

## 体外诱导耐万古霉素金黄色葡萄球菌及分子机制

王玉冰 李晓丽 王伟轩 陈南 何晓青 金一\* 谢响明\*

(北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083)

**摘要:**【目的】通过前期体外诱导获得耐万古霉素金黄色葡萄球菌,从基因突变方面对万古霉素耐药性菌株进行研究。【方法】通过低浓度万古霉素逐步诱导 13 株敏感性金黄色葡萄球菌,用琼脂稀释法和 E-test 法检测所有菌株对万古霉素的耐药性(最低抑菌浓度, MIC),PCR 扩增与万古霉素耐药性密切相关的 4 个重要基因: *rpoB*、*vraS*、*graR* 和 *graS*,并测序分析,比较诱导前后不同菌株的基因序列。【结果】通过 60 d 的体外诱导实验,13 株对万古霉素敏感性金黄色葡萄球菌中有 6 株被诱导为中介耐药金黄色葡萄球菌(Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, VISA),7 株菌被诱导之后对万古霉素仍处于敏感状态, MIC<4 mg/L。检测诱导前后所有菌株的 *rpoB*、*vraS*、*graR* 和 *graS* 基因发现:有 3 株 VISA 的 *rpoB* 基因同时有 L466S 和 H481N 的突变, *graS* 基因同时有 R232K 的突变。【结论】对万古霉素敏感的金黄色葡萄球菌经过较长时间的体外诱导可发展为 VISA。在已检测的重要基因中, *rpoB* 和 *graS* 的突变对耐药性的发展很可能起关键作用,而 *vraS* 和 *graR* 对这一过程没有显著影响。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌, 万古霉素, 耐药性, 基因突变

## Mechanism of vancomycin intermediate resistance development in *Staphylococcus aureus in vitro*

WANG Yu-Bing LI Xiao-Li WANG Wei-Xuan CHEN Nan HE Xiao-Qing  
JIN Yi\* XIE Xiang-Ming\*

(College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** [Objective] In order to study the mechanism of vancomycin intermediate resistance *Staphylococcus aureus* development, strains were treated with vancomycin *in vitro* and mutations in critical genes were analyzed. [Methods] Thirteen vancomycin susceptible *S. aureus* were treated by low dose of vancomycin *in vitro*. Minimum inhibitory concentrations were determined by the agar dilution and E-test methods. The complete sequences of *rpoB*, *vraS*, *graR* and *graS* associated with drug-resistance development were compared with those in the parental strains. [Results] Through a

**Foundation item:** Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. TD2012-03)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-62336013; E-mail: JIN Yi: wizard.jin@163.com; XIE Xiang-Ming: xxm1005@126.com  
Received: November 19, 2015; Accepted: February 22, 2016; Published online (www.cnki.net): March 11, 2016  
基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. TD2012-03)

\*通讯作者: Tel: 86-10-62336013; E-mail: 金一: wizard.jin@163.com; 谢响明: xxm1005@126.com

收稿日期: 2015-11-19; 接受日期: 2016-02-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-11

60 d vancomycin treatment *in vitro*, 6 vancomycin intermediate resistance strains were generated, whereas 7 strains remained vancomycin susceptible. Sequence analysis revealed that 3 vancomycin intermediate resistance strains contained L466S and H481N mutations in *rpoB* gene and R232K mutation in *graS* gene. **[Conclusion]** Evolution of vancomycin intermediate resistance *S. aureus* could be achieved by long-term vancomycin treatment *in vitro*. Our results suggest that *rpoB* and *graS* play crucial roles in vancomycin non-susceptibility development, whereas *vraS* and *graR* are less important.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Vancomycin, Drug-resistance, Gene mutation

