

革兰阳性球菌对利奈唑胺耐药机制的研究*

许宏涛, 陈东科, 赖惠英 (北京医院检验科 国家老年医学研究中心, 北京 100730)

摘要:目的 对利奈唑胺耐药革兰阳性球菌主要耐药分子机制进行初步研究。方法 采用 KB 法及 E-test 法对 6 株利奈唑胺耐药革兰阳性球菌进行药敏试验, 并应用脉冲场凝胶电泳(PFGE), PCR 及测序技术对菌株主要分子流行病学及耐药分子机制进行研究。结果 5 株柯氏葡萄球菌 PFGE 分为 2 型, 对利奈唑胺 MIC 介于 16~64 mg/L, 菌株均呈现 cfr 基因阳性、L3 存在双位点突变; 1 株粪肠球菌对利奈唑胺 MIC 为 8 mg/L, 耐药与 23SrRNA 存在 G2576T 点突变相关。结论 利奈唑胺耐药革兰阳性球菌在临床的出现应引起广泛关注, 为有效进行抗感染治疗应重视对利奈唑胺耐药菌株的临床监测。

关键词:利奈唑胺耐药; 革兰阳性球菌; 耐药机制

中图分类号: R378.1; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)06-020-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.006

Study on the Linezolid Resistance Mechanism of Gram Positive Cocci

XU Hong-tao, CHEN Dong-ke, LAI Hui-ying (Department of Laboratory Medicine, Beijing Hospital, National Geriatric Research Centre, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To study the molecular resistance mechanism of linezolid resistant gram positive cocci. **Methods** KB and E-test methods were used in antibiotic susceptibility tests. PFGE, PCR and sequencing techniques were applied to study the molecular epidemiological characteristics and resistance mechanisms of linezolid to gram positive cocci. **Results** The MICs of linezolid of the 5 *Staphylococcus cohnii* isolates were from 16 to 64 mg/L, and they were all cfr gene positive and with L3 mutations, and there were two PFGE types. The linezolid MIC of one *Enterococcus faecalis* was 8 mg/L with G2576T mutation in 23SrRNA. **Conclusion** There were linezolid resistant gram positive cocci appeared in clinical samples, for the effective anti-infection treatment monitoring linezolid resistant gram positive cocci in clinical lab is important.

Keywords: linezolid resistance; gram positive cocci; resistance mechanism

利奈唑胺(linezolid, LZD)是一种新型恶唑烷酮类抗生素, 2000 年在美国上市, 主要应用于万古霉素耐药肠球菌(VRE)、甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)、青霉素耐药链球菌等多重耐药革兰阳性球菌的治疗。因为自然界中缺乏天然耐药基因库, 理论上不易出现利奈唑胺耐药; 但事实并非如此, 2001 年美国哈佛大学医学院报道了第一株利奈唑胺耐药的 MRSA^[1]。而后, 多个国家出现了利奈唑胺耐药葡萄球菌的暴发性流行。我们收集了 2012 年 1 月~2014 年 12 月我院临床标本中出现的 6 株利奈唑胺耐药革兰阳性球菌, 对分子流行病学及其主要耐药分子机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2012 年 1 月~2014 年 12 月我院临床标本中对利奈唑胺耐药的革兰阳性球菌 6 株, 经过 VITEK2 COMPACT 鉴定 5 株为柯氏葡萄球菌、1 株为粪肠球菌。

1.2 试剂 KB 法药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品; MH 培养基干粉及 E-test 药敏条为法国生物梅里埃公司产品; Vitek-2 Compact 全自动细菌鉴

定义购自法国生物梅里埃公司; ABI-2400 PCR 仪购自美国 ABI 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自凯捷公司; TaqDNA 聚合酶、dNTP 和 DNA 分子量 Marker 购自日本 TaKaRa 公司。PCR 引物合成由北京赛百盛公司完成。

1.3 药敏试验 采用 E-test 法检测利奈唑胺、青霉素、苯唑西林、头孢西丁、万古霉素、替考拉宁、环丙沙星、红霉素、四环素、氯霉素的 MIC; 药敏方法和折点判断参照 CLSI 2012, 以 ATCC29213 作为质控菌株。

1.4 利奈唑胺耐药基因及相关突变检测 细菌基因组 DNA 提取应用凯捷公司的基因组提取试剂盒, 23Sr DNA V 区域引物及 4 个拷贝基因片段引物^[2], L3 和 L4^[3], cfr^[4] 基因扩增条件及引物序列参照文献进行, 引物序列见表 1; PCR 扩增产物序列测定由上海生工公司完成。

1.5 柯氏葡萄球菌 PFGE 分析 5 株柯氏葡萄球菌进行了脉冲场凝胶电泳(PFGE), 染色体 DNA 制备及电泳条件参照 Murchan 等^[11] 的文献进行, 条带分析应用软件 BioNumerics software package

