

多重耐药肺炎克雷伯菌发现一组 *gyrA*、*parC*、*qnrS* 基因新变异型

朱健铭 姜如金 孔海深 张嵘 吕火祥 孙长贵 黄支密

【摘要】 目的 研究多重耐药肺炎克雷伯菌 (MDR-KPN) 对喹诺酮类药物的耐药机制。方法 收集 2008 年 8 月至 2010 年 5 月浙江省杭州市和湖州市 6 所医院共 47 株 MDR-KPN, 采用聚合酶链反应 (PCR) 及序列分析方法分析喹诺酮类药物作用靶位编码基因 *gyrA*、*parC* 和可移动遗传元件介导的喹诺酮类耐药基因 [*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*aac*(6')-I b-cr、*qepA*]。结果 47 株 MDR-KPN 中检出 43 株 (91.5%) *gyrA* 突变、40 株 (85.1%) *parC* 突变、3 株 (6.4%) *qnrB2*、1 株 (2.1%) *qnrB4*、8 株 (17.0%) *qnrS1*、5 株 (10.6%) *qnrS4*、2 株 (4.3%) *aac*(6')-I b-cr, 发现 5 株 *gyrA* 基因新的变异型 (GenBank 登录号: JN811952、JN811953、JN811954、JN811955、JN811956), 5 株 *parC* 基因新的变异型 (GenBank 登录号: JN817432、JN817433、JN817434、JN817435、JN817436), *qnrS4* 为首次发现的 *qnrS* 变异型 (GenBank 登录号: JN836269)。结论 本组菌株喹诺酮类药物耐药主要与 *gyrA* 和 *parC* 基因的喹诺酮耐药决定区 (QRDR) 有义突变相关, 部分菌株可检出 *qnrB2*、*qnrB4*、*qnrS1*、*qnrS4*、*aac*(6')-I b-cr 等可移动遗传元件介导的喹诺酮类耐药基因。检出 *qnrS4* 为国内外首次报道。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; 喹诺酮类; 新变异型; 喹诺酮耐药决定区; 多重耐药

Emergence of novel variants of *gyrA*, *parC*, *qnrS* genes in multi-drug resistant *Klebsiella* caused pneumonia ZHU Jian-ming¹, JIANG Ru-jin¹, KONG Hai-shen², ZHANG Rong³, LV Huo-xiang⁴, SUN Chang-gui⁵, HUANG Zhi-mi⁶. 1 Department of Microbiology Laboratory, Yuhang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311106, China; 2 Medical Laboratory Department of the First Affiliated Hospital, 3 Medical Laboratory Department of the Second Affiliated Hospital, College of Medicine Zhejiang University; 4 The Center of Medical Laboratory, Zhejiang Provincial People's Hospital; 5 Department of Medical Laboratory, the No. 117 Hospital of PLA; 6 Department of Medical Laboratory, the No. 98 Hospital of PLA

Corresponding author: ZHU Jian-ming, Email: zhujianming001@126.com

This work was supported by grants from the Science and Technology Project of Hangzhou Science and Technology Bureau (No. 20110833B48), Health Science and Technology Project of Hangzhou (No. 2010B078) and Science and Technology Key Project of Yuhang District in Hangzhou (No. 2010001).

