

志贺菌对喹诺酮类药物耐药分子机制的研究

朱静媛 段广才 郝园林

【摘要】 目的 研究志贺菌对喹诺酮类药物耐药性及其耐药基因 *gyrA* 和 *parC* 的变异。方法 对 73 株临床分离的志贺菌及标准株 51573 进行吡哌酸 (PI)、氧氟沙星 (OFL)、诺氟沙星 (NOR)、环丙沙星 (CIP) 4 种药物的药敏试验,对其 DNA 旋转酶 *gyrA* 基因、拓扑异构酶 IV *parC* 基因 N 末端编码区分别进行聚合酶链反应 (PCR) 扩增后,对 *gyrA* 基因进行限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析,对 *parC* 基因进行 RFLP 及单链构象多态性 (SSCP) 分析。结果 标准株 51573 对 4 种喹诺酮类药物均敏感,73 株临床分离的志贺菌属细菌对 PI、CIP、NOR、OFL 的耐药率分别为 79.5%、60.3%、41.1% 和 36.9%; 67 株 (91.8%) 菌株对喹诺酮类药物敏感性降低,其中 *gyrA* 基因突变率为 91%,*parC* 基因突变率为 7.5%,6 株临床敏感株及标准株 51573 均未检测出以上两基因突变。结论 志贺菌对喹诺酮类药物耐药严重,靶基因突变是其耐喹诺酮类药物的主要机制之一,以 DNA 旋转酶 *gyrA* 基因突变为主,拓扑异构酶 IV *parC* 基因突变次之。

【关键词】 志贺菌;喹诺酮类药物;耐药性;基因

Study on the molecular mechanism of quinolone resistance in *Shigellae spp.* ZHU Jing-yuan*, DUAN Guang-cai, XI Yuan-lin. *The Department of Environmental Hygiene, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective To study the resistance and its mechanism of *Shigellae spp.* to quinolones. **Methods** Seventy-three clinical isolates were collected. Susceptibility tests of piperidic acid (PI), ofloxacin (OFL), norfloxacin (NOR), and ciprofloxacin (CIP) were performed in all clinical isolates and *Shigella* 51573. The N-terminal coding region of *gyrA* and *parC* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) respectively. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) was applied to all PCR products of *gyrA* and *parC* and single strand conformational polymorphism analysis (SSCP) was also applied to PCR products of *parC*. **Results** The resistance rates for all the *Shigella spp.* to PI, CIP, NOR and OFL were 79.5%, 60.3%, 41.1% and 36.9%. Sixty-seven strains (91.8%) were quinolone-reduced-sensitive isolates, in which 61 strains (91%) were found carrying mutations in *gyrA* with 5 strains (7.5%) found carrying mutations in *parC*. No mutation was found in 6 quinolone-sensitive isolates or *Shigella* 51573. **Conclusion** The *Shigella spp.* had high resistance rates to quinolones. The target gene mutations which were mainly found in *gyrA* and secondarily in *parC*, played an important role in the quinolone-resistance in *Shigella spp.*

【Key words】 *Shigella*; Quinolones; Resistance; Gene

志贺菌是细菌性痢疾(菌痢)的病原体,菌痢至今仍是影响人类健康的主要肠道传染病之一。20 世纪 60 年代以来志贺菌逐渐对多种传统抗生素耐药,80 年代对喹诺酮类药物耐药菌株增多。为了解志贺菌对喹诺酮类药物的耐药性及其与编码靶酶的基因(*gyrA*、*parC*)突变的关系,我们从临床收集了 54 株福氏志贺菌,15 株宋内氏志贺菌和 4 株痢疾志贺菌,进行 4 种喹诺酮类药物的敏感性试验,对所有

临床菌株及标准株 51573 的 *gyrA* 基因和 *parC* 基因进行 N 末端编码区的聚合酶链反应(PCR)扩增、限制性片段长度多态性(RFLP)分析,并对 *parC* 基因进行单链构象多态性(SSCP)分析,结果报道如下。

材料与方法

1. 菌株来源:收集 1995~1996 年江西省铜鼓县福氏志贺菌 30 株(郑州铁路中心卫生防疫站惠赠),1998~2001 年河南省郑州市两家医院腹泻患者粪便培养细菌标本,在就诊医院鉴定后送河南省分子医学重点实验室重新进行生化和血清学鉴定。

2. 主要试剂:吡哌酸(PI)、氧氟沙星(OFL)、诺氟沙星(NOR)、环丙沙星(CIP)的药敏纸片北京天坛医院产品;引物合成由上海生工生物工程公司完成;4种dNTP及Taq酶由上海生工生物工程公司生产;限制性内切酶Hinf I、100 bp DNA Ladder产自MBI公司;丙烯酰胺、琼脂糖产自BBI公司。