在世界各地,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是造成医院感染和社区感染的最常见病原菌之一,能够引起各种感染,从轻微的皮肤损伤到严重威胁人类生命的疾病,如坏死性肺炎、骨髓炎、心内膜炎和败血症等强致死性疾病<sup>[1]</sup>。有效的抗生素治疗是目前对抗金黄色葡萄球菌感染的主要手段。但随着抗生素的广泛使用,耐药性问题就会越来越严重。迄今为止,人类面临的最大的耐药性问题当属感染几乎遍及全世界的“超级细菌”——耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)<sup>[2]</sup>。目前普遍将糖肽类抗生素万古霉素(Vancomycin)作为治疗MRSA感染的一线用药<sup>[3]</sup>。随着MRSA感染病例的增加和万古霉素的广泛使用,临床上已经出现了万古霉素治疗失败的病例<sup>[4]</sup>,随后对万古霉素敏感性降低的金黄色葡萄球菌在世界各国均有报道,在世界范围内引起了极大关注。

完全耐药金黄色葡萄球菌的耐药性是从耐万古霉素肠球菌(Vancomycin-resistant enterococci, VRE)中获得耐药基因 *vanA* 等形成<sup>[5]</sup>。中介耐药金黄色葡萄球菌的形成与许多调节基因的突变有关,基因的突变能引起细菌的代谢和转录水平发生变化,但耐药性发展过程非常复杂,确切的耐药性产生机制尚未被阐明<sup>[6]</sup>。近年的研究普遍认为中介耐药金黄色葡萄球菌是由敏感菌经过一系列突变后转变而来。本研究通过前期体外诱导获得中介耐万古霉素金黄色葡萄球菌,PCR扩增与万古霉素耐药性密切相关的4个重要基因 *rpoB*、*graR*、*graS* 和 *vraS*,并测序分析。比较诱导前后不同菌株的基因序列,探讨金黄色葡萄球菌在万古霉素的选择压力下耐药性的产生机制,具有重要的理论意义,也可

为研究新的控制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的策略提供重要的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源:**金黄色葡萄球菌共13株。1334 (S1)和1340 (S12)购自中国农业菌种保藏中心(ACCC);ATCC 29213 (S2)、ATCC 6538 (S6)、1.1697 (S3)和1.1529 (S8)购自中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC);21648 (S4)、23656 (S5)和ATCC 27217 (S11)购自中国工业微生物菌种保藏中心(CICC);140660 (S7)和141405 (S13)购自中国药微生物菌种保藏管理中心(CPCC);S9、S10由中国农业大学动物医学院赠与。所有菌株均保存于-80℃。

**1.1.2 试剂:**万古霉素、溶菌酶、溶葡萄球菌素均为美国Sigma公司产品;万古霉素E-test条为法国生物梅里埃产品;脑心浸液琼脂(BHIA)培养基、脑心浸液肉汤(BHI)培养基、Mueller-Hinton (MH)琼脂培养基均为英国Oxoid公司产品;PCR反应所用的ExTaq、dNTPs等均购自大连TaKaRa宝生物工程有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;引物由北京博迈德生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)测定:**(1)琼脂稀释法:配制浓度0.5–4.0 mg/L的BHI-万古霉素选择性固体培养基。过夜脑心浸液琼脂培养的金黄色葡萄球菌用生理盐水调制成 $10^6$  CFU/mL,取100 μL稀释好的菌悬液分别接种于0.5–4.0 mg/L的不同浓度BHI-万古霉素选择性平板的表面。将接种后的平

板置于 37 °C 普通温箱孵育 24 h 后观察结果。于黑色、无反射光的物体表面,用透射光判断试验终点,在投射光下仔细检查,是否有 1 个以上菌落或薄膜样生长, >1 个菌落推测为对万古霉素的敏感性降低菌株,以能抑制细菌生长的最低药物浓度为此菌株的 MIC 值。(2) E-test 法:挑取脑心浸液琼脂培养基上的单个菌落,制成浊度为 0.5 麦氏菌悬液(使细菌的浓度达  $10^8$  CFU/mL 后),均匀涂布于厚 4 mm、直径 150 mm 的 MH 琼脂培养基上,室温放置 15 min 待琼脂表面水分被吸干。贴长 60 mm、宽 5 mm、浓度范围为 0.016–256 mg/L 的 E-test 试验塑料薄条于涂布后的 MH 琼脂培养基上,37 °C 孵育 18 h 读结果。结果按照美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)规定,读取椭圆形抑菌环的边缘与 E-test 试验塑料薄条交叉处的药物浓度标记值即为万古霉素对该菌的最低抑菌浓度(MIC)值。如 E-test 试验塑料薄条两端产生不同的交界点,则读取较高数值侧的 MIC 值,如两侧相差值大于 1 个稀释度,则需重复实验。每次检测 MIC 值均用标准株 ATCC 25923 做质控监测。

