

# 养殖场分离的耐氟喹诺酮类药物的大肠杆菌基因突变研究

陶文琴<sup>1,2</sup>, 曾振灵<sup>1</sup>, 陈杖榴<sup>1</sup>, 蒋红霞<sup>1</sup>, 陈晓琴<sup>1</sup>, 吴聪明<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>华南农业大学兽医学院/广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广州 510642; <sup>2</sup>广州大学生命科学学院, 广州 510006)

**摘要:** 【目的】探讨从养殖场动物、环境和饲养员分离的大肠杆菌的 *gyrA* 和 *parC* 基因突变特征。【方法】用琼脂稀释法测定环丙沙星和恩诺沙星对菌株的最小抑菌浓度。PCR 扩增 *gyrA* 和 *parC* 基因的喹诺酮耐药决定区, 扩增的片段长度分别为 525 bp 和 487 bp, PCR 产物直接测序。【结果】在 63 株突变株中, 在 GyrA 亚基发生的氨基酸替代有 Ser83→Leu (62 株) 和 Asp87→Asn (52 株)、Asp87→Tyr (2 株)、Asp87→His (2 株); ParC 亚基的氨基酸替代有 Ser80→Ile (47 株)、Ser80→Arg (2 株) 和 Glu84→Val (3 株)、Glu84→Lys (4 株)、Glu84→Gly (5 株)、Glu84→Ala (1 株)。环丙沙星对菌株的 MIC 小于 0.125  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时, GyrA 和 ParC 亚基均没有任何变异; 环丙沙星的 MIC 为 0.125~0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时, GyrA 亚基出现单一氨基酸替代; 环丙沙星的 MIC 为 0.5~32  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时, 出现 GyrA 83 位和 87 位双替代或者 GyrA83 和 ParC80 位双替代; 环丙沙星的 MIC 为 4~128  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 发生 GyrA 双替代和 ParC 单替代; 环丙沙星的 MIC 在 16~128  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 发生 GyrA 双替代和 ParC 双替代。【结论】不同来源的耐氟喹诺酮类药物的大肠杆菌 GyrA 和 ParC 具有多种氨基酸替代类型, 而且 GyrA 和 ParC 突变位点的数量与菌株对氟喹诺酮类耐药水平呈正相关。

**关键词:** 大肠杆菌; 氟喹诺酮类; 耐药性; *gyrA*; *parC*

## Mutations of *gyrA* and *parC* in Fluoroquinolones-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Animals, Farmers and Environment

TAO Wen-qin<sup>1,2</sup>, ZENG Zhen-ling<sup>1</sup>, CHEN Zhang-liu<sup>1</sup>, JIANG Hong-xia<sup>1</sup>, CHEN Xiao-qin<sup>1</sup>, WU Cong-ming<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine/Guangdong Provincial Key Laboratory for Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642;

<sup>2</sup>School of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006)

**Abstract:** 【Objective】To detect mutations of *gyrA* and *parC* in 72 *Escherichia coli* strains isolated from human feces, animal feces and the environment. 【Method】MICs of ciprofloxacin or enrofloxacin for 72 isolates were determined by an agar dilution test with standard strain ATCC25922 as the control. The mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of the *gyrA* and *parC* genes were analyzed by PCR and sequencing. 【Result】Amino acid substitutions (number of strains) found in 63 mutants were Ser83→Leu (62) and Asp87→Asn (52), Asp87→Tyr (2), Asp87→His (2) in GyrA and Ser80→Ile (47), Ser80→Arg (2) and Glu84→Val (3), Glu84→Lys (4), Glu84→Gly (5), Glu84→Ala (1) in ParC. No amino acid changes in GyrA or ParC were detected when strains MIC of ciprofloxacin were under 0.125  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . A single substitution in GyrA was found in the strains whose MIC of ciprofloxacin ranged from 0.125 to 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Double substitutions in GyrA or one in GyrA with one in ParC were found in the strains with MIC of ciprofloxacin ranging from 0.5 to 32  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . A double changes in GyrA and a single change in ParC were found in strains with MIC of ciprofloxacin ranging from 4 to 128  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Double changes in GyrA and double changes in ParC were found in strains with MIC of ciprofloxacin ranging from 16 to 128  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . 【Conclusion】A variety of amino acid

收稿日期: 2005-08-15; 接受日期: 2006-05-25

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30130140) 和面上项目 (30271000) 资助

作者简介: 陶文琴 (1969-), 女, 江西南昌人, 讲师, 博士, 研究方向为兽医药理学与细菌耐药机制。Tel: 020-31873770; Fax: 020-39366915; E-mail: taowenqin@gzhu.edu.cn。通讯作者曾振灵 (1963-), 广东兴宁人, 研究方向为兽医药理与毒理学。Tel: 020-85284899; Fax: 020-85284896; E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

changes in *GyrA* and *ParC* were detected in the fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolates from different origin. A correlation was found between the number of changes in the QRDR of *GyrA* and *ParC* and the resistance level to fluoroquinolone in *E. coli* strains.

