

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.09.002

养殖环境中耐氟喹诺酮类药物大肠杆菌 *gyrA* 基因的检测与序列分析^①

曹立亭¹, 周晏丞¹, 仲崇华², 陈鑫¹, 马跃¹

1. 西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 荣昌 402460; 2. 农标普瑞纳(重庆)饲料有限公司, 重庆 荣昌 402460

摘要: 该文探讨从养殖场动物、环境、饲养员等分离的大肠杆菌耐氟喹诺酮类药物的靶位基因 *gyrA* 突变特征, 对养殖环境中分离的 8 株大肠杆菌进行临床常用氟喹诺酮类药物的耐药性分析、PCR 扩增 *gyrA* 基因并测序, 并采用 DNASTAR 软件对 *gyrA* 基因的氟喹诺酮耐药决定区进行生物信息学分析。结果表明: 养殖场环境中分离的菌株编号为 1, 6 和 8 的 3 株大肠杆菌对环丙沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星敏感, 菌株 2, 3, 4, 5 和 7 的 5 株大肠杆菌对环丙沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星耐药; 氨基酸序列分析发现, 敏感菌株氨基酸位点未发生突变或 83 位发生单突变; 耐药菌株的突变发生在 83 位 Ser→Leu 替代和 87 位 Asp→Asn 替代, 且发生氨基酸双替代的菌株均为高度耐药菌株。表明不同来源的耐氟喹诺酮类药物的大肠杆菌 *gyrA* 基因的氨基酸变异具有多种类型, 该研究将更好地诠释养殖场大肠杆菌的氟喹诺酮类耐药机制。

关键词: 大肠杆菌; 氟喹诺酮类药物; 耐药性; *gyrA* 基因

中图分类号: S853

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)9-0009-06

氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQs)为人工合成化学抗菌药, 以细菌 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 为作用靶点, 抑制菌体 DNA 的合成而起到杀菌作用^[1-2]。其抗菌谱比较广, 且与其他抗菌药物无交叉耐药性, 故常作为临床治疗肠道致病菌感染的首选药物^[3]。然而, 经过 20 多年的临床应用, 发现细菌对该药物普遍具有耐药性, 耐药菌谱也日益增大, 严重影响其疗效和临床应用。有关大肠杆菌对氟喹诺酮类抗生素耐药机制和耐药性消除机制的研究逐渐成为当今世界研究的热门课题。近年来的研究证实, 大肠杆菌对氟喹诺酮类药物产生耐药机制主要包括编码靶酶 DNA 促旋酶(由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码)和拓扑异构酶 IV(*parC* 和 *parE* 基因编码)的基因突变; 细菌膜通透性的降低以及膜的主动外排泵激活; 由 *qnr* 家族、*aac*-(6')-Ib-cr 和 *qepA* 等质粒介导的耐药基因参与的耐药机制^[4-11]。其中, 编码靶酶 DNA 促旋酶的 *gyrA* 基因突变范围主要集中于第 67~106 个氨基酸的区域, 称为喹诺酮耐药性决定区(QRDR)^[12]。目前, 国内外对大肠杆菌耐氟喹诺酮类药物耐药机制的研究多集中于人或动物源致病性大肠杆菌的研究层面, 而对于养殖环境中分离的非致病性大肠杆菌研究较少。本试验选择养殖场不同动物、环境和饲养员中分离到的致病性和非致病性大肠杆菌作为研究对象, 对耐 FQs 靶位基因 *gyrA* 进行检测及序列分析, 为动物生产过程中合理使用喹诺酮类药物提供理论依据, 为耐药机制的研究提供基础。