**1.2.2 耐万古霉素金黄色葡萄球菌体外诱导:**根据美国临床实验室标准化研究所 2011 年出版的操作手册中的定义:金黄色葡萄球菌对万古霉素的最低抑菌浓度  $\leq 2$  mg/L 时,是万古霉素敏感金黄色葡萄球菌(Vancomycin susceptible *S. aureus*, VSSA); MIC 为 2–4 mg/L 时是指异质性中介耐万古霉素金黄色葡萄球菌(Heterogeneous vancomycin-intermediate *S. aureus*, hVISA), hVISA 是指原代菌对万古霉素敏感,而子代菌种中却含有 VISA 亚克隆,出现频率为  $10^{-6}$  或以上<sup>[7]</sup>; MIC 为 4–8 mg/L,为万古霉素中介耐药金黄色葡萄球菌(Vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA); MIC  $\geq 16$  mg/L,为完全耐药金黄色葡萄球菌(Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA)。

用脑心浸液琼脂培养基复苏金黄色葡萄球菌,挑取单克隆细菌,用生理盐水稀释成 0.5 麦氏左右,取 100  $\mu$ L 接种于浓度为含 1/2MIC 万古霉素浓度的

脑心浸液琼脂平板上,37 °C 恒温培养 24 h。如有菌落生长,接种于同浓度 BHI-万古霉素平板上,每个药物浓度培养 4 d,每 4 天测定一次细菌的万古霉素 MIC,根据细菌的 MIC 决定下次接种的万古霉素平板浓度,连续培养 60 d。当菌株万古霉素 MIC  $\geq 4$  mg/L 时,用 E-test 法再次验证。

**1.2.3 耐药性关键基因检测:**提取基因组 DNA:分别取 10 对金黄色葡萄球菌的细菌培养液 1–5 mL, 12 000 r/min 离心 1 min,尽量吸净上清。配 20 g/L 的溶菌酶,向菌体沉淀中加入 180  $\mu$ L 溶菌酶使沉淀悬浮。再加入 15  $\mu$ L 溶葡萄球菌素,混匀,37 °C 处理 1 h 以上。其余步骤按提取细菌基因组 DNA 试剂盒说明书进行。*graR*、*graS*、*vraS* 和 *rpoB* 基因扩增引物见表 1。25  $\mu$ L PCR 反应体系: *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer (含有  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 上下游引物(25  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 DNA (50–100 ng) 1  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。根据预扩增的目的基因 *graR*、*graS*、*vraS* 和 *rpoB* 基因片段大小、碱基构成、引物序列的不同,设置不同的反应条件。*graS*、*rpoB* 基因的扩增条件如下: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C 7 min。*vraS*、*graR* 基因的反应条件如下: 94 °C

表 1 *graR*、*graS*、*vraS*、*rpoB* 基因上下游引物  
Table 1 PCR primers used for *graR*, *graS*, *vraS* and *rpoB*

| 引物名称<br>Primers | 引物序列<br>Primer sequence (5'→3')    | 目标片段<br>Product length (bp) |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------------|
| <i>graR</i> F   | GGATTAAGATTTCACAAAGTC              | 750                         |
| <i>graR</i> R   | GAGATTTCACAAAAATAAGCTAC            |                             |
| <i>graS</i> F   | ATGAGTATGGAAGCTGGCGCA              | 1 592                       |
| <i>graS</i> R   | TTCCCAGATCCAGAGGGACC               |                             |
| <i>vraS</i> F   | GACGTAGAGGTGATTATCGAT<br>GAACCACT  | 1 044                       |
| <i>vraS</i> R   | TTAATCGTCATACGAATCCTCCT<br>TATTTAA |                             |
| <i>rpoB</i> F1  | GCAAGGTATGCCATCTGCAAAG             | 1 954                       |
| <i>rpoB</i> R1  | TGCTTCGGCGATACATCCA                |                             |
| <i>rpoB</i> F2  | ACGTGAACGTGCTCAAATGG               | 2 262                       |
| <i>rpoB</i> R2  | ATGCCTTTGTAGCGAACACG               |                             |

