

19 株诺卡菌的药敏与克拉霉素及四环素类耐药相关基因的关系研究

程振娜¹ 李刚^{2,3} 陶佳² 周晓燕² 殷国民² 贾伟^{2,3,*}

(1 山东医学高等专科学校, 临沂 276000; 2 宁夏医科大学总医院医学实验中心, 银川 750004;

3 宁夏临床病原微生物重点实验室, 银川 750004)

摘要: **目的** 研究诺卡菌临床分离株的药敏及与克拉霉素和四环素类耐药相关基因的关系。**方法** 以微量肉汤稀释法检测诺卡菌对 15 种抗菌药物的耐药性; 以 PCR 法检测 19 株诺卡菌克拉霉素的耐药相关基因 *ermA*、*ermB*、*mefA*、*msrD*, 对四环素类的耐药相关基因 *tetO*、*tetM*、*tetL*。**结果** 19 株诺卡菌中, *ermA* 基因检出率为 15.8%(3/19), 未检出 *tetO*、*tetM*、*tetL*、*ermB*、*mefA*、*msrD* 基因。药敏结果显示 19 株诺卡菌对米诺环素和多西环素耐药率均为 5.3%, 未见克拉霉素耐药菌株。耐药率最高的为环丙沙星, 占 78.9%, 其次为庆大霉素和头孢吡肟, 分别占 21.1% 和 15.8%。对其余药物均具有较高的敏感性。**结论** 诺卡菌对米诺环素、多西环素耐药与 *tetO*、*tetM*、*tetL* 基因无关, 存在另外的四环素类相关耐药机制。*ermA* 基因并不能引起克拉霉素耐药。

关键词: 诺卡菌; 克拉霉素; 四环素类; 耐药基因

中国分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Study of relationship between drug susceptibility and related resistant genes of clarithromycin and tetracycline in 19 isolates of *Nocardia*

Cheng Zhen-na¹, Li Gang^{2,3}, Tao Jia², Zhou Xiao-yan², Yin Guo-min² and Jia Wei^{2,3}

(1 Shandong Medical College, Linyi 276000; 2 Clinical Laboratory Center of General Hospital of Ningxia Medical University,

Yinchuan 750004; 3 Ningxia Key Laboratory of Clinical Pathogens, Yinchuan 750004)

Abstract Objective To investigate the drug susceptibility and the relationship with related resistant genes of clarithromycin and tetracycline carried in the clinical isolates of *Nocardia*. **Methods** Antibiotic susceptibility was determined by broth microdilution method for 15 *Nocardia* isolates. PCR was used to detect the clarithromycin resistance genes *ermA*, *ermB*, *mefA* and *msrD*, tetracycline resistance genes *tetO*, *tetM* and *tetL*. **Results** Of the 19 *Nocardia* isolates, the detection rate of the gene of *ermA* was 15.8% (3/19). The genes of *tetO*, *tetM*, *tetL*, *ermB*, *mefA* and *msrD* were not found. The drug resistance rates of 19 isolates of *Nocardia* to minocycline and doxycycline were both 5.3%, all the isolates were sensitive to clarithromycin. Ciprofloxacin has the highest drug sensitive rates which was 78.9%. The drug sensitive rates of *Nocardia* to gentamicin and cefepime were 21.1% and 15.8% separately. The drug sensitive rates to others drugs are high. **Conclusions** The genes of *tetO*, *tetM* and *tetL* do not contribute to the drug resistant mechanisms of minocycline and doxycycline for *Nocardia*, and may have other resistant mechanisms. The gene of *ermA* may play any role in resistance of clarithromycin.

Key words *Nocardia*; Clarithromycin; Tetracycline; Drug resistance genes

收稿日期: 2017-12-08

作者简介: 程振娜, 女, 生于 1990 年, 硕士, 主要从事微生物耐药性研究, E-mail: 1511688632@qq.com

* 通讯作者, E-mail: jiawei6365@126.com

诺卡菌 (*Nocardia*) 又称奴卡菌, 是一种革兰阳性需氧菌, 具弱抗酸性, 可以引起人类肺部、皮肤、中枢神经系统、角膜、脊椎、手术切口等各系统各部位的感染^[1]。诺卡菌感染的临床表现不典型, 极易造成误诊、漏诊。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术是病原菌鉴定的一种新手段, 近年来得到广泛使用。本研究通过对宁夏医科大学总医院近五年来收集的诺卡菌进行分析。并检测克拉霉素耐药相关基因 *ermA*、*ermB*、*mefA* 和 *msrD*, 四环素类药物耐药相关基因 *tetO*、*tetM* 和 *tetL*, 分析其耐药表型与耐药基因的相关性。

