 林 雯, 邓建平 (湖北省黄石市爱康医院, 湖北黄石 435000)

**摘要:**目的 建立一种检测人粪便样本中,空肠弯曲杆菌含喹诺酮类抗生素耐药基因情况的实时荧光 PCR 方法,并对空肠弯曲杆菌对喹诺酮类抗生素耐药性与耐药基因的相关性进行初步研究。方法 根据空肠弯曲杆菌对喹诺酮类抗生素耐药基因 *gyrA* 和 *gyrB* 序列设计引物,建立对应的实时荧光 PCR 方法,对 79 例空肠弯曲杆菌进行检测,基因扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。以药敏试验结果作为参照标准,对两种检测方法的结果进行统计学分析,计算实时荧光 PCR 的主要技术指标。结果 22 例(27.8%)空肠弯曲杆菌的实时荧光 PCR 出现特异性扩增曲线,扩增产物电泳结果显示其中 13 例携带 *gyrA* 基因(59.1%),7 例携带 *gyrB* 基因(31.8%),2 例同时携带 *gyrA* 和 *gyrB* 基因(9.1%)。药敏试验显示 26 例空肠弯曲杆菌为环丙沙星耐药型(32.9%)。统计学分析显示,两种方法的检测结果差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.125, P > 0.05$ ),一致性较好。实时荧光 PCR 法的灵敏度和特异度分别为 76.9% 和 96.2%,总符合率为 89.9%。结论 实时荧光 PCR 法能够检测空肠弯曲杆菌耐药基因 *gyrA* 和 *gyrB*。耐药基因与耐药型之间有所关联,需要进一步研究。

**关键词:**实时荧光 PCR;空肠弯曲杆菌;耐药基因;喹诺酮类抗生素

中图分类号:R378.3;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)02-027-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.008

### Study on the Quinolone Antibiotic Resistance and Its Relative Genes in *Campylobacter Jejuni*

CHEN Yun-peng, LIN Wen, DENG Jian-ping

(Huangshi Love and Health Hospital of Hubei Province, Hubei Huangshi 435000, China)

**Abstract:** Objective To establish a real-time fluorescence PCR method to detect the drug resistance genes of pathogenic *Campylobacter jejuni* in human stool samples, and investigate the relationship between quinolone antibiotic resistance and the related genes in *Campylobacter jejuni*. **Methods** According to the *gyrA* and *gyrB* gene sequences that related with the fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, the primers of the PCR method was designed and synthesized. A rapid real-time fluorescence PCR method to detect the drug resistance genes in *Campylobacter jejuni* samples was established, and the optimum reaction system and conditions were screened through an optimized approach. The developed method was compared with the classical drug susceptibility assay. **Results** It was found in the compared results that, there were 8 inconsistent strains of *Campylobacter jejuni*, 2 of the 8 strains were drug sensitive but contained the drug resistance gene, while 6 strains were drug resistant but had no drug resistant gene. **Conclusion** The established method can be applied to detect the drug resistance relative genes of *gyrA* and *gyrB* in *Campylobacter jejuni*. There was some correlation between the drug resistance representation and its genotype, but this point requires further studies.

**Keywords:** real-time fluorescence PCR; *Campylobacter jejuni*; drug resistance gene; quinolone antibiotics

空肠弯曲杆菌是全球食源性急性细菌性胃肠炎的主要致病菌之一。虽然该菌引发疾病的死亡率低,但其感染后遗症较为严重。如格林-巴利综合征、瑞特综合征、反应性关节炎、肠易激综合征等<sup>[1]</sup>。高效、低毒的氟喹诺酮曾一度被选为空肠弯曲杆菌致急性肠炎的首选药物,其后的第三代喹诺酮类抗生素-环丙沙星也曾被广泛应用于该菌感染的治疗。然而,随着喹诺酮类抗生素的大量使用,空肠弯曲杆菌对喹诺酮类抗生素的耐药性也迅速增加。据报道,挪威空肠弯曲杆菌对喹诺酮类抗生素的耐药率由 2001 年的 6.5% 上升至 2003 年的

