

耐喹诺酮类药物铜绿假单胞菌的质粒基因研究^{*}

刘鲜花¹, 罗史科¹, 祝玲玲¹, 吕东月² (1. 广东省深圳市盐田区人民医院检验科 518081; 2. 广州医科大学附属深圳沙井医院检验科, 广东深圳 518104)

【摘要】 目的 研究耐喹诺酮类药物铜绿假单胞菌(PA)的质粒基因,并分析其耐药机制。**方法** 临床分离的耐喹诺酮类药物的 PA 100 株,采用 PCR 法检测质粒介导的喹诺酮类耐药基因 qnrA、qnrB、qnrC、qnrD、qnrS、qepA、aac(6′)-Ib-cr,并对阳性结果进行测序分析。**结果** 100 株 PA 中检测出含有 qnrA 基因的菌株 34 株(34%);qnrB 基因 79 株(79%);qnrD 基因 14 株(14%);qnrS 基因 8 株(8%);aac(6′)-Ib-cr 基因 55 株(55%);未检测出 qnrC 和 qepA 基因的菌株。**结论** 质粒携带的 qnrA、qnrB/aac(6′)-Ib-cr 耐药基因是 PA 耐喹诺酮类药物的主要机制。

【关键词】 喹诺酮类药物; 铜绿假单胞菌; 质粒; 基因

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.11.014 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)11-1530-02

Study of plasmid-mediated quinolones antibacterial in pseudomonas aeruginosa^{*} LIU Xian-hua¹, LUO Shi-ke¹, ZHU Ling-ling¹, LU Dong-yue² (1. Department of Clinical Laboratory, Yantian Hospital, Shenzhen, Guangdong 518081, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shajing Affiliated Hospital of Guangzhou Medical, Shenzhen, Guangdong 518104, China)

【Abstract】 Objective To study the quinolones resistance plasmid genes in pseudomonas aeruginosa and analyze its mechanism. **Methods** pseudomonas aeruginosa samples were collected for the detection of qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, qepA and aac(6′)-Ib-cr gene using PCR, then the positive samples were detected by sequence analysis. **Results** qnrC and qepA gene were not detected in strains resistance to Ciprofloxacin, the positive rate of qnrA, qnrB, qnrD, qnrS, aac(6′)-Ib-cr gene is 34%, 79%, 14%, 8%, 55% respectively. **Conclusion** plasmid with qnrA, qnrB, aac(6′)-Ib-cr gene is the main mechanism in pseudomonas aeruginosa to quinolones antibacterial.

【Key words】 quinolones antibacterial; pseudomonas aeruginosa; plasmid; gene

喹诺酮类药物是临床上常用的抑制细菌 DNA 旋转酶的抗菌药物,铜绿假单胞菌(PA)是一种最常见的引起医院感染的革兰阴性杆菌^[1]。随着喹诺酮类药物在临床上的广泛应用,PA 耐药株不断增加,造成临床对其感染治疗和控制变得困难^[2]。PA 对喹诺酮类药物的耐药机制复杂,其中质粒介导的喹诺酮类耐药(PMQR)包括 qnr、qepA、oqxAB、aac(6′)-Ib-cr,其耐药新机制近年来倍受关注^[3-5]。现对 100 株 PA 进行检测,探讨耐药机制。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 该院自 2012 年 2 月至 2014 年 6 月门诊及住院患者的 100 株耐喹诺酮类药物的 PA,−80 ℃ 冻存备用。菌株分离自痰液、分泌物、血液、胸水和脓液等,剔除同一患者来源的重复菌株。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和大肠埃希菌 ATCC 25922,均购自卫生部临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 EPS3501XL 电泳仪,美国 Pharmacia 公司;5810R 型高速离心机,德国 Eppendorf 公司;PCR 扩增仪,美国 MJ Research 公司;310 基因分析仪,美国应用生物系统公司;FUSION Fx7 凝胶成像系统,法国 VILBER 公司;细菌 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒均购自上海英骏生物技术有限公司。