① 收稿日期: 2013-04-08

基金项目: 西南大学博士基金资助项目(09BSR04); 西南大学本科毕业论文基金资助项目。

作者简介: 曹立亭(1979-), 男, 山东临朐人, 博士, 副教授, 主要从事兽医生物技术和中兽医学研究。

通信作者: 马跃, 教授。

1 材料与方法

1.1 菌株

8 株大肠杆菌分别由西南大学荣昌校区动物医学系药理教研室和动物医院从养殖场动物、环境、饲养员等临床样品中分离获得,其编号和来源如下:菌株 1(饲养员粪便)、菌株 2(牛粪便)、菌株 3 和菌株 5(鸡粪便)、菌株 4(饲水)、菌株 6(饲料)、菌株 7(猪粪便)、菌株 8(土壤)。

ATCC 25922 为药物敏感性试验质控菌,由西南大学荣昌校区动物医学系药理教研室提供。

1.2 检测药物与试剂

诺氟沙星(10 μg /片)、环丙沙星(5 μg /片)、左氧氟沙星(5 μg /片),购自杭州天和微生物试剂有限公司。250 bp DNA Ladder Marker、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、6 \times Loading Buffer 等分子生物学常用试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 药敏试验

药敏试验按照 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)推荐的 K-B 法进行。

1.4 引物设计

根据 GenBank 中 *Escherichia coli* K-12 株相应的基因序列(登录号:NC_000913),利用 Primer 5.0 软件设计 *gyrA* 基因的 PCR 扩增引物,上游引物 P1:5'-GAGGGATAGCGGTTAGAT-GAGC-3',下游引物 P2:5'-CCGTTACACCAGCAGGTTAGG-3'。扩增的 *gyrA* 基因序列大小为 525 bp,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.5 PCR 扩增

参照文献[13]方法提取模板 DNA,用 P1 和 P2 引物进行 *gyrA* 基因 PCR 扩增。PCR 反应条件为: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,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.6 测序及分析

将 *gyrA* 基因 PCR 扩增产物送到英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。对未见报道的突变位点,重复 PCR 反应并测序以确证。测序结果用 DNASTAR 软件与从 GenBank 中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

2.1 药敏试验结果

2.1.1 K-B 纸片法的质量控制

质控菌大肠埃希菌(ATCC 25922)的药敏结果质控范围见表 1,符合大肠杆菌药敏试验的药敏结果质控范围。

表 1 质控菌大肠埃希菌(ATCC 25922)的药敏结果质控范围

mm

	环丙沙星	左氧氟沙星	诺氟沙星
K-B 法	≥ 34.43	≥ 34.00	≥ 34.50

2.1.2 8 株大肠杆菌的药物敏感性检测结果

临床分离的 8 株大肠杆菌对 3 种氟喹诺酮类药物的敏感性结果见表 2。参照 CLSI(2006)判断标准,菌株 2、菌株 3、菌株 4、菌株 5、菌株 7 对氟喹诺酮类 3 种药物耐药,菌株 1、菌株 6、菌株 8 对氟喹诺酮类 3 种药物敏感。

表2 K-B法对大肠埃希菌的药敏结果

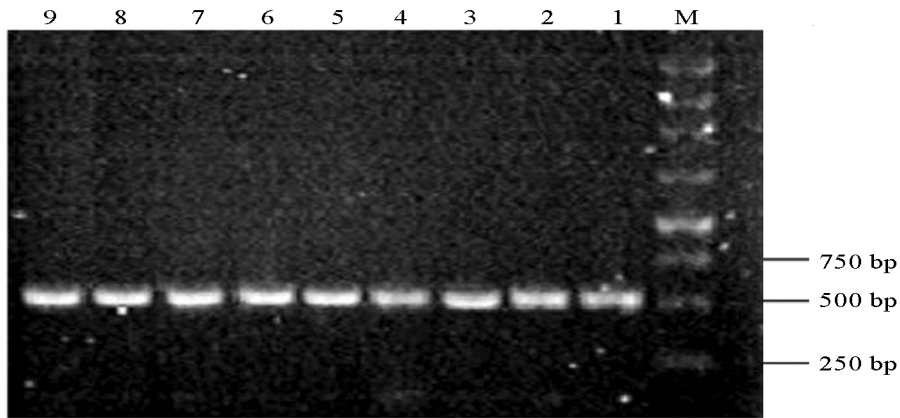
mm

菌株编号	环丙沙星	左氧氟沙星	诺氟沙星	菌株编号	环丙沙星	左氧氟沙星	诺氟沙星
1	S	S	S	5	R	R	R
2	R	R	R	6	S	S	S
3	R	R	R	7	R	R	R
4	R	R	R	8	S	S	S

