

动物源性链球菌红霉素耐药基因的分布

王丽平, 陆承平^{1*}

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

关键词: 链球菌; 耐药表型; *ermB* 基因; *erfA* 基因; PCR 方法

中图分类号: R378.1⁺2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)09-0977-04

致病性链球菌可导致人和动物的各种化脓性疾病, 肺炎、乳腺炎、败血症等, 且部分致病性链球菌是重要的人畜共患病病原, 对人畜健康均造成极大危害, 已引起高度重视。大环内酯类抗生素作为青霉素药物的替代药物是治疗致病性链球菌感染的有效药物。国内外对人医重要的链球菌诸如肺炎球菌、化脓性链球菌的研究表明, 临床分离株对大环内酯类抗生素的耐药率较高^[1-2], 而动物源性链球菌对红霉素的耐药性调查国内外报道均少见, 故本试验拟检测国内兽医临床中分离的链球菌对红霉素的耐药率并建立 PCR 方法对相应耐药基因进行检测。

1 材料与方法

1.1 菌株

1998-2003 年分离的 111 株链球菌, 其中猪源链球菌 84 株, 分离自发病猪, 血清型以 C 群和 2 型猪链球菌为主; 牛源链球菌 27 株, 分离自乳腺炎发病牛, 血清型以 A 群为主。

1.2 药品

红霉素(Erythromycin, ERY), 克林霉素(Clindamycin, CLZ), 青霉素(Penicillin, PEN), 均为中国药品生物制品检定所标准品; 红霉素(15 μg)、克林霉素(2 μg) 药敏纸片, 均为上海伊华生物科技有限公司产品。

1.3 PCR 试剂

Taq 酶, DNA Marker DL2000, dNTP, 购自大连宝生物工程(大连)有限公司, DNA 抽提试剂盒,

胶回收试剂盒, 均购自上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司。

1.4 方法

1.4.1 体外最小抑菌浓度(MIC)测定 以美国临床检验标准委员会(NCCLS)^[3]推荐的琼脂稀释法测定红霉素、克林霉素和青霉素对 111 株链球菌的最小抑菌浓度, 质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC29213, 对所测得的 MIC 结果经统计学处理, 得出 MIC₅₀、MIC₉₀ 及 MIC 范围, 并计算细菌对各抗菌药的耐药率(包括中介菌株)。

1.4.2 耐药表型测定 以改良的双纸片法测定^[4], 在涂布菌液的平板上, 间隔 1.5~2 cm 贴上红霉素及克林霉素纸片, 过夜培养后观察结果, 如 2 个纸片抑菌圈 ≤15 mm 则为内在型耐药(CR, constitutive resistance), 因这类耐药菌同时对所有大环内酯类、林可霉素类及 B 族链阳菌素类耐药, 故称为 cMLS_B 耐药性表型(constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin); 如对红霉素耐药而靠近红霉素的克林霉素抑菌圈有缺损("D"型)则为诱导型耐药(IR, inducible resistance), 称为 iMLS_B; 如对红霉素耐药而对克林霉素敏感则为 M 型耐药(MR, M resistance), 这类耐药仅对红霉素耐药; iMLS_B 和 M 型耐药均对 14、15 元环大环内酯类抗生素耐药, 而对克林霉素及链阳菌素敏感, 其区别在于诱导型耐药菌可被红霉素诱导而对克林霉素产生耐药性, 另外, 以下述方法区分 IR 与 MR, 将菌株在 0.5 倍 MIC 红霉素的 THB 培养基中进行培养(若红霉素的 MIC ≥32 μg/mL 时, 红霉素的浓度定为 0.5 μg/mL), 然后以纸片法测定克林霉素的药敏性, 如耐药则为 IR, 如仍敏感则为 MR。

1.4.3 红霉素耐药基因的检测

1.4.3.1 菌体总 DNA 提取: 挑取兔血琼脂平板上单菌落接种至含 5% 犊牛血清的 Todd-Hewitt broth(THB)肉汤中, 37 °C 静置培养过夜, 取 0.5

收稿日期: 2004-09-22

基金项目: 国家 973 项目子专题(G1999011906)