1.3 检测方法

1.3.1 DNA 提取 从血琼脂平板上选取单个菌落,接种于 LB 液体培养基中,置 37 ℃,190 r/min,振荡孵育过夜。吸取 1 mL 菌液于离心管内,12 000 r/min,离心 5 min,去除上清液。

加入 PBS 1 mL,吹打沉淀细菌后,12 000 r/min,离心 5 min,弃上清液。再加入超纯水 500 μL,吹打混匀后置于 100 ℃ 沸水浴 5 min,12 000 r/min,离心 5 min,获取上清液即 DNA 提取液分装于离心管中,于 −20 ℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 引物的设计与合成 采用 PCR 检测的 qnrA、qnrB、qnrC、qnrD、qnrS、qepA、aac(6′)-Ib-cr 基因引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。见表 1。

1.3.3 PCR 扩增及产物电泳 引物各 0.5 μmol/L, dNTPs 各 200 μmol/L,加入 Taq DNA 聚合酶 2.5 U, MgCl₂ 2 mmol/L,模板液 5 μL,总体积 20 μL。PCR 反应热循环参数:(1) qnrB、qnrD、qnrS、qepA 基因:95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃ 50 s, 53 ℃ 45 s, 72 ℃ 60 s,共 35 个循环,72 ℃ 延长至 2 min。(2) qnrA、qnrC、aac(6′)-Ib-cr 基因:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s,35 个循环;72 ℃ 延长至 5 min。PCR 产物 10 μL 与 2 μL 上样缓冲液混匀加入 2% 琼脂糖凝胶,110 V 电泳 30 min 后置入凝胶成像仪中观察并记录结果。

1.3.4 核酸序列分析 扩增后的基因 PCR 产物经纯化后,送深圳华大基因生物技术有限公司进行序列测定,检测结果使用 DNASTar 软件进行校正并与 GenBank 核酸(www.ncbi.nlm.nih.gov)数据库进行比对分析。

2 结果

2.1 质粒介导的 PMQR 基因扩增产物 利用 PCR 方法检测质粒介导的 PMQR 基因 qnrA、qnrB、qnrC、qnrD、qnrS、qepA、aac(6′)-Ib-cr,扩增产物大小分别为 516 bp、469 bp、447 bp、664

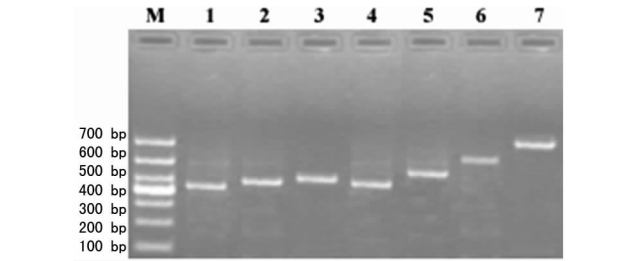
^{*} 基金项目:深圳市盐田区科技计划资助项目(201211)。

作者简介:刘鲜花,女,本科,主管技师,主要从事微生物检验研究。

bp、417 bp、596 bp、482 bp。见图 1。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'~ 3')	产物大小(bp)
qnrA	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516
	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	
qnrB	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469
	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	
qnrC	GGGTTGTACATTTATTGAATC	447
	TCCACTTTACGAGGTTCT	
qnrD	CGAGATCAATTTACGGGGAAT	664
	AAACAAGCTGAAGCGCCTG	
qnrS	ACGACATTCTCAACTGCAA	417
	TAAATTGGCACCTGTAGGC	
qepA	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	596
	GTCTACGCCATGGACCTCAC	
aac(6')-Ib-cr	CGTCACTCCATACATTGCAA	482
	CTCGAATGCCTGGCGTGT	



注:M 表示标记物;1 表示 qnrS;2 表示 qnrB;3 表示 aac(6')-Ib-cr;4 表示 qnrC;5 表示 qnrA;6 表示 qepA;7 表示 qnrD。

图 1 质粒介导的耐药 PMQR 基因 PCR 电泳图

2.2 质粒介导的 PMQR 基因检测结果 100 株耐喹诺酮类药物(环丙沙星)的 PA 中检测出含有 qnrA 基因的菌株 34 株(34%);qnrB 基因 79 株(79%);qnrD 基因 14 株(14%);qnrS 基因 8 株(8%);aac(6')-Ib-cr 基因 55 株(55%);未检测出含 qnrC 和 qepA 基因的菌株。见表 2。

表 2 100 株质粒介导的 PMQR 基因检测结果

基因类型	株数(n)	基因类型	株数(n)
qnrA	34	qnrS	8
qnrB	79	qepA	0
qnrC	0	aac(6')-Ib-cr	55
qnrD	14	—	—

