

## 营养条件改变逆转 MRS 的研究

童明华<sup>1</sup>, 刘 琼<sup>1</sup>, 王 敏<sup>2</sup>, 梁日初<sup>1</sup>, 胡 敏<sup>2</sup>, 郑 荣<sup>2</sup>, 徐 霞<sup>1</sup>, 董 政<sup>1</sup>, 丁海榕<sup>1</sup>, 彭凤英<sup>1</sup>

(1. 湖南旺旺医院检验科, 湖南长沙, 410016; 2. 中南大学湘雅二医院检验科, 湖南长沙, 410011)

**摘要:**目的 改变耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)的营养条件, 连续传代诱导, 使 MRS 诱变为甲氧西林敏感葡萄球菌(MSS)。方法 将临床分离并经确定为 MRS 的菌株接种于不同营养条件环境中进行连续传代培养, 定期做药敏试验, 观察 MRS 的表型变化及生化反应有无改变。同时采用 PCR 法检测原菌株及通过传代诱导其脱耐诱变菌株 *mecA* 基因的携带情况并测序比对。结果 53 株 MRS 经过不同次传代, 有 6 株菌脱耐诱变为 MSS。这 6 株菌在未进行诱导前检测均含有 *mecA* 基因, 诱导后有 2 株菌未检测到 *mecA* 基因, 其他 4 株菌 *mecA* 基因条带显示极弱。结论 临床分离的 MRS 能通过不同营养条件的传代培养诱变脱耐转为 MSS, MRS 的 *mecA* 基因能随生长环境改变丢失或表达下降, MRS 与其脱耐菌株在基因组学上存在差异。

**关键词:**耐甲氧西林葡萄球菌; 甲氧西林敏感葡萄球菌; 营养条件改变; *mecA* 基因; 耐药机制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-1029-03

### Reversal of methicillin resistance in *Staphylococcus* by changing cultural conditions

Tong Minghua<sup>1</sup>, Liu Qiong<sup>1</sup>, Wang Min<sup>2</sup>, Liang Richu<sup>1</sup>, Hu Min<sup>2</sup>, Zhen Rong<sup>2</sup>, Xu Xia<sup>1</sup>,

Dong Zheng<sup>1</sup>, Ding HaiRong<sup>1</sup>, Peng Fengying<sup>1</sup>

(1. Clinical Laboratory of Hunan Wantwant Hospital, Changsha, Hunan 410016, China; 2. Clinical Laboratory of Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

**Abstract:** Objective To reversing methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS) to methicillin-susceptible *Staphylococcus* (MSS) by changing nutritional conditions and continuous transfer of culture. Methods MRS strains separating from clinical specimens were cultured in different conditions, continuous cultural transfer, and drug sensitive test were proceeded periodically to observe the phenotypic and chemical reaction change of MRS. The *mecA* gene were detected of the original and mutant strains by polymerase chain reaction (PCR), then the gene sequenced and compared. Results 53 MRS strains were studied, 6 strains were phenotype successfully converted to MSS in different cultural conditions, among them *mecA* gene was undetected in 2 strains, and down expressed in 4 strains. Conclusion The MRS strains separated from clinical specimens may revert to MSS by culture under different nutritional conditions. The *mecA* gene of MRS may be lost or lower expressed and the MRS and mutant strains may be different in genomics.

**Key words:** methicillin-resistant *Staphylococcus*; methicillin-susceptible *Staphylococcus*; nutritional conditions change; *mecA* gene; drug resistance mechanism

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)是目前世界性医院内感染的重要病原菌之一。目前 MRSA 的感染流行已成为一项严重的临床及公共卫生问题<sup>[1]</sup>。据美国疾病控制和预防中心(CDC)统计:美国院内感染 MRSA 分离率已超过 80%<sup>[2]</sup>;世界每年约有 10 万人感染 MRSA, 其所致感染与乙型肝炎、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)同为当今三大感染性顽症<sup>[3]</sup>。早在 1992 年就有文献报道, MRSA 严重感染发生时, 即使在使用万古霉素治疗的情况下, 其病死率仍可达到 10%~30%, 有时甚至大于 50%<sup>[4]</sup>。凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)是一种机会致病菌, 在机体抵抗力下降和医源性因素干预等的情况下亦可造成局部或大面积感染, 临床以菌血症较为常见, 其次是心内膜炎。耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)某些菌株的耐药性可能比 MRSA 更强。可见由 MRCNS 引起的感染同样不容忽视。因此, 对耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)的耐药性进行研究与探讨, 不仅有助于临床 MRS 严重感染的控制, 还能为抗菌药物的开发与合理应用奠定基础。国内外先后有多位学者都对 MRSA 能否逆转为 MSSA 进行了相关研究, 本文扩大了研究范围(增加了 CNS), 以 MRS 为研究对象, 对改变营养条件能否逆转 MRS