**Key words:** *Escherichia coli*; Fluoroquinolones; Resistance; *gyrA*; *parC*

## 0 前言

【本研究的重要意义】在动物生产过程中大量使用抗菌药,促进了肠道细菌种群中耐药菌的筛选,导致正常肠道菌群的耐药水平提高。这些细菌为致病菌形成了巨大的耐药基因库<sup>[1]</sup>。因而,内源性菌群的耐药水平可视为抗菌药选择压力的良好标志,也是预测病原菌耐药性的指标之一。大肠杆菌既是肠道菌群的共生菌,又是条件性致病菌,因而食品动物肠道大肠杆菌也是重要的潜在感染源。尽管仍存在争论,但有学者推测食品动物肠道寄殖的耐药大肠杆菌可能通过食物链、人与动物的直接接触及污染环境而传播到人,从而对公共卫生造成严重威胁<sup>[2,3]</sup>。因此,探讨从养殖场的不同动物、饲养员以及环境中分离的大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制具有重要意义,并且为动物生产过程中合理使用氟喹诺酮类药物提供理论依据。【前人研究进展】氟喹诺酮类药物为一类抗菌作用强、抗菌谱广的化学合成抗菌药,已广泛用于人医临床以及兽医治疗和预防细菌感染性疾病<sup>[4]</sup>。近年来,从人类和动物分离的大肠杆菌中对氟喹诺酮类药物的耐药菌株迅速增多,耐药菌谱也日益扩大,严重影响其疗效和临床应用<sup>[5-8]</sup>。大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制主要有3种:(1)编码靶酶DNA促旋酶(由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码)和拓扑异构酶 IV (由 *parC* 和 *parE* 编码)的基因突变;(2)膜的通透性降低;(3)膜的主动外排泵激活<sup>[4,6,9-11]</sup>。【本研究切入点】目前国内外对大肠杆菌氟喹诺酮类药物耐药机制的研究多数集中于对人类临床分离株和动物源致病性大肠杆菌的研究,对从养殖场分离的非致病性大肠杆菌对氟喹诺酮类耐药性的研究较少。【拟解决的关键问题】研究大肠杆菌氟喹诺酮类药物靶位基因(*gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE*)突变的位点、类型、数量及其与耐药水平的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

试验所用菌株为广东省兽药研制与安全评价重点实验室 2001~2003 年从规模化养殖场分离的大肠杆菌保存菌株,其中动物(猪、鸡和牛)粪便分离株 47

株,饲养环境分离株 11 株,饲养员粪便分离株 14 株,共 72 株。大肠杆菌标准菌株 ATCC25922 购自美国菌种保存中心。

### 1.2 培养基及主要试剂

伊红美兰琼脂,营养肉汤培养基, MH 肉汤培养基,水解酪蛋白琼脂(MH 琼脂)均购自杭州天和微生物试剂有限公司。盐酸环丙沙星对照品和恩诺沙星对照品购自中国兽医药品监察所。TaKaRa ExTaq<sup>TM</sup> 和 DL2000 DNA marker 购自 TaKaRa 公司。

### 1.3 主要仪器设备

THZ-C 恒温振荡器(广州深华生物技术有限公司),PCR 扩增仪(eppendorf Mastercycler<sup>®</sup>, 德国),DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂),DYCP-31C 型电泳槽(北京市六一仪器厂),WFH-201 型紫外分析仪(温州孚华分析仪器厂),电泳凝胶成像系统(英国 UVitec 公司),数显隔水式恒温培养箱(上海浦东跃欣科学仪器厂),超净工作台(苏州净化设备有限公司);台式高速离心机(eppendorf, 德国),微量移液器(eppendorf, 德国)。