67.5%,美国则由 1990 年的零耐药发展到 2001 年的 19%<sup>[2~6]</sup>。中国疾病预防控制中心调查显示,我国空肠弯曲杆菌的耐药现象也十分严重。因此对空肠弯曲杆菌的耐药性进行研究十分必要。本文采用实时荧光 PCR 技术,对空肠弯曲杆菌对喹诺酮类抗生素耐药基因进行检测,研究空肠弯曲杆菌的耐药基因与耐药性之间的关系,为该菌所致疾病的临床诊疗提供参考。

#### 1 材料与方法

1.1 菌种来源 79 例空肠弯曲杆菌来自黄石市爱康医院 2011 年 1 月~2014 年 6 月临床感染标

\* 基金项目:黄石市医疗卫生科技攻关计划项目 2012A070-19。

作者简介:陈云鹏(1980-),男,硕士研究生,主管技师,研究方向:微生物检验,Tel:0714-6226255。

通讯作者:邓建平,男,主任技师,研究方向:微生物检验,E-mail:3yue12@sina.com。



本,均参照国家标准 GB/T 4789.9-2008 进行培养鉴定。

1.2 主要仪器与试剂 细菌培养基(北京陆桥科技有限公司),微需氧产气袋(MGC 公司),药敏纸片(杭州生物制剂有限公司),细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根, TIANanp Stool DNA Kit), 7600 型实时荧光 PCR 仪(达安公司)。

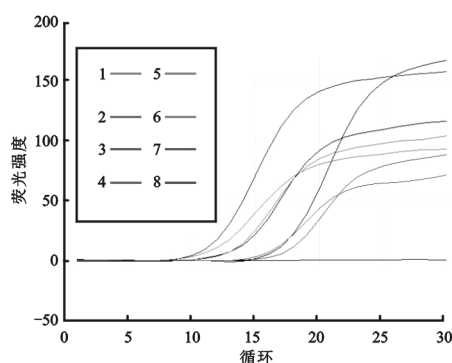
### 1.3 方法

1.3.1 引物设计:参照 Genbank 中发表的序列<sup>[7,8]</sup>,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。gyrA(F):AAA AAC CAT TCA CGA ACC TG, (R)CCT CTA TGT CGT CAA ATA CTA CG, 目的片段大小为 431bp; gyrB: (F) TAA TGG CAG CTA GAG GAA GAg, (R)GCC TAC AAC TAC CTA GAG TA, 目的片段大小为 403 bp。由武汉安基生物合成,用于扩增喹诺酮类耐药基因。

1.3.2 DNA 提取:参照试剂盒说明书进行粪便空肠弯曲杆菌基因组 DNA 提取, -20℃ 保存备用。

1.3.3 实时荧光 PCR:总反应体系为 25.0  $\mu$ l, dNTP 终浓度 0.25 mmol/L, 引物终浓度 0.2  $\mu$ mol/L, 模板浓度 50 ng, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2 $\times$ ) 15.0  $\mu$ l。反应条件:95℃ 预变性 300s, 94℃ 60s, 56℃ 60s, 72℃ 30s, 共 40 个循环; 72℃ 最终延伸 600s。

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳:所有产物经 2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳,电压 80 V,时间 1.5 h;用凝胶成像仪检测。



(1,2,4,6,7 携带 gyrA 基因;3 携带 gyrA 和 gyrB 基因;5 携带 gyrB 基因;8 阴性对照)

图2 携带耐药基因空肠弯曲杆菌实时荧光 PCR 及电泳

2.3 药敏试验结果 根据 CLSI 抗菌药物敏感性试验纸片法判断标准,对 79 例空肠弯曲杆菌进行耐药性检测,其中 26 例为环丙沙星耐药型 (32.9%)。

2.4 两种检测方法的比较 实时荧光 PCR 法与药敏试验结果比较,见表 1。经统计学分析,两者的差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 1.125$ , 查表得自由度 1 对应的临界值  $\chi_{0.05,1}^2 = 3.84$ ,  $\chi^2 < \chi_{0.05,1}^2$ ,  $P > 0.05$ ),即一致性较好。以药敏试验作为参照标准,

