

# 凝固酶阴性葡萄球菌对利奈唑胺耐药机制的初步研究

徐洪亮 薛文成 褚美玲 马均 任微 王璐 孟冬娅

**【摘要】 目的** 探讨凝固酶阴性葡萄球菌对利奈唑胺的耐药机制。**方法** 收集临床分离的 1 株凝固酶阴性葡萄球菌,菌株来源的患者进行血液细菌培养前未经利奈唑胺治疗,但曾服用罗红霉素。本研究采用 PCR 和 DNA 测序法扩增其 23S rRNA 基因 V 区序列,与基因库中对利奈唑胺敏感的标准菌株基因序列进行对比分析。**结果** 利奈唑胺对实验菌株的最小抑菌浓度(MIC)为  $\geq 256$  mg/L,此外该菌株对氯霉素、红霉素和克林霉素均耐药,对链阳菌素敏感,克林霉素诱导实验阴性。与 GenBank 中 *S. epidermidis* RP62A (Accession No:CR000029) 进行比对分析,结果发现实验菌株 6 个拷贝的 23S rRNA V 区出现 C2390T、G2431C、G2436A 和 C2453T 纯合突变。**结论** 初步判断该株凝固酶阴性葡萄球菌 23S rRNA 保守区 V 区 C2390T、G2431C、G2436A 和 C2453T 多位点变异可能导致其对红霉素、林可霉素、氯霉素及利奈唑胺的多重耐药,进一步阐明罗红霉素是否可诱导葡萄球菌 23S rRNA 的 V 区保守区碱基突变,从而产生对利奈唑胺的交叉耐药,对阐明利奈唑胺耐药机制以及恶唑烷酮新药的开发具有重要的意义。

**【关键词】** 葡萄球菌;利奈唑胺;23S rRNA;突变;耐药

**Primary study on the molecular mechanisms of the coagulase negative *Staphylococcus* resistance to linezolid** XU Hong-liang, XUE Wen-cheng, CHU Mei-ling, MA Jun, REN Wei, WANG Lu, MENG Dong-ya. The No. 230 Hospital of Shenyang Command, Dandong 118000, China  
Corresponding author: MENG Dong-ya, Email: mengdongya@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To discuss the mechanisms of acquired resistance of coagulase negative *Staphylococcus* resistance to linezolid. **Methods** One strain of coagulase negative *Staphylococcus* isolated from blood of a patient treated by roxithromycin but not linezolid (LZD). The isolate was screened for mutations in V conserved domain of 23S rRNA in comparison with *S. epidermidis* RP62A (Accession No: CR000029) in GenBank. **Results** The isolate was resistant to linezolid (MIC  $\geq 256$  mg/L). It is also resistant to chloramphenicol, erythromycin and clindamycin, but sensitive to streptogramins A. In the resistant isolate, V domain sequencing of six 23S rRNA operons revealed C2390T, G2431C, G2436A and C2453T mutation compared with *S. epidermidis* RP62A (Accession No. CR000029). **Conclusions** Four new mutations were described in a clinical linezolid-resistant coagulase negative *Staphylococcus* which was also resistant to chloramphenicol, erythromycin and clindamycin, but sensitive to streptogramins A. Attention should be paid to the fact that the strain might also be selected under treatment with roxithromycin, and this could be due to co-selection, might multiply the risk of development of linezolid-resistant strains.

**【Key words】** *Staphylococcus*; Linezolid; 23S rRNA; Mutation; Resistance

利奈唑胺为人工合成的恶唑烷酮类抗菌药物之一,2000 年美国 FDA 批准该药可用于治疗革兰阳性( $G^+$ )球菌引起的感染,如由 MRSA 引起的疑似或确诊院内感染获得性肺炎、复杂性皮肤或皮肤软组织

感染,尤其是多重耐药的耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant enterococcus, VRE)感染治疗。一般认为利奈唑胺独特的抗菌机制为主要通过作用于 50S 核糖体亚基 23S rRNA 的 V 功能区,阻止 50S 与 30S 亚基结合成 70S 起始复合物,从而抑制细菌蛋白质合成,据此推测该药不易与其他抑制蛋白合成的抗菌药发生交叉耐药<sup>[1]</sup>,但随着该药的广泛应用,有关该药耐药菌株流行及耐药机制的研究报道日渐增多。本研究从临床患者血培养中分离出 1 株凝固酶阴性葡萄球菌,发现其对利奈唑胺高度耐药,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.05.010

基金项目:辽宁省科技攻关项目(No. 2011225021)

