

苏州医院氟喹诺酮耐药无乳链球菌 *gyrA* 和 *parC* 分子特征调查*戴晓莉¹, 沙茜茜², 张宇茵³, 陆文香³, 钟桥^{3Δ}

(1. 苏州大学附属第二医院检验科, 江苏苏州 215004; 2. 苏州大学医学检验系, 江苏苏州 215009; 3. 南京医科大学附属苏州医院检验科, 江苏苏州 215002)

摘要:目的 调查苏州地区氟喹诺酮耐药无乳链球菌(GBS)临床分离株 *gyrA* 和 *parC* 基因的分子特征。方法 收集氟喹诺酮耐药 GBS 菌 46 株, 利用 PCR 法扩增耐药基因 *gyrA* 和 *parC*, 并进行基因测序, 分析其高频突变位点。结果 *gyrA* 以第 81 位丝氨酸突变为亮氨酸为主, 即 *gyrA*_S81L(TCA→TTA) 为主, 其突变率高达 93.4%(43/46)。 *parC* 以第 79 位丝氨酸突变为酪氨酸和苯丙氨酸为主, 即 *parC*_S79Y(TCC→TAC), 其突变率为 73.9%(34/46); 以及 *parC*_S79F(TCC→TTC), 其突变率为 17.4%(8/46)。基因突变模式汇总分析发现, 主要以 *gyrA*_S81L 合并 *parC*_S79Y 为主, 占 73.9%(34/46); 其次为 *gyrA*_S81L 合并 *parC*_S79F, 占 13.0%(6/46)。结论 该地区氟喹诺酮耐药 GBS 耐药基因主要为 *gyrA* 和 *parC*, 其主要突变模式为 *gyrA*_S81L 合并 *parC*_S79Y 和 *gyrA*_S81L 合并 *parC*_S79F。

关键词: 无乳链球菌; 氟喹诺酮; 耐药; 基因突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.002

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2018)05-0517-04

文献标识码: A

Surveillance of molecular characteristics of *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone resistant *Streptococcus agalactiae* isolates in Suzhou hospitals*DAI Xiaoli¹, SHA Qianqian², ZHANG Yulin³, LU Wenxiang³, ZHONG Qiao^{3Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215004, China; 2. Department of Medical Laboratory, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215009, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu 215002, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular characteristic of fluoroquinolone resistant *Streptococcus agalactiae* (GBS) isolates in Suzhou. **Methods** Totally 46 fluoroquinolone resistant GBS strains were collected, and then subjected into PCR and two resistance genes were sequenced and their high frequency mutation sites, *gyrA* and *parC* were analysed. **Results** Among these isolates, the most frequent *gyrA* mutation was *gyrA*_S81L (TCA→TTA), which displayed 93.4%(43/46) with substituted at No. 81 site of amino acid from Ser to Leu. However, the most frequent *parC* mutation was mutated at No. 79 site of amino acid from Ser to Tyr or Phe, with two mutations *parC*_S79Y (73.9%, 34/46) and *parC*_S79F (17.4%, 8/46). The analysis showed that the major mutation patterns are *gyrA*_S81L with *parC*_S79Y (73.9%, 34/46), *gyrA*_S81L with *parC* (13.0%, 6/46). **Conclusion** The most frequent mutations of fluoroquinolone resistant gene in Suzhou are *gyrA* and *parC* and the major mutation patterns are *gyrA*_S81L/*parC*_S79Y and *gyrA*_S81L/*parC*_S79F.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; fluoroquinolone; antibiotic resistance; gene mutation

无乳链球菌(GBS), 也被称为 B 族链球菌, 常定植于人体消化道及生殖道, 是造成孕妇产褥期脓毒血症和新生儿脑膜炎的重要原因, 严重者可导致新生儿死亡或残疾, 造成严重经济和社会负担^[1-2]。抗菌药物预防治疗是阻断母婴 GBS 感染最有效的手段, 尽管 GBS 对青霉素类抗菌药物的敏感性较高, 但在日本等地相继检出青霉素敏感性降低的 GBS 菌株, 且

