

耐氟喹诺酮类鲍曼不动杆菌 ParC 的变异研究*

杨 茁^a, 刘凌华^a, 张利侠^b, 孙 莉^a

(陕西省人民医院, 西安交通大学医学院第三附属医院 a. 呼吸二科; b. 检验科, 西安 710068)

摘要:目的 研究鲍曼不动杆菌拓扑异构酶ⅣC亚基(ParC)的变异与其耐氟喹诺酮类(FQNL)的关系。方法 收集临床分离耐喹诺酮鲍曼不动杆菌30株及敏感株10株,测定其对萘啶酸、环丙沙星、左旋氧氟沙星的最低抑菌浓度(MIC),并对此30株菌ParC的基因(parC)进行PCR扩增和DNA序列的分析比较。结果 在4株高度耐FQNL(MIC≥128 mg/L)和1株低度耐FQNL(MIC=64 mg/L)菌中存在ParC的变异,同FQNL耐药性相关的变异有丝氨酸Ser87(TCG)→Leu(TTG)。结论 临床分离的鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物耐药的分子机制可表现为ParC基因87位氨基酸密码子突变,当鲍曼不动杆菌合并有ParC的变异时,其耐药性往往会增强。

关键词:鲍曼不动杆菌;氟喹诺酮;药物耐受性;DNA拓扑异构酶(ATP水解)

中图分类号:R378;Q754 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)06-025-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.007

Study on ParC Mutant in Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter Baummanii*

YANG Zhuo^a, LIU Ling-hua^a, ZHANG Li-xia^b, SUN Li^a (a. Two Department of

Breathing; b. Department of Clinical Laboratory, Shaanxi Provincial People's Hospital, the Third of Affiliated Hospital of Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710068, China)

Abstract: Objective To study the relation between the alterations in the topoisomeraseⅣ subunit C (ParC) and fluoroquinolones(FQNL) resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Methods** Used age the micro broth diluent to determine the MICs of three quinolones of 30 quinolone-resistant and 10 quinolone-susceptible isolates. The genes of ParC in the 30 strains were amplified by PCR and their DNA sequences were compared. **Results** Alteration in ParC existed in all 4 strains which were highly resistant to FQNL (MIC≥128 mg/L) and one strain was moderately resistant to FQNL (MIC=64 mg/L), and the alteration related to FQNL resistance was Ser87(TCG)→Leu(TTG). **Conclusion** The molecular mechanism of the quinolone resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinics was mutations in the ParC gene at codon 87. When alteration occurs in ParC, the FQNL resistance of bacteria tends to intensify.

Keywords: *acinetobacter baumannii*; fluoroquinolone; drug tolerance; DNA topoisomerase(ATP-Hydrolysing)

鲍曼不动杆菌是医院感染的主要致病菌,在全国医院感染中位于首位^[1,2]。近10年,随着广谱抗生素的广泛使用,耐药菌株愈来愈多,而鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物产生耐药的机制非常复杂,临床上对氟喹诺酮类抗菌药物的耐药机制主要是通过细菌染色体耐药基因的突变产生,另外细菌外膜蛋白数量下降、特异性外膜蛋白丢失以及外排泵过度表达,药物在细菌体内积蓄下降,也可引起对喹诺酮类和其他抗菌药物的交叉耐药。因此研究其耐药机制对临床有效治疗鲍曼不动杆菌引起的感染和开发新的喹诺酮类药物有重要的指导意义。本课题的实验是对临床分离敏感菌株和耐药菌株的parC喹诺酮耐药决定区(quinolone-resistant determining re-gion, QRDR)进行PCR扩增及DNA碱基序列进行分析,研究临床分离的耐药菌

株和parC基因突变与其对氟喹诺酮类耐药的关系。

1 材料和方法

1.1 试验菌株的收集、鉴定和筛选 所有菌株均来自陕西省人民医院细菌室收集的分离到的非重复性鲍曼不动杆菌,经microscan walkaway-4.0鉴定到种,从中随机筛选出40株为试验菌株;10株敏感菌(萘啶酸MIC≤8 μg/ml)为A组,30株耐药菌(萘啶酸MIC≥32 μg/ml)为B组,所有测试菌株均采用K-B(kirby-Bauer)纸片扩散法进行药敏试验,按美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)2002颁布的判断标准进行药敏结果判断^[3]。

1.2 标准菌株 细菌鉴定的标准菌株ATCC25922购自中国药品生物制品检定所。

1.3 主要仪器 HZQ-C空气浴振荡器(哈尔滨东

* 基金项目:陕西省自然科学基金研究计划(2013JM4027)。

作者简介:李 茁(1972—),女,医学硕士,主任技师,主要从事细胞耐药机制的研究,E-mail:yangzhuo1972@163.com。

联电子技术公司);台式高速离心机 LX-200(海门其林贝尔仪器厂);超低温冰箱(日本西门子公司);稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.4 药敏试验最低抑菌浓度(MIC)的测定 试剂盒购自天津医科大学第二医院感染疾病研究所。