作者简介: 王丽平(1971-), 女, 内蒙古人, 博士生, 讲师, 主要从事兽医药理学与毒理学研究。E-mail: wlp71@163.com

* 通讯作者: 陆承平(1945-), 教授, 博导, 主要从事兽医微生物学与免疫学等方面的研究

mL 菌液离心,按试剂盒步骤提取染色体 DNA,溶于 pH 8 TE 缓冲液中,冻存备用。

1.4.3.2 PCR 反应:(1)引物:所有引物均由大连宝生物工程(大连)有限公司合成。参考文献[5]设计 2 对引物, *mef A* (F): 5'-AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3', *mef A* (R): 5'-TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG-3', 预期片段 348 bp; *ermB* (F): 5'-GAA AAG GAT CTC AAC CAA ATA-3', *ermB* (R): 5'-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3', 预期片段 640 bp。50 μL PCR 反应体系:水 34.5 μL, MgCl₂ 4 μL (1.5 mmol/L), dNTP 4 μL (0.2 mmol/L), 前后引物各 0.5 μL (40 μmol/L), *Taq* 酶 0.5 μL, 模板 DNA 0.1 μL, 10× PCR buffer 5 μL。优化后的扩增条件:93 °C 预变性 3 min; 然后 93 °C 变性 1 min, 57 °C 退火 1 min, 72 °C 延长 1 min, 共 35 个循环; 最后一个循环结束后再延长 10 min。

1.4.3.3 扩增产物的鉴定:1.5% 琼脂糖凝胶电泳中观察 PCR 产物,初步确定扩增片段大小,然后切下 PCR 产物的目的条带,用 DNA 快速纯化试剂盒回收。纯化凝胶中目的片段,具体步骤按试剂盒说明书进行操作,回收产物送中科开瑞测序,与已登陆 GenBank 序列进行比较。

2 结果

2.1 体外抑菌试验

临床分离的 111 株链球菌中,对青霉素、红霉素、克林霉素的耐药率分别达 54.95%、68.47% 和 64.86%。其中,84 株猪源链球菌对青霉素、红霉素、克林霉素的耐药率分别高达 56.2%、69.2% 和 67%,27 株牛源链球菌对青霉素、红霉素、克林霉素的耐药率分别高达 51.9%、66.7% 和 59.3%。所选药物对 111 株链球菌的体外最小抑菌浓度见表 1。

表 1 3 种药物对 111 株链球菌的体外抑菌活性

Table 1 The antimicrobial activity of three drugs against 111 strains of streptococcus

药物 Drugs	猪源链球菌(n= 84)				牛源链球菌(n= 27)			
	<i>Streptococcus</i> isolated from swine				<i>Streptococcus</i> isolated from bovine			
	MIC 范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀	耐药率/ %	MIC 范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀	耐药率/ %
青霉素 Penicillin	0.031 25~ > 128	4	64	56.2	0.031 25~ > 128	8	128	51.9
红霉素 Erythromycin	0.125~ > 128	16	> 128	69.2	0.125~ > 128	16	> 128	66.7
克林霉素 Clindamycin	0.125~ > 128	16	128	67	0.125~ > 128	16	> 128	59.3

2.2 链球菌对红霉素的耐药表型及基因型构成情况

采用双纸片法测定了 76 株红霉素耐药链球菌的耐药表型,其中 cMLS_B 耐药表型占 81.58% (62/76), M 型耐药表型占 6.6% (5/76), iMLS_B 耐药表型占 11.84% (9/76)。耐药基因 *ermB* 和 *mef A* 的 PCR 检测结果表明:在 76 株耐红霉素链球菌中,*ermB* 基因的检出率为 85.6%, *mef A* 的检

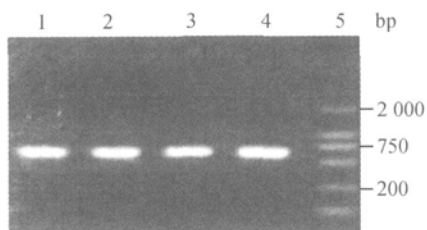
出率为 6.6%,有 6 株耐红霉素菌株未检测到 *ermB* 和 *mef A* 基因,1 株菌同时检测到 *ermB* 和 *mef A* 基因,所有红霉素敏感株均未检测到上述 2 种基因。红霉素耐药表型和基因型的符合率为 92.1%。*ermB* 和 *mef A* 基因的 PCR 扩增电泳图见图 1 和图 2,所有扩增到的片段均对其进行测序,确定为目的片段(数据未显示)。