注:依照 NCCLS 2006 判断标准判定. 氟喹诺酮类抑制菌圈直径超过 17 mm 时为敏感(S), 13~16 mm 时为中敏(I), 低于 12 mm 时为耐药(R); 环丙沙星抑制菌圈直径超过 21 mm 时为敏感(S), 16~20 mm 时为中敏(I), 低于 15 mm 时为耐药(R); 左氧氟沙星抑制菌圈直径超过 17 mm 时为敏感(S), 14~16 mm 时为中敏(I), 低于 13 mm 时为耐药(R).

2.2 养殖环境中不同来源大肠杆菌 *gyrA* 基因 PCR 扩增结果

PCR 扩增各耐药菌株、敏感菌株以及质控菌株 *gyrA* 基因片段, 均获得与目的片段大小一致的条带, 大小约为 525 bp. 结果如图 1 所示.



M: DNA Ladder Marker; 1: 大肠杆菌 ATCC 25922; 2: 菌株 1; 3: 菌株 2; 4: 菌株 3; 5: 菌株 4; 6: 菌株 5; 7: 菌株 6; 8: 菌株 7; 9: 菌株 8.

图1 *E. coli gyrA* 基因 PCR 产物琼脂糖电泳图

2.3 大肠杆菌 *gyrA* 基因突变

8 株不同来源大肠杆菌分离株的 *gyrA* 基因氟喹诺酮类药物耐药决定区突变引起的不同碱基和氨基酸替代类型及其发生的菌株数见表 3、表 4、图 2 和图 3.

表3 大肠杆菌 *gyrA* 基因核苷酸序列比较分析

菌株编号	GyrA 基因核苷酸变化位点								
	248	255	259	273	300	333	453	468	480
ATCC 25922	C	C	G	C	T	T	C	G	A
<i>E. coli</i> K12	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	T	—	T	C	C	T	—	—
2	T	T	A	T	C	C	—	C	—
3	T	T	A	—	C	C	—	C	—
4	T	T	A	T	C	C	—	C	—
5	T	T	A	T	C	C	—	C	—
6	—	T	—	T	C	C	—	C	—
7	T	T	A	T	C	C	—	C	G
8	T	T	—	T	C	C	—	C	—

注:“—”表示测序菌株氨基酸在此位点与标准株 *E. coli* K12 *gyrA* 的核苷酸相同, 未发生突变.

表 4 大肠杆菌 *gyrA* 基因氨基酸序列比较分析

菌株编号	GyrA 基因氨基酸变化位点		菌株编号	GyrA 基因氨基酸变化位点	
	83	87		83	87
ATCC 25922	Ser	Asp	4	Leu	Asn
<i>E. coli</i> K12	—	—	5	Leu	Asn
1	—	—	6	—	—
2	Leu	Asn	7	Leu	Asn
3	Leu	Asn	8	Leu	—