作者单位:118000 丹东市,解放军 230 医院检验科(徐洪亮);  
沈阳军区总医院检验科(薛文成、褚美玲、马均、任微、王璐、孟冬娅)

通讯作者:孟冬娅,Email:mengdongya@hotmail.com

第一作者:徐洪亮、薛文成为并列第一作者

现将相关耐药机制报道如下。

## 资料与方法

### 一、材料

1. 菌株及来源:患者,男,75 岁,因双肺炎于 2011 年 8 月入住本院,入院前自行口服罗红霉素,入院后,抽血细菌培养前经验用药给予哌拉西林/他唑巴坦钠治疗。自患者血培养中分离出 1 株葡萄球菌,其凝固酶阴性。

2. PCR 试剂及引物:LOT BK701。Ex Taq 酶 (TaKaRa), dNTP (TaKaRa), 引物 (Invitrogen 合成), Marker:DL5000。所用引物参考文献<sup>[2]</sup>根据实验效果进行适当改进,详见表 1。

3. 主要仪器:离心机,电泳仪,PCR 仪,ABI 3730XL 测序仪。

表 1 研究中 6 个拷贝的 23S rRNA 及 V 区扩增引物

引物(5'→3')	来源(文献)
rm1F ATGAAGCGATGAATAAAGCAG	本研究
rm1R GCCTCATGATATACGCTTCCTTT	文献 <sup>[2]</sup>
rm2F GCAGACGCACAGACTTA	文献 <sup>[2]</sup>
rm2R ATCTACTTTTGACCTGTTGGT	本研究
rm3F AACGCTTACCAAGGCAACG	本研究
rm3R GTCGTCAAACGGCACTAATA	文献 <sup>[2]</sup>
rm4F TGTGGACGGTGCATCTGTAG	文献 <sup>[2]</sup>
rm4R ATCACCCGCTCCATAGATAAT	文献 <sup>[2]</sup>
rm5F GCCGATAGCTCTACCACTG	文献 <sup>[2]</sup>
rm5R AGGTGCGATGGCAAAACA	文献 <sup>[2]</sup>
rm6F GAAAGGCGTAACGATTGGG	文献 <sup>[2]</sup>
rm6R CGTTGACATATTGTCATTGAG	文献 <sup>[2]</sup>
V 区 引物	
F GCGGTGCGCTCCTAAAAG	文献 <sup>[2]</sup>
R ATCCCGGTCTCTCTGCTACTA	文献 <sup>[2]</sup>

### 二、方法

1. 菌株鉴定及药敏试验:采用生物梅里埃公司 VITEK COMPACT 细菌自动鉴定仪,GP 鉴定卡(批号:242208240)鉴定菌株,同时用 GP-AST 药敏卡完成相关药物最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定,采用 E-test 药敏纸条作为利奈唑胺的确证试验。药敏试验质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853,均由卫生部临检中心提供。

2. 细菌基因组 DNA 抽提:操作参考文献<sup>[2]</sup>中的方法。

3. PCR 反应体系:反应总体积 20  $\mu$ l,包括 10  $\times$  Ex Taq buffer 2.0  $\mu$ l,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6  $\mu$ l,2.5 mmol/L dNTP Mix 1.6  $\mu$ l,引物 5p Primer 1 为 1  $\mu$ l,5p Primer 2 为 1  $\mu$ l,Template 0.5  $\mu$ l,5U Ex Taq 0.2  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 12.1  $\mu$ l。

PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min 30 s,24 个循环,最后 72℃ 延长 10 min。电泳检测 1299 bp 条带处切胶纯化测序。证实所得产物正确后,内侧巢式 PCR 扩增 V 区保守区,反应体系同上,PCR 反应条件也相同,35 个循环。

## 结 果

### 一、实验菌株的菌种鉴定

VITEK COMPACT 细菌自动鉴定仪鉴定结果提示为马胃葡萄球菌或缓慢葡萄球菌,但 16S rRNA 基因扩增测序与葡萄球菌属多种如 *Staphylococcus cohnii* strain JL812 (GenBank: EF512729.1) 序列 100% 一致,见表 2,与基因库中马胃葡萄球菌或缓慢葡萄球菌差异较大。

### 二、药敏试验结果

常规药敏结果显示,该菌株对氯霉素、红霉素和克林霉素均耐药,对链阳菌素敏感,克林霉素诱导实验阴性。E-test 试验确认利奈唑胺对实验菌株的最小抑菌浓度为 MIC $\geq$ 256 mg/L,见表 3。