表 2 76 株耐红霉素菌株对红霉素的耐药表型及耐药基因

Table 2 The phenotype and genotype of 76 erythromycin resistance streptococcus

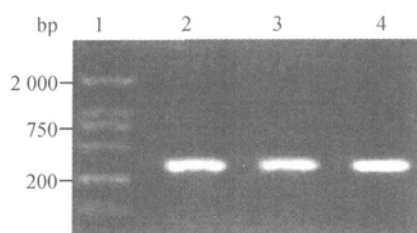
耐药表型 Phenotype	猪源链球菌(n= 58)			牛源链球菌(n= 18)		
	<i>Streptococcus</i> isolated from swine			<i>Streptococcus</i> isolated from bovine		
	菌株数 No. of strains	基因型 Genotype	阳性率/ % Positive rate	菌株数 No. of strains	基因型 Genotype	阳性率/ % Positive rate
cMLS _B	44	<i>ermB</i>	89(39/44)	18	<i>ermB</i>	100(18/18)
M	5	<i>mef A</i>	100(5/5)	0	-	0(0/0)
iMLS _B	9	<i>ermB</i>	89(8/9)	0	-	0(0/0)

- . 未检测到; - . not detected



1~ 3. 检测菌; 4. 阳性菌; 5. DL2 000 DNA Marker

1~ 3. Detected strain; 4. Positive strain; 5. DL2 000 DNA Marker

图 1 部分链球菌的 *ermB* 基因扩增电泳Fig. 1 PCR products of *ermB* of chromosomal DNA in *Streptococcus*

1. DL2 000 DNA Marker; 2. 阳性菌; 3 4. 检测菌

1. DL2 000 DNA Marker; 2. Positive strain; 3, 4. Detected strain

图 2 部分链球菌的 *mefA* 基因扩增电泳Fig. 2 PCR product of *mefA* of chromosomal DNA in *Streptococcus*

3 讨论

目前认为革兰氏阳性菌对红霉素的耐药机制主要集中在两方面, 一是细菌获得 *ermB* 基因表达红霉素核糖体甲基化酶对细菌 23s rRNA 靶基因位点进行甲基化修饰, 减少细菌核糖体与红霉素的结合, 故产生耐药性, 该基因不仅能调控大环内酯类抗生素如红霉素的耐药性, 还可同时影响细菌对其它一些与大环内酯类无结构相关性的抗生素林可霉素、链阳菌素 B 等抗生素的敏感性, 因为它们与细菌 rRNA 的结合位点存在较大重叠区域, 同时会产生交叉耐药, 这种现象称为大环内酯-林可霉素-链阳菌素 B (MLS_B) 表型; 二是细菌获得 *mefA* 基因, 编码一种膜相关蛋白 (约 44.2 ku), 在菌体表面形成“外排泵”, 将进入细菌内的红霉素泵出菌体外, 同时该蛋白泵可主动将 14、15 元环大环内酯类抗生素排出细胞内, 导致细菌耐药性的产生^[6]。又有学者指出这两种耐药机制存在地域差异, 如北美分离株以 M 型耐药为主, 而欧洲地区以 cMLS_B 和 iMLS_B 为主^[7]。该机制在链球菌其它群中可能也存在^[8]。

本研究表明, 国内兽医临床中分离的链球菌的

耐药表型以 cMLS_B 耐药表型为主, 占 81.6%, M 型占 6.8%, 而含 *ermB* 和 *mefA* 基因的链球菌全部对红霉素耐药, 耐药菌株的耐药表型与基因型符合率为 92.1%, 表明 *ermB* 和 *mefA* 基因的表达导致了菌株对红霉素产生耐药性, 这与国外的某些研究结果相似^[7]。6 株耐药菌未检测到 *ermB* 和 *mefA*, 提示链球菌对红霉素的耐药可能存在其它机制, 如产生修饰酶等介导大环内酯类的耐药, 有待进一步证实。

用药敏实验的方法检测细菌对大环内酯类抗生素的耐药性, 较繁琐且耗时长, 存在一定的缺陷, 而本实验建立的 PCR 法检测 *ermB* 和 *mefA* 基因对判断和预测链球菌的耐药性有一定的可靠性和实用价值, 可快速筛选出大环内酯类耐药菌株, 对临床检测提供了极大的方便。