【Abstract】 Objective To investigate the resistant mechanism of quinolones on multi-drug resistant *Klebsiella* caused pneumonia (MDR-KPN). **Methods** From August 2008 to May 2010, 47 strains of MDR-KPN were collected from 6 hospitals in Hangzhou and Huzhou in Zhejiang province in China. Drug target genes to quinolones (*gyrA*, *parC*) and quinolone-resistance genes mediated by mobile genetic elements [*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac*(6')-I b-cr, *qepA*] were analyzed by PCR and verified by DNA sequencing. **Results** Positive results were found in 47 strains of MDR-KPN, 43 strains (91.5%) of *gyrA* mutation, 40 strains (85.1%) of *parC* mutation, 3 strains (6.4%) of *qnrB2*, 1 strain (2.1%) of *qnrB4*, 8 strains (17.0%) of *qnrS1*, 5 strains (10.6%) of *qnrS4*, 2 strains (4.3%) of *aac*(6')-I b-cr respectively. Moreover, 5 novel variants of *gyrA* (GenBank accession number: JN811952, JN811953, JN811954, JN811955, JN811956), 5 novel variants of *parC* (GenBank accession number: JN817432, JN817433, JN817434, JN817435, JN817436) were also identified. In addition, *qnrS4* (GenBank accession number: JN836269) appeared to be the novel variants of *qnrS*. **Conclusion** Quinolone-resistance-determining region played a key role on the resistance to quinolones in this group of MDR-KPN, and quinolone-resistance genes mediated by mobile genetic elements [*qnrB2*, *qnrB4*, *qnrS1*, *qnrS4*, *aac*(6')-I b-cr] showed positive in some parts of the

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.01.015

作者单位: 311106 杭州市余杭区中医院检验科 (朱健铭、姜如金); 浙江大学医学院附属第一医院检验科 (孔海深), 附属第二医院检验科 (张嵘); 浙江省人民医院检验中心 (吕火祥); 解放军第 117 医院检验科 (孙长贵); 解放军第 98 医院检验科 (黄支密)

通信作者: 朱健铭, Email: zhujianming001@126.com

strains. This was the first report on emergence of *qnrS4* in the world.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; Quinolone; Novel variant; Quinolone-resistance-determining region; Multi-drug resistance

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, *Kpn*)可引起多部位复杂感染,威胁患者生命。据我国2010年CHINET对华东地区细菌耐药监测数据表明,*Kpn*的分离率居第三位^[1]。近年来随着抗菌药物的广泛及不合理使用,*Kpn*临床分离株的耐药性不断上升,而多重耐药肺炎克雷伯菌(multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, MDR-KPN)感染的治疗已经成为临床一大难题,特别是2010年,在印度和巴基斯坦率先发现了产NDM-1金属酶的泛耐药菌,使*Kpn*耐药问题备受关注^[2-5]。我们曾报道了一组(47株)MDR-KPN β -内酰胺类和氨基糖苷类药物耐药相关基因检测状况,并发现了KPC和*aac(6')-Ib*基因新的变异型^[6-9]。该组菌株对喹诺酮类药物也有较高的耐药性,为了解该组菌株对喹诺酮类药物的耐药机制,本研究进行了喹诺酮类药物作用靶位拓扑异构酶II编码基因(*gyrA*)与拓扑异构酶IV编码基因(*parC*)突变热点区——喹诺酮耐药决定区(quinolone-resistance-determining region, QRDR)突变分析,并进行可移动遗传元件介导的喹诺酮类耐药基因[*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*aac(6')-Ib-cr*、*qepA*]检测,结果在MDR-KPN中发现了一组*gyrA*、*parC*、*qnrS*基因新的变异型。现报道如下。

材料与方法

1. 菌株来源及鉴定:47株试验菌株分别分离自2008年8月至2010年5月浙江省杭州市和湖州市6所医院住院患者临床样本(同一患者剔除重复样本)。其中1~15号株来自杭州市A医院、16~26号株来自杭州市B医院、27号株来自杭州市C医院、28~34号株来自杭州市D医院、35~38号株来自湖州市E医院、39~47号株来自杭州市F医院。男性33例,女性14例,年龄25~91岁,平均(68.0±16.4)岁。样本来源痰液(21份)、中段尿(13份)、血液(6份)、引流液(3份)、脑脊髓液(2份)、咽拭子和脓液(各1份)。采用法国生物梅里埃公司VITEK2-Compact全自动微生物鉴定仪及配套革兰阴性菌鉴定卡进行常规菌种鉴定,结果均为*Kpn*。药物敏感性试验质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922、金黄色葡萄球菌ATCC25923、铜绿假单胞菌ATCC27853和大肠埃希菌ATCC35218(为监控 β -内酰胺 β -内酰胺酶抑制剂用)。将分离自临床,并对本研究所涉及

