

利奈唑胺体外诱导金黄色葡萄球菌耐药的实验研究

李艳芬 王俊 王淑香 郭文学 祁伟

【摘要】目的 体外诱导金黄色葡萄球菌对利奈唑胺耐药, 研究分析其耐药后菌株变化。方法用利奈唑胺浓度2倍递增的方法对9株临床分离金黄色葡萄球菌(5株MSSA、4株MRSA)和质控菌株ATCC25923进行体外诱导; PCR扩增诱导前后金黄色葡萄球菌23S rRNA的V区基因并测序、Blast比对, 分析突变与耐药性的关系; 比较诱导前后金黄色葡萄球菌的适应性以及对抗菌药物的耐药性变化。**结果** 10株实验菌株中有9株诱导出稳定的利奈唑胺耐药性, 其中5株耐药菌发生了突变; 利奈唑胺耐药后金黄色葡萄球菌生长速率减慢, 对其他抗菌药物耐药性也发生改变。**结论** 经利奈唑胺诱导后金黄色葡萄球菌可以获得稳定耐药性, 但同时也产生了适应性代价, 其耐药机制与23S rRNA的V区基因突变相关, 并且可能有其他耐药机制的参与。

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 利奈唑胺; 耐药性; 基因突变; 适应性代价

The drug-resistance of *Staphylococcus aureus* induced by linezolid in vitro LI Yan-fen, WANG Jun, WANG Shu-xiang, GUO Wen-xue, QI Wei. Institute of Infection Disease, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Corresponding author: QI Wei, Email: qiweiyx@yahoo.com

【Abstract】 Objectives To investigate the in vitro linezolid-induced resistance in *Staphylococcus aureus* and its change. **Methods** Linezolid in vitro induction was conducted with 9 *S. aureus* isolates (5 MSSA, 4 MRSA) and 1 reference strain. Amplification and sequencing of domain V 23S rRNA gene. To compare the fitness of *S. aureus*, and the susceptibility against other antibiotics. **Results** Resistance to linezolid was successfully in 9 of 10 strains. Point mutation was identified in 23S rRNA gene in 5 linezolid-resistant strains. The linezolid-resistant *S. aureus* grew much slower than the susceptible parent, and definite changes in the susceptibility were demonstrated. **Conclusions** *S. aureus* can be induced resistance in vitro by linezolid, and this resistance may be associated with the point mutation of 23S rRNA gene. The fitness cost observed in the linezolid-resistant strains.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; Linezolid; Drug-resistance; Gene mutation; Fitness cost

耐药菌感染正在全球蔓延, 感染率和病死率正在逐年上升, 特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、耐万古霉素肠球菌(Vancomycin-resistant *Enterococci*, VRE)的出现和流行, 严重威胁着人类健康。利奈唑胺是第一个获得美国食品和药物管理局(FDA)批准用于临床的恶唑烷酮类抗菌药物, 对大多数的革兰阳性致病菌表现出很强的抗菌活性, 如MRSA、VRE、多重耐药肺炎链球菌等^[1-2]。该药应用临床后不久便出现了耐药菌株^[1-2], 因此受到各国学者的高度关注。本研究在体外诱导金黄色葡萄球菌对利奈唑胺耐药, 初步探

讨其耐药性的形成机制, 并对比分析诱导前后菌株的适应性及对其他抗菌药物的耐药性变化, 为今后更深入、全面的耐药机制研究奠定基础。

资料与方法

一、材料

1. 菌株来源: 9株临床分离金黄色葡萄球菌均为本研究所低温冷冻保存, 其中5株为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA)、4株为MRSA。菌株鉴定采用API葡萄球菌鉴定系统及血浆凝固酶试验, MRSA筛选采用mecA基因扩增法。以金黄色葡萄球菌ATCC25923作为质控菌株。

2. 药品与试剂: Mueller-Hinton (M-H) 肉汤和MH琼脂购自杭州天和微生物试剂有限公司;