### 1.4 MIC 的测定—琼脂平板稀释法<sup>[12]</sup>

抗菌药物原液配制方法:盐酸环丙沙星加蒸馏水配成 1 280  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;恩诺沙星先用少量乙醇溶解,再加蒸馏水配成 2 560  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。用细菌滤器(直径 0.22  $\mu\text{m}$ )过滤除菌,分装备用。以灭菌水倍比稀释药物原液,分别精密量取 1.5 ml 不同浓度药液与 13.5 ml MH 琼脂于 12 cm 直径的平皿中充分混匀,制成含梯度浓度药物的琼脂平板。在 96 孔板中用 MH 肉汤将 0.5 麦氏比浊度菌液稀释 10 倍,用多头接种器吸取菌液接种于琼脂平板表面。平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 16 h 后观察结果。设立肉汤对照。每株菌重复 3 个接种点,以 3 个重复接种的菌落同步生长或抑制方为有效。参照 NCCLS (1999) 公布的标准,以质控菌(*E. coli* ATCC25922) MIC 在允许范围内者方可记录。

### 1.5 细菌总 DNA 的提取

采用煮沸法提取 DNA:挑取 1 个单菌落接种到 5 ml LB 肉汤,37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 20 h。取 1.5 ml 培养物于离心管中离心,13 000 r/min,5 min。弃上清,沉淀用 200 ml 灭菌双蒸水重悬,95 $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min,13 000 r/min 离心 5 min。得到的上清液可直接作为 PCR 扩增

的模板。

### 1.6 引物设计及合成

根据 GenBank 中 *E.coli* K-12 株相应的基因序列,

利用 Primer 5.0 软件分别设计 *gyrA*、*parC*、*gyrB* 和 *parE* 基因的 PCR 扩增引物 (表 1), 由上海博亚生物技术公司合成。

表 1 *gyrA*、*parC*、*gyrB* 和 *parE* 基因 PCR 扩增引物

Table 1 Primers of *gyrA*, *parC*, *gyrB* and *parE* for PCR

目的基因 Target genes	引物序列 (5'→3') Sequences(5' to 3')	长度(bp) Length (bp)	扩增片段 (bp) Amplification (bp)	GenBank 登录号 GenBank access
<i>gyrA</i>	F: GAGGGATAGCGTTAGATGAGC	22	525	X06373
	R: CCGTTCACCAGCAGGTTAGG	20		
<i>parC</i>	F: AATGAGCGATATGGCAGAGCG	21	487	M58408
	R: TTGGCAGACGGCAGGTAG	19		
<i>gyrB</i>	F: GCCTTCTTCACTTTGTACAGCG	23	794	AE000447
	R: GTGACGGCGGTACTCACCTG	20		
<i>parE</i>	F: CTGACCGAAAGCTACGTCAACC	22	892	M58409
	R: CGTTCGGCTGCCTTCTTG	20		

F: 上游引物 Forward; R: 下游引物 Reverse

### 1.7 PCR 扩增

*gyrA* 和 *parC* 基因 PCR 反应体系: 在 50  $\mu\text{l}$  反应体系中, 4 种 dNTP 的终浓度各为 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 上、下游引物的终浓度各为 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , TaKaRa EXTaq DNA 聚合酶 1.25U, 10 $\times$ EXTaq Buffer 5.0  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 1.0  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5min。*gyrB* 和 *parE* 基因 PCR 反应体系除 dNTP 的终浓度各为 0.25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  之外, 其余同上。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 反应产物, DL-2000 DNA Marker 作分子量标准。

### 1.8 测序及结果分析

将PCR反应产物送上海博亚生物技术公司测序。对于从未报道的突变, 再重复PCR和并测序以确证。用DNASIST软件, 将所测的序列与从GenBank获得的相应基因片段进行核苷酸和氨基酸序列比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌 *gyrA*、*parC*、*gyrB* 和 *parE* 基因 PCR 扩增结果

经 PCR 扩增获得与各个基因目的片段大小一致的条带 (图 1~3)。

### 2.2 大肠杆菌 *gyrA*、*parC*、*gyrB* 和 *parE* 基因突变

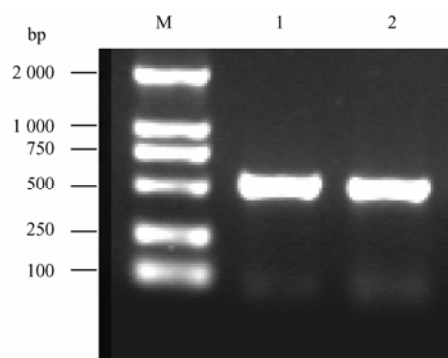
72 株不同来源的 *E.coli* 分离株的 *gyrA* 和 *parC* 喹诺酮耐药决定区 (quinolone resistance-determining region, QRDR) 突变引起的不同氨基酸替代类型及其