抗菌药物均呈敏感的*Kpn*作为敏感参照株(S株)。多重耐药定义为 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类、氯霉素和复方磺胺甲恶唑6类药物中有3类(含3类)以上的药物耐药者。

2. 菌株分子鉴定:参照文献[10]进行。采用PCR法扩增*gyrA*和*parC*看家基因,对*gyrA*和*parC*基因PCR扩增产物进行测序,所测序列采用GenBank中的BLASTn程序进行确认分析。

3. 药敏试验:采用E test法测定21种抗菌药物(头孢噻吩、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁、氨基曲南、亚胺培南、美洛培南、厄他培南、头孢哌酮/舒巴坦、阿米卡星、妥布霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、四环素、替加环素、氯霉素和复方磺胺甲恶唑)的敏感性。E test条为AB BIOMERIEUX(Solna,瑞典)公司产品, MH琼脂为梅里埃(上海)生物化学制品有限公司(pH 7.3, Ca²⁺ 50 μ g/ml, Mg²⁺ 25 μ g/ml),并根据2011年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)的标准进行抗菌药物敏感性判断^[11]。由于CLSI目前无肠杆菌科头孢哌酮/舒巴坦和替加环素MIC解释标准,故头孢哌酮/舒巴坦参照头孢哌酮标准,替加环素参照文献[12]标准。

4. 细菌处理:挑纯培养菌落置入0.5 ml离心管内(内置200 ng/ml蛋白酶K溶液400 μ l),56 $^{\circ}$ C水浴2 h,95 $^{\circ}$ C水浴10 min,即为基因检测的模板液,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

5. 基因检测:喹诺酮类药物作用靶位编码基因*gyrA*、*parC*和可移动遗传元件介导的喹诺酮类耐药基因[*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*aac(6')-Ib-cr*、*qepA*]检测均为PCR法,阳性产物均做DNA测序。目标基因引物序列和产物长度见表1。各种基因PCR扩增体系:每反应体系P1引物1 μ l(1.0 μ mol/L)、P2引物1 μ l(1.0 μ mol/L),dNTPs 2 μ l(各2 mmol/L),10 \times PCR缓冲液2 μ l [KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl(pH 9.0) 10 mmol/L, NP₄₀ 0.5%, 牛血清白蛋白(BSA)0.02%], Taq DNA pol 1 U(不计体积),双蒸水9 μ l,模板液5 μ l,总反应体积为20 μ l。PCR扩增热循环参数:93 $^{\circ}$ C预变性2 min,然后93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,循环35个周期,最后一个周期72 $^{\circ}$ C延长至5 min。PCR产物长度>500 bp者PCR扩增热循环参数为:93 $^{\circ}$ C预变性

表 1 PCR 引物序列和目的产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')		产物长度(bp)
<i>gyrA</i>	P1:CGCGTACTATACGCCATGAACGTA;	P2:ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	441
<i>parC</i>	P1:CTGAATGCCAGCGCCAAATT;	P2:TGCGGTGGAATATCGGTGCGC	389
<i>qnrA</i>	P1:CAAGAGGATTTCTACGCCAG;	P2:GAACTCTATGCCAAAGCAGTTGG	240
<i>qnrB</i>	P1:ATGRCTCTGGCMTMGTTGGCGA;	P2:CTARCCAATMAMCGCGATGCCAAG	645
<i>qnrS</i>	P1:ATGGAACCTACMRTCAYACATAT;	P2:TTAGTCAGGAWAAACAACAATACCC	657
<i>aac(6')-I b</i> 群	P1:ATGACTGAGCATGACCTTGC;	P2:TTAGGCATCACTGCGTGTTC	519
<i>qepA</i>	P1:GCCGAACGCCGCTGCCGACAG;	P2:TGCTGCTGACGCTGGCGCTC	501