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.05.017

作者单位: 300211 天津市, 天津医科大学第二医院感染性疾病研究所

通讯作者: 祁伟, Email: qiweiyx@yahoo.com

Luria-Bertani (L-B) 肉汤和LB琼脂购自北京陆桥技术有限责任公司; 利奈唑胺 (linezolid) 为美国Pfizer公司产品 (批号为10K16Z24); 药敏纸片包括利奈唑胺、红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、万古霉素、替考拉宁、头孢西丁、苯唑西林、青霉素G、利福平、米诺环素、庆大霉素、克林霉素及氯霉素共14种, 购自天津滨海华康医疗器械贸易有限公司。Taq DNA聚合酶、DNA Marker (DL1000) 购于大连宝生物工程有限公司; 引物合成及PCR产物测序委托北京六合华大基因技术有限公司完成。上游引物5' -GCGGTCGCCTCCTAAAAG-3', 下游引物5' -ATCCGGTCCTCTCGTACTA-3' [2]。

二、方法

1. 利奈唑胺对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定: 采用琼脂稀释法进行操作及判读结果。依据美国临床和实验室标准化研究所 (CLSI) 2010年标准, 利奈唑胺对金黄色葡萄球菌MIC值 ≤ 4 mg/L为敏感 (S), MIC值 ≥ 8 mg/L为耐药 (R)。

2. 体外诱导耐药: 将金黄色葡萄球菌依次接种在利奈唑胺浓度2倍递增的MH琼脂培养基中, 初始浓度为1/4 MIC, 每个药物浓度培养5~7代, 当细菌生长不良时可降低浓度重复传代培养。同时接种无药平皿进行同期培养, 观察细菌生长情况。每间隔5代做菌株鉴定及测定利奈唑胺对检测菌株的MIC值。

3. 诱导耐药菌株的耐药稳定性测定: 将诱导产生的耐药菌株用无抗菌药物的MH培养基传代培养, 用Kirby-Bauer纸片扩散法每天测量抑菌环直径, 记录其维持耐药性的天数。

4. 诱导前后金黄色葡萄球菌23S rRNA的V区基因扩增及测序: PCR反应终体积为25 μ l体系。参照Rohrer等[3]的方法提取细菌总DNA作为扩增模板。反应参数: 预变性94 $^{\circ}$ C 2 min, 变性94 $^{\circ}$ C 10 s, 退火55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 30 s, 共30个循环, 终延伸72 $^{\circ}$ C 7 min。取扩增产物5 μ l进行2%琼脂糖凝胶电泳50 min, 溴化乙锭染色, 凝胶系统下观察结果。

将PCR反应产物测序, 结果经Blast程序与GenBank数据库公布的标准菌序列比对, 分析基因突变位点与利奈唑胺耐药性的关系。

5. 比较诱导前后金黄色葡萄球菌的倍增时间: 诱导耐药后在各MIC值中选取一株金黄色葡萄球菌 (S1、S5、S8、S10) 及其诱导前菌株 (Sa1、Sa5、Sa8、Sa10) 作为受试菌, 分别挑取单个菌落接种于LB液体培养基中, 震荡培养18 h。参照Miriam等[4]的方法将震荡培养后的菌液用LB液体培养基1:100稀释, 培养3 h, 再1:500稀释, 培养6 h, 每隔30 min测量1次 A_{600} 值, 以时间 (h) 为横轴、 A_{600} 值为纵轴绘图比较诱导前后金黄色葡萄球菌倍增时间的变化。

6. 抗菌药物敏感试验: 采用K-B纸片扩散法进行检测, 挑取培养18~24 h的单个菌落, 稀释至0.5麦氏浊度, 用棉拭子涂布整个MH培养基表面, 贴抗菌药物纸片, 放入35 $^{\circ}$ C恒温箱中, 孵育18~24 h, 所有菌株严格按照CLSI2010年标准, 判断及记录结果。

