

# 空肠弯曲菌喹诺酮类抗生素敏感性检测 及其耐药机理分析

付燕燕<sup>1</sup>, 顾一心<sup>1</sup>, 宋立<sup>2</sup>, 李颖<sup>3</sup>, 段永翔<sup>4</sup>, 梁昊<sup>1</sup>, 张茂俊<sup>1</sup>

**摘要:** 目的 了解我国不同宿主来源空肠弯曲菌对喹诺酮及氟喹诺酮类抗生素的耐药现状, 分析耐药菌株的耐药机制。**方法** 利用96孔琼脂稀释法分析不同来源空肠弯曲菌对萘啶酸、环丙沙星两种抗生素的最小抑菌浓度(MIC)。对102株检测耐药的菌株和27株敏感菌株通过基因测序的方法分析其耐药机制。**结果** 234株空肠弯曲菌中共筛查到218株(93.16%)萘啶酸耐药菌株, 其中鸡粪和鸭粪来源菌株耐药率均为100.00%, 腹泻病人粪便来源菌株耐药率是97.96%, 食品动物来源菌株耐药率是97.83%, 牛粪来源菌株耐药率是77.97%, 耐药率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 鸡粪和鸭粪来源菌株耐药率最高; 211株(90.17%)环丙沙星耐药菌株, 其中鸡粪和鸭粪来源菌株耐药率均为100%, 腹泻病人粪便来源菌株耐药率是91.84%, 食品动物来源菌株耐药率是95.65%, 牛粪来源菌株耐药率是77.97%, 耐药率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 鸡粪和鸭粪来源菌株耐药率最高。所有的耐药菌株gyrA基因的喹诺酮类耐药决定区(QRDR)都存在Thr-86-Ile点突变。gyrB基因相关区域测序显示不存在有意义突变。**结论** 我国分离空肠弯曲菌菌株对萘啶酸、环丙沙星耐药严重, gyrA基因QRDR内的Thr-86-Ile突变能引起空肠弯曲菌对喹诺酮类及氟喹诺酮类抗生素高水平耐药。

**关键词:** 空肠弯曲菌; 萘啶酸; 环丙沙星; 耐药

中图分类号: R378

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2018)02-0105-04

## Antibiotics susceptibility and genetic characteristics analysis for quinolone resistant *Campylobacter jejuni* isolated from China

FU Yan-yan<sup>1</sup>, GU Yi-xin<sup>1</sup>, SONG Li<sup>2</sup>, LI Ying<sup>3</sup>,  
DUAN Yong-xiang<sup>4</sup>, LIANG Hao<sup>1</sup>, ZHANG Mao-jun<sup>1</sup>

(1. State Key of Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

2. China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 100081, China;

3. Beijing Shunyi Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China;

4. Shenzhen Nanshan Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518000, China)

**Abstract:** According to CLSI, agar dilution method was used to analyze the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the nalidixic acid and ciprofloxacin for the isolates from different sources. Mutations in the quinolone resistant determining region (QRDR) of *gyrA* and *gyrB* were examined by DNA sequencing of 102 resistant *C. jejuni* isolates and 27 sensitive isolates. The results showed that 218 isolates (93.16%) were resistant to nalidixic acid among the entire tested 234 isolates. Among these, the resistant rates of the isolates from chicken feaces, duck feaces, human feaces, food animal and cow feaces were 100.00%, 100.00%, 97.96%, 97.83% and 77.97%, respectively. The 211 isolates (90.17%) were resistant to ciprofloxacin. Among these, the resistant rates of the isolates from chicken feaces, duck feaces, human feaces, food animal and cow feaces were 100.00%, 100.00%, 91.84%, 95.65% and 77.97%, respectively. The differences were both statistically significant. All of the resistant isolates on the QRDR of *gyrA* had Thr-86-Ile mutation. However, the point substitutions in *gyrB* gene were synonymous mutations. The results indicated that the *C. jejuni* isolates in this study showed highly resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin. The Thr-86-Ile mutation on the QRDR of *gyrA* can cause highly resistant to quin-

