【临床研究】

鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物的耐药机制分析

戴宁 陈济超 王占伟 赵素蕊 高占成

基金项目：科技部 863 课题项目(2006AA02Z4A9)

工作单位：100007 北京市，北京大学人民医院呼吸与危重症医学科，北京市第六医院干部病房(戴宁)

100046 北京市，北京大学航天中心医院呼吸内科(陈济超)

100044 北京市，北京大学人民医院微生物实验室(王占伟 赵素蕊)

100044 北京市，北京大学人民医院呼吸与危重症医学科(高占成)

通讯作者：高占成，E-mail:gaozhancheng5446@163.com

【摘要】 **目的** 探讨鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumanii*, Ab)对喹诺酮类药物的耐药机制。**方法** 收集 2007 年 11 月至 2008 年 10 月全国多省市 21 家医院院内下呼吸道感染住院患者痰标本 2698 份进行培养鉴定，对 Ab 分离株进行药敏检测，采用聚合酶链反应对 Ab 的不同耐药基因进行扩增，并进行序列分析。**结果** 2698 份痰标本共计培养出 39 株 Ab。对环丙沙星耐药率为 61.54%，对左氧氟沙星耐药率为 53.85%。39 株 Ab 中有 30 株(76.92%)发生 parC 基因突变，19 株(48.72%)发生 gyrA 基因突变，15 株同时发生 parC 基因和 gyrA 基因突变。**结论** Ab 对喹诺酮类药物耐药机制主要与 gyrA、parC 基因突变有关。

【关键词】 鲍曼不动杆菌；喹诺酮类；抗药性；gyrA 基因；parC 基因

Analysis on the resistance mechanism of *Acinetobacter baumanii* to quinolones

DAI Ning[1], CHEN Ji-chao[2], WANG Zhan-wei[3], et al. [1]Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Peking University People's Hospital, Cadres ward, Beijing No. 6 Hospital, Beingjing 100007, China [2]Department of Respiratory Medicine, Peking University Aerospace College of Clinical Medicine, Beijing 100046, China [3]Lab of Microorganism, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

[Abstract] **Objective** To explore the drug resistance mechanism of *Acinetobacter baumanii* (Ab) to quinolones. **Methods** 2698 sputum specimens were collected during Nov. 2007 to Oct. 2008 from patients with lower respiratory infection in 21 hospitals. All specimens were cultivated and the isolated Ab strains were identified. Drug sensitivity assay of these strains were performed. Drug resistance genes of Ab were amplified by PCR and the gene sequence were analyzed. **Results** 39 strains of Ab were identified from 2698 sputum specimens. 61.54% of the bacteria were resistant to ciprofloxacin and 53.85% were resistant to levofloxacin. There were 30 strains(76.92%) had parC gene mutation and 19 strains(48.72%) had gyrA gene mutation and 15 strains both had parC gene and gyrA gene mutation. **Conclusion** The mechanism of Ab drug resistance to quinolones are closely associated with parC and gyrA gene mutation.

[Key words] *Acinetobacter baumanii*; Quinolones; Drug resistance; gyrA gene; parC gene

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumanii*, Ab)是一种革兰染色阴性非发酵菌，属于条件致病菌，目前已经成为院内感染的主要病原菌之一。近年来随着喹诺酮类等广谱抗菌药物的广泛使用，Ab 对其耐药问题越来越受到关注，特别是出现多重耐药甚至泛耐药的 Ab，给临床治疗造成很大困难。该菌对喹诺酮类抗生素耐药主要与 gyrA、parC 基因突变有关。本文对多家医院 2007 年 11 月至 2008 年 10 月住院期间下呼吸道感染患者痰标本分离的 39 株 Ab 进行药敏分析，在基因水平上探讨 Ab 对喹诺酮类药物的耐药机制，并为临床选择有效治疗方案提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2007 年 11 月至 2008 年 10 月期间来自北京大学人民医院、福建省立医院、内蒙古医学院第三附属医院(包钢医院)、江西省南昌大

