

parC 基因突变致环丙沙星不敏感化脓性链球菌及其同源性研究

张晓飞 胡云建 池丹 胡燕燕 周宏伟 张嵘

【摘要】 目的 研究环丙沙星不敏感化脓性链球菌的耐药机制及其同源性。**方法** 对 2012 年 3 月北京地区分离自猩红热患者的 48 株化脓性链球菌采用稀释法检测环丙沙星及临床常用 7 种抗生素的 MIC。对环丙沙星 MIC ≥ 4 mg/L 的 13 株化脓性链球菌检测氟喹诺酮染色体介导的耐药基因 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 的突变,同时以环丙沙星 MIC ≤ 0.25 mg/L 的 4 株化脓性链球菌做比对。采用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 对分离自北京不同地区的菌株进行同源性分析。**结果** 化脓性链球菌对左氧氟沙星、氨苄西林和青霉素的敏感率均为 100%。对四环素、红霉素和克林霉素的耐药率分别为 91.7% (44/48)、91.7% (44/48) 和 89.6% (43/48)。环丙沙星、左氧氟沙星和莫西沙星的 MIC₅₀ 分别为 2 mg/L、1 mg/L 和 ≤ 0.25 mg/L; MIC₉₀ 分别为 4 mg/L、2 mg/L 和 0.5 mg/L。48 株化脓性链球菌中有 12 株对环丙沙星 MIC 为 4 mg/L, 1 株 MIC 为 8 mg/L, 菌株来自北京朝阳区。对这 13 株耐药基因检测结果显示, 12 株在 *parC* 基因上出现 79 位丝氨酸突变为苯丙氨酸或酪氨酸 (Ser79Phe/Tyr), 10 株在 *parC* 基因的 121 位出现丙氨酸突变为缬氨酸 (Ala121Val)。发现 1 株在 *parC* 基因上 Ser79Phe 突变合并 *parE* 基因上 371 位丝氨酸突变为亮氨酸 (Ser371Leu) 的化脓性链球菌, 但该菌株对环丙沙星的 MIC 未显著增高 (MIC = 4 mg/L)。17 株试验菌株的 PFGE 结果显示为 7 个克隆, 其中克隆 A 均为环丙沙星 MIC ≥ 4 mg/L 的菌株, 主要分布在朝阳区、大兴区、丰台区、顺义区和石景山区, 占 MIC ≥ 4 mg/L 菌株的 69.2%。克隆 C 菌株也为环丙沙星 MIC ≥ 4 mg/L 菌株, 均分布在怀柔区。克隆 B、D、E、F 和 G 分别分散在不同地区。**结论** *parC* 基因突变是北京地区分离的化脓性链球菌对环丙沙星 MIC 略有升高的主要原因, PFGE 分析显示化脓性链球菌感染在北京部分地区有小范围流行。(中华检验医学杂志, 2013, 36:425-429)

【关键词】 链球菌, 脓疮; 环丙沙星; 突变; DNA 拓扑异构酶 IV; 电泳, 凝胶, 脉冲场

Ciprofloxacin non-susceptible *Streptococcus pyogenes* due to mutations in *parC* gene and its homology analysis ZHANG Xiao-fei*, HU Yun-jian, CHI Dan, HU Yan-yan, ZHOU Hong-wei, ZHANG Rong.

* Pharmaceutical Analysis, Pharmaceutical College of Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310004, China

Corresponding author: ZHANG Rong, Email: brigitte_zx@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the resistant mechanism of *Streptococcus pyogenes* to ciprofloxacin and its homology. **Methods** Forty-eight isolates of *Streptococcus pyogenes* were collected from patients diagnosed with scarlet fever in districts of Beijing in March, 2012 and MIC to ciprofloxacin and other 7 common antibiotics in clinic were detected by using blood M-H agar dilution method. Thirteen isolates, which have MICs ≥ 4 mg/L against ciprofloxacin, were detected for mutations of Fluoroquinolone resistance genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*. At the same time, 4 isolates, with MIC ≤ 0.25 mg/L against ciprofloxacin, were used for comparison. Homology analysis of 17 isolates from different areas of Beijing was performed by using the method of pulsed field gel electrophoresis. **Results** Sensitive rates of *Streptococcus pyogenes* to levofloxacin, ampicillin and penicillin were all 100%. The resistance rates to tetracycline, erythromycin and clindamycin were 91.7% (44/48), 91.7% (44/48) and 89.6% (43/48), respectively. MIC₅₀ of ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin was 2 mg/L, 1 mg/L and ≤ 0.25 mg/L, respectively; MIC₉₀ was 4 mg/L, 2 mg/L and 0.5 mg/L, respectively. Of the 48 isolates of *Streptococcus pyogenes*, 12 isolates