多为氟喹诺酮耐药菌株^[3]。此外, 流行病学资料表明, 耐氟喹诺酮 GBS 菌株多出现在亚洲^[4-5], 而欧美地区流行较为罕见^[5-6]。因此, 耐氟喹诺酮 GBS 菌株引起了人们的高度关注。本研究拟调查苏州地区耐氟喹诺酮 GBS 菌株耐药基因的分子特征, 对明确和监测本地区此类菌株的耐药性, 以及丰富我国 GBS 流行病学资料等都具有重要意义, 现报道如下。

* 基金项目: 南京医科大学校基金面上项目(2015NJMU126)。

作者简介: 戴晓莉, 女, 主管技师, 主要从事病原微生物与感染免疫研究。 Δ 通信作者, E-mail: zhongqiao1983@163.com。

本文引用格式: 戴晓莉, 沙茜茜, 张宇茵, 等. 苏州医院氟喹诺酮耐药无乳链球菌 *gyrA* 和 *parC* 分子特征调查[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5): 517-520.

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集苏州某三甲医院检验科微生物室 2015 年 10 月至 2016 年 10 月门诊及住院患者分离获得的非重复氟喹诺酮 GBS 耐药菌 46 株,同时收集标本来源及患者信息等资料,其中阳性质控菌株为 GBS ATCC13813, 阴性对照为大肠杆菌 ATCC25922。

1.2 仪器与试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自碧云天生物技术公司;PCR 产物胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;Ex Taq DNA 聚合酶、PCR 试剂、DNA Marker 等均购自大连宝生生物(Takara)公司;药敏纸片购自 OXOID 公司;PCR 仪购自 ABI 公司,核酸浓度测定仪购自 NanoDrop 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 本研究所用引物依据 Streptococcus agalactiae 2603V/R 全基因组序列信息为模板设计 gyrA 和 parC 基因片段,并经 BLAST 比对后,由苏州金唯智生物工程公司合成。其引物序列如表 1 所示。

表 1 本研究引物所用列表

引物	引物(5'→3')	产物长度(bp)
gyrA_F	ATT GTT GCT CGT GCA CTT CC	749
gyrA_R	ACA AAA CGA ACG CCT TCA CG	
parC_F	AGC CTC TGC TTG AGC TTC TG	1 128
parC_R	AGC CTC TGC TTG AGC TTC TG	

1.3.2 菌株分离与鉴定 临床生殖道标本均采用 Todd Hewitt 增菌肉汤增菌 24 h 后,接种于哥伦比亚血琼脂培养基,置于 5% CO₂ 培养箱 35 °C 培养 16~18 h。依据菌落特征筛选可疑 β 溶血菌株,参考《全国临床检验操作规程(第 4 版)》方法^[7],采用 CAMP 协同溶血实验鉴定,并采用 BD 链球菌平板经细菌鉴定仪进行鉴定和药敏分析。其中氟喹诺酮耐药依据左氧氟沙星,根据 CLSI M100-S23 规则^[8]进行判断。所有氟喹诺酮 GBS 耐药菌株鉴定结果经 MALDI-TOF 质谱仪进行确认。

1.3.3 细菌基因组 DNA 提取 离心收集 GBS 菌株,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明,提取细菌基因组 DNA。经 NanoDrop1000 进行核酸浓度和纯度确认无误后进行后续实验。

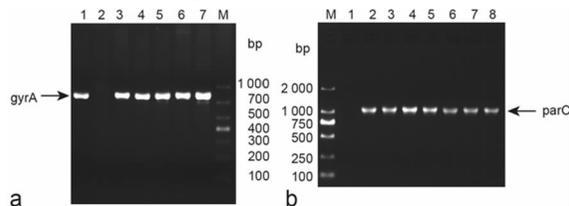
1.3.4 PCR 法扩增 gyrA 和 parC 基因片段 PCR 实验以 GBS ATCC13813 DNA 作为阳性对照,以大肠杆菌 ATCC25922 DNA 作为阴性对照。PCR 体系为 20.0 μL,包括:2.0 μL 10×PCR 缓冲液,dNTP(各 2.5 mmol/L)1.6 μL,引物(10 μmol)1.0 μL,1.0 μL 模板 DNA,其余用 dH₂O 补足 20.0 μL。扩增条件为:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 °C 延伸 5 min。扩增后,将 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖电泳分析,电泳电压为 120 V,时间 30 min。采用凝胶成像仪检