1 材料和方法

1.1 菌株来源及鉴定

19株诺卡菌为2013年1月—2017年11月临床分离菌株, 其中标本来源分别为痰液10份、静脉血3份、肺泡灌洗液2份、穿刺液2份、脓性分泌物1份、透析液1份。全部菌株均使用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 鉴定, 并对其16S rRNA基因扩增后测序确认, 序列在NCBI网站BLAST比对, 同源性 $\geq 99\%$ 为同一菌株。

1.2 质控菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠埃希菌 ATCC35218(仅用于阿莫西林/克拉维酸)均购自美国菌种保藏中心。

1.3 仪器与试剂

血平板(法国 Bio-Mérieux)、质谱仪(法国 Bio-Mérieux)、电泳及凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)、PCR扩增仪(Eppendorf公司)、二氧化碳培养箱(型号 Galaxy170R, Eppendorf公司)、Premix Taq、DNA Marker DL2000(宝生物工程有限公司)、抗菌药物标准品(大连美仑生物技术有限公司)。

1.4 抗菌药物敏感性试验

使用微量肉汤稀释法测定15种抗菌药物的敏感性, 包括阿米卡星、阿莫西林/克拉维酸、头孢曲松、环丙沙星、克拉霉素、亚胺培南、利奈唑胺、米诺环素、复方磺胺甲噁唑、复方磺胺甲噁唑、妥布霉素、头孢吡肟、头孢噻肟、多西环素、庆大霉素。结果根据美国临床实验室标准协会 (CLSI)2003年版 M24-A^[2] 要求进行判读。

1.5 细菌处理

将菌株接种于血平板上, 在37℃恒温培养箱中培养, 直至长出肉眼可见菌落, 挑取单个菌落

于EP管中, 振荡混匀后100℃加热10min, 高速离心10min后小心吸取上清液, 上清液即为提取的DNA。测DNA浓度与纯度后, 置于-80℃冰箱中保存备用。

1.6 耐药基因特异性 PCR 扩增

采用软件 Primer.5 设计部分耐药基因引物, 引物序列由上海生工生物有限公司合成。25 μ L PCR 扩增体系为: 2 \times Taq Master Mix 12.5 μ L, 上下游引物各 0.25 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 10 μ L。反应条件: 94℃预变性 3min, 94℃ 30s, (30~52℃)退火 45s, 72℃延伸 90s, 30个循环, 72℃延伸 7min。将产物经1%琼脂糖凝胶电泳。出现目的条带后将PCR产物原液送至上海生工生物有限公司测序, 序列在NCBI网站进行比对, 确定为目的基因。并将该菌作为阳性对照, 出现与阳性对照大小一致的条带为阳性。耐药基因引物序列及产物大小见表1。

2 结果

2.1 药物敏感性试验

19株诺卡菌中有3株为多重耐药株, 耐药率最高的为环丙沙星, 占78.9%, 其次为庆大霉素、头孢吡肟分别占21.1%、15.8%。四环素类药物多西环素及米诺环素耐药率均为5.3%。阿米卡星、克拉霉素、亚胺培南、利奈唑胺、复方磺胺甲噁唑未见耐药菌株(表2)。

2.2 耐药基因检测结果

19株诺卡菌中, *ermA* 基因的检出率为15.80% (3/19), 均存在于克拉霉素敏感株中, 且其MIC值并

表1 靶基因 PCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences for amplifying the genes

基因名称	引物序列 (5' → 3')	产物长 / bp	退火温度 / °C
<i>ermA-F</i>	GAAATGAGTCAACGGGT	353	30
<i>ermA-R</i>	GGCTTAGGGTGAAAATA		
<i>ermB-F</i>	CGAGTGAAAAAGTACTCAACC	652 ^[3]	44
<i>ermB-R</i>	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		
<i>mefA-F</i>	GATGGTCTTGCTATGGCT	269	52
<i>mefA-R</i>	CTGGTACTAAAAGTGGCGT		
<i>msrD-F</i>	ATGACCGCTATTTTCTTGAT	226	49
<i>msrD-R</i>	CCTTTTGCTTCTGTCTAT		
<i>tetO-F</i>	TAGATGAAGGCACAACAAG	196	49
<i>tetO-R</i>	AATACGGATAAAGAACGGT		
<i>tetM-F</i>	AATAACCTCTTTTCAGTGG	309	47
<i>tetM-R</i>	GGATACAGTTCTACCTTCT		
<i>tetL-F</i>	TATGGGAAGAAGAACA	160	41
<i>tetL-R</i>	ACCTCCAAAAATGAAT		

