

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2014.10.006

· 论 著 ·

2 株利奈唑胺中介粪肠球菌 23S rRNA V 区基因变异检测

郑金鑫, 李多云, 陈 重, 邓名贵, 刘晓军, 邓启文, 余治健

(广东医学院附属深圳市南山区人民医院, 广东 深圳 518000)

[摘要] 目的 研究粪肠球菌对利奈唑胺(LNZ)的耐药情况和耐药机制,为临床合理用药提供依据。方法 收集 2012 年 1 月—2013 年 1 月深圳市南山区人民医院接受 LNZ 治疗患者痰液标本分离的粪肠球菌 12 株,采用琼脂稀释法测定抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC),聚合酶链反应(PCR)扩增 23S rRNA V 区基因,并进行测序分析。结果 12 株菌中,2 株为中介株(菌株编号分别为 3 和 6),10 株为敏感株。2 株中介株均检测到 G2576U 突变,其中 1 株(编号 6)还同时存在 C2424U 突变;10 株敏感株未检测到变异。C2424U 和 G2576U 突变分别发生在 23S rRNA V 区基因的 R1 区和 R4 区。结论 粪肠球菌 LNZ 中介株中发现 23S rRNA V 区基因变异,提示临床应密切关注 LNZ 的 MIC 变化。

[关键词] 粪肠球菌; 利奈唑胺; 耐药性; 抗药性; 微生物; 变异; 突变

[中图分类号] R378.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)10-0601-04

Variations of 23S rRNA V region gene of two linezolid-intermediate *Enterococcus faecalis* strains

ZHENG Jin-xin, LI Duo-yun, CHEN Zhong, DENG Ming-gui, LIU Xiao-jun, DENG Qi-wen, YU Zhi-jian (The Affiliated Shenzhen Nanshan People's Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate antimicrobial resistance and antimicrobial resistance mechanisms of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) to linezolid (LNZ), and provide basis for clinical rational drug use. **Methods** Twelve *E. faecalis* strains isolated from sputum of patients who received LNZ therapy in a hospital between January 2012 and January 2013 were collected. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents were determined by agar dilution method, 23S rRNA V region gene of *E. faecalis* was amplified by polymerase chain reaction, the amplified products were sequenced. **Results** Of 12 isolates, 2 were intermediate strains and 10 sensitive strains. The G2576U mutation was detected in 2 intermediate strains, 1 of which was also detected G2424U mutation; the variations were not detected in 10 sensitive strains. C2424U and G2576U mutation existed in R1 and R4 region respectively. **Conclusion** 23S rRNA V region gene mutations are found in the intermediate strains of *E. faecalis*. Change in MIC values of linezolid should be paid close attention in clinical use.

[Key words] *Enterococcus faecalis*; linezolid; drug resistance; drug resistance, microbial; variation; mutation

[Chin Infect Control, 2014, 13(10):601-604]

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,2000 年首先在美国上市^[1]。目前,该药已成为治疗耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)感染,以

及控制 VRE 医院感染暴发流行的主要药物之一。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已成为热点问题之一。既往研究^[2-5]表明, LNZ 耐药变异主要位于细菌的

[收稿日期] 2014-02-20

[作者简介] 郑金鑫(1982-),男(汉族),湖北省丹江口市人,主治医师,主要从事肠球菌耐药机制研究。

[通信作者] 余治健 E-mail: yuzhijiansmu@163.com

23S rRNA V 区基因,特别是 G2576U 和 G2447U 变异;其他位点(如 C2512U、G2513U、C2610G、G2505A 等)的突变也与耐药的发生密切相关。细菌核糖体蛋白 L3 和 L4 氨基酸变异也与 LNZ 耐药相关,金黄色葡萄球菌核糖体蛋白 L3 氨基酸的 F147L 或 A157R 突变,能显著提高 LNZ 耐药的最低抑菌浓度(MIC)^[6]。目前,国内关于 LNZ 临床耐药变异的研究少有报道,为了解粪肠球菌对 LNZ 的耐药变异情况,笔者进行了如下研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2012 年 1 月—2013 年 1 月深圳市南山区人民医院接受 LNZ 治疗的患者资料, LNZ 治疗时间为 10~25 d(600 mg/d),患者痰液标本分离粪肠球菌 12 株。

1.2 菌株鉴定与药敏试验 采用法国生物梅里埃 VITEK2-compact 全自动微生物分析仪及配套的鉴定卡与药敏卡进行菌株鉴定及药敏试验。以粪肠球菌 ATCC 29212 作为质控菌株。采用 2013 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的琼脂二倍稀释法进行操作及结果判读,同时测定 ATCC 29212 的 MIC 进行质控。