为甲氧西林敏感葡萄球菌(MSS)进行了相关探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** 53 株 MRS 为 2010 年 1 月至 2011 年 12 月期间从湖南旺旺医院及中南大学湘雅二医院住院患者的血液、伤口分泌物、前列腺液、尿液、痰液及脓拭子等临床标本中分离所得。

**1.1.2 质控菌株** 金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 购自卫生部临检中心。

**1.1.3 主要仪器与试剂** VITEK2-ComPact 全自动微生物鉴定仪及药敏系统、Slidex staph plus 乳胶凝集快速检测金黄色葡萄球菌(简称乳胶凝集试验)试剂均为法国生物梅里埃公司产品, PCR 扩增仪和电泳仪购自德国 Biometra 公司, 凝胶成像仪购自美国 Bio Rad 公司, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 100 bp Marker 购自北京天根生化科技有限公司, 不含染料的 PCR MasterMix(内含 Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, DNA 聚合酶, ddH<sub>2</sub>O)购自索莱宝公司, 药敏培养基(水解酪蛋白)及药敏纸片、血平皿、普通营养琼脂、普通营养肉汤、脑心浸液基础试剂均购自英国 Oxoid 公司, *mecA* 基因测序由上海生工生物

有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌种鉴定 按常规方法分离菌株,革兰阳性球菌呈葡萄状排列,血浆凝固酶玻片法、试管法、乳胶凝集试验均为阳性判定为金黄色葡萄球菌,均为阴性则判断为 CNS。再经微生物分析仪鉴定确证。

1.2.2 MRS 筛查 药敏纸片琼脂扩散法(K-B 法)用头孢西丁(FOX)纸片,严格按美国临床和实验室标准协会(CLSI)操作要求及标准进行判断;结合微生物鉴定仪 AST 药敏卡结果及专家评论确证。

1.2.3 营养条件设计与试验操作 将已确定为 MRS 的菌株配成 0.5 麦氏浓度的菌液,分别取一环(固定的泊金环)接种在绵羊血脑心浸液肉汤(简称为 A 培养液)、普通营养肉汤(简称为 B 培养液)、血平皿、普通营养琼脂(简称为普皿),以及无菌生理盐水与 B 培养液按 1:1、1:100、1:200、1:400、1:800 稀释的肉汤中培养 8~16 h,每天分别取以上各液体培养基中菌液一环,转种于各自相对应的培养基中。血平皿与普皿上的菌也每天同时转种,在相同条件下进行培养。3~5 d 后将 A、B 培养液,血平皿,普皿,以及 5 种不同比例稀释后的培养液中的细菌同时转种在新的血平皿与普皿上。取细菌按常规标准操作,先用手工进行 FOX 药敏试验,发现有 FOX 敏感株则立即用 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪及手工法进行细菌鉴定与药敏分析。一方面确认试验前后菌株的一致性;另一方面证实原菌株是否经诱导后发生变化,即对 FOX 由原耐药(R)转为敏感(S),以下简称诱变脱耐;同时观察所有诱导后的菌株对各种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)值及生化反应有无改变。

1.2.4 *mecA* 基因检测 取试验原菌株与诱变脱耐菌株按文献[5]描述方法提取 DNA。*mecA* 基因扩增引物(上游:5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3',下游:5'-AGT

TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3')由上海 Invitrogen 公司合成并纯化。通过 PCR 对 *mecA* 基因进行扩增,同时设阴性对照。扩增体系:扩增反应总体积为 50  $\mu$ L,其中灭菌三蒸水 23  $\mu$ L、10 $\times$  PCR 反应缓冲液 5  $\mu$ L、15 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 25  $\mu$ L、2.0 mmol/L Dntp 5  $\mu$ L、25 pmol primers 各 1  $\mu$ L、模板 DNA 10  $\mu$ L、1.5 U *Taq* DNA 酶。置 DNA 热循环仪上进行自动化扩增反应。循环参数为 94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,73  $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个循环,最后一个循环于 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 100 bp DNA Marker 为分子量标准,取 5  $\mu$ L 扩增产物与 1  $\mu$ L 上样缓冲液(6 $\times$  Loading buffer)混匀后点样于含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶,140 V 电泳 20 min 后,在凝胶成像仪中观察结果并照相。将 PCR 产物送上海生工生物技术有限公司测序。