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2013.05.010

作者单位: 310004 杭州, 浙江工业大学药学院药物分析专业 (张晓飞); 卫生部北京医院检验科 (胡云建); 温州医学院 (池丹); 浙江大学医学院附属第二医院检验科 (胡燕燕、周宏伟、张嵘)

通信作者: 张嵘, 电子信箱: brigitte_zx@163.com

showed the MIC at 4 mg/L, while one isolate has a MIC against ciprofloxacin at 8 mg/L, which isolated from Chaoyang district. Analysis of sequence of chromosome mediated fluoroquinolone resistance genes in those 13 ciprofloxacin non-susceptible isolates exhibited that there were 12 isolates that harbored Ser79Phe/Tyr mutation and 10 isolates harbored Ala121Val in parC gene. It is shown that one isolate contained Ser79Phe mutation in parC gene in the occurring of Ser371Leu mutation in parE gene for the first time, but there was no marked increase in ciprofloxacin MIC (MIC = 4 mg/L). There were no mutations in gyrA and gyrB genes. The PFGE results demonstrated that the 17 tested isolates could be divided into 7 clones. The clone A isolates from Chaoyang, Daxing, Fengtai, Shunyi and Shijingshan district have a MIC ≥ 4 mg/L against ciprofloxacin, which covered 69.2% of all MIC ≥ 4 mg/L isolates. The clone C isolates from Huairou district were MIC ≥ 4 mg/L isolates. B, D, E, F and G clones isolates come from different districts. **Conclusions** The mutation of parC gene was the main reason that contribute to the slightly increase of ciprofloxacin MIC in *Streptococcus pyogenes* isolated from Beijing. The PFGE analysis showed that there was a small scale prevalence caused by the infection of *Streptococcus pyogenes* in some districts. (Chin J Lab Med, 2013, 36: 425-429)

【Key words】 *Streptococcus pyogenes*; Ciprofloxacin; Mutation; DNA topoisomerase IV; Electrophoresis, gel, pulsed-field

化脓性链球菌能产多种链球菌溶血素、M 蛋白和链激酶等多种致病因子。可引起急性咽炎、呼吸道感染、软组织感染等。还可引起猩红热、休克综合征、坏死性筋膜炎等疾病^[1]。2000 年 Yan 等^[2]首次报道了对氟喹诺酮耐药的化脓性链球菌,随后在美国、欧洲、日本等国也相继分离到对氟喹诺酮耐药的化脓性链球菌^[3-5]。至今,国内对氟喹诺酮类耐药的化脓性链球菌仍未见报道。处于喹诺酮耐药决定区 (quinolone resistance-determining region, QRDR) 上的 gyrA、gyrB、parC、parE 基因突变,是引起化脓性链球菌对氟喹诺酮耐药的主要原因^[2,5]。由 gyrA 和 gyrB 基因编码的 DNA 解旋酶 (DNA gyrase) 的两个亚基,以及由 parC 和 parE 基因编码的拓扑异构酶 IV (Topoisomerase IV) 的两个亚基的氨基酸序列发生变化,可使氟喹诺酮类药物的作用靶点发生改变,从而产生耐药。本研究收集北京地区 1 个月内分离的 48 株化脓性链球菌,检测其对 3 种氟喹诺酮类和 5 种其他临床常用抗生素的 MIC,检测 17 株 (包括对环丙沙星 MIC ≤ 0.25 mg/L 的 4 株和 MIC ≥ 4 mg/L 的 13 株) 化脓性链球菌的 gyrA、gyrB、parC、parE 基因的突变情况;同时采用脉冲场凝胶电泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 对这 17 株菌株进行同源性分析。

材料与方法

一、材料

1. 菌株来源:化脓性链球菌 48 株,标本来源为 2011 年 3 月份北京医院门诊患者咽拭子,患者均诊断为猩红热。质控菌株为:肺炎链球菌 ATCC49619,大肠埃希菌 DH5 α 作为基质辅助激光解析电离飞行时间质谱的标准菌株,沙门菌 H9812