1.5 对菌株的 parC 进行 PCR 扩增和 DNA 序列分析

1.5.1 试剂:质粒 DNA 小量纯化试剂盒,2 * Taq DNA Polymerase (TaKaRa);琼脂糖(Agarose,西班牙);DNA Marker II(北京天根科技有限公司)。溴化乙锭(EB)为 Sigma 公司产品,100 bp DNA 标记为 MBI 公司产品,LB 培养基购自 Gibco 公司。

1.5.2 PCR 引物设计:parC 引物参照文献[5],引物设计参照文献[4]设计一对引物 P1,P2。P1:5'-CTGAATGCCAGCGCCAAATT-3',P2:5'-ACCGTTTACCAGCAGGTTAG-3',分别对应于鲍曼不动杆菌 parC 的第 94~113 位核苷酸和第 458~477 位核苷酸。引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.5.3 模板 DNA 制备:取 1.5 ml 鲍曼不动杆菌的培养液加到 Eppendorf 离心管中,在 4℃ 条件下,以 12 000×g 离心 5 min,弃去所有上清后,加入 100 μl 消毒的双蒸水,充分悬浮细菌,于细菌沉淀中加入 200 μl TE 缓冲液,加入 400 μl 裂解液和 3 μl 蛋白酶 K,55℃ 保温 10 min,加入 200 μl 无水乙醇,用柱离心制备基因组 DNA,溶于 50 μl 水中。

1.5.4 PCR 反应:在 0.5 ml 薄壁离心管中,加入 10×buffer 5 μl,PrimerA 2 μl,PrimerB 2 μl,模板 DNA 2 μl,25 mmol/L MgCl₂ 4 μl,10 mmol/L dNTP 4 μl,ddH₂O 30 μl,反应总体积为 50 μl,引物浓度为 1 μmol/L,镁离子浓度为 1.5 mmol/L。混匀后 94℃ 预变性 3 min,冰浴冷却后,再加入 TaqDNA polymerase 1 μl,混匀后离心,将离心管移入 PCR 仪,设置 PCR 反应条件 94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 45 s,共 35 个循环数;72℃ 延伸 10 min,最后置于 4℃ 保存。

1.5.5 PCR 产物电泳和测序:PCR 反应产物于 1.5 g/dl 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)上进行电泳,电压 80V,1 h,用紫外检测仪检查分析结果并用凝胶成像系统拍照记录成像。扩增的 PCR 产物纯化后进行测序,由北京博尚生物技术有限公司完成。

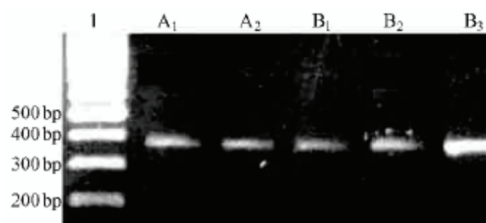
2 结果

2.1 30 株鲍曼不动杆菌耐药菌株对喹诺酮类药物的 MIC 见表 1。

2.2 30 株鲍曼不动杆菌耐药菌株 parCPCR 扩增和 DNA 序列分析结果 parC PCR 产物电泳结果,分别获得 385 bp DNA 片段,部分结果见图 1。

表 1 耐药鲍曼不动杆菌的喹诺酮类药物 MIC 分布

抗菌素	抗菌药物 MIC(mg/ml)									
	范围	<4	4	8	16	32	64	128	256	512
萘啶酸	64~	—	—	—	2	8	12	2	6	—
环丙沙星	4~64	—	2	17	2	3	3	3	—	—
左旋氧氟沙星	8~64	—	6	16	2	2	2	2	—	—



1. 标记物;A1~B3 为菌株编号

图 1 5 株临床分离筛选的鲍曼不动杆菌的 parC PCR 产物电泳图

2.3 ParC DNA 产物测序后变异 结果见表 2。

表 2 鲍曼不动杆菌对 3 种 FQSMIC 测定结果及其 ParC 的变异

菌株编号	抗菌药物 MIC(mg/L)			ParC 87
	萘啶酸	环丙沙星	左旋氧氟沙星	
A2	256	64	16	Ser(TCG)
A3	256	64	32	Leu(TTG)
A7	128	64	32	Ser(TCG)
B12	128	128	64	Ser(TCG)
B4	256	128	16	Leu(TTG)
B8	256	256	64	Leu(TTG)
B17	256	128	128	Leu(TTG)
A8	256	256	128	Leu(TTG)