国家自然科学基金(No.2013CB127204 和 973 项目)联合资助

通讯作者: 张茂俊, Email: zhangmaojun@icdc.cn

作者单位: 1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防  
控制国家重点实验室, 北京 102206;

2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081;

3. 北京市顺义区疾病预防控制中心, 北京 101300;

4. 深圳市南山区疾病预防控制中心, 深圳 518000

alone and fluoroquinolone for *C. jejuni*.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*; nalidixic acid; ciprofloxacin; resistance

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2013CB127204)

Corresponding author: Zhang Mao-jun, Email: zhangmaojun@icdc.cn

弯曲菌是主要的食源性病原菌,主要导致人类细菌性肠炎<sup>[1-2]</sup>。在欧美等发达国家,弯曲菌病是报道最多的食源性胃肠道疾病,其发病率甚至超过了沙门菌、志贺氏菌以及大肠杆菌 O157:H7<sup>[3-5]</sup>。弯曲菌病通常是自限性疾病,但是对于免疫力低下及病程迁延不愈的患者进行抗生素的治疗是必须且有效的<sup>[6]</sup>。氟喹诺酮类药物(如环丙沙星)和大环内酯类药物(如红霉素)是临幊上治疗弯曲菌病的首选药物<sup>[7]</sup>。但是目前弯曲菌对氟喹诺酮类抗生素耐药严重。2013 年,美国 CDC 将耐氟喹诺酮类和大环内酯类弯曲菌列为影响公共卫生的耐药威胁之一<sup>[8]</sup>。2017 年,WHO 将氟喹诺酮耐药弯曲菌列为优先 2 级(高度耐药)<sup>[9]</sup>。

研究发现在编码 DNA 回旋酶的 *gyrA* 基因内有一个被称之为热点的喹诺酮类耐药决定区(QRDR)<sup>[10]</sup>。在这个区域内发生突变是弯曲菌产生喹诺酮耐药的主要原因。另外研究发现,主动外排系统与多种抗生素的耐药相关,可以造成弯曲菌的多重耐药,也是导致弯曲菌对氟喹诺酮类抗生素耐药的另一个重要的机制<sup>[11]</sup>。为进一步了解近年我国不同宿主来源分离菌株喹诺酮类耐药现状及耐药机理机制,本研究通过对近期分离菌株萘啶酸、环丙沙星敏感性的分析以及耐药菌株 *gyrA* 基因, *gyrB* 基因的 DNA 序列分析,获得我国近期分离菌株喹诺酮类抗生素耐药现状及主要耐药机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验菌株 分离于 2015—2017 年不同宿主来源 234 株空肠弯曲菌菌株,其中 98 株来源于腹泻病人,20 株来源于鸡粪,59 株来源于牛粪,46 株来源于食品动物(鸡肉,鸡胗,鸡肾,鸡肝,猪肉),11 株来源于鸭粪。质控菌株 *C. jejuni* (ATCC33560)为本研究室保存。

1.1.2 试剂 CAMPYLOBACTER AGAR BASE (Karmali) (CM0935) 购自 OXOID 公司,脱纤维羊血购自北京兰博瑞生物制品有限公司,DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit (250) 购自 QIAGEN (北京)公司,Gelred 10 000×染料(Cat: 41003,

Lot: 11G0127) 购自美国 BIOTIUM 公司,2×EsayTaq PCR SuperMix (CAT: AS111) 购自全式金生物技术有限公司,Trans2K DNA Marker (BM101) 购自全式金生物技术有限公司,Regular Agarose G-10 (LOT: 111860) 购自法国 BIOWEST 公司,弯曲菌琼脂稀释法抗生素最低抑菌浓度(MIC)检测试剂盒(ZC-CAMPY-013) 购自青岛中创生物科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌培养及药敏试验 将菌株接种于含有 5% 脱纤维羊血的 Karmali 培养基上,置于 37 ℃ 微需氧( $5\% \text{O}_2, 10\% \text{CO}_2, 85\% \text{N}_2$ )条件下培养 48 h,挑取 3 代单克隆后增菌<sup>[12]</sup>。