2 结果

2.1 营养条件改变后 MRS 耐药性逆转结果 共收集 53 株 MRS 菌株。金黄色葡萄球菌(以下简称金葡)38 株、表皮葡萄球菌(以下简称表葡)3 株、人型葡萄球菌(以下简称人葡)2 株、模仿葡萄球菌(以下简称模仿葡)2 株、溶血葡萄球菌(以下简称溶葡)8 株。53 株菌中有 6 株由 MRS 逆转为 MSS,其中 4 株金葡(4/38)、2 株溶葡(2/8),分别编号为 01 号、12 号、56 号、57 号、69 号、71 号。这 6 株菌接种在 A、B 培养液,血平皿与普皿中,连续转种 80 代未见改变。这 6 株菌在无菌盐水与普通营养肉汤稀释培养液中培养 8~16 h,连续转种 5 代时发现:01 号菌株在 1:1 稀释肉汤中 FOX 抑菌环由原 6 mm(R)转为 24 mm(S);12 号菌株经过 30 次转代时在 1:100 稀释肉汤中 FOX 由原 6 mm(R)转为 26 mm(S);69、71 号菌株经过 8 次转代,56、57 号菌株分别经过 22、24 次转代,于 1:1 稀释培养液中诱导成功。而这 6 株诱变脱耐菌株对 12 种抗菌药物敏感情况在诱导后却发生了明显改变,见表 1。

表 1 6 株 MRS 诱导前、后 12 种抗菌药物 MIC 值变化情况( $\mu$ g/mL)

抗菌药物	12 号菌金葡		69 号菌金葡		57 号菌金葡		56 号菌金葡		71 号菌溶葡		01 号菌溶葡	
	诱导前	诱导后	诱导前	诱导后	诱导前	诱导后	诱导前	诱导后	诱导前	诱导后	诱导前	诱导后
FOX	$\geq 8.00$	0.50	$\geq 8.00$	0.50	$\geq 8.00$	2.00	$\geq 8.00$	2.00	$\geq 8.00$	0.50	$\geq 8.00$	0.50
SAM	$\geq 32.00$	$\leq 4.00$	$\geq 32.00$	$\leq 4.00$	$\geq 32.00$	$\leq 4.00$	$\geq 32.00$	$\leq 4.00$	$\geq 32.00$	$\leq 4.00$	$\geq 32.00$	$\leq 4.00$
CM	$\geq 8.00$	$\leq 0.25$	-	-	-	-	-	-	$\geq 8.00$	$\leq 0.50$	$\geq 8.00$	$\leq 0.50$
RF	$\geq 4.00$	$\leq 0.50$	-	-	-	-	$\geq 4.00$	$\leq 0.25$	-	-	-	-
CZ	$\geq 32.00$	$\leq 8.00$	$\geq 32.00$	$\leq 8.00$	$\geq 32.00$	$\leq 8.00$	-	-	$\geq 32.00$	$\leq 8.00$	$\geq 32.00$	$\leq 8.00$
E	$\geq 8.00$	$\leq 0.25$	-	-	-	-	-	-	4.00	$\leq 0.50$	$\geq 8.00$	$\leq 0.25$
GM	$\geq 16.00$	$\leq 0.50$	$\geq 16.00$	$\leq 0.50$	-	-	$\geq 16.00$	$\leq 2.00$	$\geq 16.00$	$\leq 2.00$	$\geq 16.00$	$\leq 0.50$
LEV	$\geq 8.00$	$\leq 1.00$	$\geq 8.00$	2.00	-	-	$\geq 8.00$	$\leq 1.00$	$\geq 8.00$	2.00	$\geq 8.00$	$\leq 1.00$
MXF	$\geq 8.00$	$\leq 0.25$	1.00	0.50	-	-	$\geq 8.00$	0.50	4.00	0.50	-	-
TE	$\geq 16.00$	$\leq 1.00$	-	-	-	-	$\geq 16.00$	$\leq 1.00$	$\geq 16.00$	$\leq 1.00$	-	-
SXT	-	-	$\geq 320.00$	$\leq 10.00$	-	-	40.00	$\leq 10.00$	$\geq 320.00$	$\leq 10.00$	$\geq 320.00$	$\leq 10.00$
VA	-	-	2.00	$\leq 0.50$	-	-	-	-	2.00	0.50	2.00	0.50

