DOI:10.16016/j.1000-5404.201508118

利奈唑胺体外诱导粪肠球菌 V 区突变及耐药相关性研究

高 睿,张美兰,杜 丽,蒲清泉,夏 云 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院检验科)

[摘要] **目的** 观察利奈唑胺是否能在体外诱导肠球菌产生高水平耐药,同时探索其耐药机制与 23S rRNA 的 V 区突变的关系,以及突变的基因拷贝数是否与耐药程度(MIC 值)相关。**方法** 5 株耐药机制未明的利奈唑胺低水平耐药粪肠球菌(MIC:4 ~ 16 μg/mL)持续给予利奈唑胺进行体外诱导,观察其耐药水平变化;采用 PCR 技术扩增诱导菌和 ATCC 29212 的 23S rRNA 的 V 区片段以及编码核糖体蛋白 L3、L4 基因片段,分析有无 V 区和 L3、L4 突变及 V 区突变拷贝数。**结果** 通过利奈唑胺持续诱导,5 株耐药菌的 MIC 值较原菌株获得 8 ~ 32 倍增加,最高 MIC 值超过 256 mg/L;其中有 3 株菌 23S rRNA 的 V583 区发生 G2576T 突变,其余 2 株菌未发现 V 区突变;所有诱导菌未发现 L3、L4 核糖体蛋白氨基酸改变。**结论** 利奈唑胺在体外可诱导粪肠球菌 MIC 值迅速增加,其 V 区 G2576T 突变与高水平耐药密切相关,且突变拷贝数量与 MIC 值增高呈正相关。

[关键词] 利奈唑胺;粪肠球菌;23S 核糖体 RNA 基因;基因突变
[中图法分类号] R378.1;R394.3;R915 [文献标志码] A

In vitro investigation on linezolid resistance-associated mutation in domain V region of *Enterococcus faecalis*

Gao Rui, Zhang Meilan, Du Li, Pu Qingquan, Xia Yun (Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate high-level linezolid resistance-associated mutation and copy number of mutation gene in domain V region of 23S rRNA through inducing *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) with linezolid *in vitro*. **Methods** The linezolid resistance was assessed in 5 strains of *E. faecalis* that had minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 4 μg/mL to 16 μg/mL and were induced with linezolid *in vitro*. After induction with linezolid, PCR and DNA sequencing were used to detect the mutations in 23S rRNA gene and genes encoding L3 and L4 ribosomal proteins in the induced strains and control strain *E. faecalis* ATCC29212. The copy number of the mutation gene was determined by DNA sequencing. **Results** After serial passages in the presence of linezolid *in vitro*, the MIC of the 5 strains were successfully increased by 8 to 32 times, and the maximum MIC was more than 256 μg/mL. The G2576T mutation was detected in 3 strains, while all possible mutations were not found in the domain V region of 23S rRNA gene in the other 2 strains. There were no mutations in the genes encoding L3 and L4 proteins in the strains. **Conclusion** Linezolid can rapidly induce the MIC increase in *E. faecalis in vitro*, and the principal mechanism may be associated with G2576T mutation in the domain V region of 23S rRNA gene. The copy number of mutation is positively correlated with MIC elevation.

[**Key words**] linezolid; *Enterococcus faecalis*; 23S rRNA; gene mutation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81572055). Corresponding author: Xia Yun, E-mail: xiayun12cn@aliyun.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81572055)
[通信作者] 夏 云,E-mail:xiayun12cn@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151207.1701.017.html(2015-12-07)

利奈唑胺作为第1个恶唑烷酮类抗生素,能与细菌核糖体23S rRNA结合,阻止翻译起始物的形成,对革兰阳性球菌引起的感染,包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)和耐万古霉素肠球菌(vancomycine resistant *enterococci*,VRE)具有良好的抗菌活性。迄今为止,已明确的肠球菌利奈唑胺耐药机制包括23S rRNA的V区突变,L3、L4核糖体蛋白氨基酸突变以及位于质粒,可使核糖体发生甲基化的多重耐药*cfr*基因介导的耐药[1]。其中23S rRNA的V区G2576T突变为最常见的耐药相关突变,且耐药程度与突变拷贝数有关[2]。然而,近年来国内外均有文献报道有部分肠球菌对利奈唑胺呈现低水平耐药表型[最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,MIC)4~16 μg/mL],并缺乏上述已知的耐药机制[3-5]。此部分肠球菌的MIC值是否能在利奈唑胺压力下增加,以及利奈唑胺压力是否能使其V区发生突变目前少见相关报道。