发生的菌株数见表 2。

对于 GyrB 亚基, 在 12 株 *E.coli* 对氟喹诺酮类高度耐药菌株中, 有 8 株 (包括标准菌株 ATCC25922) 发生 Phe385 $\rightarrow$ Ala 替代; 有 1 株在 GyrB 发生 Ser 492 $\rightarrow$ Asn; 其余 3 株未测序; 对于 ParE 亚基, 有 3 株发生 Ser 458 $\rightarrow$ Ala 替代, Ile355 $\rightarrow$ Thr 和 Ile529 $\rightarrow$ Thr 替代各 1 株, 其余 7 株耐药株和标准菌株无突变。

### 2.3 大肠杆菌 *gyrA*、*parC* 基因突变与耐药表型相关性

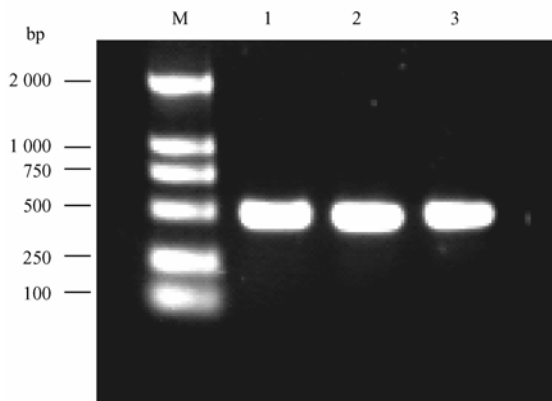
如表 3 所示, 所有 *E.coli* 分离株的恩诺沙星 MIC 与环丙沙星 MIC 具有 1~8 倍的倍比关系, 说明二者呈完全交叉耐药性。所有菌株按 GyrA 和 ParC QRDR 不同氨基酸替代组合可分为 13 种突变型。各突变型与



M. DL-2000 marker; 1.大肠杆菌 ATCC25922; 2.菌株 CG13-5  
M. DL-2000 marker; 1.*E.coli* ATCC25922; 2. Strain CG13-5

图 1 *E.coli gyrA* 基因 PCR 产物琼脂糖电泳图

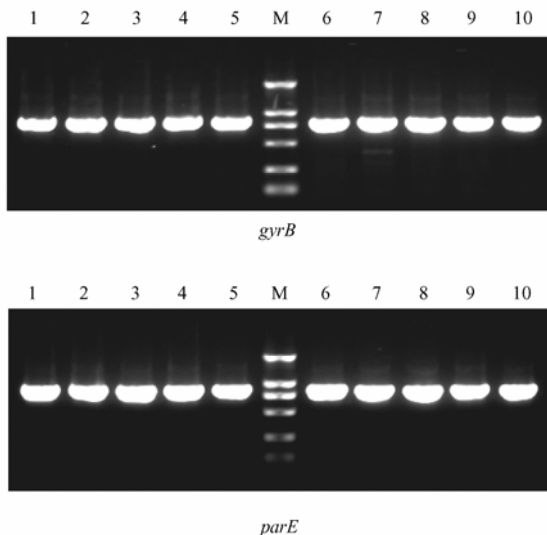
Fig.1 Agrose gel electrophoresis of *E.coli gyrA* PCR products



M. DL-2000 marker; 1. 氟喹诺酮类敏感株; 2~3. 氟喹诺酮类耐药株  
M. DL-2000 marker; 1. FQs susceptible strain; 2-3. FQs resistant strains

图2 *parC* 基因 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig.2 Agrose gel electrophoresis of *E.coli parC* PCR products