作为脉冲场凝胶电泳分子量标记菌株。

2. 试剂与仪器:基质辅助激光解析电离解析飞行时间质谱仪 (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 购自德国 Bruker Daltonics 公司;细菌多点接种仪购自日本 Oriental motor 公司;PCR 扩增仪购自德国 Biometra 公司;DYY-11 型水平电泳仪购自北京市六一仪器厂;脉冲场凝胶电泳仪及成像系统购自德国 Biometra 公司;细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒购自美国 Axygen 公司;引物合成购自上海生工生物工程股份有限公司;Taq 酶及 PCR 相关试剂购自日本 Takara 公司;蛋白酶 K、溶菌酶购自美国 Sigma 公司;限制性内切酶 Sma I 购自立陶宛 Fermentas 公司;青霉素购自华北制药股份有限公司;氨苄西林购自齐鲁制药;克林霉素购自北京四环科宝制药有限公司;红霉素购自湖南中南科伦药业有限公司;四环素购自美国 Sigma 公司;左氧氟沙星购自山西普德药业有限公司;莫西沙星购自拜耳先灵医药保健股份有限公司;环丙沙星购自广州南新制药有限公司。

二、方法

1. 细菌鉴定:使用 API 20 Strep 链球菌鉴定系统对分离的链球菌进行鉴定,采用 MALDI-TOF MS 进行进一步鉴定,具体操作步骤参见文献[6]。分别使用 flexcontrol 3.3 软件和 MALDI Biotyper 3 软件进行数据采集和结果分析。

2. 稀释法药敏试验:采用琼脂稀释法测定左氧氟沙星、莫西沙星、环丙沙星、四环素、红霉素、克林霉素、氨苄西林、青霉素的 MIC 值。具体实验操作参照 CLSI 操作规程^[7]。

3. PCR 扩增 gyrA、gyrB、parC、parE 基因:扩增对环丙沙星 MIC ≤ 0.25 mg/L 的 4 株和 MIC ≥ 4 mg/L

的 13 株化脓性链球菌的 *gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 基因。引物序列分别为:*gyrA* 上游引物 5'-TATGCCAT GAGTGTCATTGT-3'以及下游引物 5'-ATTATGAGCC GGAATGTTAG-3'; *gyrB* 上游引物 5'-GCAACTCAGAA GTGGTTAAG-3'以及下游引物 5'-AGCTTCTAGAACA GGTCTCA-3'; *parC* 上游引物 5'-GGCCGTTATTCCAA GTATAT-3'以及下游引物 5'-CACAAACAGCATCAATC ACTT-3'; *parE* 上游引物 5'-GCTCAGATTATCGAGAA GGA-3'以及下游引物 5'-CAGCATCGGTCATGATAAT A-3'。PCR 反应条件参照文献[8]。

4. 测序及比对:PCR 扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司测序,测序结果比对用野生菌基因序列参考 Rivera 等^[9]的报道,使用 DNAMAN 软件进行比对。

5. PFGE 操作方法:对 17 株(包括对环丙沙星 MIC $\leq$ 0.25 mg/L 的 4 株和 MIC $\geq$ 4 mg/L 的 13 株)化脓性链球菌的 PFGE 操作参考 Bahnan 等^[10]的报道方法进行。使用 Sma I 限制性内切酶酶切化脓性链球菌的染色体 DNA。Xba I 酶切沙门菌 H9812 的染色体 DNA 作为 PFGE 标准分子量。电泳温度为 14 ℃,转换时间间隔为 4~40 s,转换角度为 120°,电压 6 V/cm,电泳 20 h。

6. 菌株同源性分析:利用 UVIBand 软件对 PFGE 结果进行分析,软件使用非加权组平均法(unweighted pair group match average,UPGMA)分析各菌株之间的亲缘关系。

结 果

一、菌种鉴定

利用 API20 Strep 链球菌鉴定系统和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定来自北京地区的 48 株菌,鉴定结果全部显示为化脓性链球菌。

二、抗生素的抗菌活性

3 种氟喹诺酮类抗生素及临床常用 5 种抗生素

的 MIC 结果见表 1。从表 1 可见化脓性链球菌对四环素耐药率为 91.7% (44/48),对红霉素耐药率也为 91.7% (44/48),对克林霉素耐药率为 89.6% (43/48)。左氧氟沙星、氨苄西林、青霉素的抗菌活性良好,敏感率为 100%。环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星的 MIC₅₀分别为 2 mg/L、1 mg/L 和 $\leq$ 0.25 mg/L, MIC₉₀分别为 4 mg/L、2 mg/L 和 0.5 mg/L。