3. 药物敏感性试验:采用改良Kinby-Bauer法,质控菌为ATCC2922。

4. PCR:PCR扩增志贺菌属细菌gyrA基因引物参照文献[1],上游引物:5'-TACACCGGTCAA CATTGAGG-3',下游引物:5'-TTAATGATTG CCGCCGTCGG-3',扩增片段位于gyrA基因24~671位点,扩增产物648 bp。PCR扩增parC基因引物根据大肠埃希菌已发表序列^[2]利用DNAclub软件自行设计,上游引物:5'-GCGTTGCCGTTTAT TGGTGAT-3',下游引物:5'-GCAGGTTATGC GGTGGAAT-3',扩增片段位于parC基因88~556位点,扩增产物469 bp。取增菌8 h的增菌肉汤1 ml 10 000 r/min离心1 min,去上清,加入三蒸水100 μl混匀后煮沸10 min,稍离心,取上清液为模板进行PCR反应。50 μl反应体系包括10×PCR缓冲液、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTP、2.5 U Taq酶、上下游引物各12.5 pmol/L及DNA模板8 μl。反应条件:94℃预变性5 min后进行如下循环,94℃ 45 s,56℃ 40 s,72℃ 40 s,共30个循环,最后72℃延伸10 min。产物以1.5%琼脂糖5 V/cm电压电泳0.5 μg/ml溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果[核酸相对分子质量(M_r)标准为100 bp DNA Ladder]。

5. RFLP:限制性内切酶Hinf I在gyrA基因244位、343位碱基处各有一个识别位点,能把648 bp长的PCR扩增产物消化成三个片段:221 bp、99 bp和328 bp,有研究^[1]证实gyrA基因第244位碱基识别位点的丧失,即编码第82/83位氨基酸密码子的突变,能导致氨基酸替代,并使酶切产物成为320 bp和328 bp两个片段。限制性内切酶Hinf I在parC基因366位碱基处有一个识别位点,能把469 bp长的PCR扩增产物消化成两个片段:278 bp和191 bp。酶切反应体系包括20 μl PCR反应产物、20 U限制性内切酶Hinf I及10×限制性内切酶缓冲液2 μl。置37℃恒温水浴消化2 h后,参照文献[3]的方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染并观

察结果(M_r为100 bp DNA Ladder)。

6. parC基因的SSCP:取parC基因Hinf I酶切产物5 μl与30 μl变性缓冲液(95%甲酰胺)混合,95℃加热10 min后立即冰浴10 min,参照文献[3]的方法进行8%聚丙烯酰胺凝胶电泳(交联度3%,胶厚度1.5 mm,电压8 V/cm)4℃恒压电泳3 h后银染并观察结果(M_r为100 bp DNA Ladder)。

结 果

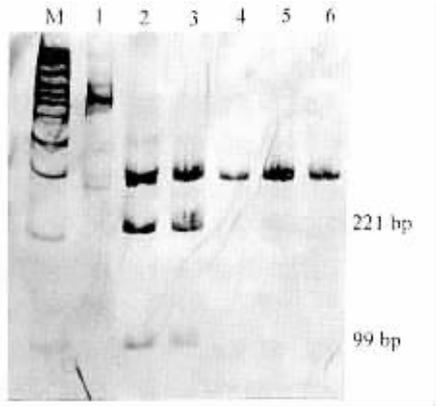
1. 菌株鉴定:1995~2001年共收集菌株73株,其中江西铜鼓福氏志贺菌30株(1995~1996年),定为甲组;郑州福氏志贺菌24株(1998~2001年),定为乙组;郑州宋内氏志贺菌15株(1998~2001年),定为丙组;郑州痢疾志贺菌4株(2000~2001年),定为丁组。菌株编号:H从H1~32,无H3、7;Z编号从Z1~24,无Z16、18、19、21;N编号从N1~16;三位数编号有7株:658、626、677、699、768、831、139。

2. 药敏试验:73株志贺菌中67株(91.8%)对一种或多种喹诺酮类药物中度敏感或耐药。4种喹诺酮类药物中,第一代喹诺酮类药物PI的耐药率最高,为79.5%;第二代喹诺酮类药物CIP、NOR、OFL的耐药率分别是60.3%、41.1%和36.9%,其中PI与CIP($\chi^2=23.921, P<0.05$)、CIP与NOR($\chi^2=5.32, P<0.05$)的耐药率差异有显著性,而NOR与OFL耐药率差异无显著性($\chi^2=0.259, P>0.05$)。

3. PCR反应产物电泳:73株志贺菌全部分别扩增出648 bp和469 bp长度的片段,分别是gyrA和parC基因的扩增产物。

4. gyrA基因PCR-RFLP检测突变:6株喹诺酮类药物敏感株均产生221 bp、99 bp和328 bp三条酶切产物片段,无一例突变;67株非敏感株中有6株产生如上三条酶切片段,另61株产生两条300 bp左右的酶切片段(图1),非敏感株突变率为91%。

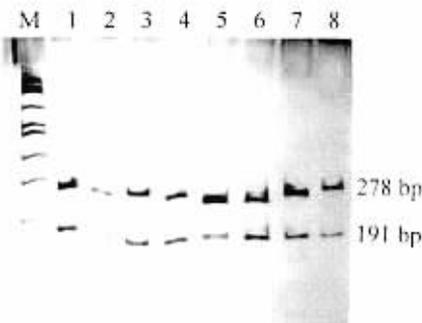
5. parC基因PCR-Hinf I-SSCP检测突变:所有志贺菌的parC基因PCR扩增产物经Hinf I酶切后均产生278 bp、191 bp两条酶切产物片段(图2)。将酶切产物变性后分析SSCP发现,6株敏感株和62株非敏感株具有一致的单链构象,另5株非敏感株显示出单链构象不同(图3),非敏感株突变率为7.5%。