注：“—”表示测序菌株氨基酸在此位点与标准株 *E. coli* K12 *gyrA* 的核苷酸相同，未发生突变。

	G G T G A C T T G G C G G T T T A T G A C A C G A T C G T C Majority																														
	250									260									270												
241	G	G	T	G	A	C	T	C	G	G	C	G	G	T	C	T	A	T	G	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	ATCC
211	G	G	T	G	A	C	T	C	G	G	C	G	G	T	C	T	A	T	G	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	<i>E. coli</i> K12
219	G	G	T	G	A	C	T	C	G	G	C	G	G	T	T	T	A	T	G	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	1
219	G	G	T	G	A	C	T	T	G	G	C	G	G	T	T	A	T	A	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	2	
219	G	G	T	G	A	C	T	T	G	G	C	G	G	T	T	A	T	A	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	3	
218	G	G	T	G	A	C	T	T	G	G	C	G	G	T	T	A	T	A	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	4	
214	G	G	T	G	A	C	T	T	G	G	C	G	G	T	T	A	T	A	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	5	
211	G	G	T	G	A	C	T	C	G	G	C	G	G	T	T	A	T	G	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	6	
213	G	G	T	G	A	C	T	T	G	G	C	G	G	T	T	A	T	A	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	7	
213	G	G	T	G	A	C	T	T	G	G	C	G	G	T	T	A	T	G	A	C	A	C	G	A	T	C	G	T	C	8	

图 2 大肠杆菌 *gyrA* 基因核苷酸序列

	K A Y K K S A R V V G D V I G K Y H P H G D L A V Y D T I V Majority																														
	70									80									90												
61	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	L	A	V	Y	D	T	I	V	ATCC
51	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	Y	D	T	I	V	<i>E. coli</i> K12
53	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	Y	D	T	I	V	1
53	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	L	A	V	Y	N	T	I	V	2
53	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	L	A	V	Y	N	T	I	V	3
53	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	L	A	V	Y	N	T	I	V	4
51	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	L	A	V	Y	N	T	I	V	5
50	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	Y	D	T	I	V	6
51	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	L	A	V	Y	N	T	I	V	7
51	K	A	Y	K	K	S	A	R	V	V	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	L	A	V	Y	D	T	I	V	8

图 3 大肠杆菌 *gyrA* 基因氨基酸序列

3 讨论

目前对 *E. coli* 耐氟喹诺酮类药物报道集中于临床上^[14-17]，对环境 *E. coli* 耐氟喹诺酮类药物的报道有限^[18]。本研究选择的 8 株大肠杆菌菌株分别从养殖场环境中采集，来源比较广泛，涉及饲料、饮水、饲养员粪便、动物粪便和土壤等。药敏实验结果显示，菌株编号为 1, 6 和 8 的 3 株大肠杆菌对环丙沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星敏感，远大于 NCCLS2002 中 K-B 法的判定点；另外 5 株(菌株编号分别为 2, 3, 4, 5 和 7)对环丙沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星耐药，甚至无抑菌圈出现，耐药较为严重。

通过 DNASTAR 软件将测得的各耐药菌和敏感菌的序列分别与 *E. coli* K12 *gyrA* 基因的相应序列进行比较，发现质控菌株 ATCC 25922 的碱基和氨基酸没有任何突变。敏感菌株中菌株编号为 1 和 6 的 2 株大肠杆菌有 5 个碱基发生突变，但编码氨基酸没发生改变；菌株 8 有 6 个碱基发生突变，但编码氨基酸的 83 位发生单突变，Ser(丝氨酸)→Leu(亮氨酸)替代。耐药菌株中编号为 2 和 4 的 2 株菌株均有 7 个碱基发生突变，编码氨基酸的 2 个位点发生突变，突变位点均为 83 位 Ser→Leu 替代和 87 位 Asp(天冬氨酸)→Asn(天冬酰胺)替代；菌株编号为 3, 5 和 7 的 3 株菌株均有 6 个碱基发生突变，编码氨基酸的突变位点均为 83 位 Ser→Leu 替代和 87 位 Asp→Asn 替代。该实验可以看出，动物、饲养员及环境等不同来源的大肠

杆菌分离株之间具有相似的 *gyrA* 氨基酸变化特征,这与 Sáenz^[19] 等报道的从食品动物、食品和人中分离的大肠杆菌 *gyrA* 氨基酸变化具有类似规律。