3 讨论 近年随着广谱抗菌药物、免疫抑制剂和糖皮质激素在临床上的广泛应用,以及在选药过程中认识不足,导致不动杆菌属对常用抗菌药物的耐药性呈逐年上升趋势,甚至导致难治性感染,所以对鲍曼不动杆菌的耐药机制的研究已受到越来越广泛的重视。环丙沙星等氟喹诺酮类药物由于具有良好的体外抗菌活性及组织渗透性曾一度作为治疗鲍曼不动杆菌的有效药物,但由于该类药物的使用,其耐药性呈上升趋势,但国内对其耐药机制的研究资料较少。文献报道鲍曼不动杆菌对氟喹诺酮类抗菌药物耐药性形成是通过干扰细菌的 DNA 复制而发挥作用,其作用靶位是拓扑异构酶 II,即 DNA 解旋酶和拓扑异构酶 IV^[2]。DNA 解旋酶由两种亚基 GyrA 和 GyrB 组成四聚体酶,分别由 gyrA 基因和 gyrB 基因编码。拓扑异构酶 IV 由两个 ParC 和两个 ParE 组成的四聚体,分别由 parC 基因和 parE 基因编码,在 DNA 复制期的分裂中起作用,是喹诺酮类的另一个靶位。氟喹诺酮类药物通过分别与这两种酶以及 DNA 形成的三元复合物而抑制它们的活性,最终导致细菌的死亡。gyrA 和 parC 的 N 末端均有与喹诺酮耐药决定区域 QRDR 有关的区域, (下转 31 页)

(上接 26 页)此区域的变异是鲍曼不动杆菌对喹诺酮类耐药的主要原因,其中变异位点最常见于 GyrA 的丝氨酸 Ser83 和天冬氨酸 Asp87,ParC 的丝氨酸 Ser87 和 Ser80,其他位点变异频率较诱导耐药菌株低^[5]。本课题的研究发现在所有 4 株对环丙沙星高度耐药(MIC \geq 128 mg/L)和 1 株对环丙沙星轻度耐药菌株(A3,MIC=64 mg/L)的 ParC 丝氨酸 Ser87 均有变异。同 FQNL 耐药性相关的 ParC 变异 Ser87(TCG) \rightarrow Leu(TTG),引起氨基酸由 Ser \rightarrow Leu 的改变,但未发现国外报道的 Ser80 \rightarrow Trp,Ser87 \rightarrow Trp 的变异^[6,7]。

鲍曼不动杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制极为复杂,大多数研究只关注到 gyrA 基因的突变是氟喹诺酮类药物对临床分离菌株的主要耐药机制,而 ParC 的突变发生于 gyrA 突变之后,parC 基因的突变使耐药性上升到更高水平^[8]。本研究对鲍曼不动杆菌喹诺酮耐药菌株的耐药基因决定区中 parC 基因进行了测序分析,并且和耐药菌株进行了比对,发现两者具有一定相关性。但是不能排除尚存在 parC 以外的其它形式的突变,有必要进行深入研究。从流行病学观点来看,高度重视临床分离耐喹诺酮类药物的鲍曼不动杆菌的突变方式,进一步阐明其 parC 突变与喹诺酮类药物耐药性的关系,将对我们研制有效治疗耐喹诺酮类药物的鲍曼不动杆菌的新型药物产生较重要作用。

参考文献:

- [1] 都嫻如,张毅,罗敏,等.鲍曼不动杆菌的临床分布及对氟喹诺酮类药物的耐药性分析[J].川北医学院学报,2009,24(6):532-534.
Du YR, Zhang Y, Luo M, et al. Clinical distribution and resistance to fluoroquinolones analysis of *Acineto-*

bacter baumannii[J]. Journal of North Sichuan Medical College, 2009, 24(6): 532-534.

- [2] 王艳丽,黄茂,梅亚宁,等.鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物的耐药机制研究[J].中国感染与化疗杂志,2008,8(4):266-270.
Wang YL, Huang M, Mei YN, et al. Study on mechanism of quinolones resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. China Journal of Infection and Chemotherapy, 2008, 8(4): 266-270.
- [3] 姜泊,张亚历,周殿元.分子生物学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,1996:25-199.
Jiang B, Zhang YL, Zhou DY. Molecular biology experimental methods used[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996: 25-199.
- [4] Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR 技术实验指南[M].北京:科学出版社,1998.
Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR experimental guide[M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [5] Kato J, Nishimura Y, Imamura R, et al. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. Coli*[J]. Cell, 1990, 63(2): 393-404.
- [6] Vila J, Ruiz J, Goni P, et al. Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(5): 1201-1203.
- [7] Vila J, Ruiz J, Goni P, et al. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 39(6): 757-762.
- [8] 袁星,沈继录,徐元宏.鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究进展[J].现代检验医学杂志,2010,25(3):157-159.
Yuan X, Shen JL, Xu YH. *Acinetobacter baumannii* real progress in the study on the mechanism of quinolone-resistant[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(3): 157-159.

收稿日期:2015-04-12

修回日期:2015-05-11