三、氟喹诺酮耐药基因检测及比对

17 株(包括对环丙沙星 MIC $\leq$ 0.25 mg/L 的 4 株和 MIC $\geq$ 4 mg/L 的 13 株)化脓性链球菌 *gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 基因与野生株化脓性链球菌的相应基因序列比对,分析碱基突变导致的氨基酸突变,比对结果见表 2。由表可见,*gyrA*、*gyrB* 基因上未发现突变位点。*parC* 基因上,除第 1、11 株未发现突变外,其他菌株均检测到突变。79 位出现丝氨酸突变为苯丙氨酸(Ser79Phe)的共 3 株,包括 5、9、13 号株;出现丝氨酸突变为酪氨酸(Ser79Tyr)的共 9 株,包括 6~8、10、12、14~17 号株;121 位出现丙氨酸突变为缬氨酸(Ala121Val)的共 13 株,包括 2~8、10、12、14~17 号株。在 9 号菌株的 *parE* 基因上检测到 371 位丝氨酸突变为亮氨酸(Ser371Leu)。

四、PFGE 同源性分析

使用 UVIBand 软件根据 PFGE 图像生成同源性树状图,见图 1。由图可见,17 株化脓性链球菌可以分为 7 个克隆:菌株 6~8、10、12、14~17 属于 A 克隆且均为环丙沙星 MIC $\geq$ 4 mg/L 菌株,占 MIC $\geq$ 4 mg/L 菌株的 69.2%,其中 4 株来自北京朝阳区、2 株来自大兴区,其他株分别来自丰台区、石景山区和顺义区;菌株 3、4 属于 B 克隆,为环丙沙星 MIC $\leq$ 0.25 mg/L 的菌株,均来自北京海淀区;菌株 11、13 属于 C 克隆,为环丙沙星 MIC $\leq$ 0.25 mg/L 的菌株,均来自北京怀柔区;菌株 1、2、5、9 分属于 D、E、F、G 克隆,分别来自顺义区、石景山区和延庆县。

表 1 48 株化脓性链球菌对临床常用抗生素的药敏情况(%)

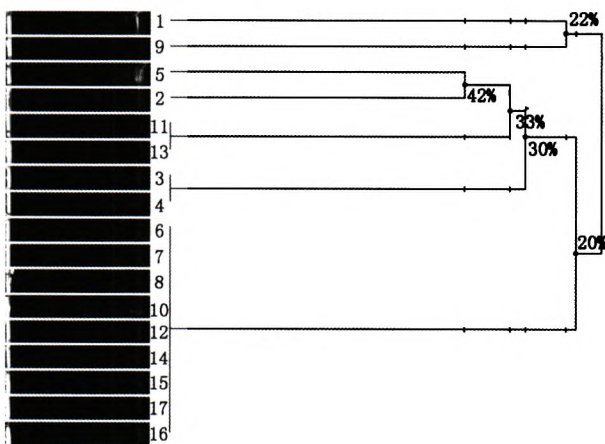
抗生素	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC 范围 (mg/L)	耐药	中介	敏感
环丙沙星	2	4	$\leq$ 0.25~8	- ^a	- ^a	- ^a
左氧氟沙星 ^b	1	2	$\leq$ 0.25~2	0	0	100
莫西沙星	$\leq$ 0.25	0.5	$\leq$ 0.25~0.5	- ^a	- ^a	- ^a
四环素	32	$\geq$ 32	$\leq$ 0.25~32	91.7	0	8.3
红霉素	$\geq$ 8	$\geq$ 8	0.125~ $\geq$ 8	91.7	0	8.3
克林霉素	$\geq$ 8	$\geq$ 8	0.0625~ $\geq$ 8	89.6	0	10.4
氨苄西林	$\leq$ 0.03	0.0625	$\leq$ 0.03~0.125	0	0	100
青霉素	$\leq$ 0.03	$\leq$ 0.03	$\leq$ 0.03~0.0625	0	0	100

注:^aCLSI(2011)缺少环丙沙星和莫西沙星的折点判定标准;^b根据 CLSI(2011)标准, $\leq$ 2 mg/L 为敏感,4 mg/L 为中介, $\geq$ 8 mg/L 为耐药