表 2 19 株诺卡菌对抗菌药物的敏感性 (%)

Tab. 2 Drug susceptibility rates(%) of the 19 *Nocardia* isolates

抗菌药物	耐药		中介		敏感	
	株数	耐药率	株数	中介率	株数	敏感率
阿米卡星	0	0	1	5.3	18	94.7
阿莫西林 / 克拉维酸	1	5.3	3	15.8	13	78.9
头孢曲松	2	10.5	0	0	17	89.5
环丙沙星	15	78.9	1	5.3	3	15.8
克拉霉素	0	0	0	0	19	100.0
亚胺培南	0	0	2	10.5	17	89.5
利奈唑胺	0	0	0	0	19	100.0
米诺环素	1	5.3	1	5.3	17	89.4
磺胺甲噁唑	0	0	0	0	19	100.0
复方磺胺甲噁唑	0	0	0	0	19	100.0
妥布霉素	2	10.5	2	10.5	15	79.0
头孢吡肟	3	15.8	0	0	16	84.2
头孢噻肟	2	10.5	1	5.3	16	84.2
多西环素	1	5.3	3	15.8	15	78.9

不完全高于 *ermA* 基因阴性菌株。 *tetO*、 *tetM*、 *tetL*、 *ermB*、 *mefA*、 *msrD* 基因均未检出，详见表 3。 N-F-13 号株作 *ermA* 阳性基因测序，见图 1。

3 讨论

诺卡菌是广泛分布于土壤中的需氧性放线菌，引起人类致病的主要有新星诺卡菌、鼻疽诺卡菌、橡胶诺卡菌等^[1]。常从患者的痰液、肺泡灌洗液、脑脊液中分离出，本资料中的诺卡菌最多来源于痰液，其次为静脉血，这可能与其感染特性有关。而据报道^[4]，诺卡菌在其致病性和感染部位上具有种间特异性，将其鉴定到种对疾病的流行病学以及临床诊断具有重要的意义。诺卡菌的常规鉴定方法主要是直接镜检和培养鉴定，但此法费时、费力且准确率不高。分子生物学方法是细菌鉴定的金标准，但不易在常规实验室开展。基质辅助激光飞行时间质谱技术是近年发展的一种快速、简便鉴定细菌的新技术，Blosser 等^[5]采用此技术将 84.2% 的诺卡菌鉴定到种或复合群。在本实验中证实，质谱技术可成功将诺卡菌鉴定到种的水平。

诺卡菌的治疗主要是采取抗生素联合治疗的方案，目前国内外对诺卡菌药物敏感试验结果显示，诺卡菌对利奈唑胺、复方磺胺甲噁唑、阿米卡星、克拉霉素、米诺环素等仍具有较高的敏感性，Wang 等^[6]报道所检测的 132 株诺卡菌中，对利奈唑胺以及复方磺胺甲噁唑敏感率为 100%，克拉霉素耐药率

表 3 克拉霉素、米诺环素、多西环素药敏与耐药相关基因检测结果

Tab. 3 Drug resistance test results and associated genes to clarithromycin, minocycline and doxycycline

编号	克拉霉素	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA</i>	<i>msrD</i>	米诺环素	多西环素	<i>tetO</i>	<i>tetM</i>	<i>tetL</i>
N-C-1	S	-	-	-	-	R	S	-	-	-
N-C-2	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-C-3	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-C-4	S	-	-	-	-	S	I	-	-	-
N-C-5	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-C-6	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-C-7	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-C-8	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-C-8	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-C-10	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-F-11	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-F-12	S	-	-	-	-	I	I	-	-	-
N-F-13	S	+	-	-	-	S	I	-	-	-
N-O-14	S	+	-	-	-	S	S	-	-	-
N-O-15	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-O-16	S	-	-	-	-	S	R	-	-	-
N-C-17	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-F-18	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
N-C-19	S	+	-	-	-	S	S	-	-	-