表 2 实验菌株与 GenBank 中部分菌株 16S rRNA 序列的对比结果

基因序列号	菌株描述	得分	涵盖查询序列	同一性
GQ169065.1	科氏葡萄球菌解脲亚种 CTDE2 16S rRNA 基因部分序列	2399	100%	100%
FJ514811.1	葡萄球菌属 gy 种 232 株 16S rRNA 基因部分序列	2399	100%	100%
AM944030.1	葡萄球菌属 R-25657 株 16S rRNA 基因部分序列	2399	100%	100%
EF512729.1	科氏葡萄球菌 JL812 株 16S rRNA 基因部分序列	2399	100%	100%

表 3 实验菌株对多种药物的 MIC 值及敏感性

抗菌药物	MIC (mg/L)	敏感度
氨苄西林	≥ 4	R
克林霉素	≥ 8	R
氯霉素	≥ 32	R
红霉素	≥ 8	R
左氧氟沙星	≤ 4	S
环丙沙星	≤ 4	S
青霉素	≤ 0.5	S
莫西沙星	≤ 4	S
万古霉素	≤ 1	S
利奈唑胺	≥ 256	R
四环素	≥ 16	R
庆大霉素	≤ 0.5	S
奎奴普丁/达福普汀	≤ 2	S
克林霉素诱导试验	Neg( 阴性)	

注:R:耐药,S:敏感

## 三、23S rRNA V 区序列分析

采用文献中引物进行扩增效果不佳,扩增出目的条带偏少且特异性差,重新设计引物进行扩增,经试验后确定:rrlA\_F 改为:5'-ATGAAGCGATGAATAAAGCAG-3';rrlB\_R 改为:5'-ATCTACTTTTGACCTGTTGGT-3';rrlC\_F 改为:5'-AACGGCTTACCAAGGCAACG-3'。扩增后的产物稀释后用测序引物进行巢式 PCR 内侧扩增,23S rRNA 保守区 V 区跨度 2280 ~ 2699 bp (*E. coli* numbering) 被扩增,扩增效果见图 1。基因测序后与 GenBank 中 *S. epidermidis* RP62A (accession No. CR000029) 比对分析,发现 6 个拷贝的 23S rRNA V 区文献报道的 2444、2447、2503、2504 和 2576 等位点未检出突变。与 GenBank 库中序列相比,6 个拷贝的保守区 V 区均出现 C2390T、G2431C、G2436A 和 C2453T 位点的纯合突变;部分位点出现杂合突变,分别为:rrlB: T2307C, G2315A, C2652T;rrlD: T2307C。

## 讨 论

近年来,国外关于利奈唑胺耐药的报道逐渐增加,其中葡萄球菌属和肠球菌属耐药报道所占比例较高,多以金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌等为主。已报道的利奈唑胺耐药机制有 23S rRNA 靶位突变<sup>[3-5]</sup>、甲基转移酶-氯霉素-氟甲砜霉素耐药 (chloramphenicol-florfenicol resistance, cfr) 基因的产生<sup>[6-7]</sup>,也有少数关于核糖体蛋白 L3、L4 突变导致利奈唑胺耐药的报道<sup>[2,8-9]</sup>。其中以 23S rRNA 靶位突

变报道较多,常见的有保守区 V 区 2444、2447、2503、2504 和 2576 位点突变,以 G2576T 突变报道较多见。葡萄球菌中存在 6 个拷贝的 23S rRNA 等位基因,对利奈唑胺的耐药性与 6 个拷贝中发生 V 区突变的个数相关,6 个拷贝同时发生突变时,菌株对利奈唑胺的 MIC 值可达 526 ~ 1052 mg/L<sup>[10]</sup>。