3 min; 94 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C 7 min。结束后, 将 PCR 产物于 4 °C 保存。

PCR 产物电泳检测, 以目标片段处出现荧光条带为阳性。PCR 产物纯化后送北京博迈德生物技术有限公司测序。将诱导前后 13 对金黄色葡萄球菌的 *graR*、*graS*、*rpoB*、*vraS* 基因进行序列比对, 研究基因突变情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 MIC 测定

通过 60 d 体外诱导金黄色葡萄球菌, 测定诱导前后金黄色葡萄球菌对万古霉素的 MIC, 如表 2 所示。发现除了菌株 S3 诱导前后 MIC 值没有发生变化之外, 其余 12 株金黄色葡萄球菌对万古霉素 MIC 都有不同程度的升高, 其中 6 株菌经过体外诱导之后成为 VISA, 7 株菌诱导之后对万古霉素仍处于敏感状态, MIC < 4 mg/L。

### 2.2 万古霉素诱导结果

13 株金黄色葡萄球菌通过万古霉素的逐步诱导 60 d 后, 有 7 株菌对万古霉素仍处于敏感状态, 万古霉素 MIC 仍未超过 4 mg/L, 除了 S3 菌株的 MIC 值没有发生变化之外, 其余 6 株菌 S5、S6、S8、S11、S12 和 S13 的 MIC 值都有所提升。在这 13 株金黄色葡萄球菌中, 6 株菌诱导为 VISA (万古霉素 MIC > 4 mg/L)。其中 S9 的 MIC 为 8 mg/L, 剩余 5 株菌的万古霉素 MIC 均超过 8 mg/L, 如表 2 所示。图 1 为 13 株金黄色葡萄球菌万古霉素 MIC 随诱导时间的变化情况。

### 2.3 耐药性关键基因检测

以所有菌株的基因组 DNA 为模板, 利用表 1 中的特异性引物对所有菌株的耐药性基因 *graR*、*graS*、*rpoB*、*vraS* 进行 PCR 扩增。电泳检测 PCR 产物均能获得目的条带。图 2 为 *graR*、*graS*、*rpoB* 和 *vraS* 的基因条带。所有菌株的 PCR 产物纯化后送北京博迈德生物技术有限公司测序。将诱导前后 13 对金黄色葡萄球菌的 *graR*、*graS*、*rpoB* 和 *vraS* 基因进行序列比对。比对结果如表 3 所示。

表 2 金黄色葡萄球菌诱导前后万古霉素 MIC 的比较

| 菌株编号<br>Strains  | 诱导前万古霉素<br>MIC<br>MICs of parental<br>strains<br>(mg/L) | 诱导后万古霉素<br>MIC<br>MICs of vancomycin<br>treated strains<br>(mg/L) |
|------------------|---|---|
| S1 (1334)        | 1.5   | 10  |
| S2 (ATCC 29213)  | 1.5   | 12  |
| S3 (1.1697)      | 1.0   | 1   |
| S4 (21648)       | 1.5   | 14  |
| S5 (23656)       | 1.5   | 3   |
| S6 (ATCC 6538)   | 1.5   | 3   |
| S7 (140660)      | 1.5   | 12  |
| S8 (1.1529)      | 0.5   | 3   |
| S9               | 1.0   | 8   |
| S10              | 1.0   | 14  |
| S11 (ATCC 27217) | 1.5   | 3   |
| S12 (1340)       | 1.5   | 3   |
| S13 (141405)     | 1.5   | 3   |

