

利奈唑胺体外诱导粪肠球菌中介耐药及机制研究

郑金鑫, 马桂红, 潘伟光, 李多云, 陈重, 刘晓军, 邓启文, 余治健*

摘要:目的 研究利奈唑胺对粪肠球菌中介耐药的体外诱导作用并探讨其耐药机制。方法 采用多步诱导法对4株临床分离粪肠球菌以及质控菌株进行体外诱导耐药试验, 采用琼脂平皿二倍稀释法测定诱导前后的MIC值, 采用PCR测序法检测粪肠球菌4个23S rRNA V区基因的变异。结果 4株临床分离粪肠球菌和质控菌株均诱导出中介株和稳定耐药株, 在中介株和耐药株中均检测到了G2576U、G2505A和C2424U变异, 2株中介株和耐药株还同时存在G2576U和C2424U变异。结论 利奈唑胺可体外诱导粪肠球菌产生中介株和稳定性耐药株, 粪肠球菌中介株即可出现23S rRNA V区基因变异。

关键词:粪肠球菌; 利奈唑胺; 体外诱导; 耐药; 中介; 变异;

中图分类号: R978.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2013)7-797-03

Intermediate resistance of *Enterococcus faecalis* induced by linezolid in vitro and the mechanism. ZHENG Jin-xin, MA Gui-hong, Pan Wei-guang, et al. (Department of Infectious Diseases, Affiliated Nanshan People's Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518000, Guangdong, P.R. China; Corresponding author: YU Zhi-jian, Email: yuzhijiansmu@163.com)

Abstract: Objective To explore the in vitro linezolid-induced intermediate resistance of *Enterococcus faecalis* and its mechanism. **Methods** Multi-step in vitro induction by using linezolid was conducted with 4 *Enterococcus faecalis* isolates and 1 reference strain. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by agar dilution method. And the variations of 23S rRNA V region gene of *Enterococcus faecalis* were detected by PCR sequencing. **Results** The intermediate-resistant strains from 4 *Enterococcus faecalis* isolates and 1 reference isolate were successfully induced. The G2576U, G2505A and C2424U mutations were detected in the intermediate-resistant strains. The G2576U and C2424U mutations were both detected in 2 intermediary and resistant strains. **Conclusion** Linezolid can induce intermediate resistance in *Enterococcus faecalis* in vitro, 23S rRNA V region gene mutations can be detected in the intermediate-resistant strains of *Enterococcus faecalis*.

Key words: *Enterococcus faecalis*; Linezolid; Induction in vitro; Resistance; Intermediary; variations

利奈唑胺(linezolid, LNZ)是第一个应用于临床的新型唑烷酮类抗生素, 目前该药已成为治疗万古霉素耐药肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococci*, VRE)感染和控制VRE医院感染暴发流行的主要药物之一^[1-3]。但是随着LNZ在临床的应用, 其耐药问题也逐渐出现, 目前对其耐药机制的研究也成为热点问题之一。既往大量研究表明LNZ耐药变异主要位于细菌的23S rRNA V区基因, 特别是G2576U和G2447U变异最为常见, 其它如C2512U、G2513U、C2610G、G2505A等位点突变也与耐药的发生密切相关^[4-7]。但目前国内关于LNZ耐药变异的研究还少有报道, 特别是中介耐药及其相关机制研究更鲜有报道。本研究通过多步诱导法对4株临床分离粪肠球菌以及质控菌株进行体外诱导中介耐药, 分别测定诱导前后粪肠球菌对利奈唑胺的MIC值, 并检测细菌23S rRNA V区基因的变异情况, 探讨粪肠球菌对利奈唑胺的中介耐药机制。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源、鉴定及药敏试验 4株临床分离粪肠球菌来自深圳市南山区人民医院2012年3月至2012年5月住院患者的各类培养标本, 均为不重复菌株。菌株鉴定采用VITEK2-compact全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司)。以粪肠球菌ATCC 29212作为质控菌株。药敏试验采用2009年CLSI标准推荐的琼脂平皿二倍稀释法进行操作及判读结果, 同时测定ATCC29212的MIC值进行质控。

1.2 多步法诱导耐药试验 按参考文献方法进行体外多步法诱导耐药试验^[8]。简述如下: 先用琼脂二倍稀释法检测每株粪肠球菌的MIC值, 然后将粪肠球菌依次接种在利奈唑胺浓度成倍增加的MH琼脂培养基中, 初始浓度为1/4MIC, 每个药物浓度培养3~5代, 细菌生长不良时降低药物浓度重复传代培养, 每个药物浓度最多培养10代。在接种含药平皿的同时接种无药平皿进行同期培养, 观察细菌生长情况。对诱导