1 :699 ; 2 :Z24 ; 3 :标准株 S51573 ; 4 :H10 ; 5 :H13 ; 6 :Z17 ; M :100 bp DNA Ladder

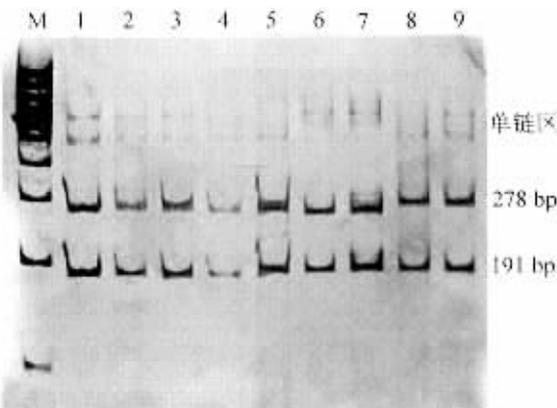
1 gyrA 基因 PCR 产物(648 bp) ; 2-6 :PCR-RFLP 产物 ; 其中 2,3 为非突变株 , 产生三条酶切产物(99 bp, 221 bp, 328 bp) ; 4, 5, 6 为突变株 , 产生两条酶切产物(320 bp, 328 bp)

图1 gyrA 基因 Hinf I 酶切产物多态性



1 :标准株 S51573 ; 2 :699 ; 3 :Z9 ; 4 :Z7 ; 5 :Z6 ; 6 :626 ; 7 :N5 ; 8 :H17 ; M :100 bp DNA Ladder

图2 parC 基因 PCR-Hinf I 酶切产物



1 :Z11 ; 2 :标准株 S51573 ; 3 :Z13 ; 4 :Z5 ; 5 :N4 ; 6 :658 ; 7 :626 ; 8 :H28 ; 9 :H25 ; M :100 bp DNA Ladder

parC 基因 PCR-Hinf I-SSCP 分析显示两条双链带(191 bp, 278 bp)和多条单链带 ; 6, 7 为突变株 , 其单链带位置与 1(敏感株) 及余者不同(差距 > 3 mm)

图3 parC 基因酶切产物 SSCP 分析结果

讨 论

许多研究表明 , 志贺菌对多种抗生素普遍耐药^[4]。本研究的结果显示志贺菌对喹诺酮类药物耐药性相当严重 , 91.8% 的菌株对一种或多种喹诺酮类药物敏感性降低或耐药 , 对 4 种喹诺酮类药物的耐药率在 36.9% ~ 79.5% 之间。其中 PI 与 CIP、CIP 与 NOR 耐药率差异有显著性 , NOR 与 OFL 耐药率则差异无显著性 , 可能与药物投放年代、临床应用时间及自身结构不同有关。

喹诺酮类药物是由萘啶酸发展起来的合成抗菌药 , 该药都具有吡啶酮酸的共同结构 , 通过抑制拓扑异构酶 II(又称 DNA 旋转酶 , Gyrase) 和拓扑异构酶 IV(topoisomerase IV) 阻断 DNA 的复制而产生抗菌作用。本研究结果发现靶基因突变在志贺菌耐喹诺酮类药物菌株中普遍存在 , 提示靶基因突变机制可能是志贺菌耐喹诺酮类药物的主要机制之一 , 以 gyrA 基因突变为主要 , parC 基因突变次之。gyrA 基因编码 82/83 位氨基酸的碱基在喹诺酮类药物非敏感株中突变率达 91% , 提示此位点可能是喹诺酮类药物作用的一个共性位点。

从菌痢的防治及对喹诺酮类药物耐药性的防治角度 , 本研究提示 : ① 使用喹诺酮类药物治疗菌痢时 , 应做多种喹诺酮类药物药敏试验 , 因对一种喹诺酮类药物耐药未必对其他种喹诺酮类药物耐药 ; ② 新的喹诺酮类药物开发设计时应设计不同的自身结构与靶酶结合以避免上述常见突变位点 ; ③ 其他耐药机制的研究应予重视。

(感谢郑州铁路中心卫生防疫站提供的大力支持与帮助)

参 考 文 献

- 1 Rahman M, Mauff G, Levy J, et al. Detection of 4-quinolone resistance mutation in gyrA gene of *Shigella* dysenteriae type I by PCR. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38: 2488-2491.
- 2 Kato J, Nishimura Y, Imamura R, et al. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. Cell, 1990, 63: 393-404.
- 3 谷志远, 主编. 现代医学分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1998. 445-451.
- 4 陈荣川. 569 株病原菌耐药性调查. 中华流行病学杂志, 1999, 20: 217.

(收稿日期 2003-01-24)

(本文编辑 : 尹廉)