根据 CLSI 推荐的弯曲菌琼脂稀释法(Agar Dilution Method)对菌株进行药敏试验。ATCC33560 作为质控菌株。37 ℃ 微需氧培养 48 h 后读取结果。根据 NARMS-2014 规定,萘啶酸 $\leqslant 16 \mu\text{g}/\text{mL}$  为敏感, $32 \mu\text{g}/\text{mL}$  为中介, $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$  为耐药;环丙沙星 $\leqslant 1 \mu\text{g}/\text{mL}$  为敏感, $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  为中介, $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$  为耐药。

1.2.2 *gyrA* 和 *gyrB* 基因筛查 *gyrA* 基因筛查所用的引物:上游引物:5'-ATAGGTCGTGCTTGCC-3',下游引物:5'-GCTCTCATCTCTTACT-TCAGA-3',产物长度为 700 bp;*gyrB* 基因筛查所用的引物:上游引物 5'-ATGGCAGCTAGAG-GAAGAGA-3',下游引物 5'-GTGATCCATCAA-CATCCGCA-3',产物长度为 650 bp。50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系:2×EsayTaq PCR SuperMix 25  $\mu\text{L}$ ,上游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )2.0  $\mu\text{L}$ ,下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )2.0  $\mu\text{L}$ ,模板 200 ng。按照以下程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,共 30 个循环;72 ℃ 10 min。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,并送天一辉远生物科技有限公司测序。

1.2.3 统计学分析 采用 SAS9.4 软件对数据进行导入、整理和分析。对不同宿主来源菌株耐药情况进行卡方检验分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

2.1 药敏试验结果 234 株空肠弯曲菌中共筛查

到 218 株(93.16%)萘啶酸耐药菌株,其中鸡粪来源菌株耐药率是 100.00%,鸭粪来源菌株耐药率是 100.00%,腹泻病人粪便来源菌株耐药率是 97.96%,食品动物来源菌株耐药率是 97.83%,牛粪来源菌株耐药率是 77.97%,耐药率差异有统计学意义( $P<0.05$ ),鸭粪和鸡粪来源菌株耐药率最高;211

株(90.17%)环丙沙星耐药菌株,其中鸡粪和鸭粪来源菌株耐药率均为 100%,食品动物来源菌株耐药率是 95.65%,腹泻病人粪便来源菌株耐药率是 91.84%,牛粪来源菌株耐药率是 77.97%,耐药率差异有统计学意义( $P<0.05$ ),鸡粪和鸭粪来源菌株耐药率最高。结果见表 1。

表 1 空肠弯曲菌对萘啶酸和环丙沙星的耐药情况

Tab.1 Resistance for nalidixic acid and ciprofloxacin of *Campylobacter jejuni*

Antibiotics	Resistant isolates (%)					
	Total (n/T)	Human feaces (n/T)	Chicken feaces (n/T)	Cow feaces (n/T)	Duck feaces (n/T)	Food animal (n/T)
Nalidixic acid	93.16(218/234)	97.96(96/98)	100.00(20/20)	77.97(46/59)	100(11/11)	97.83(45/46)
Ciprofloxacin	90.17(211/234)	91.84(90/98)	100.00(20/20)	77.97(46/59)	100(11/11)	95.65(44/46)

n, 耐药菌株的数量;T, 检测菌株的总数量

2.2 基因测序分析结果 选择对萘啶酸( $\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g/mL}$ )或环丙沙星( $\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/mL}$ )其中一种药物耐药或者是同时耐药的菌株共 102 株进行 *gyrA* 基因和 *gyrB* 基因测序;选取空肠弯曲菌敏感菌株(萘啶酸  $\text{MIC} \leq 16 \mu\text{g/mL}$  并且环丙沙星  $\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ )共 27 株进行 *gyrA* 基因测序。测序结果发现:

2.2.1 耐药菌株 *gyrA* 基因相关区域测序 共发现 23 个突变位点,其中有义突变 5 个,分别是 Thr-86-Ile, Val-149-Ile, Ser-203-Asn, Thr-206-Ala, Lys-285-Arg。所有耐药菌株都存在 Thr-86-Ile 点突变,但所有敏感菌株不存在该点突变。除 Thr-86-Ile 突