2 min, 然后 93 °C 60 s, 55 °C 60 s, 72 °C 60 s, 循环 35 个周期, 最后一个周期 72 °C 延长至 5 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 出现与阳性对照分子相当的目的条带为阳性。上述参数和检测试剂盒以及阳性对照 DNA 由无锡市克隆遗传技术研究所提供。

6. 序列测定: 对所有扩增阳性基因 PCR 产物经纯化后用美国 ABI 公司 3730 型自动 DNA 序列分析仪进行序列测定(正反向测序), 委托上海博尚生物技术有限公司完成。所测序列采用 GenBank 中的 BLASTn Search 程序进行同源性分析, 并将基因核酸序列登录于 GenBank。

结 果

1. 菌株分子鉴定: 47 株菌经 *gyrA* 和 *parC* 基因 PCR 扩增、测序、同源性分析, 均确认为 *Kpn*。

2. 药敏试验: 47 株 MDR-KPN 对替加环素敏感率最高, 为 93.62%。对其余 20 种抗菌药物的敏感率均 < 40.0%, 对喹诺酮类药物诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率分别高达 87.23%、87.23%、89.36% 和 87.23% (表 2)。

3. 喹诺酮类药物药敏及耐药相关基因检测: 47 株 MDR-KPN 中 4 株对 4 种喹诺酮类药物均为敏感和对 21 种抗菌药物均为敏感的参照株(S 株) *gyrA*、*parC* 基因喹诺酮耐药决定区(QRDR)均无突变。41 株对 4 种喹诺酮类药物均为耐药者, *gyrA* 基因翻译成氨基酸序列后在第 83 位密码子有义突变 41 株(100%)、第 87 位密码子有义突变 28 株(68.3%) 以及 *parC* 基因翻译成氨基酸序列后在第 80 位密码子有义突变 40 株(97.6%)。2 株喹诺酮类药物存在部分耐药或中介者, *gyrA* 基因翻译成氨基酸序列后在第 83 位均存在有义突变(表 3)。

本研究 2、5、7、9、10 号株的 *gyrA*

基因测得序列各不相同, 并与已登录于美国 GenBank 的 *Kpn gyrA* 基因也各不相同(截止 2011 年 9 月 28 日), 确认为 *gyrA* 基因新的变异型, 其序列已登录于美国 GenBank(登录号分别为: JN811952、JN811953、JN811954、JN811955、JN811956); 而本研究 1、7、21、28、34 号株的 *parC* 基因测得序列各不相同, 并与已登录于美国 GenBank 的 *Kpn parC* 基因也各不相同(截止 2011 年 9 月 28 日), 确认为 *parC* 基因新变异型, 其序列已登录于美国 GenBank(登录号分别为: JN817432、JN817433、JN817434、JN817435、JN817436)。

47 株 MDR-KPN 经可移动遗传元件介导的喹诺酮类耐药基因 [*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*aac(6')-I b-cr*、*qepA*] 检测和测序, 检出 *qnrB2*、*qnrB4*、*qnrS1*、*qnrS4*、*aac(6')-I b-cr* 基因, 其中 *qnrS4* 序列为首次发现的 *qnrS* 变异型, 命名后将 1 号株的 *qnrS4* 序列登录于美国 GenBank(登录号: JN836269)。