表 2 17 株化脓性链球菌的来源、氟喹诺酮类药敏以及基因比对结果

序号	患者来源	MIC (mg/L)			氨基酸突变位点			
		LEV ^a	MXF	CIP	parC	gyrA	parE	gyrB
1	顺义	0.5	≤0.25	≤0.25	-	-	-	-
2	石景山	≤0.25	≤0.25	≤0.25	Ala121Val	-	-	-
3	海淀	≤0.25	≤0.25	≤0.25	Ala121Val	-	-	-
4	海淀	≤0.25	≤0.25	≤0.25	Ala121Val	-	-	-
5	石景山	2	≤0.25	4	Ser79Phe, Ala121Val	-	-	-
6	丰台	2	≤0.25	4	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-
7	朝阳	2	≤0.25	4	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-
8	朝阳	2	≤0.25	4	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-
9	延庆	2	≤0.25	4	Ser79Phe	-	Ser371Leu	-
10	大兴	2	≤0.25	4	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-
11	怀柔	1	≤0.25	4	-	-	-	-
12	大兴	1	≤0.25	4	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-
13	怀柔	1	≤0.25	4	Ser79Phe	-	-	-
14	石景山	2	0.5	4	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-
15	顺义	2	≤0.25	4	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-
16	朝阳	2	0.5	4	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-
17	朝阳	2	≤0.25	8	Ser79Tyr, Ala121Val	-	-	-

注:LEV 示左氧氟沙星;MXF 示莫西沙星;CIP 示环丙沙星。“-”未发现突变。Ala 示丙氨酸;Val 示缬氨酸;Ser 示丝氨酸;Phe 示苯丙氨酸;Tyr 示酪氨酸;Leu 示亮氨酸



注:树状图使用骰子相似系数及 UPGMA 算法计算,误差为 1%;编号代表菌株 1~17。百分数表示相似度

图 1 17 株化脓性链球菌的 PFGE 及树状图

讨 论

国内化脓性链球菌对红霉素、克林霉素、氯霉素、四环素一直保持很高耐药率。本研究中,化脓性链球菌对四环素、红霉素、克林霉素的耐药率均在 90% 左右,氨苄西林、青霉素对化脓性链球菌的抗菌效果良好,与文献报道^[2,10]一致。青霉素类药物仍可以作为化脓性链球菌感染治疗的首选药物。

左氧氟沙星与莫西沙星的抗菌活性良好,与文献^[11-12]报道一致。文献报道化脓性链球菌对环丙沙星以 MIC ≥ 2 mg/L 作为判断不敏感的折点时,葡萄牙^[11]的不敏感率为 4.9%,西班牙^[13]为

13.0%,而本研究假定以 MIC ≥ 2 mg/L 为判断菌株环丙沙星不敏感的折点时,环丙沙星不敏感率 (29.2%, 13/48) 远高于国外。虽然国内还未报告对氟喹诺酮耐药的化脓性链球菌,但不敏感率增高极有可能导致耐药株的出现,故应该引起注意。

细菌对喹诺酮类抗生素耐药的机制,除了由含喹诺酮耐药基因的质粒介导引起以外,主要是由编码拓扑异构酶 A 亚基和 B 亚基的基因 (gyrA、gyrB、parC 和 parE) 突变引起^[14-15]。化脓性链球菌对氟喹诺酮耐药的基因突变,文献报道^[2,4,12-13,16]主要集中在 parC、gyrA 基因上,而在基因 parE、gyrB 上的突变报道较少^[12,16]。

本研究中,17 株测序菌株在 gyrA 和 gyrB 基因上均未发现突变。

文献^[4,12]中 parC 基因 Ala121Val 突变菌株对喹诺酮的耐药率均有所增高。本研究的 17 株化脓性链球菌,不论是对环丙沙星 MIC ≤ 0.25 mg/L 的菌株还是 MIC ≥ 4 mg/L 的菌株,在 parC 基因上都出现了 Ala121Val 突变,提示这一突变可能是无义突变。除来自怀柔区的 11 号菌株外,13 株环丙沙星 MIC ≥ 4 mg/L 的化脓性链球菌菌株中有 12 株 parC 基因上存在 Ser79Phe/Tyr 突变,提示可能是由于 79 位的碱基突变导致了化脓性链球菌对环丙沙星的耐药性提高。而 11 号菌株虽然对环丙沙星的 MIC 为 4 mg/L,但未发现耐药基因的突变,是否是由于其他原因导致了该菌株环丙沙星 MIC 值升高有待