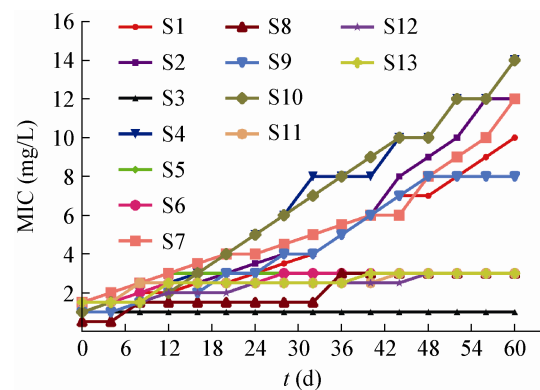


图 1 万古霉素诱导耐药性时间曲线图

Figure 1 The process of vancomycin non-susceptibility development

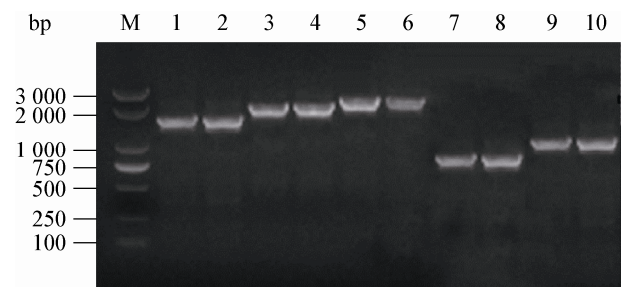


图 2 耐药性关键基因的扩增

Figure 2 Amplification of the resistance genes

注: M: 核酸标准分子量; 1、2: *graS* 扩增产物; 3、4: *rpoB1* 扩增产物; 5、6: *rpoB2* 扩增产物; 7、8: *graR* 扩增产物; 9、10: *vraS* 扩增产物。

Note: M: DNA marker; 1, 2: PCR products for *graS*; 3, 4: PCR products for *rpoB1*; 5, 6: PCR products for *rpoB2*; 7, 8: PCR products for *graR*; 9, 10: PCR products for *vraS*.

表 3 耐药性关键基因变化  
Table 3 Mutations in *rpoB*, *vraS*, *graR* and *graS*

| 菌株<br>Strains | MIC (mg/L) | <i>rpoB</i>          | <i>vraS</i> | <i>graR</i>  | <i>graS</i>        |
|---------------|------------|----------------------|-------------|--------------|--------------------|
| S4            | 14         | L466S, H481N, T1182I | -           | -            | I59L, R232K        |
| S10           | 14         | L466S, H481N         | G15V        | -            | L26F, I59L, R232K  |
| S2            | 12         | R917S                | -           | -            | -                  |
| S7            | 12         | L466S, H481N         | V15G        | -            | R232K              |
| S1            | 10         | T1182I               | -           | -            | L26F, I59L, R232K  |
| S9            | 8          | -                    | -           | -            | L26F               |
| S5            | 3          | T1182I               | -           | I136V, G207S | T224I              |
| S6            | 3          | I1182T               | -           | -            | -                  |
| S8            | 3          | -                    | -           | -            | L26F, D223Y        |
| S11           | 3          | -                    | -           | -            | -                  |
| S12           | 3          | -                    | -           | -            | F26L, L59I         |
| S13           | 3          | -                    | -           | -            | -                  |
| S3            | 1          | -                    | -           | -            | L26F, D223Y, T224I |

注: - : 氨基酸没有发生变化。

Note: -: Showed no change in the amino acid.

经过实验室 60 d 的体外诱导, 大部分菌株都至少有一个基因发生了突变, 并导致编码的氨基酸发生改变。13 株菌中有 6 株菌诱导成 VISA, 占所有菌株的 46%。在这 5 株 *rpoB* 基因存在突变的 VISA 菌株中有 3 株菌 S4、S10、S7 同时有 L466S、H481N 这两个突变, 占 *rpoB* 突变率的 60%; 有 2 株菌同时有 T1182I 的突变。在 7 株 VSSA 中, 有 2 株菌存在 *rpoB* 氨基酸的突变, 其中 S5 也存在 T1182I 突变, 而 S6 却发生 I1182T 的突变, 即第 1182 位的异亮氨酸被苏氨酸替代; 另外 5 株 VSSA 菌株 S8、S11、S12、S13 和 S3 的 *rpoB* 基因均未发现氨基酸突变。