FOX:头孢西丁,SAM:氨基西林/舒巴坦,CM:克林霉素,RF:利福平,CZ:头孢唑啉,E:红霉素,GM:庆大霉素,LEV:左氧氟沙星,MXF:莫西沙星,TE:四环素,SXT:磺胺甲恶唑,VA:万古霉素;-:MIC 值无明显改变。

2.2 生化反应分析 12 号菌株和 69 号菌株诱变前  $\beta$ -D-半乳糖苷酶、尿素酶、D-核糖、精氨酸双水解酶均为阳性,诱变后全部转为阴性;56 号菌株尿素酶改变与 12 号、69 号菌株相同;57

号菌株 N-乙酰-D 氨基葡萄糖、甲基- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃苷、精氨酸双水解酶皆由诱变前的阴性转为诱导后的阳性。01 号和 71 号菌株由诱变前、后的生化反应改变完全一致,即尿素酶由阴

性转为阳性, D-海藻糖、D-核糖、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶均由阳性转为阴性。69 号菌、56 号菌对杆菌肽由原敏感经诱导后转为耐受, 其他 4 株菌诱导前后均为耐受。以上生化反应显示出了这 6 株菌在诱导前后有酶与糖类的改变。

**2.3 扩增产物分析** 01、56、57、69、71、12 号这 6 株菌, 经过 PCR 检测原试验株[FOX(R)]均有 *mecA* 基因(不含 01 号), 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”); 诱变脱耐后[FOX(S)]的 01 号、57 号未检测到 *mecA* 基因。而 12、69、56、71 是菌株诱变后的 *mecA* 基因电泳带表现非常弱, 几乎不见, 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。以 01 号为代表株进行测序, PCR 扩增产物电泳结果显示见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

**2.4 PCR 扩增产物测序** 01 号扩增产物诱导前细菌扩增出的特异性条带测序结果与 *mecA* 基因的序列完全相同, 从而证实诱导前细菌中有 *mecA* 基因; 01 号诱导后细菌扩增出的条带测序结果与溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*) JCSC1435 一段基因序列部分相似(证实了 01 号溶血性葡萄球菌诱变前后的同源性); 诱导后未见 *mecA* 基因, 而扩增出一条比预期相对分子质量偏大的非特异性产物。这表明诱导后 *mecA* 基因出现丢失现象。

### 3 讨 论

MRSA 的耐药机理: (1) 主要是 *mecA* 基因编码的低亲和力的青霉素结合蛋白(PBP2a)的耐药性, 为染色体 DNA 介导的固有耐药性; (2) 属获得性耐药, 由于质粒介导产生的  $\beta$ -内酰胺酶。来源于 DNA 的转导、转化、或其他类型的 DNA 的插入<sup>[5]</sup>。目前国内外均有对 MRSA 脱耐的研究。王慧等<sup>[6]</sup>以聚乙烯亚胺(PEI)为载体, 将硫代寡聚脱氧核苷酸(PS-ODNs)转导至 MRSA 体内, 研究表明, PS-ODNs 可部分逆转 MRSA 对  $\beta$  内酰胺类抗菌药物的耐药性。宦梦蕾等<sup>[7]</sup>研究采用薄膜分散冻干法制备反义寡核苷酸阴离子脂质体, 证实反义寡核苷酸脂质体能逆转 MRSA 的耐药性, 且效果明显优于单用 PS-ODNs。Klitgaard 等<sup>[8]</sup>用硫利达嗪作用于 MRSA, 使 *laZ* 表达水平降低, 进而降低 PBP2a 的水平。Lemaire 等<sup>[9]</sup>研究发现酸性条件能恢复 MRSA 对  $\beta$  内酰胺类抗菌药物的敏感性。