结 果

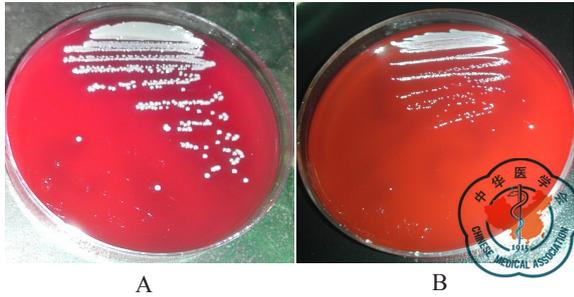
一、体外耐药性诱导结果

10株金黄色葡萄球菌经利奈唑胺长期体外诱导后, 除1株MSSA (Sa4) 外, 其余9株均获得了耐药性, 但诱导代数远高于其他文献报道[5], 培养50代左右才初始耐药 (MIC ≥ 8 mg/L), 最高培养至107代停止生长, 具体耐药结果见表1。其中临床分离金黄色葡萄球菌Sa10经诱导后MIC值增高最显著, 增加了64倍, 为128 mg/L; 质控菌ATCC25923 (Sa1) 经诱导后MIC值亦增高了16倍 (64 mg/L); Sa8诱导后MIC值最低 (8 mg/L), 其余诱导后金黄色葡萄球菌的MIC值均为16 mg/L。在体外诱导过程中还发现, 耐药株的菌落较小, 大小仅为0.3~0.5 mm, 继续培养至36 h, 菌落大小才达到0.4~1.0 mm, 而敏感株菌落大小可达到2~4 mm; 且耐药株菌落周围形成的溶血环也较小, 溶血现象明显减弱; 疑似形成小菌落突变株, 见图1。

表1 利奈唑胺体外诱导金黄色葡萄球菌耐药结果

菌株	药敏试验 (MIC mg/L)		诱导代数*
	诱导前	诱导后	
MSSA			
Sa2	4 (S)	16 (R)	78
Sa3	4 (S)	16 (R)	69
Sa5	2 (S)	16 (R)	72
Sa6	4 (S)	16 (R)	72
ATCC25923 (Sa1)	4 (S)	64 (R)	107
MRSA			
Sa7	4 (S)	16 (R)	61
Sa8	2 (S)	8 (R)	62
Sa9	4 (S)	16 (R)	69
Sa10	2 (S)	128 (R)	107

注: *指菌株诱导生长的终末代数



注: A: 诱导前的原始金黄色葡萄球菌; B: 诱导成功的利奈唑胺耐药金黄色葡萄球菌

图1 利奈唑胺体外诱导耐药前后金黄色葡萄球菌的菌落形态

二、耐药稳定性检测

上述菌株经诱导耐药后, 在无药培养基上传代培养90 d后仍具有耐药性, 表明采用利奈唑胺MIC 2倍增加的培养方法对金黄色葡萄球菌进行体外诱导所获得的耐药性稳定。

三、PCR产物测序结果

诱导前后的金黄色葡萄球菌全部扩增出419 bp的基因片段, 是金黄色葡萄球菌23S rRNA的V区域中第2280~2699 bp基因片段, 琼脂糖凝胶电泳呈现均一条带且与目的片段大小相等。对PCR产物进行测序, 与NCBI Blast中已知的金黄色葡萄球菌23S rRNA基因序列(X68425.1)比对, 结果示诱导前的全部金黄色葡萄球菌未发生突变; 诱导后菌株S1