4. 喹诺酮类耐药相关基因检出和突变状况: 见

表 2 47 株 MDR-KPN 对 21 种抗菌药物的敏感性试验结果

抗菌药物	耐药 (%)	中介 (%)	敏感 (%)	MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)	MIC 范围 (μg/ml)
头孢噻吩	47(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	≥256	≥256	≥256
头孢唑辛	47(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	≥256	≥256	≥256
头孢噻肟	47(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	≥256	≥256	≥256
头孢他啶	45(95.74)	1(2.13)	1(2.13)	≥256	≥256	1.5 ~ ≥256
头孢吡肟	44(93.62)	2(4.25)	1(2.13)	≥256	≥256	6 ~ ≥256
头孢西丁	40(85.11)	5(10.64)	2(4.25)	≥256	≥256	8 ~ ≥256
氨基糖甙	47(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	≥256	≥256	48 ~ ≥256
亚胺培南	36(76.60)	0(0.00)	11(23.40)	≥32	≥32	0.25 ~ ≥32
美洛培南	36(76.60)	0(0.00)	11(23.40)	≥32	≥32	0.032 ~ ≥32
厄他培南	39(82.98)	1(2.13)	7(14.89)	≥32	≥32	0.25 ~ ≥32
头孢哌酮/舒巴坦	38(80.85)	2(4.26)	7(14.89)	≥256	≥256	2 ~ ≥256
阿米卡星	29(61.70)	0(0.00)	18(38.30)	≥256	≥256	2 ~ ≥256
妥布霉素	37(78.72)	3(6.38)	7(14.89)	≥256	≥256	0.75 ~ ≥256
诺氟沙星	41(87.23)	2(4.26)	4(8.51)	≥256	≥256	1 ~ ≥256
氧氟沙星	41(87.23)	2(4.26)	4(8.51)	≥32	≥32	0.032 ~ ≥32
环丙沙星	42(89.36)	1(2.13)	4(8.51)	≥32	≥32	0.032 ~ ≥32
左氧氟沙星	41(87.23)	1(2.13)	5(10.64)	≥32	≥32	0.094 ~ ≥32
复方磺胺甲恶唑	33(70.21)	0(0.00)	14(29.79)	≥32	≥32	0.064 ~ ≥32
四环素	17(36.17)	17(36.17)	13(27.66)	8	≥256	2 ~ ≥256
替加环素	0(0.00)	3(6.38)	44(93.62)	1	2	0.75 ~ 3
氯霉素	36(76.60)	5(10.64)	6(12.76)	≥256	≥256	3 ~ ≥256

注: 各种质控菌株检测的 MIC 值均在可接受的质量控制范围内; 括号外数据为株数, 括号内数据为百分比(%)

表 3 47 株 MDR-KPN 喹诺酮类药物药敏及耐药相关基因检测

菌株号	<i>gyrA</i> ^a		<i>parC</i> ^c 80	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac</i> (6')- I b-cr	诺氟沙星	氧氟沙星	环丙沙星	左氧氟沙星
	83	87								
1	I	G	I	-	S4	-	R	R	R	R
2	Y	D	S	-	-	-	R	R	R	R
3	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
4	Y	D	S	-	-	-	I	I	I	S
5	F	D	I	-	-	-	R	R	R	R
6	I	G	I	-	S4	-	R	R	R	R
7	S	D	S	-	-	-	S	S	S	S
8	Y	D	S	-	-	-	I	I	R	I
9	S	D	S	-	-	-	S	S	S	S
10	I	D	I	B2	S4	+	R	R	R	R
11	I	D	I	B2	-	+	R	R	R	R
12	S	D	S	B4	-	-	S	S	S	S
13	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
14	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
15	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
16	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
17	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
18	I	G	I	-	S1	-	R	R	R	R
19	I	G	I	-	S1	-	R	R	R	R
20	I	G	I	-	S4	-	R	R	R	R
21	F	H	I	-	S1	-	R	R	R	R
22	I	G	I	-	S1	-	R	R	R	R
23	I	G	I	-	S1	-	R	R	R	R
24	S	D	S	-	S1	-	S	S	S	S
25	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
26	I	G	I	-	S1	-	R	R	R	R
27	I	D	I	-	-	-	R	R	R	R
28	I	D	I	-	S1	-	R	R	R	R
29	I	D	I	-	-	-	R	R	R	R
30	I	D	I	-	-	-	R	R	R	R
31	I	D	I	-	-	-	R	R	R	R
32	I	D	I	-	-	-	R	R	R	R
33	I	D	I	-	-	-	R	R	R	R
34	I	D	I	B2	S4	-	R	R	R	R
35	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
36	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
37	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
38	I	G	I	-	-	-	R	R	R	R
39	F	H	I	-	-	-	R	R	R	R
40	F	H	I	-	-	-	R	R	R	R
41	F	H	I	-	-	-	R	R	R	R
42	F	H	I	-	-	-	R	R	R	R
43	F	H	I	-	-	-	R	R	R	R
44	I	D	I	-	-	-	R	R	R	R
45	F	H	I	-	-	-	R	R	R	R
46	F	H	I	-	-	-	R	R	R	R
47	F	H	I	-	-	-	R	R	R	R
S株	S	D	S	-	-	-	S	S	S	S