1.3.5 药敏试验:根据 CLSI 抗菌药物敏感性试验纸片法进行操作,对 79 例空肠弯曲杆菌进行药敏试验。

1.4 统计学分析 计数资料采用配对的两组二分类资料比较,采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 79 例空肠弯曲杆菌实时荧光 PCR 结果 见图 1。其中 22 例 (27.8%) 携带喹诺酮类耐药基因 (gyrA/gyrB) 的空肠弯曲杆菌出现特异性扩增曲线,且  $C_t$  值均小于 30;未携带耐药基因的菌株没有进入指数扩增期。

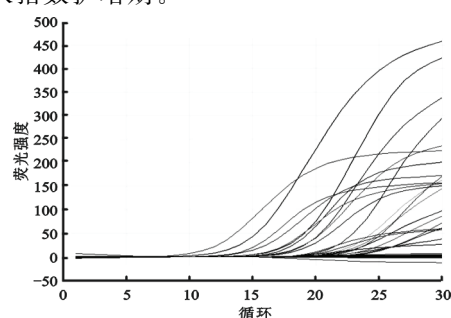
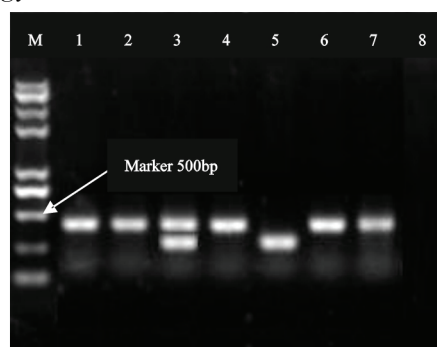


图1 空肠弯曲杆菌实时荧光 PCR

2.2 电泳结果 实时荧光 PCR 对目的基因 gyrA/gyrB 的扩增结果与电泳结果 100% 一致 (见图 2)。22 例携带耐药基因的菌株均出现特异的电泳条带;其中 13 例携带 gyrA 基因 (59.1%), 7 例携带 gyrB 基因 (31.8%), 2 例同时携带 gyrA 和 gyrB 基因 (9.1%)。



计算实时荧光 PCR 的主要技术指标,见表 2。

3 讨论 喹诺酮类抗生素通过抑制 II 型拓扑异构酶 (DNA 旋转酶、DNA 拓扑异构酶 II) 发挥抗菌作用。DNA 旋转酶是分别由 gyrA 和 gyrB 基因<sup>[9,10]</sup>各自编码的两个亚单位所组成的四聚体,可催化 DNA 链的负超螺旋化,与细菌的染色体复制、重组及转录相关。研究发现,gyrA 基因突变的位点主要集中在发生在 N 端核苷酸序列为 199~318 (编码氨基酸的 67~106) 的区间内,即喹诺酮类药物耐



药决定区(QRDR)内<sup>[11]</sup>。gyrB基因作为旋转酶编码的重要基因,其突变也可能影响着细菌的耐药性。故本文选择 gyrA 和 gyrB 作为耐药基因进行检测。

表1 实时荧光PCR法与药敏试验的比较

项目	药敏试验(+)	药敏试验(-)	合计
实时荧光PCR(+)	20	2	22
实时荧光PCR(-)	6	51	57
合 计	26	53	79

表2 实时荧光PCR主要技术指标

技术指标	评价值(%)
灵敏度	76.9
特异度	96.2
误诊率( $\alpha$ )	3.8
漏诊率( $\beta$ )	23.1
阳性符合率	90.9
阴性符合率	89.5
观察符合率(总符合率)	89.9