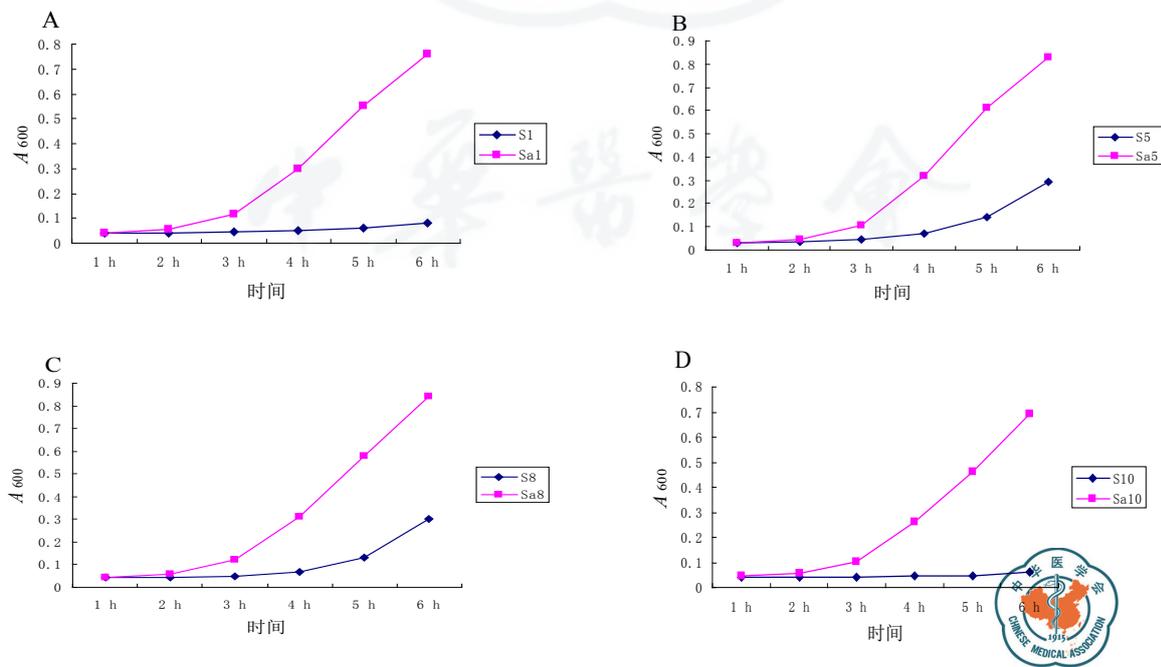
(A2531T)、S3 (A2289G)、S5 (A2289G)、S9 (C2691T、A2289G)、S10 (C2474A、A2289G) 均出现了点突变, 且第2289位点的突变发生率最高(4/5); 诱导后金黄色葡萄球菌S2、S6、S7和S8未发生突变。

四、诱导前后金黄色葡萄球菌适应性的变化

倍增时间是指细菌繁殖一代即个体数目增加一倍的时间, 细菌生长越快, 倍增时间越短。通过测定细菌对数期内不同时间的细菌数量绘图, 即可获得倍增时间曲线图, 从而反映出细菌适应其生长、繁殖环境条件的能力, 即细菌的适应性^[6]。诱导前敏感菌株(Sa1、Sa5、Sa8、Sa10)的生长速率明显高于诱导后耐药菌株(S1、S5、S8、S10), 敏感菌的倍增时间也远低于耐药菌; 且菌株MIC值越高, 生长越缓慢, 倍增时间越长, 见图2。重复本实验所得结果相近。

五、利奈唑胺诱导后金黄色葡萄球菌的药敏结果变化

10株金黄色葡萄球菌经利奈唑胺长期诱导后, 其中9株出现对利奈唑胺的耐药性, 并且对其他抗生素的耐药性也发生了变化, 特别是4株MSSA, 诱导后对所检测的大部分抗菌药物耐药性消失, 质控菌株ATCC25923和4株MRSA诱导前后对14种抗菌药物的耐药性几乎无变化, 仅S9诱导后对3种大环内酯类药物的耐药性消失, 见表2。



注: A~D分别以金黄色葡萄球菌S1与Sa1、S5与Sa5、S8与Sa8、S10与Sa10在不同时间测得A₆₀₀值所绘的曲线图, 比较诱导前后金黄色葡萄球菌倍增时间的变化

图2 诱导前后金黄色葡萄球菌的倍增时间曲线图

表2 利奈唑胺诱导前后的金黄色葡萄球菌对14种抗菌药物药敏结果比较

抗菌药物	S1		S2		S3		S5		S6		S7		S8		S9		S10	
	诱导前	诱导后																
红霉素	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
阿奇霉素	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
克拉霉素	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
万古霉素	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
替考拉宁	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢西丁	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
苯唑西林	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
青霉素G	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
利福平	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
米诺环素	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
庆大霉素	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
克林霉素	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
氯霉素	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
利奈唑胺	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R