测扩增条带位置,将与目的条带位置一致的阳性扩增产物进行基因测序,以及序列比对分析。

1.3.5 基因测序及结果分析 阳性扩增产物经胶回收后,送苏州金唯智生物工程公司,采用双向测序策略进行 Sanger 测序。对获得的基因测序结果,采用 DNASTar 软件 MegAlin 模块,用 Clustal W 方法进行比对分析,并显示保守序列及保守性;采用 Chromas 软件对主要突变位点进行分析。

2 结 果

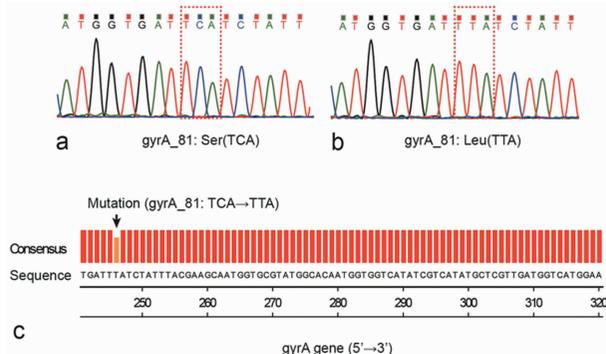
2.1 gyrA 及 parC 基因扩增 本研究选取 46 株耐氟喹诺酮 GBS 菌株,通过高保真 DNA 聚合酶采用 PCR 法,对 gyrA 及 parC 基因编码区域进行扩增。凝胶电泳显示基因扩增产物 gyrA 约 750 bp,parC 约 1 100 bp,见图 1。基因扩增产物经 DNA 胶回收后送基因公司进行 Sanger 测序。



注:a 为 gyrA PCR 扩增产物电泳,其中泳道 1 为阳性对照,泳道 2 为阴性对照,泳道 3~7 为临床菌株,泳道 M 为 DL1000 DNA Marker; b 为 parC 基因扩增产物电泳,泳道 M 为 DL2000 DNA Marker,泳道 1 为阴性对照,泳道 2 为阳性对照,泳道 3~8 为临床菌株

图 1 gyrA 和 parC 基因扩增产物电泳图

2.2 gyrA 基因测序结果分析 gyrA 基因产物经测序后分析,本地区 GBS 菌株 gyrA 在第 81 位氨基酸为高频突变位点,即 gyrA₈₁,见图 2。其中图 2a 为野生型(WT)基因,其测序结果为 TCA,编码丝氨酸(Ser);图 2 b 为突变型,基因测序结果为 TTA,编码亮氨酸(Leu)。46 株菌丝氨酸突变为亮氨酸,即 S81L(TCA→TTA)突变率高达 93.4%(43/46),其余 3 株为野生型,说明本地区 GBS 对氟喹诺酮类耐药主要为此形式(见图 2c)。而本次未检出另一常见高频突变位点 gyrA₈₅,即发生第 85 位氨基酸 GAA→AAA 的突变。



注:a 为 gyrA 野生型;b 为 gyrA 突变株,gyrA 基因第 81 位氨基酸为 Leu,编码基因为 TTA;c 为 46 株菌株在 242~320 位的碱基保守性分析

图 2 gyrA 基因测序图及保守性分析

2.3 parC 基因测序结果分析 parC 基因测序结果

[2] 林爱心,袁春雷,汪伟山,等. 孕妇生殖道无乳链球菌带菌状况及药物敏感性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(12): 3220-3221.

[3] KIMURA K, NAGANO N, NAGANO Y, et al. High frequency of fluoroquinolone- and macrolide-resistant streptococci among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(3): 539-542.

[4] KAWAMURA Y, FUJIWARA H, MISHIMA N, et al. First Streptococcus agalactiae isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in gyrA and parC[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(11): 3605-3609.

[5] WEHBEH W, ROJAS-DIAZ R, LI X, et al. Fluoroquinolone-resistant Streptococcus agalactiae: epidemiology and mechanism of resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(6): 2495-2497.