M. DL-2000 marker; 1.大肠杆菌 ATCC25922; 2~10.氟喹诺酮类耐药株

M. DL-2000 marker; 1.*E.coli* ATCC25922; 2-10. FQs resistant strains

图3 *E. coli gyrB* 和 *parE* 基因 PCR 产物琼脂糖电泳图谱

Fig. 3 Agrose gel electrophoresis of *E.coli gyrB* 和 *parE* PCR products

环丙沙星 MIC 的关系如下: 当菌株的环丙沙星 MIC 小于  $0.125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时, GyrA 和 ParC 亚基均没有任何变异; 环丙沙星 MIC 为  $0.125\sim 0.25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时, GyrA 亚基出现单一氨基酸替代; 环丙沙星的 MIC 为  $0.5\sim 32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时, 出现 GyrA 83 位和 87 位双替代或者 GyrA83 和 ParC80 位双替代; 环丙沙星的 MIC

为  $4\sim 128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时, 发生 GyrA 双替代和 ParC 单替代; 环丙沙星的 MIC 在  $16\sim 128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时, 发生 GyrA 双替代和 ParC 双替代。

表2 GyrA 和 ParC QRDR 区的氨基酸替代及其发生频率

Table 2 Frequency of amino acid changes in the GyrA and ParC QRDR

	氨基酸替代 Amino acid substitutions	菌株数 Strains No.
GyrA	Ser83→Leu	62
	Asp87→Asn	52
	Asp87→Tyr	2
	Asp87→His	2
ParC	Ser80→Ile	47
	Ser80→Arg	2
	Glu84→Val	3
	Glu84→Lys	4
	Glu84→Ala	5
	Glu84→Gly	1

### 3 讨论

#### 3.1 大肠杆菌 *gyrA* 和 *parC* 基因突变分析

在 63 株 *E.coli* 突变株中发生最多的替代是 Ser83→Leu (62); 其次是 Asp87→Asn (52) 和 Ser80→Ile (47); 其它较少的替代为 Glu84→Ala (5)、Glu84→Lys (4)、Glu84→Val (3)、Asp87→Tyr (2)、Asp87→His (2)、Ser80→Arg (2) 和 Glu84→Gly (1)。结果表明, 动物肠道菌群中的耐氟喹诺酮类大肠杆菌在 GyrA 和 ParC 的氨基酸变异具有多种类型, 这些突变类型与临床耐药菌的报道一致<sup>[4,11,13]</sup>。另外, 从动物、饲养员和环境等不同来源的大肠杆菌分离株之间具有相似的 GyrA 和 ParC 氨基酸变化特征, 而且与 Saenz 等<sup>[14]</sup>报道的从食品动物、食品和人中分离的大肠杆菌 GyrA 和 ParC 氨基酸变化具有类似的规律。值得注意的是, 本文首次报道了在 ParC 蛋白的 Glu84→Ala 这一氨基酸替代。这 5 株突变株均为高度耐药株 (环丙沙星 MIC 为  $32\sim 128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), 且分别来自于猪 (3 株)、牛 (1 株) 和饲养环境 (1 株)。在人类还没有发现的突变型却在动物肠道菌群中首先发现, 这表明动物尤其是动物肠道可能成为耐药基因或耐药菌的孵育器和储存库。另外, 动物专用的恩诺沙星与人医常用的环丙沙星之间存在完全交叉耐药性。这些结果都提示了在动物生产过程中滥用氟喹诺酮类药物的可能对公共卫生造成潜在威胁。

虽然 GyrA 和 ParC 的 QRDR 区的氨基酸替代各

表 3 不同来源 *E. coli* GyrA 和 ParC QRDR 氨基酸变化及其与环丙沙星 MICs 的关系Table 3 Amino acid changes in the QRDR of GyrA and ParC proteins in 72 *E. coli* strains of different origins and the corresponding relation with MICs of ciprofloxacin

分型 Types	菌株来源(菌株数) Origins (No.)	菌株总数 Total No.	MIC ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )		氨基酸变化 Amino acid changes			
			CIP	ENR	GyrA		ParC	
					Ser83	Asp87	Ser80	Glu84
0	H(4),P(1),Ch(4),	9	0.008~0.06	0.016~0.125				
I	H(2),Ch(2),P(1)	5	0.125~0.25	1	Leu			
II	Ch(1)	1	0.125	1		Tyr		
III	H(1),Ch(1),P(2),	4	0.5~8	2~32	Leu		Ile	
IV	P(1)	1	4	16	Leu		Arg	
V	H(1),Ch(1),Ca(1),P(1)	4	8~32	16~64	Leu	Asn		
VI	Ch(2)	2	4	16	Leu	His	Ile	
VII	P(1)	1	8	32	Leu	Asn	Arg	
VIII	H(4),Ch(3),Ca(5),P(11),E(9)	32	4~128	8~128	Leu	Asn	Ile	
IX	P(4)	4	32~64	64~128	Leu	Asn		Lys
X	H(1),E(1)	2	16~32	32~64	Leu	Asn	Ile	Val
XI	Ca(1),P(3),E(1)	5	32~128	64~128	Leu	Asn	Ile	Ala
XII	H(1)	1	64	64	Leu	Asn	Ile	Gly
VIII	P(1)	1	32	64	Leu	Tyr	Ile	Val