本研究通过对临床分离的 53 株 MRS 在无菌盐水与普通营养肉汤稀释后的液体培养基中, 连续传代培养, 有 6 株 MRS 脱耐逆转为 MSS, 提示改变营养条件: (1) 可以使 MRSA 逆转为 MSSA, 也可使 MRCNS 逆转。(2) 经过 PCR 检测原 53 株试验菌均有 *mecA* 基因, 而逆转成功后的 6 株菌, 有两株未检测到 *mecA* 基因; 另 4 株菌的 *mecA* 基因电泳带表现非常弱, 几乎不见。这说明脱耐诱变株的 *mecA* 基因确实发生了改变。(3) 53 株试验菌仅 6 株诱变成功, 且 *mecA* 基因表达程度不一。这可以说明葡萄球菌 *mecA* 基因表达的不均一性, 同时也说明 MRS 菌株在基因组学上明显存在差异, 与文献<sup>[10]</sup>报道相似。

综合以上情况, 值得探讨的是: (1) MRS 逆转成功的 6 株菌 MIC 值的改变, 仅是耐药表型发生了改变, 还是使其耐药机制发生了改变? (2) *mecA* 基因的改变是丢失、脱落、或是隐藏? 还只是表达下降? (3) 曾有学者提出<sup>[10]</sup>, 若改善培养条件 *mecA* 基因表达水平提高, 原来敏感的菌株重新鉴定为耐药株。

作者制备的营养条件恰恰是让原来耐药的菌株重新诱变为敏感株。微生物的致病能力与生物体的毒素因子和宿主的营养条件关系密切。*mecA* 基因和细菌染色体上的一些辅助基因和调控基因共同作用下, 影响细菌细胞壁合成, 使细胞表现出异质性耐药。*mecA* 基因的表达受多种因素的影响<sup>[11]</sup>。作者认为, 低劣的营养环境能阻碍 PBP2a 产生, 破坏细菌细胞壁及某些酶的合成; 对黏附因子、毒素因子以及细菌生物膜的形成都有一定的遏制作用。本研究发现不同营养条件可以影响 *mecA* 基因的表达, 引起了抗菌药物与某些生化反应的改变, 究竟与某种辅助基因(如 *femABX* 新家族成员或是新的调控基因 *orf1*、*orf2*、*orfX*)中 DNA 片段基因的转导、转化, 或其他类型 DNA 的插入有无直接关系<sup>[10]</sup>? (4) 01 号诱导后扩增出一条比预期相对分子质量偏大的非特异性产物又为何物? 是否为与 PBP2a 无关的新作用靶位? 它在 MRS 的耐药与敏感中起什么作用? 这都是值得继续研究与探讨的课题。作者希望本研究能为今后 MRS 感染的临床医学、预防医学提供一定依据。

### 参考文献

- [1] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家委员会. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家共识[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2010, 4(2): 215-223.
- [2] 徐振波, 李琳, 石磊. 甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌多位点序列、SCCmec 及随机扩增多态性 DNA 分型研究[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(11): 1270-1272.
- [3] 徐邦牢, 张革, 马为. 多重 PCR 法对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌染色体 *mec* 盒的分型研究[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(8): 900-901.
- [4] 李仲兴, 郑家齐, 李家宏. 诊断细菌学[M]. 香港: 黄河文化出版社, 1992: 178-179.
- [5] 刘思平, 江凌晓. MRSA 耐药机理及其检测方法的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(10): 1030-1032.
- [6] 王慧, 孟静茹, 陈涛. 反义寡核苷酸-聚乙烯亚胺纳米微粒逆转耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(1): 33-35.
- [7] 宦梦蕾, 罗晓星, 孟静茹. 脂质体包裹的反义寡核苷酸逆转耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(9): 983-986.
- [8] Klitgaard JK, Skov MN, Kallipolitis BH, et al. Reversal of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by thioridazine[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(6): 1215-1221.
- [9] Lemaire S, Fuda C, Van Bambeke F, et al. Restoration of Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -Lactam Antibiotics by Acidic Ph: role of penicillin-binding protein PBP 2a [J]. J Biol Chem, 2008; 283(19): 12769 - 12776.
- [10] 李晓芳, 范昕建. 甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药基因与耐药性关系[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(3): 140-142.
- [11] 余方友, 陈增强, 刘存丽. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌染色体 *mecI* 基因的检测及多态性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(7): 796-797

(收稿日期: 2013-12-05)