注: R: 耐药; S: 敏感

讨 论

利奈唑胺属于新型恶唑烷酮类抗菌药物, 并且是当前此类中唯一应用于临床的药物^[1]。本药与细菌23S rRNA的V结构区结合, 阻止70S起始复合物的形成, 进而阻断细菌蛋白质的合成。以往的抗菌药物均未将此阶段作为抑制细菌蛋白合成的靶位, 故利奈唑胺不易与其他抑制蛋白合成的抗菌药物发生交叉耐药性。利奈唑胺是一种化学全合成抗菌药物, 在自然界不存在天然耐药现象。最初, 研究人员认为全新的分子结构和独特的作用机制使其不会很快产生耐药性, 但利奈唑胺用于临床后的较短时间内就在全球范围内相继分离出临床耐药株, 尽管至今发现的数量并不多, 但该类药物的耐药性出现之快仍引起人们的高度关注。金黄色葡萄球菌对利奈唑胺的耐药机制主要包括23S rRNA基因位点突变、核糖体蛋白L3及L4突变、cfr基因介导耐药。其中23S rRNA基因的V结构区是利奈唑胺的结合位点, 该区基因的点突变直接导致这个靶位的改变, 降低与利奈唑胺的亲合力, 从而发生耐药, 这是迄今为止最常见且报道最多的耐药机制。*rplC*和*rplD*基因分别编码核糖体蛋白L3、L4, 其发生突变也可引起耐药^[7]。cfr基因即氯霉素-氟氯尼考耐药基因(chloramphenicol-florfenicol resistant gene, cfr), 最初分离自松鼠葡萄球菌, 编码一种甲基转移酶, 使23S rRNA分子2503位腺苷酸的第8位碳原子甲基化, 降低利奈唑胺与50S核糖体亚单位的结合, 从而导致耐药; 而且该基因由质粒携带, 可在葡萄球菌中水平传播, 引起医院内感染暴发^[8]; 还有报道^[9]称, 在临床分离的利奈唑胺耐药金黄色葡萄球菌中发现cfr基因可与利奈唑胺的其他耐药机制(靶位突

变)同时存在, 并且相互协调。

本研究结果显示, 9株临床分离金黄色葡萄球菌及质控菌株ATCC25923经过体外利奈唑胺诱导后, 除1株未出现耐药性, 其余菌株的MIC值均明显增高, 最高达到128 mg/L, 并经无药平皿连续传代培养证实耐药性稳定。本研究中金黄色葡萄球菌是经过体外长时间(> 50代)在抗菌药物的压力下才开始出现耐药性, 提示金黄色葡萄球菌虽然可以对利奈唑胺产生继发耐药, 但需要经过长时间的利奈唑胺作用; 与肠球菌相比, 金黄色葡萄球菌对利奈唑胺的耐药性更难诱导^[5]。国外研究发现, 耐利奈唑胺金黄色葡萄球菌临床株几乎均分离自长期使用利奈唑胺的患者, 分离率也远低于肠球菌^[1]。23S rRNA基因第2576位是第一个被发现, 也是最常见的突变点, 而且此突变可在23S rRNA分子的单拷贝基因中发生, 也可在基因的多个拷贝中发生^[10]。此外, 23S rRNA基因中的其他位置也可出现突变, 如T2500A、G2447T、T2504C、C2534T、G2766T等, 但是到目前为止, 仅有G2576T和T2500A在利奈唑胺耐药金黄色葡萄球菌临床株中发现^[11], 其他突变均发现于实验室诱导菌株。体外实验诱导出的9株耐药菌中有5株发生了突变, 而且第2289位的碱基突变(A2289G)发生率最高(4/5), 关于突变点国外鲜有报道。为排除PCR过程中碱基错配所致的非特异性基因突变, 此部分进行了重复试验, 显示2次扩增及测序结果一致。这些新突变位点的出现是否与抗生素的使用习惯、频率不同以及不同地区菌株间的遗传差异性有关, 还有待进一步研究验证。由于本次实验所用引物并未扩增出V区的全部序列, 因此对于诱导后表现出耐药性但无突变点的4株金黄色葡萄球菌, 推测其耐药性的产生可能由扩增区域外的基因突变所致, 或者是存在其他耐药