H. 人 Human; P. 猪 Pig; Ch. 鸡 Chicken; Ca. 牛 Calf; E. 环境 Environment; CIP. 环丙沙星 Ciprofloxacin; ENR. 恩诺沙星 Enrofloxacin

不相同,但其规律有类似之处。在 GyrA QRDR 区的氨基酸变化, Ser83 替代为 Leu, 失去了形成氢键的羟基, 并导致脂肪链的置换。Asp87 替代为 Asn、Tyr 或 His, 失去了负电荷氨基酸<sup>[15]</sup>。这些氨基酸的变化规律提示了在 DNA 螺旋酶-DNA 复合体与喹诺酮类药物相互作用时, 氢键的形成以及负电荷的存在起重要作用。同样地, 在 ParC 的氨基酸变异中, Ser80 替代为 Ile 或 Arg 后失去形成氢键的能力, 而 Glu84 替代为 Val、Lys、Gly 或 Ala 则失去负电荷。

*E. coli* GyrA83 位氨基酸与喹诺酮 1 位的基团结合, 而 GyrA87 位氨基酸与 7 位的基团结合。因此, 这些位点处不同的氨基酸替代以不同的方式和程度影响与喹诺酮分子的亲和力。因而, 同一位点不同的氨基酸替代可能导致不同的喹诺酮类药物敏感水平<sup>[14]</sup>。

### 3.2 *E. coli gyrB* 和 *parE* 基因突变分析

目前认为大肠杆菌中能导致对喹诺酮类耐药的 GyrB 替代是 Asp426→Asn 和 Lys447→Glu<sup>[16,17]</sup>, 但本研究在 9 株高度耐药菌中均未发现这两个位点替代, 这与 Saenz 等的报道一致<sup>[14]</sup>。但在本试验发现 GyrB 另外 2 个位点的氨基酸变异 Phe385→Ala 和 Ser 492→Asn。前者发生于多数的耐药菌株和敏感菌株, 后者发生于一株高度耐药株中, 这一替代对耐药性的贡献还有待探讨。对于 ParE, 分别发现 3 个位点的氨基酸改变: Ile355→Thr、Ser458→Ala 和 Ile529→Thr。这与 Komp 等<sup>[18]</sup>从人尿道分离 *E. coli* 中发现的 ParE458

位 (Ser→Thr) 和 529 位 (Ile→Leu) 氨基酸变化相比, 替代位点相同而替代的氨基酸类型不同。这些氨基酸替代的意义还有待于进一步研究。而目前普遍认为 ParE 氨基酸替代对喹诺酮耐药关系不大<sup>[19]</sup>, 仅在 *E. coli* 体外诱导喹诺酮耐药株中在发现 Leu445→His 替代, 而且只有当 GyrA 同时突变时才对喹诺酮类 MIC 有影响。

### 3.3 *E. coli* GyrA 和 ParC 亚基的变化与氟喹诺酮类耐药水平的相关性

GyrA 亚基的单个氨基酸替代的菌株只是造成对环丙沙星敏感性下降 (MIC 0.125~0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )。这些单碱基替代菌株虽然不具有临床意义, 但在药物压力下有利于筛选出高水平耐药株, 所以在耐药性监测和指导临床用药上具有重要意义, 对于筛选和开发新的氟喹诺酮类药物具有指导作用。双氨基酸替代分为 2 种: 或是分别发生在 GyrA 亚基和 ParC 亚基, 或是都在 GyrA 亚基上。前者造成耐药水平 (环丙沙星 MIC 0.5~8.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 低于后者耐药水平 (8~32  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )。3 个氨基酸替代 (2 个 GyrA 替代和 1 个 ParC 替代) 在氟喹诺酮类药物耐药株中的出现频率较高, 且所有菌株为高水平耐药, 但其环丙沙星 MIC 值跨度较大 (4~>128  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )。具有相同氨基酸替代的菌株其耐药表型却相差很大, 提示了除靶位突变外还有其它非靶位耐药机制的参与, 如外排泵将药物排除, 膜通透性降低, 或调节基因座 *mar* 的调控蛋白 MarR