本研究利用临床分离的5株耐药机制未明的利奈唑胺耐药粪肠球菌(MIC 4~16 μg/mL),持续给予利奈唑胺进行体外诱导,观察其MIC值在抗生素压力下的变化,同时分析其耐药改变与23S rRNA的V区突变的联系,探讨利奈唑胺耐药肠球菌的相关耐药机制。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

从2011年8月至2013年11月,收集从重庆医科大学附属第一医院检验科临床标本分离的5株利奈唑胺耐药粪肠球菌,经Vitek 2 Compact全自动细菌鉴定和药敏检测系统进行菌种鉴定和药敏实验,纸片扩散法和微量肉汤稀释法测定利奈唑胺药敏结果。ATCC 29212(MIC 2 μg/mL)为本室保存。菌株经分离后纯培养,采用纸片法冷冻保存于-80 ℃。

采用PCR方法扩增5株菌的相关耐药基因,包括23S rRNA的V区基因,编码L3、L4核糖体蛋白基因及多重耐药*cfr*基因[6-7]。扩增片段经测序后与标准野生株ATCC 29212基因序列进行对比分析。经检测,5株耐药菌与标准野生菌的23S rRNA的V区核酸以及L3、L4核糖体蛋白氨基酸序列一致,未检出*cfr*基因,表明5株菌不存在任何已知的利奈唑胺耐药机制。菌株基本情况见表1。

1.2 仪器与试剂

PCR扩增仪、凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司),细菌基因组DNA提取试剂盒(北京天根公司),质粒提取试剂盒(德国Qiagen公司),Mueller Hinton Broth(MHB)培养基、脑心浸液肉汤(Brain Heart Infusion,BHI)培养基(青岛日水生物公司),MH琼脂平板、血平板(郑州安图公司),利奈唑胺(美国Pfizer公司),利奈唑胺药敏纸片(英国Oxoid公司),利奈唑胺E-test试条(法国bioMérieux公司),*Bfa* Ⅰ限制性内切酶(美国New England Biolabs公司)。

表1 5株利奈唑胺耐药粪肠球菌的基本信息

细菌编号	标本类型	分离病区	利奈唑胺MIC(μg/mL)
N0551	尿	泌尿外科	8
P4992	引流液	肝胆外科	8
N4289	尿	妇科	16
N2504	尿	妇科	16
N8774	尿	泌尿外科	8

1.3 利奈唑胺体外诱导实验

5株耐药菌经复苏后调制0.5麦氏单位接种于MH琼脂平板,贴利奈唑胺药敏纸片37 ℃孵育16~20 h,刮取纸片边缘细菌重新接种于新鲜MH琼脂平板并重复以上步骤。实验过程中采用利奈唑胺E-test试条检测细菌利奈唑胺MIC值变化。为检测诱导耐药的稳定性,诱导完成后细菌接种于无抗生素血平板传代10次,再次用E-test试条测定其利奈唑胺MIC值有无变化。

1.4 诱导菌23S rRNA的V区突变及L3、L4核糖体蛋白氨基酸突变分析

将诱导完成后的细菌接种至血平板,37 ℃孵育16~20 h。挑取单个菌落接种于BHI肉汤,增菌后按照细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌基因组DNA,通过PCR扩增及测序方法检测23S rRNA的V区突变和L3、L4核糖体蛋白氨基酸突变。为进一步证实G2576T突变的发生,当23S rRNA的V区发生G2576T突变后,会产生新的酶切位点(C↓UAG)[8]。利用PCR扩增诱导菌V区片段(429 bp)进行切胶纯化,纯化产物经酶切后将分别产生2个新的酶切片段(335 bp和94 bp)。取10 μL PCR纯化产物,1 μL *Bfa* Ⅰ限制性内切酶,2 μL酶切反应液,7 μL无菌纯水,总体系20 μL 37 ℃过夜,最后取5 μL酶切产物采用30 mg/mL琼脂糖电泳检测目的条带。

1.5 23S rRNA的V区G2576T突变拷贝分析

粪肠球菌含有4条不同的23S rRNA基因拷贝(*rrlA*~*rrlD*)[9]。将经测序及酶切证实含有G2576T突变的诱导菌利用PCR分别扩增4条不同的23S rRNA

基因拷贝,所用引物包括 1 条通用上游引物 5′-GGCGCTGGTGGGATACTA-3′和 4 条不同的下游引物 *rrlA*:5′-GGACGGTTATGAGCCGTC-3′, *rrlB*:5′-GCGATCTCCTGCGTGAC-3′, *rrlC*:5′-CCCTTCTTCAAGCTTATC-3′和 *rrlD*:5′-CCACAGTGATTTTGCCCA-3′。随后将上述扩增产物切胶纯化回收,再次利用 PCR 技术扩增上述片段中所包含的 V583 区域,扩增产物经纯化后双向测序,与标准野生株进行序列对比分析。