将本研究建立的实时荧光PCR法用于喹诺酮类抗生素耐药基因的检测,与传统的药敏试验结果作比较,发现空肠弯曲杆菌的耐药基因型与表现型之间有所不同。推测其可能原因是:携带耐药基因的细菌可能由于环境或自身的原因,其耐药基因未表达或表达量不够,从而导致细菌虽携带耐药基因却对抗生素不耐药。此外,耐药性的产生有多种途径,如外排、降解、难渗入等机制<sup>[12~15]</sup>,因而未携带本研究耐药基因的菌株也可能耐药。本研究中两种方法的阴、阳符合率较高,也提示耐药基因与耐药性之间有所关联,但不是绝对的,需要进行深入研究。

实时荧光PCR方法虽特异度较高,但漏诊率也较高。出现这一现象的可能原因是存在着其他的耐药基因位点。与已有的文献报道相比<sup>[2~6]</sup>,本研究中的空肠弯曲杆菌对环丙沙星耐药水平较低,这可能与样本量、样本组成、来源和地域用药习惯有关。电泳结果显示,部分菌株同时携带 gyrA 和 gyrB 基因,这也需要进一步扩大样本量进行探讨和验证。由于实验条件的限制,在后续的研究中可考虑引入基因测序技术,加强对多重突变位点的研究。

本研究所建立的实时荧光PCR对环丙沙星耐药空肠弯曲杆菌进行检测,是从耐药基因的水平进行直接测定,结果快速准确。期待本方法能在指导临床用药、控制耐药菌产生和发现新型抗生素等多方面发挥其应有的作用。

参考文献:

- [1] 王艳玲.空肠弯曲菌检测方法研究进展[J].职业与健康,2010,26(14):1638-1639.  
Wang YL. Progress on detection method of *Campylobacter jejuni*[J]. Occup and Health, 2010, 26(14): 1638-1639.
- [2] Padungtod P, Kaneene JB, Hanson R, et al. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food animals and humans in northern Thailand[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 47(2): 217-225.
- [3] Jimenez A, Velazquez JB, Rodriguez J, et al. Prevalence of fluoroquinolone resistance in clinical strains of *Campylobacter jejuni* isolated in Spain[J]. J Antimicrob Chemother, 1994, 33(1): 188-190.
- [4] Piddlck LJ, Rice V, Pumbwe L, et al. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals; detection of mutations in topoisomerase genes [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(1): 19-26.
- [5] Wiecezorek K, Osek J. Characteristics and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from pig and cattle carcasses in Poland[J]. Pol J Vet Sci, 2013, 16(3): 501-508.
- [6] Thibodeau A, Fravalo P, Garneau P, et al. Distribution of colonization and antimicrobial resistance genes in *Campylobacter jejuni* isolated from chicken [J]. Foodborne Pathog Dis, 2013, 10(4): 382-391.
- [7] Han J, Wang Y, Sahin O, et al. A fluoroquinolone resistance associated mutation in gyrA affects DNA supercoiling in *Campylobacter jejuni*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012(2): 21.
- [8] Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, et al. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(1): 24-34.
- [9] Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, et al. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii* [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(4): 821-823.
- [10] Spence RP, Towner KJ. Frequencies and mechanisms of resistance to moxifloxacin in nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 52(4): 687-690.
- [11] Hamouda A, Amyes SG. Norel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(3): 695-696.
- [12] Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(3): 331-351.
- [13] Di Giannatale E, Di Serafino G, Zilli K, et al. Characterization of antimicrobial resistance patterns and detection of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Italy [J]. Sensors (Basel), 2014, 14(2): 3308-3322.
- [14] Shin E, Oh Y, Kim M, et al. Antimicrobial resistance patterns and corresponding multilocus sequence types of the *Campylobacter jejuni* isolates from human diarrheal samples [J]. Microb Drug Resist-Mecha Epide Dise, 2013, 19(2): 110-116.
- [15] Iovine NM. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* [J]. Virulence, 2013, 4(3): 230-240.

收稿日期:2014-07-16

修回日期:2015-01-10