突变等<sup>[20,21]</sup>。

从本试验中各种不同替代类型菌株的环丙沙星 MIC 值可知, GyrA83 位单个氨基酸的变化对 MIC 的影响很小, 但在所有的耐药株中都有这一突变, 提示了 GyrA83 氨基酸替代是 *E.coli* 分离株产生对氟喹诺酮类耐药性的最首要条件。而 GyrA 87 位和 ParC 80 位的替代是高水平耐药必需的条件, ParC 84 位替代有助于耐药水平进一步提高。与报道一致<sup>[4,11,13]</sup>, 本试验没有发现只发生 *parC* 突变而 *gyrA* 没有突变的菌株, 说明在氟喹诺酮类耐药性发展过程中 ParC 变异亚基只有在 GyrA 变异亚基存在时才能发挥作用。

## 4 结 论

动物肠道 *E.coli* 对氟喹诺酮类耐药水平较高, 突变类型较多, 提示抗菌药压力可能使动物肠道正常菌群成为耐药菌的孵育器; GyrA 和 ParC 突变替代的类型和数量与菌株对氟喹诺酮类的耐药水平呈正相关。

## References

- [1] Van den Bogaard A E, Stobberingh E E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 14: 327-335.
- [2] 胡子鉴, 张翌元. 耐氟喹诺酮类大肠埃希菌的感染与寄殖. 中国抗感染化疗杂志, 2002, 2 (1): 59-62.  
Hu Z J, Zhang Y Y. Infection and colonization of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Infectious Chemotherapy*, 2002, 2 (1): 59-62. (in Chinese)
- [3] Van den Bogaard A E, London N, Driessen C, Stobberingh E E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 47: 763-771.
- [4] Hopkins K L, Davies R H, Threlfall E J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005, 25: 358-373.
- [5] Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods, and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2001, 18: 353-358.
- [6] Everett M J, Fang J Y, Ricci V, Piddock L J. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40: 2380-2386.
- [7] Thomson C J. The global epidemiology of resistance to ciprofloxacin and the changing nature of antibiotic resistance: a 10 year perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, 43 (Suppl. A): 31-40.
- [8] Bazile-Pham-Khac S, Truong Q C, Lafont J P, Gutmann L, Zhou X Y, Osman M, Moreau N J. Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40: 1504-1507.
- [9] 王重振, 钱利生. 细菌对喹诺酮类抗菌药的分子耐药机制. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 26-30.  
Wang C Z, Qian L S. Molecular mechanisms of resistance to Quinolones in bacteria. *China Biotechnology*, 2003, 23(12): 26-30. (in Chinese)
- [10] Tavio M M, Vila J, Ruiz J, Ruiz J, Martin-Sanchez A M, Jimenez de Anta M T. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, 44: 735-742.
- [11] Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51: 1109-1117.
- [12] 倪语星, 洪秀华. 细菌耐药性监测与抗感染治疗. 北京: 人民军医出版社, 2002: 56-58.  
Ni Y X, Hong X H. *Monitoring of Antimicrobial Resistance in Bacterial and Anti-infectious Therapy*. Beijing: People's Military Medical Press, 2002: 56-58. (in Chinese)
- [13] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐药性. 上海: 华东理工大学出版社, 2001: 171-175.  
Chen D J. *Antibacterial Drugs and Bacterial Resistance*. Shanghai: East China Technology University Press, 2001: 171-175. (in Chinese)
- [14] Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51: 1001-1005.
- [15] Oram M, Fisher L M. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991, 35: 387-389.
- [16] Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka L M, Nakamura S. Quinolone resistance- determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991, 35: 1647-1650.
- [17] Heddle J, Maxwell A. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase:

- role of GyrB. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2002, 46: 1805-1815.
- [18] Komp L P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2003, 47: 3222-3232.
- [19] Ruiz J, Casellas S, Jimenez de Anta M T, Vila J. The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1997, 39: 839-840.
- [20] Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40: 879-885.
- [21] Kern W V, Oethinger M, Jellen-ritter A S, Levy S B. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44: 814-820.

(责任编辑 林鉴非)