经过 60 d 的体外诱导之后, 6 株 VISA 中有 2 株菌的 *vraS* 基因发生氨基酸的改变, 其中 VISA 菌株 S10 发生了 G15V 的突变, 而 S7 却是 V15G 的突变; 其余 11 株菌, 包括 7 株 VSSA 的 *vraS* 基因都未发生变化。*graR* 仅在 1 株 VSSA 中发生 I136V、G207S 的突变。

6 株 VISA 中也有 5 株菌的 *graS* 基因经过 60 d 的体外诱导发生了氨基酸突变, 与 *rpoB* 基因的突变率在 VISA 中所占的比例相似, VISA 中只有 S2 菌株的 *graS* 基因未发现氨基酸的改变。在这 5 株

*graS* 基因存在突变的 VISA 菌株中有 4 株菌 S4、S10、S7 和 S1 同时有 R232K 突变, 占 *graS* 突变率的 80%。同时有 3 株 VISA 菌 S10、S1 和 S9 都有 L26F 的突变, 3 株 VISA 菌 S4、S10、S1 都有 I59L 突变。在 7 株 VSSA 中, 有 3 株菌的 *graS* 基因在诱导前后未发现氨基酸的改变。其中 L26F、D223Y、T224I 的突变各有两株菌产生, 但是 S12 却发生了 F26L、L59I 的突变。

### 3 讨论

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有多重耐药性, 感染率逐年升高, 与艾滋病、病毒性乙型肝炎并列为世界三大感染性疾病, 严重威胁着人类的健康<sup>[8]</sup>, 万古霉素通过抑制细胞壁合成来达到抑制细菌的目的<sup>[9]</sup>。我国暂无 VISA 和 VRSA 的报道, 但据最新研究表明, 我国耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对万古霉素的 MIC 有逐年上升的趋势<sup>[10]</sup>, 金黄色葡萄球菌对万古霉素的敏感性下降已成为人们关注的热点。本研究利用前期实验通过实验室体外诱导获得耐万古霉素金黄色葡萄球菌, 结果显示: 13 株万古霉素敏感性金黄色葡萄球菌体外经万古霉素诱导 60 d 后, 发现除了菌株 S3 诱导

前后 MIC 值没有发生变化之外,其余 12 株金黄色葡萄球菌对万古霉素 MIC 都有不同程度的升高,其中 6 株菌经过诱导之后达到万古霉素中介耐药,占菌株数量的 46%,说明大多数对万古霉素敏感的金黄色葡萄球菌在长时间的选择压力下都有转变为 VISA 的潜力。此现象警示各医院系统要重视耐药性问题,合理地选择使用抗生素药物。

多种基因及基因调控系统参与金黄色葡萄球菌细胞壁的合成代谢,与万古霉素 MIC 值的改变密切相关<sup>[11-12]</sup>。过去关于万古霉素耐药性机制的研究主要集中在双组分调控系统(Two-component regulatory system, TCRS)。有大量报道表明,TCRS 相关基因 *vraRS*<sup>[13]</sup>、*graRS*<sup>[14-16]</sup>、*walkR*<sup>[17-18]</sup> 的突变与 hVISA 和 VISA 的出现直接相关。编码 RNA 聚合酶  $\beta$  亚单位的 *rpoB* 突变也可使 Mu3 (hVISA)转变为 Mu50 (VISA)<sup>[19-20]</sup>。Cui 等通过基因工程研究指出 *vraS* 基因的 I5N 突变和 *graR* 基因的 N197S 突变在 VSSA 向 VISA 的逐渐转变中起着非常重要的作用<sup>[15]</sup>。但也有报道 *vraSR* 突变不经常在 VISA 临床菌株中找到<sup>[21]</sup>。Howden 等<sup>[16]</sup>报道用 VISA 的 *graS* 等位基因替换对万古霉素敏感的亲本株的 *graS* 等位基因,导致敏感菌的万古霉素抗性达到敏感菌和临床分离株 VISA 之间的一个水平。JKD6008 (VISA)和 JKD6009 (VSSA)相比较,尽管有 6 个基因突变,但是有一个潜在的重要突变导致了预测的第 136 位非极性氨基酸异亮氨酸取代了极性氨基酸苏氨酸(T136I)。导入 SACOL0717 (*graS*) T136I 突变到 JKD6009,提高了万古霉素抗性。Matsuo 等<sup>[19]</sup>报道编码 RNA 聚合酶  $\beta$  亚单位的 *rpoB* 基因的第 481 位氨基酸的组氨酸被替换为酪氨酸(H481Y)增加了金黄色葡萄球菌对万古霉素的抗性。