据资料显示, *gyrA* QRDR 抗喹诺酮的有效突变常发生在第 83,87,81,84,82,67 和 106 位氨基酸的编码基因,单位点突变以 83 位的亮氨酸取代丝氨酸最常见,双位点突变有第 83,87 位氨基酸取代的报道^[20-23]。本试验中耐药菌株的突变发生在 83 位 Ser→Leu 替代和 87 位 Asp→Asn 替代,且发生氨基酸双替代的菌株均为高度耐药;单突变位点位于 83 为氨基酸取代的 8 号菌株对常规氟喹诺酮类药物敏感。

在 *gyrA* QRDR 区的氨基酸变化 Ser 替代为 Leu,失去了形成氢键的羟基,导致脂肪链的置换; Asp 替代为 Asn,失去了负电荷氨基酸^[24]。这些变化可以影响 DNA 螺旋酶-DNA 复合体与氟喹诺酮类药物的结合。因此,不同位点的氨基酸替代,同一位点的不同氨基酸替代、单个氨基酸替代或氨基酸双替代都可导致不同氟喹诺酮的药物敏感度不同。

4 结 论

动物、环境和饲养员不同来源的大肠杆菌对氟喹诺酮类药物有不同程度的耐药性,且耐氟喹诺酮类大肠杆菌在 *gyrA* 的氨基酸变异具有多种类型。随着氟喹诺酮类药物的广泛使用,以动物肠道为主以及外界环境将成为耐药基因和耐药菌的孵育库和储存库。*gyrA* 突变替代的类型和数量与菌株对氟喹诺酮类药物的耐药水平呈正相关。本试验中耐药菌株的突变位点均发生在 83 位 Ser→Leu 替代和 87 位 Asp→Asn 替代,且双替代菌株均为高度耐药。该研究结果将更好地诠释养殖场环境中大肠杆菌的氟喹诺酮类耐药机制。

参考文献:

- [1] HOOPER D C. Mode of Action Fluoroquinolones [J]. *Drugs*, 1999, 58(增刊 2): 6-10.
- [2] DRLICA K, MALIK M, KERNS R J, et al. Quinolone-Mediated Bacterial Death [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(2): 385-392.
- [3] 朱 僧, 邢艳萍, 胡 腾, 等. 15 株临床分离耐药大肠杆菌耐氟喹诺酮类抗生素基因的检测与序列分析 [J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(6): 875-879.
- [4] RUIZ J. Mechanisms of Resistance to Quinolones: Target Alterations, Decreased Accumulation and DNA Gyrase Protection [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(5): 1109-1117.
- [5] CHENIA H Y, PILLAY B, PILLAY D. Analysis of the Mechanism of Fluoroquinolone Resistance in Urinary Tract Pathogens [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58(6): 1274-1278.
- [6] NISHINO K, YAMADA J, HIRAKAWA H, et al. Roles of TolC-Dependent Multidrug Transporters of *Escherichia coli* in Resistance to Beta-Lactams [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(9): 3030-3033.
- [7] 方志平, 徐 炜, 刘小康, 等. 大肠杆菌体内耐氟喹诺酮类药物耐药机制的研究 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2005, 36(1): 86-89.
- [8] TRAN J H, JACOBY G A, HOOPER D C. Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(1): 118-125.
- [9] JEONG J Y, YOON H J, KIM E S, et al. Detection of Qnr in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Korea [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(6): 2522-2524.
- [10] AMBROŽIČ AVGUŠTIN J, KEBER R, ŽERJAVIČ K, et al. Emergence of the Quinolone Resistance-Mediating Gene *aac(6')-Ib-cr* in Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella isolates* Collected in Slovenia Between 2000 and 2005 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(11): 4171-4173.
- [11] CATTOIR V, POIREL L, NORDMANN P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Pump QepA2 in an *Escherichia coli* Isolate from France [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(10): 3801-3804.
- [12] TRUONG Q C, NGUYEN VAN J C, SHLAES D, et al. A Novel, Double Mutation in DNA Gyrase A of *Escherichia coli* Conferring Resistance to Quinolone Antibiotics [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(1): 85-90.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [14] 洪秀华. 临床微生物检验 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 140-145.
- [15] EVERETT M J, JIN Y F, RICCI V, et al. Contributions of Individual Mechanisms to Fluoroquinolone Resistance in 36 *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(10): 2380-2386.