2　结果

2.1　利奈唑胺诱导结果

经过利奈唑胺多步体外诱导后,5 株利奈唑胺耐药菌 MIC 值显著增高。其中有 2 株菌初始 MIC 值分别为 8 μg/mL 和 16 μg/mL,在经过 12、10 代传代后 E-test试条测定其 MIC 值超过 256 μg/mL;其余 3 株菌经不同代数诱导后最低利奈唑胺 MIC 值为 64 μg/mL。诱导基本情况见表 2。

表 2　利奈唑胺体外诱导耐药

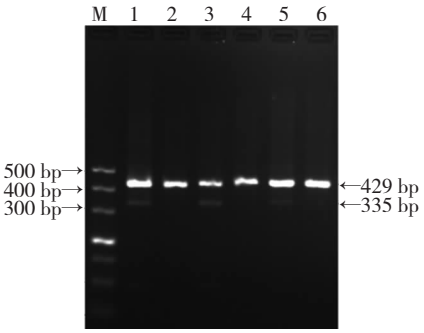
菌株编号	初始 MIC (μg/mL)	传代次数	诱导后 MIC (μg/mL)
N0551	8	12	>256
P4992	8	27	64
N4289	16	10	>256
N2504	16	31	96
N8774	8	17	192

2.2　诱导菌 V 区突变及耐药分析

通过 PCR 扩增和测序分析,结果显示 N551、N4289 以及 N8774 发生了 G2576T 突变,未发现 V 区其他位点突变。P4992 及 N2504 未发现 G2576T 及其他 23S rRNA 的 V 区突变。5 株诱导菌均未发现核糖体蛋白 L3、L4 氨基酸改变。*Bfa* Ⅰ酶切 G2576T 突变结果与测序结果一致,5 株诱导菌 G2576T 酶切结果见图 1。

2.3　诱导菌 G2576T 突变拷贝数变化结果

通过 PCR 分别扩增粪肠球菌 4 条不同的 23S rRNA 基因拷贝,测序分析 N551、N4289 以及 N8774 的 G2576T 突变的拷贝数。测序结果发现粪肠球菌 4 个 23S rRNA 基因拷贝(*rrl*A ~ *rrl*D)均可发生 G2576T 突变。5 株菌中 N0551 和 N4289 的 MIC 值超过 256 μg/mL,2 株菌除了在 *rrl*D 拷贝的 23S rRNA 基因发生了 1 个完整的 G2576T 突变,还分别在 *rrl*C 和 *rrl*A 的 23S rRNA 基因存在野生型及突变型混合的现象,测序图显示为 G/T 完全重叠混合双峰。而 MIC 为 192 μg/mL 的 N8774 诱导菌仅在 *rrl*B 的 23S rRNA 基因发生了 G2576T 突变。测序结果见图 2,突变拷贝数变化见表 3。



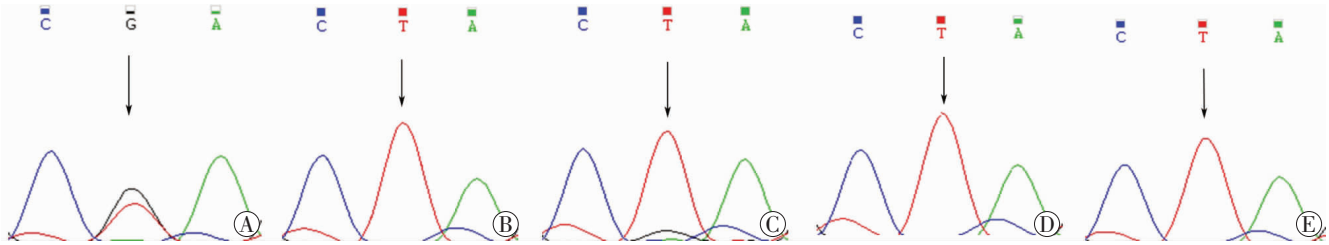
M:标准;1 ~ 6:分别为诱导后 N551、P4992、N4289、N2504、N8774 和 ATCC 29212;1、3、5:G2576T 突变株