基金项目: 深圳市医学临床重点专科经费资助

作者单位: 广东医学院附属深圳市南山区人民医院感染疾病科, 广东 深圳 518000

作者简介: 郑金鑫(1982~), 男, 湖北丹江口, 汉族, 博士, 主治医师, 主要从事HBV和细菌变异相关方面研究。

*通讯作者: E-mail: yuzhijiansmu@163.com

出的耐药菌株行琼脂二倍稀释法检测 MIC 值,比较诱导前后菌株 MIC 值变化情况。为保证诱导耐药菌株的稳定性,在检测 MIC 值前,在无抗生素培养基中培养 3 代。

1.3 23S rRNA V 区基因变异检测 按参考文献方法对粪肠球菌 4 个拷贝 23S rRNA V 区基因进行 PCR 扩增和测序分析^[9]。扩增的 4 个拷贝的 23S rRNA V 区送华大基因测序,序列与标准株 *Enterococcus faecalis* V538 (Genebank 号: NC_004668.1) 进行比对,进行变异分析。

2 结果

2.1 MIC 值测定结果 上述 4 株临床分离粪肠球菌以及质控菌株,在经过体外多步法诱导耐药后, MIC 值均有明显提高,各株细菌的诱导代数以及 MIC 值变化情况见表 1。依据 2009 年 CLSI 标准,肠球菌对利奈唑胺的 MIC 值 ≤2mg/L 为敏感(S), MIC 值 =4mg/L 为中介(I), MIC 值 ≥8mg/L 为耐药(R)。本研究 4 株临床

分离菌株均为敏感株。质控菌株粪肠球菌 ATCC 29212 MIC 值为 1mg/L,符合 CLSI 标准(1~4mg/L)。但经过体外多步法诱导耐药后,4 株临床分离粪肠球菌和质控菌株 MIC 值逐步升高,由敏感到中介,直到产生稳定耐药株,见表 1。

2.2 变异检测结果 23S rRNA V 区基因变异检测结果详见表 1。在开始体外诱导前,4 株临床分离粪肠球菌均为敏感株,其 23S rRNA V 区基因未检测到变异。随着体外多步法诱导耐药后,中介株里分别检测到了 G2576U、G2505A 和 C2424U 变异,并且在两株中介株里检测到同时存在 G2576U 和 C2424U 变异。但 1 株临床分离粪肠球菌和质控菌株诱导为中介株后,并没有检测到 23S rRNA V 区基因变异。随着体外多步法诱导耐药出现稳定耐药株后,中介株的 G2576U、G2505A 和 C2424U 变异仍存在耐药株中。另外,未检测到变异的 2 株中介株,在诱导为稳定耐药株后也检测到了 G2576U 变异。

表 1 23Sr RNA V 区变异检测结果
Table 1 Mutations in the domain V of 23S rRNA of *Enterococcus faecalis*

菌株 Strains	最低抑菌浓度值 MIC value	培养传代数 Passages	23S rRNA V 的变异 Mutations in Domain V of 4 copies of 23S rRNA				比例 Ratio
			1	2	3	4	
F1-0	0.50	0	W	W	W	W	0/4
F1-1	6.00	6	C2424U	W	W	G2576U	2/4
F1-2	12.00	12	C2424U	W	W	G2576U	2/4
F4-0	0.25	0	W	W	W	W	0/4
F4-1	4.00	5	W	W	G2505A	W	1/4
F4-2	12.00	14	W	W	G2505A	W	1/4
110303-0	1.00	0	W	W	W	W	0/4
110303-1	6.00	7	C2424U	W	W	G2576U	2/4
110303-2	12.00	14	C2424U	W	W	G2576U	2/4
111012-0	1.00	0	W	W	W	W	0/4
111012-1	4.00	5	W	W	W	W	0/4
111012-2	8.00	12	W	W	W	G2576U	1/4
ATCC 29212-0	1.00	0	W	W	W	W	0/4
ATCC 29212-1	4.00	7	W	W	W	W	0/4
ATCC 29212-2	12.00	12	W	W	W	G2576U	1/4

注: W: wildtype (野生型)

3 讨论

利奈唑胺(linezolid, LNZ) 主要通过抑制细菌 70 s 初始复合物的形成而阻止细菌蛋白的合成^[10]。这种独特的作用机制减少了与其他抑制蛋白合成的抗生素,如 CHL、克林霉素和大环内酯类抗生素等对革兰氏阳性菌的交叉耐药,对医院获得性的主要革兰氏阳性菌均有抗菌活性,对多重耐药菌株也具有良好的抑菌活性。但近些年随着越来越广泛的临床应用,细菌耐药也逐渐成为一个严重问题。本研究通过体外多步法诱导耐药试验,4 株临床分离粪肠球菌和质控菌