变外,耐药菌株在 Val-149-Ile, Ser-203-Asn, Thr-206-Ala, Lys-285-Arg 位点也存在有义突变,但这些突变位点均不在喹诺酮类耐药决定区范围内(区间:69-120)<sup>[13]</sup>。并且与耐药菌株相比,敏感菌株在 Ser-203-Asn, Thr-206-Ala, Lys-285-Arg 3 个点也存在有义突变,表明这 3 个点的突变均可能与耐药无关。*gyrA* 基因突变的详细结果见表 2。

2.2.2 耐药菌株 *gyrB* 基因相关区域测序 显示不存在有义突变,92.16%(94/102)的耐药菌株存在 Arg-389-Arg 突变,89.22%(91/102)的耐药菌株存在 Leu-403-Leu 突变,但都属于无义突变。

表 2 耐药及敏感空肠弯曲菌 *gyrA* 基因突变特征Tab.2 Mutations in the *gyrA* for both the resistant and sensitive *C.jejuni*

Mutation	Resistant isolates						Sensitive isolates	
	Thr-86-Ile	Val-149-Ile	Ser-203-Asn	Thr-206-Ala	Lys-285-Arg	Ser-203-Asn	Thr-206-Ala	Lys-285-Arg
Isolates No.	102	6	28	99	7	16	27	10
Proportion/%	100	5.88	13.59	97.06	6.86	7.77	100	9.80

### 3 讨 论

研究发现在临床和兽医药中的不规范使用是导致弯曲菌喹诺酮类抗生素耐药率升高的最主要原因<sup>[7]</sup>。欧美等发达国家弯曲菌对喹诺酮类抗生素的耐药率要低于发展中国家。美国耐环丙沙星弯曲菌在 1990 年开始出现,1997 年开始呈现增加趋势<sup>[14]</sup>,2001—2002 年美国腹泻病人粪便源弯曲菌环丙沙星的耐药率为 13.5%,鸡来源环丙沙星耐药率为

19%<sup>[15]</sup>。2011—2013 年加拿大对腹泻病人源空肠弯曲菌的耐药率为 30.8%,对结肠弯曲菌的耐药率是 41%<sup>[16]</sup>。印度在上个世纪 90 年代开始出现耐氟喹诺酮类弯曲菌<sup>[17]</sup>,在 1994 年末有对氟喹诺酮类耐药弯曲菌的相关报道,2001—2006 年升高到 79%<sup>[17-18]</sup>2008—2010 年高达到 97%,耐药情况非常严重<sup>[19]</sup>。

我国空肠弯曲菌对喹诺酮类抗生素的耐药情况

非常严重。1995—2010 年腹泻病人来源的空肠弯曲菌对环丙沙星的耐药率为 80.2%，对萘啶酸的耐药率为 79.3%，且随着时间的推移，萘啶酸和环丙沙星的 MIC 有明显增高的趋势<sup>[20]</sup>。858 株不同宿主来源的空、结肠弯曲菌对喹诺酮类抗生素的耐药率接近 95%<sup>[21]</sup>。2011 年我国宁夏和山东两个地区猪来源的结肠弯曲菌对环丙沙星的耐药率高达 95% 以上<sup>[22]</sup>。最近研究表明，耐喹诺酮类弯曲菌在 17 年内增长迅速，在 2000 年就增长到 93.7%—100%<sup>[23]</sup>。本研究中，234 株空肠弯曲菌中共筛查到 218 株 (93.16%) 萘啶酸耐药菌株，211 株 (90.17%) 环丙沙星耐药菌株，两者都是鸭粪和鸡粪来源菌株耐药率最高为 100.00%，是和在家禽的养殖过程中萘啶酸和环丙沙星作为饲料添加剂用于预防和治疗细菌性疾病有关系。