本研究对 13 株金黄色葡萄球菌进行 PCR 扩增,扩增与万古霉素耐药性密切相关的 4 个重要基因:*rpoB*、*vraS*、*graR* 和 *graS*,并测序分析,比较诱导前后不同菌株的氨基酸序列。比对结果发现:有 3 株 VISA 菌株同时有 L466S、H481N 这两个突变,但未发现 H481Y 的突变。Alam 等<sup>[3]</sup>报道 *rpoB* 基因的 H481 位置是金黄色葡萄球菌万古霉素

MIC 值升高的一个重要位置。H481Y/N 位于利福平耐药性区域,该位点在临床利福平耐药性金黄色葡萄球菌中已被多次报道<sup>[22-24]</sup>。与其他突变相比,*rpoB* 的突变(包括 H481N 的突变)对利福平耐药性和万古霉素耐药性具有双重作用<sup>[25-26]</sup>。虽然 *rpoB* 的 L466S 突变未曾在先前的研究中报道过,但本研究中有 H481N 突变的 3 株 VISA 中都同时伴随着 L466S 的突变。同时,具有 L466S 和 H481N 突变的 3 株 VISA 的 *graS* 基因上都包含一个新的突变位点 R232K,并且这 3 株 VISA 的 MIC 值都较高(MIC $\geq$ 12 mg/L);而 S1 菌株只含有 R232K 的突变,MIC 值较低(MIC=10 mg/L)。因此推测 *rpoB* 的 L466S 和 H481N 的突变与 *graS* 的 R232K 突变具有协同作用,协同提升万古霉素的耐药性,使其达到一个较高的耐药性水平。尽管有报道表明 H481Y、I5N、N197S 和 T136I 的突变有助于 VSSA 成为 VISA,但在本研究中却未发现这些突变。此外,本研究发现 VISA 菌株 S2 的 *rpoB* 基因第 917 位精氨酸突变为丝氨酸,*vraS*、*graR*、*graS* 基因未发现氨基酸的置换,其 MIC 为 12 mg/L。推测 *rpoB* 的 R917S 突变与金黄色葡萄球菌对万古霉素的耐药性有关,但是该突变的具体功能还有待进一步证实。与其他的报道相比,有些菌株的 *rpoB*、*vraS*、*graR* 和 *graS* 基因上不包含重要的突变,但是 MIC 值仍有所提升,这表明可能有一些其他未知的基因或者突变位点与万古霉素耐药性的形成有关。

本研究还发现一些突变位点既可能出现在 VISA 菌株,也可能出现在 VSSA 菌株中,与万古霉素 MIC 升高不具有明显的相关性。包括 *rpoB* 基因的 T1182I/I1182T 突变、*vraS* 基因的 G15V/V15G 突变、*graS* 基因的 L26F/F26L 突变及 I59L/L59I 突变。另外,*graS* 基因上的 D223Y、T224I 突变与 *graR* 的 I136V、G207S 这 4 个突变仅发生于 VSSA 菌株中,推测与 VISA 的转变无关。有报道表明 *graS* 基因上的 L26F、I59L 和 T224I 等位点既可能出现在 VISA 菌株,也可能出现在 VSSA 菌株中且突变率较高,但其对万古霉素耐药性的产生是否