图 1　粪肠球菌 23S rRNA 的 V 区扩增产物 *Bfa* Ⅰ酶切

表 3　诱导菌 G2576T 突变拷贝情况

菌株	利奈唑胺 MIC	23S rRNA 拷贝基因在 2 576 位置检测结果				G2576T 突变的总拷贝数目
		rrlA	*rrlB*	*rrlC*	*rrlD*	
N0551	>256 μg/mL	G	G	G/T	T	1.5/4
P4992	64 μg/mL	NT	NT	NT	NT	0/4
N4289	>256 μg/mL	G/T	G	G	T	1.5/4
N2504	96 μg/mL	NT	NT	NT	NT	0/4
N8774	192 μg/mL	G	T	G	G	1/4

NT:未测定



A:N0551 *rrlC* 的 2 576 位测定,G/T 混合双峰;B:N0551 *rrlD* 的 2576 位测定,T 单峰;C: N4289 *rrlA* 的 2576 位测定,G/T 混合双峰;D:N4289 *rrlA* 的 2576 位测定, T 单峰;E: N8774 *rrlB* 的 2576 位测定,T 单峰　↑:示细菌 23S rRNA 的 2576 位核苷酸

图 2　肠球菌 4 条 23S rRNA 基因拷贝 2576 位测序结果

3 讨论

近年来,肠球菌已成为医院获得性感染的主要病原菌之一,其耐药性也不断增加。利奈唑胺的主要抑菌机制是与肠球菌 23S rRNA 结合,通过抑制细菌蛋白合成而产生抑菌作用,其中 V583 区域的点突变可以直接导致利奈唑胺对核糖体的亲和力降低而形成细菌耐药。国内外常见的 V 区突变点报道包括了 G2576T、T2504C、G2505T 以及 C2610G 等点突变[1],且其中 G2576T 突变与利奈唑胺细菌耐药密切相关。然而近年来,多地区均有文献报道有部分肠球菌对利奈唑胺产生耐药却缺乏明确的耐药机制,其共同的特点是利奈唑胺 MIC 值均不超过 16 μg/mL[3-5]。

有体外诱导利奈唑胺敏感肠球菌显示随着利奈唑胺抗生素压力的增大,细菌利奈唑胺 MIC 值将增高并产生耐药,且耐药主要与 23S rRNA 的 V 区突变有关[10]。然而对于缺乏明确耐药机制,且 MIC 值不超过 16 μg/mL 的利奈唑胺耐药粪肠球菌是否会在利奈唑胺的持续作用下发生 MIC 值的改变,以及产生变化的耐药机制目前还缺乏深入的研究。

本研究通过体外诱导 5 株利奈唑胺耐药机制不明的耐药粪肠球菌(MIC 8~16 μg/mL),测定其 MIC 改变发现随着利奈唑胺抗生素压力的累积,耐药菌的 MIC 值迅速增加,所有诱导菌突破了原有的 8 μg/mL 和 16 μg/mL 耐药水平,且其中最高 MIC 值可超过 256 μg/mL。该结果提示长期、持续利奈唑胺作用可诱导低水平、耐药机制未明的粪肠球菌 MIC 值迅速增加,从而产生更高水平的耐药。

与此同时,随着细菌 MIC 值增加,诱导菌 23S rRNA 的 V 区耐药基因检测结果显示细菌在该域发生了 G2576T 突变。有研究表明,在肠球菌利奈唑胺耐药中,多个 23S rRNA 基因拷贝可在利奈唑胺压力下发生 V 区的突变。通过基因同源重组,突变型将不断替代野生型从而产生抗生素耐药,且细菌耐药程度与突变拷贝数目有关[11]。本研究通过分别扩增粪肠球菌 4 条不同的 23S rRNA 基因发现随着细菌利奈唑胺 MIC 值的升高,V 区 G2576T 突变拷贝数也在同步增加。MIC 值超过 256 μg/mL 的细菌比 MIC 值为 192 μg/mL 的细菌分别在 *rrl*A 以及 *rrl*C 拷贝多 1 条突变型和野生型混合的 23S rRNA 基因拷贝,显示为对抗抗生素压力,细菌正在突变以产生更高级更稳定的耐药。而更低 MIC 值细菌则未发现 G2576T 突变。表明利奈唑胺高水平耐药主要与 23S rRNA 基因 V 区 G2576T 突变相关,且突变拷贝数量与 MIC 值增高呈正相关。

利奈唑胺可结合到肠球菌转肽中心(PTC),通过影响转肽中心的结构及稳定性发挥抑菌作用。除了 V583 区域,与转肽中心距离相近位置的 L3、L4 核糖体蛋白同样可以通过突变引起氨基酸序列改变从而造成利奈唑胺耐药[12-13]。文献[14]报道核糖体蛋白 L3、L4 的突变主要与肠球菌低 MIC(4~8 μg/mL)耐药相关。本研究 5 株利奈唑胺耐药菌经体外诱导成高 MIC 耐药后并没有发生核糖体蛋白 L3、L4 氨基酸突变,结果与文献报[14]道一致,进一步提示利奈唑胺高水平耐药主要与 23S rRNA 基因 V 区突变有关。