注：^a分别为 *gyrA* 基因第 83 位和第 87 位密码子翻译成氨基酸序列，*parC* 基因第 80 位密码子翻译成氨基酸序列；S 为敏感；I 为中介；R 为耐药

表 4. 43 株 *gyrA* 基因翻译成氨基酸序列后在第 83 位密码子存在有义突变的类型有 3 种，其中 S(丝氨酸)→I(异亮氨酸)30 株、S(丝氨酸)→F(苯丙氨酸)10 株、S(丝氨酸)→Y(酪氨酸)3 株；28 株 *gyrA* 基因翻译成氨基酸序列后在第 87 位密码子存在有义突

变的类型有 2 种，其中 D(天冬氨酸)→G(甘氨酸)19 株、D(天冬氨酸)→H(组氨酸)9 株；40 株 *parC* 基因翻译成氨基酸序列后在第 80 位密码子存在有义突变的类型均为 S(丝氨酸)→I(异亮氨酸)。1 号株 *gyrA* 基因第 83 位和第 87 位密码子有义突变状况见图 1，1 号株 *parC* 基因第 80 位密码子有义突变状况见图 2，10 号株 *gyrA* 序列与 GenBank 已登录的 *gyrA* 基因序列分子进化见图 3。

表 4 47 株 MDR-KPN 喹诺酮类耐药相关基因检出和突变状况

基因名称	阳性株数	阳性率(%)
<i>gyrA</i> 突变(83 位)	43	91.5
<i>gyrA</i> 突变(87 位)	28	59.6
<i>parC</i> 突变(80 位)	40	85.1
<i>qnrB2</i>	3	6.4
<i>qnrB4</i>	1	2.1
<i>qnrS1</i>	8	17.0
<i>qnrS4</i>	5	10.6
<i>aac</i> (6')-I b-cr	2	4.3

注：检测结果为阴性的项目未列出

讨 论

喹诺酮类药物作用于细菌拓扑异构酶 II (DNA 旋转酶)或拓扑异构酶 IV，使细菌 DNA 无法复制而起到抑菌作用。因喹诺酮类药物在呼吸道和尿路感染的治疗中疗效卓著以及预防动物感染效果较好，故在临床医学和动物医学领域均出现了过度使用，耐药菌随之产生。

较早发现的细菌耐喹诺酮类药物机制为细菌拓扑异构酶 II (DNA 旋转酶)或拓扑异构酶 IV 编码基因(*gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE*)突变所致^[13-16]。其中 *gyrA* 编码基因第 83 位、第 87 位密码子和 *parC* 编码基因第 80 位、第 84 位密码子的突变是最常见的原因，*gyrA* 和 *parC* 基因的该区域被称为喹诺酮耐药决定区(QRDR)。国外学者研究了喹诺酮类药物与细菌拓扑异构酶 II (DNA 旋转酶)A 亚单位分子对接(molecular docking)显示，*gyrA* 编码基因第 83 位、第 87 位密码子突变后，喹诺酮类药物与之结合位置发生改变，所形成氢键的数量也减少^[17]，由此喹诺酮类药物与细菌拓扑异构酶 II (DNA 旋转酶)A 亚单位分子结合力也下降。2000 年前后，国内外学者相继报道了革兰阴性杆菌(主要为肠杆菌)中其质粒上的 *qnr* 基因也可介导低水平喹诺酮耐药，*qnr* 基因表达产物对喹诺酮类作用靶位(GyrA、ParC)具有保护作用^[13,14]。2003 年日本学者 Yamane 等^[18]在大肠埃希菌中发现了能使喹诺酮类药物外排的 *qepA* 基因。