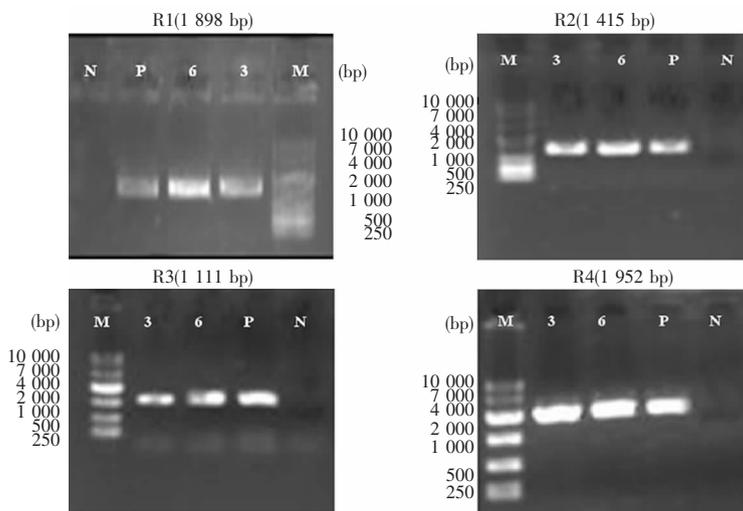
1.3 聚合酶链反应(PCR)扩增 23S rRNA V 区基因 依照参考文献[7]对粪肠球菌 23S rRNA V 区基因 4 个片段(R1:1 898 bp; R2: 1 415 bp; R3:1 111 bp;

R4:1 952 bp)进行 PCR 扩增和测序分析。引物按照参考文献合成,反应体系如下:ExTaq Buffer(Mg²⁺ plus) 5 μL,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 4 μL, Prime1(F)1 μL,Prime2(R)1 μL,ExTaq DNA polymerase 0.25 μL,模板 DNA 1 μL,加 ddH₂O 补齐至 50 μL。PCR 反应条件:94℃ 预变性 4 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,共 29 个循环;72℃ 4 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后纯化,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,应用 DNAMAN, full. version. v 5. 2. 2 软件进行序列比对分析。

2 结 果

2.1 MIC 测定 依据 2013 年 CLSI 标准,肠球菌对 LNZ 的 MIC≤2.00 μg/mL 为敏感(S),MIC = 4.00 μg/mL 为中介(I),MIC≥8.00 μg/mL 为耐药(R)。12 株菌中,2 株为中介株(菌株编号分别为 3 和 6),10 株为敏感株;其 MIC 值分别为:1.00、1.00、4.00、0.50、1.00、6.00、1.00、0.50、1.00、0.50、1.00、0.50 μg/mL。质控菌株粪肠球菌 ATCC 29212 MIC 为 2.00 μg/mL,符合 CLSI 标准(1.00~4.00 μg/mL)。

2.2 23S rRNA V 区基因 PCR 扩增结果 2 株中介株 23S rRNA V 区基因 4 个片段(R1—R4 区)PCR 扩增后均形成了单一明亮的电泳条带。见图 1。



M:DNA molecular marker (TakaRa DL10 000 DNA Marker); R1: 1 898 bp; R2: 1 415 bp; R3: 1 111 bp; R4:1 952 bp; P: Positive control;N: Negative control

图 1 2 株粪肠球菌中介株 23S rRNA V 区基因(R1—R4 片段)PCR 扩增电泳图

Figure 1 PCR amplification of 23S rRNA V region gene (R1, R2, R3, R4) of 2 intermediate *E. faecalis* strains

2.3 23S rRNA V 区基因变异检测结果 2 株中介株均检测到 G2576U 突变,其中 1 株(编号 6)还同时存在 C2424U 变异;10 株敏感株未检测到变异。见表 1。C2424U 和 G2576U 突变分别发生在 23S rRNA V 区基因的 R1 区和 R4 区。见图 2。

表 1 23Sr RNA V 区变异检测结果

Table 1 Variations of 23S rRNA V region gene of *E. faecalis*

Strains	Mutations in domain V of 4 copies of 23S rRNA					Ratio
	R1	R2	R3	R4		
1	W	W	W	W		0/4
2	W	W	W	W		0/4
3	W	W	W	G2576U		1/4
4	W	W	W	W		0/4
5	W	W	W	W		0/4
6	C2424U	W	W	G2576U		2/4
7	W	W	W	W		0/4
8	W	W	W	W		0/4
9	W	W	W	W		0/4
10	W	W	W	W		0/4
11	W	W	W	W		0/4
12	W	W	W	W		0/4

W: Wild type

3 讨论

LNZ 主要通过抑制细菌 70 S 初始复合物的形成,从而阻止细菌蛋白的合成^[8]。这种独特的作用机制减少了与其他抑制蛋白合成的抗菌药物(如氟霉素、克林霉素和大环内酯类抗菌药物)对革兰阳性菌的交叉耐药,对医院获得性的主要革兰阳性菌均具有抗菌活性,对多重耐药菌株也具有良好的抑菌活性。但近年来,随着 LNZ 广泛应用于临床,其细菌耐药逐渐成为一个严重问题。通过体内外研究发现,LNZ 耐药主要与细菌 23S rRNA V 区基因和核糖体蛋白 L3 和 L4 变异有关,但是否还有其他耐药分子参与,尚不明确^[9]。