株的 MIC 值逐步升高,并出现了稳定耐药株,这些提示粪肠球菌在药物压力下容易对利奈唑胺产生耐药。

既往研究也提示,肠球菌在体外接收利奈唑胺压力下,容易产生耐药变异,且变异主要出现在细菌的 23S rRNA V 区基因,特别是与 G2576U 变异有密切关系^[4, 8, 11]。G2576U 变异位点正好位于 23S rRNA 基因可变区(V 区)的中心,正是这个靶位的改变,导致对细菌核糖体的亲和力下降,从而产生对肠球菌的耐药。本研究在耐药株中也发现了 G2576U 变异,还同时检测到了 G2505A 和 C2424U 变异,这和之前研究结

论相似。但本研究在中介株中也检测到了G2576U、G2505A和C2424U变异。编码粪肠球菌23S rRNA基因包含4个相同基因片段(拷贝),之前研究已发现在耐药菌株23S rRNA基因中,大多已出现了2个拷贝以上的基因发生了G2576U变异^[11]。本研究中介株和耐药株23S rRNA基因中只有1个拷贝发现了G2576U变异。LNZ耐药的产生是一个缓慢过程,之前体外研究提示获得高水平LNZ耐药性需要长时间暴露于治疗浓度,除了23S rRNA基因变异外,可能需要其他多种蛋白(包括核糖体蛋白)的共同参与^[12]。目前LNZ的其他耐药机制还需要进一步研究证实。

利奈唑胺是新型的唑烷酮类抗生素,目前肠球菌的耐药现象日益严重,利奈唑胺被认为是治疗耐万古霉素肠球菌感染的理想药物^[13]。但随着临床耐药菌的不断出现,明确细菌对LNZ耐药的详细机制已变得十分迫切和重要。本研究已在中介株中发现了23S rRNA基因变异,这已经在提示我们要密切关注利奈唑胺的MIC值的变化,防止不当使用和过度使用,尽量延长利奈唑胺的临床使用周期。

参考文献:

- [1] Moellering RC. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial[J]. Ann Intern Med, 2003, 138(2): 135-142.
- [2] Chen Z, Zhang XY, Huang YP, et al. Factors associated with the infection, control of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. China Trop med, 2009, 9(7): 1332-1333. (In Chinese)
(陈忠, 张小云, 黄云平, 等. 院内耐甲氧西林金黄色葡萄球菌爆发感染控制分析[J]. 中国热带医学, 2009, 9(7): 1332-1333.)
- [3] Rui YY, Wang Q, Qiu YR. Analysis of drug resistance and risk factors of pathogens isolated from midstream voided urine from cases with urine tract infection [J]. China Trop Med, 2010, 10(1): 40-42. (In Chinese)
(芮勇宇, 王前, 裴宇容. 泌尿系感染患者中段尿中病原菌耐药性及感染危险因素[J]. 中国热带医学, 2010, 10(1): 40-42.)
- [4] Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J et al. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7): 2154-2156.
- [5] Sander P, Belova L, Kidan YG, Pfister P, Mankin AS, Böttger EC. Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations[J]. Mol Microbiol, 2002, 46(5): 1295-1304.
- [6] Dandache P, Moise PA, Orsini J, Montecalvo M, Sakoulas G. Reduced biofilm production associated with increasing linezolid MICs among linezolid-resistant staphylococci[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(5): 1114-1115.
- [7] Allen GP, Bierman BC. In vitro analysis of resistance selection by linezolid in vancomycin-susceptible and -resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(1): 21-24.
- [8] Xi R, Tian SF, Chu YZ, et al. Linezolid induces resistance in *Enterococcus* in vitro and the mechanism[J]. Chin J Infect Chemother, 2011, 11(1): 22-26. (In Chinese)
(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[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(1): 22-26.)
- [9] Bourgeois-Nicolaos N, Massias L, Couson B, Butel MJ, Andreumont A, Doucet-Populaire F. Dose dependence of emergence of resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* in vivo[J]. J Infect Dis, 2007, 195(10): 1480-1488.
- [10] Shinabarger DL, Marotti KR, Murray RW et al. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(10): 2132-2136.
- [11] Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(10): 3334-3336.
- [12] Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(2): 603-612.
- [13] Yang XQ, Wu JQ, Wu GD. Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to commonly used antibiotics [J]. China Trop Med, 2011, 11(4): 438-439. (In Chinese)
(杨小清, 吴金庆, 伍国达. 382株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 中国热带医学, 2011, 11(4): 438-439.)

收稿日期: 2013-02-24 编辑: 符式刚