机制的参与。

小菌落突变株 (small colony variants, SCVs) 是一种具有独特表型及致病特征且生长缓慢的细菌亚群, 可见于多数的细菌种属中, 目前研究最为广泛的是金黄色葡萄球菌小菌落突变株。SCVs临床分离株分为电子传递缺陷型和胸腺嘧啶依赖型, 典型特征是菌落大小仅有野生株的1/10左右^[12]。此外, 还具有生长率低、溶血能力和凝固酶活性降低、色素生成减少等异常的生化特性, 可在人和动物体内持续存在, 进而导致隐性或复发性感染。本实验利奈唑胺耐药后菌株的性状改变即有部分上述特点, 可能是在诱导过程中为适应耐药环境而形成了SCVs, 具体机制还需进一步研究, 但金黄色葡萄球菌的这种改变增加了细菌鉴定的难度。

细菌发生突变导致产生耐药性的同时, 还可以引起耐药菌生存力、稳定性、毒力下降等^[13], 即产生适应性代价。在无药物压力条件下进行实验发现, 诱导后的耐药金黄色葡萄球菌生长缓慢, 倍增时间延长; 而且倍增时间曲线图也表明耐药菌株的MIC值与其生长速率呈负相关, 即细菌获得的耐药性越强, 生长越缓慢, 付出的适应性代价越高。细菌的竞争优势来源于对环境的适应。因此, 在抗菌药物选择压力下, 耐药菌存活, 敏感菌被淘汰; 在无药环境时, 敏感菌则表现出生长优势, 耐药株的适应性反而较敏感株低。然而当前细菌耐药情况的愈发严重同时也表明, 无药环境中的耐药菌可能已通过其他代偿方式重新获得了竞争力, 如第2位点突变^[14]。

在利奈唑胺的体外长期诱导下, 部分耐药菌对其他抗菌药物耐药性也发生了显著变化。经利奈唑胺诱导耐药后, 对其他抗菌药物的药敏结果大多由耐药转为敏感, 初步考虑可能是由于菌株经过了长期数十次传代所致的耐药性丢失, 或是如文献^[11]报道, 与小菌落突变株有关, 但确切原因还需增加检测菌株数量找出其耐药性变化规律并加以分析判断。

综上所述, 利奈唑胺体外可诱导金黄色葡萄球菌耐药性产生且耐药性稳定, 耐药株生长速率较敏感株降低, 金黄色葡萄球菌23S rRNA的V区突变位点可能与上述菌株对利奈唑胺耐药性的产生有关。

参考文献

- Biedenbach DJ, Farrell DJ, Mendes RE, et al. Stability of linezolid activity in an era of mobile oxazolidinone resistance determinants: results from the 2009 Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 68(4): 459-467.
- 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.
- Rohrer S, Tschierske M, Zbinden R, et al. Improved methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001, 20(4): 267-270.
- Ender M, McCallum N, Adhikari R, et al. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(6): 2295-2297.
- 席瑞, 田素飞, 褚云卓, 等. 利奈唑胺体外诱导肠球菌耐药及耐药机制研究. *中国感染与化疗杂志*, 2011, 11(1): 22-26.
- Laurent F, Lelievre H, Cornu M, et al. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47(3): 277-283.
- 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.
- 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.
- Locke JB, Morales G, Hilgers M, et al. Elevated linezolid resistance in clinical cfr-positive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with co-occurring mutations in ribosomal protein L3. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(12): 5352-5355.
- Ikeda-Dantsuji Y, Hideaki H, Sakai F, et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. *J Infect Chemother*, 2011, 17(1): 45-51.
- Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12): 5265-5274.
- Seaman PF, Ochs D, Day MJ. Small-colony variants: a novel mechanism for triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(1): 43-50.
- Maher MC, Alemayehu W, Lakew T, et al. The fitness cost of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: insight from the field. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e29407.
- Lofmark S, Jernberg C, Billstrom H, et al. Restored fitness leads to long-term persistence of resistant bacteroides strains in the human intestine. *Anaerobe*, 2008, 14(3): 157-160.

(收稿日期: 2013-06-15)

(本文编辑: 李卓)

李艳芬, 王俊, 王淑香, 等. 利奈唑胺体外诱导金黄色葡萄球菌耐药的实验研究 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7(5): 694-698.