既往研究^[7]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 突变,C2512U、G2513U、C2610G、G2505A 等位点也参与了细菌耐药过程。本研究通过 PCR 扩增粪肠球菌 23S rRNA V 区 4 个基因片段,并对反应体系和反应条件进行了优化。PCR 反应体系由参考文献中的 100 μ L 缩小为 50 μ L,PCR 反应中

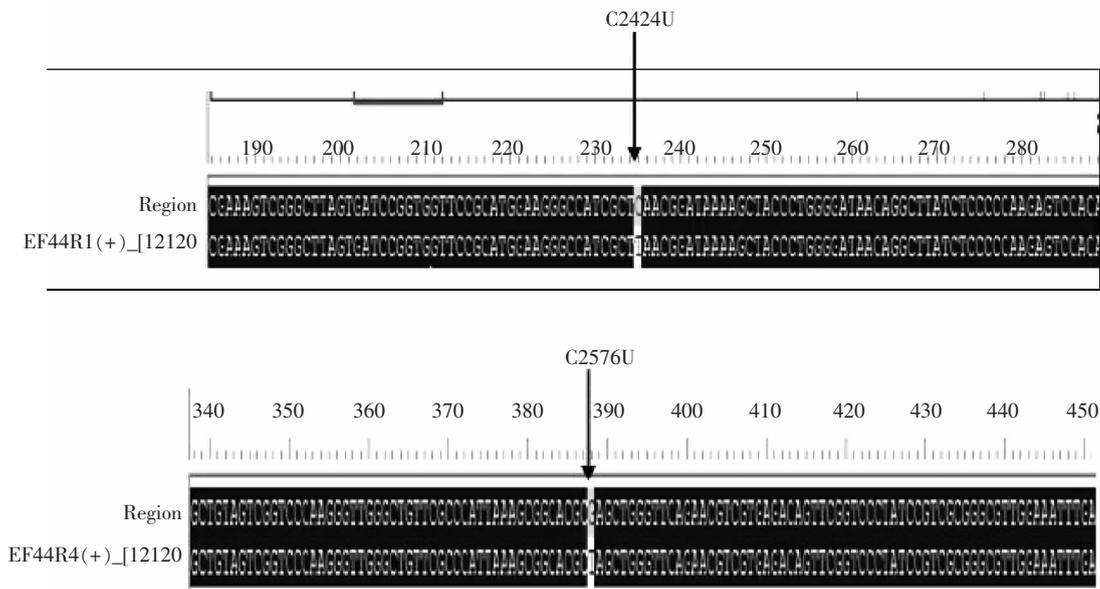


图 2 2 株中介株 23S rRNA V 区基因突变测序结果

Figure 2 Sequencing results of variation of 23S rRNA V region gene of 2 intermediate *E. faecalis* strains

变性、退火和延伸时间也相应缩短,节省了 PCR 反应体系和缩短了 PCR 反应时间,提高了实验效率,取得了理想的实验结果。对 PCR 产物测序发现,中

介株存在 G2576U 和 C2424U 突变。编码粪肠球菌 23S rRNA 基因包含 4 个相同基因片段,以往研究^[10]发现,在耐药菌株 23S rRNA 基因中,大多出

现了 2 个以上的基因片段发生 G2576U 突变。本研究中, 1 株中介株 23S rRNA 基因 R4 区发生 G2576U 变异, 1 株中介株 R1 区发生 C2424U 变异和 R4 区发生 G2576U 变异。LNZ 耐药的产生是一个缓慢过程, 体外研究^[1]提示, 获得高水平 LNZ 耐药需要长时间暴露于治疗浓度, 除 23S rRNA 基因变异外, 还需其他多种蛋白(包括核糖体蛋白)的共同参与。

LNZ 是一种新型的唑烷酮类抗生素, 常被临床用于革兰阳性多重耐药菌治疗。目前, 肠球菌耐药现象日益严重, LNZ 被认为是治疗 VRE 感染的理想药物。但随着临床耐药菌的不断出现, 明确细菌对 LNZ 耐药的机制已十分重要。本研究在中介株中发现了 23S rRNA 基因变异, 这提示临床要密切关注 LNZ 的 MIC 变化, 防止 LNZ 的不当使用和过度使用, 尽量延长 LNZ 的临床使用寿命。

[参考文献]

- [1] Moellering R C. Linezolid; the first oxazolidinone antimicrobial [J]. *Ann Intern Med*, 2003, 138(2): 135 - 142.
- [2] 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.
- [3] Sander P, Belova L, Kidan Y G, et al. Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 46(5): 1295 - 1304.
- [4] Dandache P, Moise P A, Orsini J, et al. Reduced biofilm pro-

- duction associated with increasing linezolid MICs among linezolid-resistant *staphylococci* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(5): 1114 - 1115.
- [5] Allen G P, Bierman B C. 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.
- [6] Locke J B, 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 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(12): 5352 - 5355.
- [7] 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.
- [8] Shinabarger D L, Marotti K R, Murray R W, et al. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperzolid on translation reactions [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(10): 2132 - 2136.
- [9] 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.
- [10] Marshall S H, Donskey C J, Hutton-Thomas R, et al. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(10): 3334 - 3336.
- [11] 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.

(本文编辑: 左双燕)