* 作者简介: 许宏涛(1973-), 女, 医学博士, 主任技师, 从事微生物和分子生物学工作, 研究方向: 分子生物学技术应用于病原微生物的检出及抗生素相关耐药机制研究, Tel, 010-85133617, E-mail: taotao200703@sina.com。

(version 5.10, Applied Maths Inc., Austin, TX, USA)完成。

2 结果

2.1 抗生素敏感试验 见表2。5株柯氏葡萄球菌利奈唑胺MIC介于16~64 mg/L,青霉素、苯唑西林及头孢西丁均耐药,万古霉素及替考拉宁敏感;粪肠球菌利奈唑胺MIC为8 mg/L,万古霉素

及替考拉宁显示敏感。

2.2 利奈唑胺耐药基因及相关突变检测结果 5株柯氏葡萄球菌均表现为cfr基因阳性(图1),23SrRNA及L4无突变,L3存在两对氨基酸突变,具体见表1;粪肠球菌cfr基因扩增阴性,存在23SrRNA点突变(表2)。

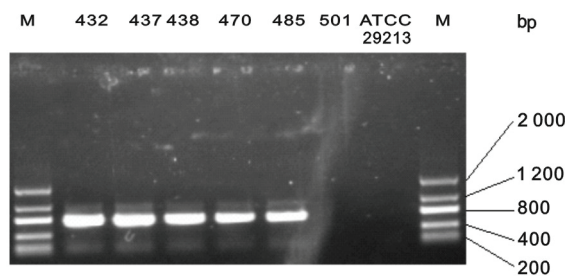
表1 本研究所应用引物序列

基因	引物	序列(5'→3')	预期片段长度(bp)
23S rDNA V区域	23S-V F	AGT TTG ACT GGG GCG GTC	429
	23S-V R	CCG GTC CTC TCG TAC TA	
23S rDNA 拷贝基因	23S-1F	GGC GCT GGT GGG ATA CTA	1 898
	23S-1R	GGA CGG TTA TGA GCC GTC	
23S rDNA 拷贝基因	23S-2F	GGC GCT GGT GGG ATA CTA	1 415
	23S-2R	GCG ATC TCC TGC GTG AC	
23S rDNA 拷贝基因	23S-3F	GGC GCT GGT GGG ATA CTA	1 111
	23S-3R	CCC TTC TTC AAG CTT ATC	
23S rDNA 拷贝基因	23S-4F	GGC GCT GGT GGG ATA CTA	1 952
	23S-4R	CCA CAG TGA TTT TGC CCA	
L3	rplC-F	ACC CTG ATT TAG TTC CGT CTA	822
	rplC-R	GTT GAC GCT TTA ATG GGC TTA	
L4	rplD-F	TCG CTT ACC TCC TTA ATG	1 200
	rplD-R	GGT AAC ACT GTA ACT G	
Cfr	cfr-F	TGA AGT ATA AAG CAG GTT GGG AGT CA	746
	cfr-R	ACC ATA TAA TTG ACC ACA AGC AGC	

表2 6株革兰阳性球菌主要耐药机制及抗生素敏感性

菌号	来源	MIC(mg/L)										分子耐药机制				
		LZD	PEN	OXA	FOX	VAN	TEC	CIP	ERY	TET	CHL	23SrRNA	cfr	L3	L4	PFGE
柯氏葡萄球菌																
432	血	16	>256	128	32	2	2	32	>256	128	>128	—	+	S158Y,D159Y	—	A
437	伤口	16	>256	128	32	1	1	32	>256	64	64	—	+	S158Y,D159Y	—	B
438	伤口	64	>256	128	32	1	4	64	>256	64	64	—	+	S158F,D159Y	—	B
470	血	64	>256	128	16	2	4	64	>256	1	>128	—	+	S158F,D159Y	—	B
485	血	16	>256	128	32	2	2	32	>256	128	>128	—	+	S158Y,D159Y	—	A
粪肠球菌																
501	尿	8	2	—	—	1	0.25	64	>256	128	64	G2576T	—	—	—	—

注:MIC,最低抑菌浓度;LZD,利奈唑胺;PEN,青霉素;OXA,苯甲异噁唑青霉素;FOX,头孢西丁;VAN,万古霉素;TEC,替考拉宁;CIP,环丙沙星;ERY,红霉素;TET,四环素;CHL,氯霉素;S:丝氨酸;Y:酪氨酸;D:天冬氨酸;F:苯丙氨酸。