学附属第一医院、中南大学湘雅医院、徐州医学院连云港市第一人民医院、北京大学航天临床医学院、首都医科大学北京儿童医院、湖北省人民医院、南方医科大学附属南方医院、上海交通大学附属瑞金医院、中国医科大学附属第一医院、广州医科大学第三附属医院、北京大学第三医院等 21 家医院因下呼吸道感染收住院患者的痰液标本 2698 份,经显微镜检查确定为合格痰液（白细胞> 25 个/视野，上皮细胞< 10 个/视野）后,在 20%甘油肉汤培养基中-80 ℃储存备用。收集的标本均经我院细菌室统一培养,对培养阳性的细菌菌落进一步分离鉴定。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪为德国产 Eppendorf;凝胶成像分析系统为上海天能器械公司产品，型号为 Tanon2500；测序用 ABIPRISM 3730XL DNA 测序仪。离心柱型质粒小提试剂盒购自天根生化(北京)科技有限公司。PCR 扩增试剂盒 Pyrobest polymerase 购自宝生物(大连)工程有限公司;琼脂糖为西班牙产 BIOWEST AGAROSE。革兰阴性杆菌鉴定卡(GN 卡)为法国生物梅里埃公司生产。

1.3 方法

1.3.1 菌种鉴定及药敏检测 菌种鉴定采用全自动微生物鉴定系统 VITEK-2 法国生物梅里埃公司的的 GN 卡鉴定。

1.3.2 质粒及基因组 DNA 的提取 挑选待测菌单个菌落接种至 5 ml 含有氨苄西林（50 mg/L）的 LB 培养基中,37 ℃,14-16 h 震荡培养；用细菌质粒小提试剂盒提取 DNA 模板。

1.3.3 耐药基因扩增 引物 gyrA [1]:F 5′-TGTCCGAGATGGCCTGAAGC-3′、R 5′-TGCCGTCATAGTTATCAACG-3′,parC[2]:F 5′-GTCTGAACTGGGCCTGAATGC -3′、R 5′ -AGCAGCTCGGAATATTTCGACAA-3′，由北京奥科生物技术有限责任公司合成。PCR 反应体系及条件:PCR 反应体系（50 μl）:Pyrobest DNA 聚合酶 0.5 μl(2.5 U),10×Pyrobest Buffer II(Mg^{2+} Plus) 5 μl,dNTP Mixture 4 μl(2.5 mM),模板 DNA 2 μl,引物各 2 μl(40 μM),加灭菌蒸馏水至 50 μl。PCR 反应条件 1:预变性 94 ℃ 5 min,变性 94 ℃ 30 s,退火 30 s,退火温度 58 ℃,延伸 72 ℃ 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 反应条件 2:parC 耐药基因 PCR 时，产物存在较多非特异条带，相应调整退火温度,采用 step down 策略,扩增分两步进行,共 35 个循环:(1)预变性 94 ℃ 5 min,变性 94 ℃ 30 s;退火 30 s,退火温度 68 ℃;延伸 72 ℃ 1 min（每个循环退火温度降 1 ℃),15 个循环;(2)变性 94 ℃ 30 s,退火 30 s,退火温度 58 ℃,延伸 72 ℃ 1 min,20 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。

1.3.4 序列分析 PCR 产物送 Invitrogen Biotechnology Co.Ltd 英俊生物技术有限公司纯化、序列分析,结果在 GenBank 比对查询。

2 结果

2.1 Ab 对喹诺酮类抗生素的耐药情况 共检出 39 株 Ab,对环丙沙星耐药率为 61.54%,对左氧氟沙星耐药率为 53.85%。

2.2 Ab 中 gyrA 耐药基因及 parC 基因突变的检出率 检出 gyrA 耐药基因突变 19 株，突变率 48.72%;30 株检出 parC 耐药基因突变，突变率 76.92%;15 株同时检出 gyrA 和 parC 基因突变。