空肠弯曲菌对喹诺酮类抗生素的耐药与 *gyrA* 基因上 QRDR 特异性点突变密切相关<sup>[24-26]</sup>，且最重要最常见的是 *gyrA* 基因发生的 Thr-86-Ile 突变<sup>[27-30]</sup>。本研究中所有的耐喹诺酮类空肠弯曲菌均有 Thr-86-Ile 突变，且 1 株菌只发生 Thr-86-Ile 突变，其萘啶酸的 MIC 可达到 512 μg/mL，环丙沙星 MIC 达到 32 μg/mL，说明 Thr-86-Ile 突变是导致空肠弯曲菌对氟喹诺酮类抗生素的高水平耐药的主要原因。

与喹诺酮类敏感菌株相比，耐喹诺酮类空肠弯曲菌除 Thr-86-Ile 突变外，Val-149-Ile 也是特异性突变，虽然 Val-149-Ile 突变已有报道，但并未描述该突变是否可导致空肠弯曲菌对喹诺酮类抗生素高水平耐药<sup>[29]</sup>。本研究中发生 Val-149-Ile 协同突变的菌株和未发生协同突变菌株相比，MIC 值没有增高。本研究测序结果显示：菌株萘啶酸 MIC 值大于等于 64 μg/mL，环丙沙星 MIC 值大于等于 4 μg/mL 时 Thr-86-Ile 已经发生突变；而菌株的萘啶酸 MIC 值大于 64 μg/mL，环丙沙星 MIC 值为 2 μg/mL 时，也发生 Thr-86-Ile 突变，提示菌株 *gyrA* 基因发生 Thr-86-Ile 突变就可以导致萘啶酸和/或环丙沙星耐药。

本研究中，未发现耐药菌株存在 *gyrB* 基因的有意义突变。研究结果与目前耐喹诺酮类空肠弯曲菌 *gyrB* 基因不存在有意义突变的报道一致<sup>[28]</sup>。

本研究通过对不同宿主来源空肠弯曲菌萘啶酸及环丙沙星的耐药现状及遗传特点分析，确定所有耐药菌株均存在 *gyrA* 基因 QRDR 的热点突变 Thr-86-Ile，该突变能引起空肠弯曲菌对喹诺酮类抗生素产生高水平耐药。

## 参考文献：

- [1] Huang JL, Xu HY, Bao GY, et al. Epidemiological surveillance of *Campylobacter jejuni* in chicken, dairy cattle and diarrhea patients[J]. Epidemiol Infect, 2009, 137(8): 1111-1120.
- [2] Kaakoush NO, Castanorodriguez N, Mitchell HM, et al. Global epidemiology of *Campylobacter* infection [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(3):687-720.
- [3] Hermans D, Pasmans F, Messens W, et al. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012, 12(2):89.
- [4] Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, et al. Human campylobacteriosis in developing countries [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(3):237-44.
- [5] Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(8):1201.
- [6] Ruizpalacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(5):701.
- [7] Luangtongkum T, Jeon B, Han J, et al. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence[J]. Future Microbiol, 2009, 4(2):189-200.
- [8] CDC. Antibiotic resistance threats in the United States [EB/OL]. (2013-7-14)[2013-4-23]. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>.
- [9] WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [EB/OL].[2017-2-27] <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
- [10] Pumbwe L, Randall LP, Woodward MJ, et al. Evidence for multiple antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(4):1289.
- [11] Charvalos E, Tselentis Y, Hamzehpour MM, et al. Evidence for efflux pump in multidrug resistant *C. jejuni* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(9):2019-2022.
- [12] Liu XY, Yu JF, Gu YX, et al. Laboratory detection and surveillance of *Campylobacter jejuni* infection[J]. Dis Surveill, 2014, 29(5): 354-358. (in Chinese)  
刘夏阳, 于俊峰, 顾一心, 等. 感染性腹泻患者弯曲菌感染的实验室检测及监测[J]. 疾病监测, 2014, 29(5):354-358.
- [13] Hakanen A, Jalava J, Kotilainen P, et al. *gyrA* polymorphism in *Campylobacter jejuni*: detection of *gyrA* mutations in 162 *C. jejuni* isolates by single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(8): 2644-2647.
- [14] Gupta A, Nelson JM, Barrett TJ, et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001 [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(6): 1102-1109
- [15] Thakur S, Zhao S, McDermott PF, et al. Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats[J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(7):835-844.

(下转第 117 页)