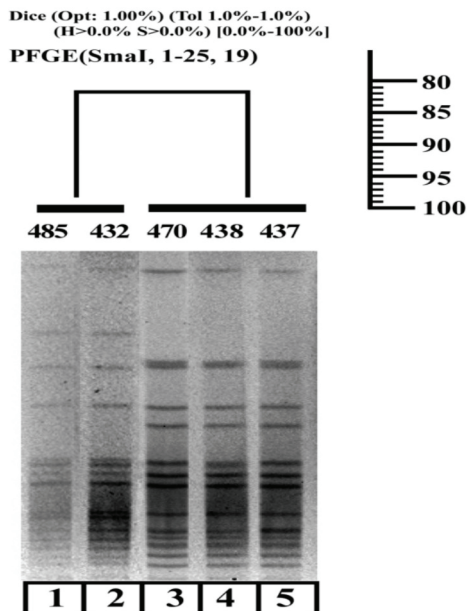
M:分子量 Marker;ATCC29213:阴性对照。

图1 cfr基因电泳图

2.3 柯氏葡萄球菌 PFGE 分型结果 见图2。5株柯氏葡萄球菌PFGE分型共分为2型,分别定义为A型和B型,菌株432和485为A型,437,438和470为B型。

3 讨论 利奈唑胺2007年在中国上市,主要用于治疗多重耐药革兰阳性球菌;耐药监测数据显示,我国第一株利奈唑胺耐药革兰阳性球菌出现在2009年^[5]。利奈唑胺通过与50S核糖体亚基23Sr

RNA的V功能区结合,阻止50S与30S亚基组合成70S核糖体,抑制细菌蛋白质合成从而发挥抗菌作用。现在已知的利奈唑胺耐药机制包括:



注:菌株485,432;PFGE A型;菌株470,438,437;PFGE B型。

图2 柯氏葡萄球菌PFGE电泳图

23SrRNA V结构区的点突变,以G2576T为主,还包括U2500A, G2505A, G2512T, T2504C, C2610G, T2505A及G2766T等,这些突变影响利奈唑胺与靶位的结合从而减弱利奈唑胺抗菌活性^[6];此外,有学者报道^[7]核糖体蛋白L3或L4突变与利奈唑胺抗菌活性下降相关,菌株通过核苷酸片段的缺失、序列改变、替换以及插入修饰编码核糖体蛋白L4, L3的rpl/D, rpl/C基因序列,从而影响肽酰转移酶的空间构象,降低抑制利奈唑胺的抗菌活性,从而达到耐药,这种突变多发生于细菌染色体上,故不易造成细菌间耐药性的横向传播;第三种已知耐药机制是菌株通过获得cfr耐药基因而达到耐药^[8],首次报道于临床分离的MRSA菌株中。cfr基因可甲基化转录后的rRNA(A2503),从而使其构象改变以影响利奈唑胺与抗菌靶位的结合而引起耐药,大量文献显示:cfr耐药基因可通过质粒在不同种属细菌间进行水平传播,而引起医院内的暴发流行^[9]。此外,cfr耐药基因还可介导对氯霉素及林可霉素的交叉耐药,由此可见cfr基因是利奈唑胺耐药菌株医院内暴发流行的潜在危险因素。

我们的研究中利奈唑胺耐药凝固酶阴性葡萄球菌经鉴定全部为柯氏葡萄球菌,其它凝固酶阴性葡萄球菌中未发现利奈唑胺耐药,5株菌均来自患者无菌部位并伴随感染症状,鉴定其均为感染菌;5

株柯氏葡萄球菌耐药分子机制均表现为cfr基因阳性伴随L3的158位及159位突变,未见23SrRNA突变及L4的突变;cfr基因多见于质粒,容易引起医院内播散;L3突变最近报道较多,但在利奈唑胺耐药中cfr基因及L3突变同时存在时其分别所起的作用及程度还需要在以后研究中明确,这也是我们下一步研究的目标。而利奈唑胺耐药粪肠球菌分离自患者尿标本,耐药由23SrRNA的G2576T点突变引起,以往研究显示:粪肠球菌中,编码23S rRNA的基因有4个相同的片段(拷贝),其突变的数量与耐药水平呈量效关系,粪肠球菌(菌株号501)的23SrRNA第5功能区的PCR扩增片段测序2576位为单一峰,显示其为一致性的G到T的点突变,此株粪肠球菌未检测出cfr基因及L3和L4的突变。

在分子流行病学研究中我们应用PFGE技术对5株柯氏葡萄球菌进行了亲缘性研究,结果显示:菌株432和485为同一分子克隆(A型),它们来自同一病房(ICU)的病人,且485被分离前病人未应用过利奈唑胺抗生素,提示菌株有播散的可能;另外三株菌(437,438和470)为PFGE分型的B型,病人在分离出利奈唑胺耐药菌株前均应用过利奈唑胺药物,分子遗传背景相同提示其存在院内传播可能。