2.3 Ab 中 gyrA 耐药基因突变检出情况 发生 gyrA 耐药基因突变的 19 株 Ab 中,17 株菌株所携带的 gyrA 基因 83 位丝氨酸(Ser)被亮氨酸(Leu)取代,2 株菌株检出的 gyrA 基因发生无义突变(表 1)。

表 1 19 株 Ab 中 gyrA 基因突变状况

基因突变	位点及氨基酸替代	菌株(株)
gyrA 基因突变	Ser-83-Leu	17
无义突变	-	2

2.4 Ab 中 parC 耐药基因突变检出情况 发生 parC 耐药基因突变的 30 株 Ab 中,28 株菌株携带的 parC 耐药基因中 80 位 Ser 被异亮氨酸(Ile)取代;1 株菌株携带 parC 耐药基因中 80 位 Ser 和 84 位谷氨酸(Glu)分别被 Ile 和缬氨酸(Val)所取代,1 株菌携带 parC 耐药基因发生无义突变(表 2)。

表 2 30 株 Ab 中 parC 基因突变状况

基因突变	位点及氨基酸替代	菌株(株)
parC 基因突变	Ser-80-Ile	28
parC 基因突变	Ser-80-Ile、Glu-84-Val	1
无义突变	-	1

3 讨论

Ab 对喹诺酮类药物的耐药性日益严重,而基因突变是细菌对喹诺酮类药物耐药的重要机制之一[3],其中 DNA 旋转酶作为喹诺酮类药物作用靶位,已得到肯定。该酶由 A、B 两个亚单位构成,分别由 gyrA、gyrB 基因编码。A 亚单位使双链 DNA 切断并与断端碱基暂时结合，促使另一条双链通过切口而改变 DNA 双链的螺旋状态。喹诺酮类药物通过嵌入断裂

DNA 链，形成酶-DNA-药物三者复合物，抑制酶活性，达到杀菌目的。当 DNA 旋转酶发生变异时，三者复合物形成受阻，则细菌对药物产生耐药性，其中尤以 A 亚单位第 67~106 位氨基酸（对应碱基位置 199~318）变异更为突出，因此该区域被称为耐喹诺酮类决定区（quinolone-resistant determining region, QRDR）。gyrA 基因 QRDR 突变主要发生在 Ser-83 及 Asp-87[3]，这些位点处不同的氨基酸替代影响其与喹诺酮分子的亲和力，对喹诺酮耐药性的产生所起的作用较大。

DNA 拓扑异构酶Ⅳ由 parC 及 parE 两亚单位组成，parC 与 DNA 旋转酶 gyrA 有一定的同源性，其中尤以 parC 及 gyrA N 末端同源性最高，该区域为酶活性中心，包含 gyrA QRDR。在革兰氏阴性菌中 parC 也可为喹诺酮类作用靶位，主要作用位点为 Ser-80 和 Glu-84[4]。在对喹诺酮类药物耐药方面，与细菌主动外排泵耐药机制相比，gyrA&parC 喹诺酮决定区基因的点突变，所起的作用更为突出[5]。

本文研究发现 17 株 Ab 所携带的 gyrA 耐药基因 83 位 Ser 被 Leu 取代，与相关文献[4]报道相符，其表型均为耐药。而对于两株 gyrA 基因存在无义突变，以及未发生 gyrA 基因突变的细菌来说，其表型耐药的情况，考虑可能是由于其他原因，如主动外排系统，细胞膜屏障作用等而产生耐药[6]。30 株携带 parC 耐药基因的 Ab 中，28 株发生 80 位 Ser 被 Ile 取代；1 株发生 80 和 84 位氨基酸同时被取代；还有 1 株 Ab 携带的 parC 耐药基因为无义突变，未发生氨基酸取代，与其表型检测（对环丙沙星及左氧氟沙星敏感）相符合。特别提出 29 株存在 parC 耐药基因突变的 Ab 中，有 14 株菌株未检测到存在 gyrA 耐药基因突变，其表型检测为敏感，这表明单独存在 parC 基因的突变，并未引发细菌对喹诺酮类药物产生耐药。因此本文研究结果也证实了：parC 基因可为喹诺酮类作用靶位，但并非第一靶位这一观点[4]。