然而,在诱导过程中,有 2 株耐药菌 MIC 被诱导至 64 μg/mL 和 96 μg/mL 后依然缺乏明确的耐药机制,提示可有其他未明确的耐药机制负责细菌耐药。文献[15]报道利奈唑胺耐药除了靶位点基因突变及 *cfr* 基因的介导耐药外,还可能与细菌外排泵有关。在研究中,我们曾采用 4 种常见的外排泵抑制剂:利血平、羰基氰氯苯腙(CCCP)、维拉帕米以及兰索拉唑处理耐药菌,用以观察利奈唑胺 MIC 值的变化。结果发现外排泵抑制剂使用前后细菌 MIC 值无明显变化。该现象提示耐药菌可能并不具有能外排利奈唑胺的外排泵,或者如果耐药菌存在可以外排利奈唑胺的外排泵,该外排泵将不能被以上抑制剂所抑制。

目前肠球菌利奈唑胺耐药机制尚未完全明确,深入探索并明确其耐药机制对于感染的防控和治疗具有重要意义。本研究通过体外诱实验发现利奈唑胺可诱导耐药机制未明的利奈唑胺耐药粪肠球菌 MIC 值迅速增加,且其耐药改变与 V 区 G2576T 突变密切相关。采用外膜蛋白提取并进行比较蛋白质组分析将有望筛选出潜在的外排泵蛋白,从而发现新的耐药相关靶标。

参考文献:

[1] Long K S, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(2): 603-612. DOI: 10.1128/AAC.05702-11

[2] Mendes R E, Deshpande L M, Jones R N. Linezolid update: stable *in vitro* activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms[J]. Drug Resist Updat, 2014, 17(1/2): 1-12. DOI: 10.1016/j.drup.2014.04.002

[3] Jones R N, Ross J E, Bell J M, *et al*. Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008[J]. Diagn Microbiol Infect

Dis, 2009, 65(4): 404 – 413. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.001

[4] Patel S N, Memari N, Shahinas D, *et al*. Linezolid resistance in Enterococcus faecium isolated in Ontario, Canada[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 77(4): 350 – 353. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.012

[5] Ross J E, Farrell D J, Mendes R E, *et al*. Eight-year (2002-2009) summary of the linezolid (Zyvox(R) Annual Appraisal of Potency and Spectrum; ZAAPS) program in European countries [J]. J Chemother, 2011, 23(2): 71 – 76.

[6] Bourgeois-Nicolaos N, Massias L, Couson B, *et al*. Dose dependence of emergence of resistance to linezolid in Enterococcus faecalis *in vivo* [J]. J Infect Dis, 2007, 195(10): 1480 – 1488.

[7] Diaz L, Kiratisin P, Mendes R E, *et al*. Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to cfr in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(7): 3917 – 3922. DOI: 10.1128/AAC.00419-12

[8] Qi C, Zheng X, Obias A, *et al*. Comparison of testing methods for detection of decreased linezolid susceptibility due to G2576T mutation of the 23S rRNA gene in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 1098 – 1100.

[9] Paulsen I T, Banerjei L, Myers G S, *et al*. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*[J]. Science, 2003, 299(5615): 2071 – 2074.

[10] 李多云, 余治健, 徐俊, 等. 利奈唑胺体外诱导粪肠球菌耐药株23S rRNA V区基因突变位点分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(4): 316 – 317,375.

[11] Lobritz M, Hutton-Thomas R, Marshall S, *et al*. Recombination proficiency influences frequency and locus of mutational resistance tolinezolid in *Enterococcus faecalis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(10): 3318 – 3320.

[12] Bosling J, Poulsen S M, Vester B, *et al*. Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein l3 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(9): 2892 – 2896.

[13] Locke J B, Hilgers M, Shaw K J. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700) [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5265 – 5274. DOI: 10.1128/AAC.00871-09

[14] Chen H, Wu W, Ni M, *et al*. Linezolid-resistant clinical isolates of enterococci and Staphylococcus cohnii from a multicentre study in China: molecular epidemiology and resistance mechanisms[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(4): 317 – 321. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.06.008

[15] Floyd J L, Smith K P, Kumar S H, *et al*. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from Staphylococcus aureus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(12): 5406 – 5412. DOI: 10.1128/AAC.00580-10

(收稿:2015-08-27;修回:2015-11-08)

(编辑 邓强庭)