近年利奈唑胺耐药的革兰阳性球菌已在国内多家医院临床标本中检测出^[10],其为革兰阳性球菌的有效抗感染治疗带来了困难;临床微生物室应加强利奈唑胺耐药革兰阳性球菌的监测,加强合理应用抗生素的宣教,以减少多重耐药菌的出现。

参考文献:

- [1] Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* [J]. Lancet, 2001, 358(9277): 207-208.
- [2] Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, et al. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy [J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(11): 2329-2335.
- [3] Toh SM, Xiong L, Arias CA, et al. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid [J]. Molecular Microbiology, 2007, 64(6): 1506-1514.
- [4] Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes fexA and cfr among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus isolates* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(4): 1156-1163.

- 2014;258.
- Xu XQ. Investigation and analysis of TORCH infection in 2061 pregnant women in Wenzhou[C]. Proceedings of the Ninth National Symposium on Immunology, 2014;258.
- [13] 韦平宜. 532例孕妇唐氏综合征筛查及TORCH筛查分析[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(4): 600-601.
- Wei PX. Screening of Down's syndrome in 532 cases of pregnant women and the analysis of TORCH screening[J]. Journal of Youjiang Medical University for Nationalities, 2014, 36(4): 600-601.
- [14] 冯先华, 郝娟, 蒋冰, 等. 武汉地区3 072例孕妇TORCH检测结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(7): 88-93.
- Feng XH, Xi J, Jiang B, et al. Analysis of TORCH test results about 3072 cases of pregnant women in Wuhan area[J]. Chinese Journal of Birth Health and Heredity, 2014, 22(7): 88-93.
- [15] 高文静, 乔杰, 莫顺华, 等. 东莞市城区孕妇TORCH感染情况调查分析[J]. 中国民族民间医药, 2014(9): 106-107.
- Gao WJ, Qiao J, Mo SH, et al. Dongguan city pregnant women TORCH investigation of infect[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2014(9): 106-107.
- [16] 米东, 祁佩, 陈淑琴, 等. 天津地区不孕妇女和孕妇TORCH感染的检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2): 241-243.
- Mi D, Qi P, Chen SQ, et al. Detection and analysis of TORCH infection in infertile women and pregnant women in Tianjin[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2014, 35(2): 241-243.
- [17] 靳庆娥, 谷俊朝, 苏建荣. 2015年北京地区孕前妇女血清TORCH抗体及TNF- α 水平检测与相关分析[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(3): 105-107.
- Jin QE, Gu JC, Su JR. Seroprevalence of TORCH infection within pre-pregnancy women and the relationship with TNF- α level during 2015 in Beijing area[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(3): 105-107.
- [18] 余杰, 王海萍, 伏春明. 上海虹口区孕前妇女TORCH三种病原体感染情况及与妊娠结局的关系分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 127-129.
- Yu J, Wang HP, Fu CM. Study on TORCH infection status of pre-pregnant women and their relationship with pregnancy outcome in Shanghai Hongkou district[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 127-129.
- [19] 黄霁, 杨敏, 吴成亮. 九江地区孕龄妇女TORCH感染情况分析[J]. 当代医学, 2015, 21(30): 162-163.
- Huang Q, Yang M, Wu CL. Analysis of TORCH infection in pregnant women in Jiujiang area[J]. Contemporary Medicine, 2015, 21(30): 162-163.

收稿日期: 2016-08-04

修回日期: 2016-09-25

(上接22页)

- [5] Zhao C, Sun H, Wang H, et al. Antimicrobial resistance trends among 5 608 clinical Gram-positive isolates in China: results from the Gram-Positive Cocci Resistance Surveillance program (2005~2010)[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2012, 73(2): 174-181.
- [6] LaMarre J, Mendes RE, Szal T, et al. The genetic environment of the cfr gene and the presence of other mechanisms account for the very high linezolid resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolate 426-3147L[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(3): 1173-1179.
- [7] Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in *staphylococci* of clinical origin[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(12): 5275-5278.
- [8] Liu Y, Wang Y, Schwarz S, et al. Transferable multi-resistance plasmids carrying cfr in *Enterococcus spp.* from swine and farm environment[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(1): 42-48.
- [9] Morales G, Picazo JJ, Baos E, et al. Resistance to linezolid is mediated by the cfr gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Clinical Infectious Diseases, 2010, 50(6): 821-825.
- [10] 蔡加昌, 周宏伟, 胡燕燕, 等. 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌对利奈唑胺耐药机制及分子流行病学研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(6): 532-536.
- Cai JC, Zhou HW, Hu YY, et al. Linezolid resistance mechanisms and molecular epidemiology of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2012, 32(6): 532-536.

收稿日期: 2016-01-17

修回日期: 2016-07-14