- [16] 朱恒乾, 廖晓萍, 陈朝喜, 等. 宠物源大肠杆菌中质粒介导喹诺酮类耐药基因 *qnrD* 的研究 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(20): 4317—4322.
- [17] 张维秋, 潘渭涓, 陈祥, 等. 禽源大肠埃希菌质粒介导的喹诺酮类药物耐药基因的检测 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(5): 74—78.
- [18] 孙建仙. 环境喹诺酮类药物耐药基因的检测方法及其应用 [D]. 济南: 山东师范大学, 2009.
- [19] SÁENZ Y, ZARAZAGA M, BRINAS L, et al. Mutations in *gyrA* and *parC* Genes Innalidixic Acid-Resistant *Escherichia coli* Strains from Food Products, Humans and Animals [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(4): 1001—1005.
- [20] YOSHIA H, BOGAKI M, NAKAMURA M, et al. Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(8): 1647—1650.
- [21] TAMANG M D, NAM H M, et al. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants Among *Escherichia coli* Isolated from Food Animals in Korea [J]. Foodborne Pathog Dis, 2012, 9(12): 1057—1063.
- [22] DE LA FUENTE C M, DAUROS S P, BELLO T H, et al. Mutations in *gyrA* and *gyrB* Genes Among Strains of Gram-Negative Bacilli Isolated from Chilean Hospitals and Their Relation with Resistance to Fluoroquinolones [J]. Rev Med Chil, 2007, 135(9): 1103—10.
- [23] PIDDOCK L J V. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance: An Update 1994—1998 [J]. Drugs, 1999, 58(增刊 2): 11—18.
- [24] ORAM M, FISHER L M. 4-Quinolone-Resistant Mutations in the DNA Gyrase of *Escherichia coli* Clinical Isolates Identified by Using the Polymerase Chain Reaction [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(2): 387—389.

Detection and Analysis of *gyrA* in Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Isolates Collected from Different Breeding Environments

CAO Li-ting¹, ZHOU Yan-chen¹, ZHONG Chong-hua²,
CHEN Xin¹, MA Yue¹

1. Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China;

2. Agribands Purina (Chongqing) Feedmill CO., Ltd., Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: The mutations of the fluoroquinolone-resistant *gyrA* gene in 8 *Escherichia coli* isolates collected from human feces, animal feces and the environment were investigated. The resistant phenotypes of 8 *E. coli* isolates to commonly used fluoroquinolones were determined by the K-B method with the standard strain ATCC25922. Chromosome DNAs from all isolates of *E. coli* were extracted. The mutations in the fluoroquinolone resistance-determining regions of the *gyrA* gene were analyzed by PCR and sequencing. The results indicated that isolates of strain 1, strain 6 and strain 8 were sensitive to all the selected fluoroquinolones (ciprofloxacin, Lomefloxacin and norfloxacin), strain 2, strain 3, strain 4, strain 5 and strain 7 were multidrug-resistant isolates. Sequence analysis showed 2 mutations in the amino acids coded by fluoroquinolone resistance-determining regions in *gyrA* gene of all multidrug resistant isolates, which resulted in 83Ser→Leu and 87Asp→Asn. The strains in which both amino acid mutational sites existed were highly resistant. For the sensitive isolates, there were no amino acid mutational sites or was only one amino acid mutational site in 83 Ser→Leu. A variety of amino acid changes in *gyrA* gene were detected in fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolates isolated from different sources. These mutations may give a satisfactory explanation of the gene mutation mechanism of resistance to fluoroquinolones in *E. coli*.

Key words: *Escherichia coli*; fluoroquinolone; drug resistance; *gyrA* gene

责任编辑 夏娟