有义突变28株(68.3%)以及*parC*基因翻译成氨基酸序列后在第80位密码子有义突变40株(97.6%)。2株喹诺酮类药物存在部分耐药或中介者其*gyrA*基因翻译成氨基酸序列后在第83位均存在有义突变。*gyrA*基因第83位上有义突变有S(丝氨酸)→I(异亮氨酸)、S(丝氨酸)→F(苯丙氨酸)和S(丝氨酸)→Y(酪氨酸)3种,*gyrA*基因第87位上有义突变有D(天冬氨酸)→G(甘氨酸)和D(天冬氨酸)→H(组氨酸)2种,*parC*基因第80位上有义突变均为S(丝氨酸)→I(异亮氨酸)。而4株对喹诺酮类药物均为敏感者和本研究对21种抗菌药物均为敏感的参照株(S株)*gyrA*、*parC*基因喹诺酮耐药决定区(QRDR)均无突变。喹诺酮类药物药敏结果与喹诺酮类药物作用靶位的有义突变高度一致。本研究并检出由可移动遗传元件介导的喹诺酮类耐药基因 $qnrB2$ 、 $qnrB4$ 、 $qnrS1$ 、 $qnrS4$ 、 $aac(6')-I b-cr$,但这类耐药基因只导致低水平喹诺酮耐药^[13,14],由表3可见12号株、24号株分别携带 $qnrB4$ 、 $qnrS1$ 基因,但4种喹诺酮类药物均为敏感。

本组菌株 $gyrA$ 基因翻译成氨基酸序列后在第83位和第87位密码子突变类型与国内先前报道相类似^[20],但2、5、7、9、10号株的 $gyrA$ 基因和1、7、21、28、34号株的 $parC$ 基因与已登录于美国GenBank的 $Kpn gyrA$ 、 $parC$ 基因均各不相同,能确认为 $Kpn gyrA$ 、 $parC$ 基因新的变异型。并且 $qnrS4$ 序列为首次发现的 $qnrS$ 变异型。本研究提示本组菌株喹诺酮类药物耐药主要与 $gyrA$ 和 $parC$ 基因的喹诺酮耐药决定区(QRDR)有义突变相关,部分菌株可检出 $qnrB2$ 、 $qnrB4$ 、 $qnrS1$ 、 $qnrS4$ 、 $aac(6')-I b-cr$ 等可移动遗传元件介导的喹诺酮类耐药基因。

Kpn 的 $gyrA$ 、 $parC$ 基因新变异型的发现具有重要临床意义。一为变异的 $gyrA$ 、 $parC$ 基因序列可作为遗传标记,用作该菌株在医院内传播扩散的监测标记;二为在抗菌药物的研发中可设计专门针对新的变异型的新化合物,以达到制服耐药菌之目的。 $qnrS4$ 序列的首次发现不仅丰富了基因数据库,也为观察 $qnrS$ 基因序列分子进化提供了基础数据。

[本文由杭州市科技局科技计划项目(20110833B48)、杭州市卫生科技计划项目(2010B078)、杭州市余杭区重大科技项目(2010001)资助]