本文研究发现，Ab 对喹诺酮类药物环丙沙星及左氧氟沙星的耐药率均大于 50%，据相关文献[7]报道，在一些地区 Ab 对喹诺酮类耐药率甚至达到 80%~90%。故鉴于 Ab 对于喹诺酮类药物的高耐药率及耐药机制这两方面原因，建议临床上对 Ab 感染的患者，尽可能不要单独选用喹诺酮类药物，以减缓对耐药细菌的压力筛选。同时应主张早期、足量及联合用药，如喹诺酮类药物联合碳氢霉烯类、三代及四代头孢菌素含或不含酶抑制剂等药物，共同抗菌治疗，以减少细菌基因突变的产生，从而减少耐药细菌的产生及传播。

志谢 衷心感谢以下单位及专家的大力支持：福建省立医院呼吸内科陈愉生教授；首都医科大学附属北京儿童医院耿荣教授和胡英惠教授；内蒙古医学院第三附属医院、包头钢铁公司职工医院杨敬平教授；贵阳医学院附属医院呼吸内科杜娟教授；中南大学湘雅医院呼吸内科胡成平教授；南昌大学附属第一医院呼吸内科张伟教授；连云港市第一人民医院李家树教授；兰州大学第一医院余勤教授；上海交通大学附属瑞金医院呼吸内科万欢英教授；北京大学航天医院呼吸内科穆兰教授；广西医科大学第一附属医院钟小宁教授；广州医学院第三附属医院呼吸内科魏立平教授；兰州市肺科医院马建军教授；中国医科大学附属第一医院王秋月教授；武汉大学人民医院胡克教授；北京军区 263 临床部田桂珍教授；南方医科大学南方医院蔡绍曦教授；清华大学附属第一医院（华信医院）呼吸科王瑞琴教授；北京大学第三医院呼吸内科贺蓓教授；河南省人民医院呼吸科王思勤教授。

4 参考文献

1 Dutta S, Kawamura Y, Ezaki T, et al. Alteration in the GyrA Subunit of DNA Gyrase and the ParC Subunit of Topoisomerase IV in Quinolone-Resistant Shigella dysenteriae Serotype 1 Clinical Isolates from Kolkata, India. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 1660-1661.

2 肖永红，王其南. 伤寒沙门菌 DNA 旋转酶 gyrA 及拓扑异构酶Ⅳ parC 基因与耐喹诺酮类关系研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20: 196-198.

3 Chen FJ, Lo HJ. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. J Microbiol Immunol Infect, 2003, 36: 1-9.

4 Hamouda A, Amyes SG. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of Acinetobacter baumannii resistant to ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother, 2004, 54: 695-696.

5 Sonya C. Valentine, Deisy Contreras, Stephanie Tan, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Acinetobacter baumannii Clinical Isolates from Nosocomial Outbreaks in Los Angeles County, California. J Clin Microbiol, 2008, 46: 2499-2507.

6 Hamouda A, Amyes SG. Development of highly ciprofloxacin-resistat laboratory mutants of Acinetobacter baumannii lacking topoisomerase IV gene mutations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 57: 155-156.

7 Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, et al. Genetic Basis of Multidrug Resistance in Acinetobacter baumannii Clinical Isolates at a Tertiary Medical Center in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52: 3837-3843.

（收稿日期：2011-03-12）

（本文编辑：李霏）