注：“+”为对应耐药基因阳性；“-”为对应耐药基因阴性

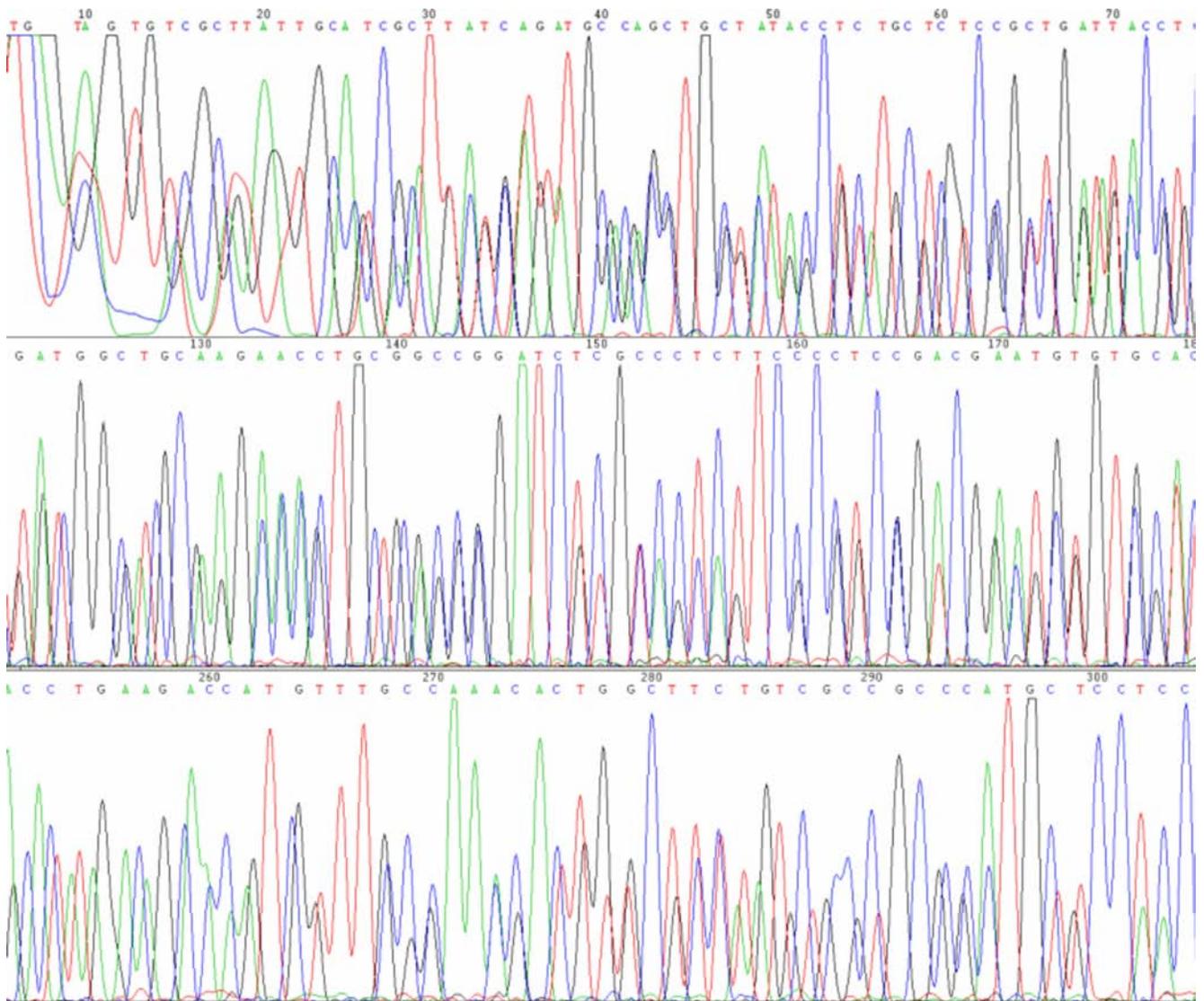


图1 N-F-13号株 *ermA* 基因测序图(部分)

Fig. 1 *ermA* gene sequencing of N-F-1

为54.4%，而在本研究中所有菌株对这3种抗生素均表现为敏感。在资料结果中，耐药率最高的为环丙沙星，占78.9%，其次为庆大霉素、头孢吡肟分别为21.1%、15.8%，且其中有3株表现为多重耐药。阿米卡星、克拉霉素、亚胺培南、利奈唑胺、复方磺胺甲噁唑未见耐药菌株，可作为本地区诺卡菌治疗的经验性用药。诺卡菌的药物敏感性具有明显的种间特异性，刘涛华等^[7]研究诺卡菌时发现盖尔森基兴诺卡菌对环丙沙星、克拉霉素以及阿莫西林的药物敏感性与其他菌株不同，而在本研究中同样发现盖尔森基兴诺卡菌对环丙沙星具有种间区别，但对克拉霉素及阿莫西林未表现出种间差异，且未见耐药菌株。诺卡菌的临床表现不典型，尤其肺部感染与普通细菌感染临床表现类似^[8]，若不及时治疗，则会错过患者