参 考 文 献

[1] Kong HS, Yang Q, Chen X, et al. Mohnarin report of 2010: bacterial distribution and resistance in north China. *Chin J Nosocomiol*, 2011, 21(23):4915-4920. (in Chinese)
孔海深, 杨青, 陈晓, 等. Mohnarin 2010年度报告: 华东地区细菌耐药监测. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(23):4915-4920.
[2] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin

esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12):5046-5054.
[3] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(9):597-602.
[4] Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, et al. New Delhi metallo-β-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1):103-106.
[5] Poirel L, Maskari ZA, Rashdi FA, et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(2):304-306.
[6] Zhu JM, Jiang RJ, Wu KL, et al. Characterization of resistance to β-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Chin J Clin Infect Dis*, 2011, 4(5):278-283. (in Chinese)
朱健铭, 姜如金, 吴康乐, 等. 肺炎克雷伯菌临床分离株β-内酰胺类耐药特征分析. *中华临床感染病杂志*, 2011, 4(5):278-283.
[7] Zhu JM, Jiang RJ, Wu KL, et al. Emergence of novel variant of KPC in drug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Chin J Microbiol Immunol*, 2011, 31(9):800. (in Chinese)
朱健铭, 姜如金, 吴康乐, 等. 耐药肺炎克雷伯菌中发现碳青霉烯酶KPC基因新的变异型. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31(9):800.
[8] Zhu JM, Jiang RJ, Mi ZH, et al. Novel KPC variant from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2011, 32(10):1050-1052.
[9] Zhu JM, Jiang RJ, Wu KL, et al. Emergence of novel variant of $aac(6')-I b$ in drug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Chin J Microbiol Immunol*, 2011, 31(11):976-977. (in Chinese)
朱健铭, 姜如金, 吴康乐, 等. 从耐药肺炎克雷伯菌中检出 $aac(6')-I b$ 基因新亚型. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31(11):976-977.
[10] Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(Pt 3):915-924.
[11] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement, 2011.
[12] Wang H, Ni YX, Chen MJ, et al. The laboratory manual of in-vitro susceptibility testing of the new glycolcycline of tigecycline. *Chin J Lab Med*, 2009, 32(11):1208-1213. (in Chinese)
王辉, 倪语星, 陈民钧, 等. 新型甘氨酸环素类抗菌药物替加环素的体外药敏试验操作规程. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(11):1208-1213.
[13] Wang MG. Resistance of quinolones and resistant mechanism mediated by plasmid. *Natl Med J Chin*, 2006, 86(9):645-647. (in Chinese)
王明贵. 喹诺酮类抗菌药物的耐药性及质粒介导耐药机制. *中华医学杂志*, 2006, 86(9):645-647.
[14] Drlica K, Malik M, Kerns RJ, et al. Quinolone-mediated bacterial death. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 52(2):385-392.
[15] Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(4):664-689.
[16] Weng XB, Mi ZH. New subtype of *gyrA* gene in multi-drug resistant strains of *Escherichia coli* isolated from urine. *Chin J Microbiol Immunol*, 2010, 30(1):11-16. (in Chinese)
翁辛璧, 糜祖煌. 大肠埃希菌尿液分离株中检出 $gyrA$ 基因新变异体. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(1):11-16.
[17] Vashist J, Vishvanath R, Kapoor R, et al. Interaction of nalidixic acid and ciprofloxacin with wild type and mutated quinolone-resistance- determining region of DNA gyrase A. *Indian J Biochem Biophys*, 2009, 46(2):147-153.
[18] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux Pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(9):3354-3360.
[19] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacobk GA, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Med*, 2006, 12(1):83-88.
[20] Mi JR, Huang ZM, Mi ZH. Quinolone-resistance genes in multi-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Chin J Nosocomiol*, 2009, 19(24):3301-3304. (in Chinese)
糜家睿, 黄支密, 糜祖煌. 多耐药肺炎克雷伯菌喹诺酮类耐药相关基因研究. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(24):3301-3304.

(收稿日期:2012-09-13)

(本文编辑:张林东)