具有显著影响还不清楚<sup>[27]</sup>。

#### 4 结论

研究表明 VISA 可在实验室诱导获得, 并且诱导成功率较高, 敏感型金黄色葡萄球菌长期在万古霉素的选择性压力下可转变成中介耐药菌株。相比 *vraS* 和 *graR* 基因, 发生在 *rpoB* 和 *graS* 上的突变对耐药性的产生更具有重要的意义; 研究在 VISA 中的 *rpoB* 和 *graS* 基因上发现 3 个新的突变位点: L466S、R917S、R232K。这些突变位点很可能在万古霉素耐药性发展中起关键作用。

#### 参考文献

- [1] David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(3): 616-687
- [2] Zhang X. Biological characteristics and resistance mechanisms of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Third Military Medical University, 2014 (in Chinese)  
张霞. 万古霉素中介耐药金黄色葡萄球菌的生物学特性及耐药机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学硕士学位论文, 2014
- [3] Alam MT, Petit III RA, Crispell EK, et al. Dissecting vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus* using genome-wide association[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2014, 6(5): 1174-1185
- [4] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1997, 40(1): 135-146
- [5] Meehl M, Herbert S, Götz F, et al. Interaction of the GraRS two-component system with the *VraFG* ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(8): 2679-2689
- [6] Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, 30(5): 398-408
- [7] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin[J]. *The Lancet*, 1997, 350(9092): 1670-1673
- [8] Dantes R, Mu Y, Belflower R, et al. National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, United States, 2011[J]. *JAMA Internal Medicine*, 2013, 173(21): 1970-1978
- [9] Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 99-139
- [10] Zhuo C, Xu YC, Xiao SN, et al. Glycopeptide minimum inhibitory concentration creep among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from 2006-2011 in China[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013, 41(6): 578-581
- [11] Gardete S, Kim C, Hartmann BM, et al. Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(2): e1002505
- [12] Dmitriev BA, Toukach FV, Holst O, et al. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(21): 7141-7148
- [13] Mwangi MM, Wu SW, Zhou YJ, et al. Tracking the *in vivo* evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(22): 9451-9456
- [14] Neoh HM, Cui LZ, Yuzawa H, et al. Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(1): 45-53
- [15] Cui LZ, Neoh HM, Shoji M, et al. Contribution of *vraSR* and *graSR* point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(3): 1231-1234
- [16] Howden BP, Stinear TP, Allen DL, et al. Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene *graS* that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(10): 3755-3762
- [17] Howden BP, McEvoy CRE, Allen DL, et al. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator *WalKR*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(11): e1002359
- [18] Shoji M, Cui LZ, Iizuka R, et al. *walK* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(8): 3870-3881
- [19] Matsuo M, Hishinuma T, Katayama Y, et al. Mutation of RNA polymerase  $\beta$  subunit (*rpoB*) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(9): 4188-4195
- [20] Drummelsmith J, Winstall E, Bergeron MG, et al. Comparative proteomics analyses reveal a potential biomarker for the detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains[J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(12): 4690-4702
- [21] Kato Y, Suzuki T, Ida T, et al. Genetic changes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: predominance of amino acid substitutions in *YvqF/VraSR*[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 65(1): 37-45
- [22] Aubry-Damon H, Soussy CJ, Courvalin P. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(10): 2590-2594
- [23] O'Neill AJ, Huovinen T, Fishwick CWG, et al. Molecular genetic and structural modeling studies of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase and the fitness of rifampin resistance genotypes in relation to clinical prevalence[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 50(1): 298-309
- [24] Mick V, Dominguez MA, Tubau F, et al. Molecular characterization of resistance to rifampicin in an emerging hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST228, Spain[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 68
- [25] Watanabe Y, Cui LZ, Katayama Y, et al. Notes: impact of *rpoB* mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(7): 2680-2684
- [26] Gao W, Cameron DR, Davies JK, et al. The *rpoB* H<sub>481</sub>Y rifampicin resistance mutation and an active stringent response reduce virulence and increase resistance to innate immune responses in *Staphylococcus aureus*[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2012, 207(6): 929-939
- [27] Yoo JI, Kim JW, Kang GS, et al. Prevalence of amino acid changes in the *yvqF*, *vraSR*, *graSR*, and *tcaRAB* genes from vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(2): 160-165