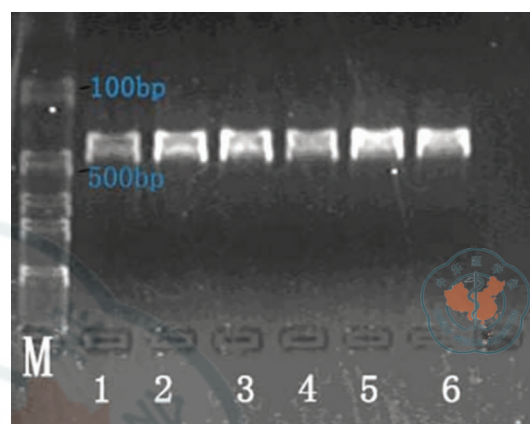


图 1 实验菌株 23S rRNA 6 个拷贝的 PCR 电泳图

注:M:核酸 Marker;1~6 泳道分别为实验菌株 23S rRNA 6 个拷贝的扩增电泳图

体内研究表明,利奈唑胺可特异性结合到 50S 亚单位高活性中心,即核糖体肽转移酶中心,和氯霉素等同为第 I 类型的蛋白质合成抑制剂具有同样功能,锚定于 A 位上的氨基酰 tRNA 结合位点,阻断 50S 中肽酰转移酶中心的功能<sup>[11-13]</sup>,此外,利奈唑胺还具有影响蛋白质翻译准确性,使密码子通读中断等作用,因而其不受 rRNA 甲基化酶介导的大环内酯类-林可类-链阳性药素类 (macrolides-lincosamides-streptogramin, MLS) 耐药机制影响<sup>[14-15]</sup>。本研究实验菌株耐药表型为红霉素和林可霉素耐药,链阳菌素类奎奴普丁/达福普汀敏感,克林霉素诱导实验阴性,可以排除甲基化酶耐药机制。

本研究是国内凝固酶阴性葡萄球菌利奈唑胺耐药的首次报道,该耐药菌株未检出 cfr 基因,6 个拷贝的 23S rRNA 的 V 区保守区均发生了 C2390T、G2431C、G2436A、C2453T 纯合突变,以往的文献报道中尚未见这些位点突变的报道。由于结构域 V 的 G2057 ~ C2611 碱基对既能稳定核糖体 23S rRNA 的三级结构,又是红霉素等大环内脂药物在该结构域上的结合位点,该区碱基突变引起的 2057 ~ 2611 碱基对破坏能导致组成型核糖体变化,也可导致红霉素对核糖体亲和力降低,从而产生红霉素抗性<sup>[16]</sup>,提示利奈唑胺与红霉素等大环内脂药物有交叉耐药的分子基础。



从本研究中耐药菌株对各种药物的耐药表型看,该菌株对氯霉素、红霉素、林可霉素等相关药物均耐药,尤其值得关注的是,菌株来源患者在血培养前无利奈唑胺用药史,但曾自服过罗红霉素,是否罗红霉素可诱导葡萄球菌 23S rRNA 的 V 区保守区碱基突变,从而产生对利奈唑胺的高度耐药,尚未明确。本研究对阐明利奈唑胺耐药机制及恶唑烷酮新药的开发具有重要的意义。

### 参 考 文 献

- 1 Livermore DM. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51 (Suppl 2): ii9-ii16.
- 2 Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in *Staphylococci* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53 (12): 5275-5278.
- 3 Seral C, Sáenz Y, Algarate S, et al. Nosocomial outbreak of methicillin and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int J Med Microbiol*, 2011, 301 (4): 354-358.
- 4 Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, et al. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis*, 2002, 186 (11): 1603-1607.
- 5 Zhu W, Tenover FC, Limor J, et al. Use of pyrosequencing to identify point mutations in domain V of 23S rRNA genes of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007, 26 (3): 161-165.
- 6 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*. *Clin Infect Dis*, 2010, 50 (6): 821-825.
- 7 Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, et al. DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65 (11): 2336-2340.
- 8 Wong A, Reddy SP, Smyth DS, et al. Polyphyletic emergence of linezolid-resistant staphylococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (2): 742-748.
- 9 Kosowska-Shick K, Julian KG, McGhee PL, et al. Molecular and epidemiologic characteristics of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 68 (1): 34-39.
- 10 Stefania S, Dafne B, Gino M, et al. Linezolid resistance in *Staphylococci*. *Pharmaceuticals*, 2010, 3 (7): 1988-2006.
- 11 Leach KL, Swaney SM, Colca JR et al. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol Cell*, 2007, 26 (3): 393-402.
- 12 Ippolito JA, Kanyo ZF, Wang D, et al. Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit. *J Med Chem*, 2008, 51 (12): 3353-3356.
- 13 Wilson D, Schlunzen F, Harms J, et al. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105 (36): 13339-13344.
- 14 Thompson J, O'Connor M, Mills JA, et al. The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. *J Mol Biol*, 2002, 322 (2): 273-279.
- 15 Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 282 (2): 147-159.
- 16 李凌凌, 张部昌, 马清钧. 红霉素抗菌作用及细菌产生红霉素抗性的机制. *国外医药·抗生素分册*, 2004, 25 (1): 12-16.

(收稿日期:2012-05-28)

(本文编辑:孙荣华)

徐洪亮, 薛文成, 褚美玲, 等. 凝固酶阴性葡萄球菌对利奈唑胺耐药机制的初步研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6 (5): 415-418.