最佳治疗时机。因此在疑似诺卡菌感染时，医务人员及时送检培养，并先选择经验性用药，根据药敏结果及时调整抗生素的种类，以免延误患者病情。

克拉霉素是第二代的大环内酯类抗生素，该类药物耐药的主要机制有23S rRNA靶基因位点的突变及甲基化修饰，其中编码主要甲基化酶的基因有 *ermA*、*ermB*。还可通过主动外排作用来减少抗生素在菌体内的集聚，*msrD*、*mefA* 可编码外排泵来产生对大环内酯类抗生素的耐药性。米诺环素、多西环素为四环素类抗生素，四环素类药物主要通过抑制氨基酰 t-RNA 与核蛋白体的结合来阻断蛋白质的合成，*tetO*、*tetM* 基因可编码一种核蛋白保护体来阻断四环素的作用，*tetL* 基因为小质粒所携带的耐药基因，这些均可使细菌对四环素类药物产生抗性。

据临床实验室标准化协会的规定, 克拉霉素、米诺环素为诺卡菌治疗的一线用药, 多西环素为二线用药, 他们常作为复方磺胺甲恶唑的联合药物来治疗诺卡菌感染。*ermA*、*ermB*、*mefA* 基因在 B 群链球菌中具有较高的检出率^[3,9], 国内尚未报道诺卡菌携带上述耐药基因, 国外学者 Valdezate 等^[10] 研究的 76 株复方磺胺甲噁唑耐药诺卡菌中, *ermA*、*ermB*、*mefA* 和 *msrD* 基因的检出率分别为 2.6%、77.6%、14.4% 和 5.2%, *tetO*、*tetM*、*tetL* 基因的检出率分别为 48.6%、25.0% 和 3.9%。在本研究中, *ermA* 基因阳性率明显高于上述研究, 这可能与当地抗生素使用情况、标本的选择、菌液处理以及地理差异有关。虽然 15.8% 的菌株存在耐药基因 *ermA*, 但这些菌株并不表现出对大环内酯类药物的耐药。因此本研究推测: 对诺卡菌来说, 大环内酯类药物作用靶点的甲基化是无效修饰, 作用位点经甲基化修饰后, 克拉霉素仍可与细菌核糖体结合, 通过 PCR 技术检测 *ermA* 基因预测诺卡菌对克拉霉素的耐药性缺乏可靠性及实用价值; 在诺卡菌中, 可能存在某些抑制 *ermA* 基因表达的因素, 因此 *ermA* 基因虽然存在, 但无法对克拉霉素作用位点进行修饰。

本研究首次对克拉霉素、四环素耐药性与其耐药基因相关性进行的分析, 发现 *ermA* 基因并不能引起克拉霉素的耐药, 部分诺卡菌虽然对米诺环素、多西环素耐药, 但未检出与 *tetO*、*tetM*、*tetL* 基因相关, 提示存在另外的四环素相关耐药机制, 具体耐药机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ambrosioni J, Lew D, Garbino J, *et al.* Nocardiosis: Updated clinical review and experience at a tertiary center[J]. *Infect*, 2010, 38(2): 89-97.
- [2] CLSI. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes[S]. CLSI document M24-AWayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003.
- [3] Villaseñor-Sierra A, Katahira E, Jaramillo-Valdivia A N, *et al.* *Streptococcus pyogenes* strains isolated from invasive and non-invasive infections from Mexico and the USA during 1999—2010[J]. *NIH Public Access Author Manuscript*, 2012, 16(3): e178-e181.
- [4] Xiao M, Pang L, Chen S C, *et al.* Accurate identification of common pathogenic *Nocardia* species: Evaluation of a multilocus sequence analysis platform and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147487.
- [5] Blosser S J, Drake S K, Andrasko J L, *et al.* Multicenter matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry study for identification of clinically relevant *Nocardia* spp[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(5): 1252-1258.
- [6] Wang H L, Seo Y H, LaSala P R, *et al.* Nocardiosis in 132 patients with cancer: Microbiological and clinical analyses[J]. *Am J Clin Pathol*, 2014, 142(4): 513-23.
- [7] 刘涛华, 王颜颜, 牟丽丽, 等. 11 株临床诺卡菌 16S rRNA 及药敏分析 [J]. 贵阳医学院学报, 2016, 41(3): 268-271.
- [8] 程振娜, 李刚, 师志云, 等. 诺卡菌感染的临床特点分析 [J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(5): 537-540.
- [9] 王佳敏, 张丽, 张丽华, 等. B 群链球菌多位点序列型及大环内酯类耐药基因相关性分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(8): 638-641.
- [10] Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, *et al.* Resistance