注:—表示无数据。

3 讨 论

抗菌药物大量、长期使用,致使细菌耐药性增强,已经成为感染性疾病治疗的一大难题。PA 广泛存在于机体的皮肤和呼吸道等,是临床上最常见的条件致病菌,引起肺炎、泌尿感染、败血症等疾病^[6]。喹诺酮类药物通过抑制细菌的拓扑异构酶,阻断 DNA 复制从而达到抗菌作用,环丙沙星是临床治疗 PA 最有效的药物之一,但随着其广泛使用,耐环丙沙星的 PA 已经达到 40% 以上,严重影响临床治疗效果^[7-8]。

PA 对喹诺酮类药物产生耐药性的主要途径:(1)主动外排和膜屏障,导致药物无法达到作用靶点,使得其对多种抗菌药物获得耐药。(2)细菌编码的喹诺酮类药物的Ⅳ类拓扑异构酶和 DNA 旋转酶的基因突变,致使药物不能与酶-DNA 复合物稳定结合导致抗菌作用无效。(3)细菌生物膜的形成,其有极强的抵抗作用和耐药性,感染了细菌生物膜的组织即使治疗药物的剂量加倍也难以治愈^[9]。染色体介导和质粒介导是

PA 对喹诺酮类药物耐药的主要机制。pMG252 是最早报道的质粒,可使细菌对喹诺酮类药物的耐药水平提高,Martinez 等将该质粒命名为 qar(quinolone resistance),后改为 qnrA1。此后又发现了 qnrB、qnrC、qnrD、qnrS 4 种基因亚基。aac(6')-Ib-cr 最早分离于大肠埃希菌中,是一类编码氨基糖苷乙酰基转移酶而使得细菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药的基因。aac(6')-Ib-cr 其编码蛋白发生 Trp 102-Arg、Asp179-Tyr 突变而产生介导环丙沙星耐药的新特性而命名,其主要对环丙沙星哌嗪环上氨基乙酰化作用而介导低水平耐药^[10]。

目前有关喹诺酮类抗菌药物的机制研究,大多数学者认为是拓扑异构酶的基因退变而导致细菌耐药,对质粒的作用仅表现低水平耐药。PMQR 基因的研究大部分是肠杆菌(如肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌),有 PA 的研究非常少。本研究从 100 株耐喹诺酮类药物(环丙沙星)的 PA 中未检测出 qnrC 和 qepA 基因,检出含有 qnrA、qnrB、qnrD、qnrS/aac(6')-Ib-cr 基因的菌株,阳性率分别为 34%、79%、14%、8%、55%,其中 qnrA、qnrB、aac(6')-Ib-cr 具有较高的携带率,表明其在耐药机制中发挥重要的作用。

参考文献

[1] 明德松,邓勇. 国内铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物耐药机制的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志,2013,13(10): 1215-1218.

[2] Willcox MD. Review of resistance of ocular isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and staphylococci from keratitis to ciprofloxacin, gentamicin and cephalosporins[J]. Clin Exp Optom,2011,94(2):161-168.

[3] 陈树林,陈利达,陈茶,等. 铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物耐药的分子机制研究[J]. 中国卫生检验杂志,2012,24(8):899-904.

[4] 郭小慧,张莉萍. 铜绿假单胞菌耐药机制的最新研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):968-971.

[5] 贺婷,江涛. 铜绿假单胞菌耐药相关基因研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2013,33(5):393-396.

[6] Stove CK, Pham QX, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 an opportunistic pathogen[J]. Nature,2000,11(4):406-409.

[7] 邱红,胡礼仪,彭涛,等. grrA 和 Parc 介导的铜绿假单胞菌对环丙沙星耐药机制研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(8):831-833.

[8] Dubois V, Arpin C. Nosocomial outbreak due to a multi-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of β -lactamase resistance[J]. Clin Microbiol,2002,39(11):2072-2074.

[9] Cavaco LM, Hasman H, Xia S, et al. A novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin[J]. Antimicrob Agents Chemother,2009,53(12):603-608.

[10] 蒋岗,徐霖,关琳琳,等. 铜绿假单胞菌中质粒介导喹诺酮类耐药基因的研究[J]. 热带医学杂志,2013,13(7):813-816.