[6] PICCINELLI G, GARGIULO F, CORBELLINI S, et al. Emergence of the first levofloxacin-resistant strains of Streptococcus agalactiae isolated in Italy[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(4): 2466-2469.

[7] 尚红,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2014.

[8] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 26th informational supplement M100-S23 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2016: 91-93.

[9] WANG P, TONG J J, MA X H, et al. Serotypes, antibiotic

susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of Streptococcus agalactiae isolates circulating in Beijing, China[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120035.

[10] WANG Y H, CHEN C L, HOU J N, et al. Serotype distribution and resistance genes associated with macrolide and fluoroquinolone resistance in Streptococcus agalactiae isolates from a hospital in southern Taiwan[J]. Biomed J, 2015, 38(3): 215-220.

[11] RYU H, PARK Y J, KIM Y K, et al. Dominance of clonal complex 10 among the levofloxacin-resistant Streptococcus agalactiae isolated from bacteremic patients in a Korean hospital[J]. J Infect Chemother, 2014, 20(8): 509-511.

[12] SOUZA V C, KEGELE F C, SOUZA S R, et al. Antimicrobial susceptibility and genetic diversity of Streptococcus agalactiae recovered from newborns and pregnant women in Brazil[J]. Scand J Infect Dis, 2013, 45(10): 780-785.

[13] 时春艳,曲首辉,杨磊,等. 妊娠晚期孕妇 B 族链球菌带菌状况的检测及带菌对妊娠结局的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(1): 12-16.

[14] DEGUCHI T, YASUDA M, NAKANO M, et al. Detection of mutations in the gyrA and parC genes in quinolone-resistant clinical isolates of Enterobacter cloacae[J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 40(4): 543-549.

(收稿日期:2017-09-15 修回日期:2017-11-22)

(上接第 516 页)

会诊、专家会诊的目的,提供学术讨论的平台,为基层医院和有需求的用户提供帮助。而骨髓检查也许是形态学检验中最难以完成的任务,是否可以配合流式细胞术、特殊染色分析、组化分析、基因分析、遗传学检查等多种技术的综合智能分析,给出更科学的诊断报告。

9 结 语

医学检验在计算机技术和“互联网+”时代,在人工智能、大数据、云计算、云存储、物联网等技术不断与医疗、大健康行业互相渗透的环境下,以大数据为基础的人工智能模型的建立,将对疾病防控、癌症筛查、病种分布、遗传图谱、基因检测、人体数据分析等带来有价值的发现和应用。在精准医疗愈发受到重视的今天,这些都成为了其中不可缺少的要素,这是实现人工智能应用的重要体现和方向^[9],或许也是未来人工智能+医学检验要走的方向。

志谢:感谢西安电子科技大学缙水平教授对本文提出的宝贵意见和建议。

参考文献

[1] 陆怡德,施新明,杨帆,等. 临床化学审核规则的制定及计算机自动确认的应用[J]. 检验医学, 2011, 26(4): 277-280.

[2] 冯强. 临床生化检验结果的自动审核[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(4): 547-548.

[3] 冯强. 血常规自动审核的应用探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(18): 2482-2483.

[4] 郑善鑫,郝晓柯. 尿液分析仪检测结果自动审核模块的设计[J]. 医疗卫生装备, 2011, 32(12): 42-44.

[5] 杨大千,邢美园,杨勤静,等. 智能检验用户使用体验的质性调查[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(4): 489-491.

[6] ARBEL Y, WEITZMAN D, RAZ R, et al. Red blood cell distribution width and the risk of cardiovascular morbidity and all-cause mortality: a population-based study [J]. Thromb Haemost, 2014, 111(2): 300-307.

[7] RIEDL J, KAIDER A, REITTER E M. Association of mean platelet volume with risk of venous thromboembolism and mortality in patients with cancer: results from the vienna cancer and thrombosis study (CATS) [J]. Thromb Haemost, 2014, 111(4): 670-678.

[8] GRANTER S R, BECK A H, PAPKE JR D J. AlphaGo, deep learning and the future of the human microscopis [J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(5): 619-621.

[9] SHARMA G, CARTER A. Artificial intelligence and the pathologist future frenemies [J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(5): 622-623.

(收稿日期:2017-10-12 修回日期:2018-01-02)