进一步研究。

另外,延庆县分离的 9 号菌株在 *parC* 基因 Ser79Tyr 突变的基础上合并 *parE* 基因 Ser371Leu 突变,但该菌株对氟喹诺酮类抗生素的耐药性并没有显著提高,因此对于 *parE* 上的这一突变,其意义还需进一步研究。

此外,Yan 等^[2-3,9]报道的 *parC* 基因上都出现了 Ser79Phe/Tyr 和(或)Ala121Val 突变,和本次研究检测到的突变一致,但在 *gyrA* 基因上这 3 篇报道中出现突变(Ser81Ala/Tyr, Met99Leu)的菌株对环丙沙星的 MIC 都为 32 mg/L;对左氧氟沙星的 MIC 分别为 32 mg/L、16 mg/L、32 mg/L;对莫西沙星的 MIC 分别为“-”(文献中未列出数据)、2 mg/L、1.5 mg/L。而本次研究中环丙沙星、左氧氟沙星和莫西沙星的 MIC 分别为 $\leq 0.25 \sim 8$ mg/L、 $\leq 0.25 \sim 2$ mg/L 和 $\leq 0.25 \sim 0.5$ mg/L,这提示如果只有 *parC* 基因突变,可能较难产生氟喹诺酮高耐药菌株。

本试验中,编号为 6~8,10,12,14~17 的菌株显示为同一克隆型 A,并且这 9 株均为对环丙沙星不敏感菌株,占所收集菌株的 18.75% (9/48),由于菌株的样本采集时间均在 2012 年 3 月,且患者地区分布(4 株来自北京朝阳区、2 株来自大兴区)相距较近,病情均为猩红热,说明在此期间出现了由 A 型化脓性链球菌引起的小范围猩红热流行。故临床应加强化脓性链球菌病原菌的防控,防止传播。

参 考 文 献

- [1] Arai K, Hirakata Y, Yano H, et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan by a point mutation leading to a new amino acid substitution. J Antimicrob Chemother, 2011, 66:494-498.
- [2] Yan SS, Fox ML, Holland SM, et al. Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44:3196-3198.
- [3] Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP, et al. Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus pyogenes*. Clin Infect Dis, 2003, 36: 380-383.
- [4] Reinert RR, Lutticken R, Al-Lahham A. High-level fluoroquinolone resistance in a clinical *Streptococcus pyogenes* isolate in Germany. Clin Microbiol Infect, 2004, 10:659-662.
- [5] Arai K, Hirakata Y, Yano H, et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan by a point mutation leading to a new amino acid substitution. J Antimicrob Chemother, 2011, 66:494-498.
- [6] 张明新,朱敏,王玫,等.应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定常见细菌和酵母菌.中华检验医学杂志,2011,34: 988-992.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 20th ed. Approved standard M7-A8. Wayne, PA: CLSI, 2010.
- [8] Jones HE, Brenwald NP, Owen KA, et al. A multidrug efflux phenotype mutant of *Streptococcus pyogenes*. J Antimicrob Chemother, 2003, 51:707-710.
- [9] Rivera A, Rebollo M, Sánchez F, et al. Characterisation of fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* in Barcelona, Spain. Clin Microbiol Infect, 2005, 9:759-761.
- [10] Bahnan W, Hashwa F, Araj G, et al. Emm typing, antibiotic resistance and PFGE analysis of *Streptococcus pyogenes* in Lebanon. J Med Microbiol, 2011, 60:98-101.
- [11] Pires R, Ardanuy C, Rolo D, et al. Emergence of ciprofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* isolates from healthy children and pediatric patients in Portugal. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54:2677-2680.
- [12] Smeesters PR, Vergison A, Junior DC, et al. Emerging fluoroquinolone-non-susceptible group A streptococci in two different paediatric populations. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34:44-49.
- [13] Montes M, Tamayo E, Orden B, et al. Prevalence and clonal characterization of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility in Spain. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54:93-97.
- [14] Fabrega A, Madurga S, Giralt E, et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb Biotechnol, 2009, 2:40-61.
- [15] Malhotra-Kuma S, Van Heirstraeten L, Lammens C, et al. Emergence of high-level fluoroquinolone resistance in emm6 *Streptococcus pyogenes* and in vitro resistance selection with ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin. J Antimicrob Chemother, 2009, 63:886-894.
- [16] 陈文标,余菲菲.细菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究进展.检验医学与临床,2007,4:200-201.

(收稿日期:2012-08-14)

(本文编辑:武昱)