参考文献:

- [1] Palavecino E L, Riedel I, Duran C, et al. Macrolide resistance phenotypes in *Streptococcus pneumoniae* in Santiago, Chile [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2002, 20(2): 108~ 112.
- [2] Petinaki E, Kontos F, Pratti A, et al. Clinical isolates of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Central Greece [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003, 21(1): 67~ 70.
- [3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals [A]. NCCLS Document M31-A [C]. Wayne, 1999.
- [4] Seppala H, Nissinen A, Huovinen P, et al. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland [J]. J Antimicrob Chemother, 1993, 32(9): 885~ 891.
- [5] Sutcliffe J, Grebe T, Wondrack L, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR [J]. Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 1996, 40(8): 2562~ 2566.
- [6] Pechere J C. Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001, 18(1): 25~ 28.
- [7] Tait-Kamradt A, Davies T, Appelbaum P C, et al. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America [J]. Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 2000, 44(12): 3395~ 3401.
- [8] Edouard B, Roland L. Emergence of group A *Streptococcus* strains with different mechanisms of macrolide resistance [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46(5): 1199~ 1203.

Erythromycin Resistance Mechanisms in *Streptococcus* Isolates from Animals

WANG Li-ping, LU Cheng-ping*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To investigate the mechanisms of erythromycin-resistant *streptococcus* isolated from animals, the minimal inhibitory concentrations (MICs) of penicillin, erythromycin and clindamycin against *streptococcus* were detected by agar two-fold dilution, the resistance phenotypes of erythromycin-resistant *streptococcus* were determined by the double disk test, and the presence of *mef A*, *ermB* genes were determined by PCR amplification. The results showed that the rate of resistance to penicillin, erythromycin and clindamycin of 111 strains studied were 54.95%, 68.47% and 64.86%, respectively. In 76 erythromycin resistant strains, 62 isolates (81.58%) were assigned to the cMLS_B phenotype, 5 isolates (6.6%) were M phenotype and 9 isolates (11.84%) were inducibly resistant, expressing the iMLS_B phenotype by the double disk test. The *mef A* gene was present in all of the strains showing the M-resistance phenotype. Some isolates expressing a cMLS_B phenotype and iMLS_B phenotype were confirmed genotypically by the presence of the *ermB* gene, but 6 isolates were not detected the *ermB* and *mef A* gene. Genes coding for both resistance mechanisms were found in one strain. No amplification was detected in all the erythromycin susceptible streptococcus isolates. Erythromycin resistant *Streptococcus* isolated from animals mediated by *ermB* was predominant in China. The PCR amplification can be a useful method to rapidly screen the erythromycin resistant strains.

Key words: *Streptococcus*; resistance phenotype; *ermB* gene; *mef A* gene; PCR method

* Corresponding author

2006年农学类核心期刊联合征订启事

刊名	第一主办单位	邮发代号	刊期	定价(元)	年价(元)	E-mail	电话
微生物学通报	中国科学院微生物所	2-817	双月	32	192	xuj@sun.im.ac.cn	62630421
畜牧兽医学报	中国畜牧兽医学会	82-453	月刊	20	240	xmsyxb@263.net	62815987
遗传	中国遗传学会	2-810	月刊	30	360	ycz@genetics.ac.cn	64889348
遗传学报	中国遗传学会	2-819	月刊	40	480	ycxb@genetics.ac.cn	64889354
植物学报	中国科学院植物所	2-500	月刊	90	1080	abs@ibcas.ac.cn	62836563
植物学通报	中国科学院植物所	2-967	双月	24	144	Cbb@ibcas.ac.cn	62595403
中国棉花	中国农业科学院棉花所	36-24	月刊	3	36	Jcotton@vip.371.net	0372-2525361
中国生态农业学报	中国科学院遗传发育所	82-973	季刊	14.6	58.4	editor@ms.sjziam.ac.cn	0311-85818007
中国生物防治	中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所	2-507	季刊	10	40	zhangxl@cja.org.cn	68919774
中国水产科学	中国水产科学研究院	18-250	双月	20	120	jfishok@publica.bj.cninfo.net	68673921
作物学报	中国作物学会	82-336	月刊	30	360	xbzw@chinajournal.net.cn	68918548