

喹诺酮类抗菌药对金黄色葡萄球菌抗生素耐药质粒的消除作用

姚 勤 陈小英 陈知本

(生物研究中心)

摘要 以喹诺酮类药物作为质粒消除剂,进行抗生素耐药质粒定位实验。通过 10 株金黄色葡萄球菌耐药株的实验,确定其中 3 株菌具有氯霉素、四环素和红霉素耐药质粒。并比较了喹诺酮类与 SDS 的消除作用,发现在不同浓度的消除剂及不同菌株中其消除作用不相同。

关键词 金黄色葡萄球菌;质粒消除;喹诺酮类

金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)引起的感染很普遍,特别是医院内感染耐药性金葡菌对病人更有危险性。为了解决这个问题,人们进行了广泛、深入的探讨。从遗传学基因定位的角度探讨耐药机制是其中一个方面。目前耐药质粒的定位方法主要有:遗传转移法,如转导、转化、接合等,消除法和电泳法。运用上述三种方法中的两种,即可进行定位^[1]。本实验运用消除法和电泳法对三株金葡菌的耐药质粒进行了定位。诺氟沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星和盐酸洛美沙星是新型喹诺酮类抗菌药,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有高度活性,对金葡菌有较好的抗菌活性,其作用机理是通过抑制细菌 DNA 回旋酶而抑制细菌 DNA 合成^[2]。实验中比较了上述喹诺酮类药物与 SDS 对抗生素耐药质粒的消除作用,发现在不同浓度的消除剂及不同菌株中其消除作用不相同。

1 材料和方法

(一) 试验菌:金葡菌耐药菌株 85094, 90013, 85040 等十株及金葡菌敏感菌株 209P, 均为本室保存株。

(二) 试剂:抗生素标准品:青霉素, 氨苄

青霉素三水物、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、四环素、红霉素、氯霉素, 来自中国药品生物制品检定所。喹诺酮类药物:诺氟沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星和盐酸洛美沙星, 由王尔华教授赠与。

(三) 试验菌耐药性测定:按 Lennette 氏法^[3], 以琼脂平板稀释法进行 MIC 测定。

(四) 质粒消除法:各消除剂原液用无菌水配制。SDS 100 μg/ml, 诺氟沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星、盐酸洛美沙星均为 3 μg/ml; 用 BPY 液体培养基稀释原液, 配制成不同稀释度的消除剂; 各加入 0.1 ml 试验菌 BPY 过夜培养液(稀释至 10⁴ CFU/ml); 37℃ 处理 48 h 后, 取低于抑菌浓度的两管菌液进行平板划线分离; 单菌落再分别点种于含抗生素平板(四环素、红霉素、链霉素、氯霉素各 10 μg/ml) 及不含抗生素的平板上, 每个平板同时点种金葡菌 209 P 为敏感菌对照。耐药性消除株再进行二次耐药性复测及革兰氏染色, 菌形检测。

(五) 质粒抽提与电泳:耐药性原始菌株和耐药性消除株进行质粒抽提与电泳检测。质粒抽提与电泳参照本室报道^[4]。取少量斜面菌于高渗液中, 加入溶菌酶和溶葡萄球菌

素,37℃水浴作用45 min后,再加入Brij-58裂解液和RNA酶,经碱酚和氯仿-异戊醇去蛋白质后,质粒DNA被抽提。质粒检测用0.7%琼脂糖(含溴化乙啶1 μg/ml)进行平板电泳,90 V恒压电泳,溴酚兰甘油为前沿指示剂。电泳毕,在2537 nm波长的紫外线下,

通过红色滤光片拍照记录。

2 结果与讨论

8种抗生素对10株金葡菌进行耐药性测定,结果见表1。

Tab 1. Antibiotic Resistance of *S. aureus*

Strains	MIC(μg/ml)							
	Pc	Ap	Sm	Km	Gm	Tc	Cm	Em
85040	<0.5	0.5	64	2	<0.25	16	4	128
85094	2	1	2	1	<0.25	16	4	2
90013	0.5	0.5-1	2	1	0.5	16-32	32	>128
82090	0.5-1	1	2	2	<0.25	16	4	<0.25
82143	4	4	2	1	0.5	16-32	4	<0.25
82184	1-2	2	2	1	<0.25	16-32	4	32
82052	32	32	>128	128	16	128	32	>128
82044	2	2	1-2	1	<0.25	2	4	<0.25
85046	1-2	1-2	64	1	<0.25	16-32	4	<0.25
82139	4-8	4	2	1	<0.25	2	4	<0.25

Pc:Penicillin; Ap:Ampicillin; Sm:Streptomycin; Km:Kanamycin;

Gm:Gentamycin; Cm:Chloromycetin; Em:Erythromycin; Tc:Tetracycline

试验株分别用SDS、诺氟沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星和盐酸洛美沙星处理,以SDS为对照,将它的消除结果与各种喹诺酮

抗菌药相比较,进行统计学方差处理。在10株试验菌中,获得3株耐药性及质粒消除株,结果见表2,3和4。

Tab 2. Comparison of Plasmid Elimination in *S. aureus* 85094 by SDS and Quinolones

Agents	Concentration (μg/ml)	Total Colonies	Susceptible Colonies	Plasmid Elimination(%)
SDS	60.0	836	75	8.97
Norfloxacin	0.3	112	9	8.04
	0.6	321	10	3.12
Ofloxacin	0.12	247	58	23.5*
	0.3	217	118	54.4*
Ciprofloxacin	0.24	310	310	100*
	0.3	274	1	0.36
Lomefloxacin	0.19	277	56	20.2*
	0.38	309	71	23.0*

*P<0.01 vs SDS

Tab 3. Comparison of Plasmid Elimination in *S. aureus* 85040 by SDS and Quinolones

Agents	Concentration (μg/ml)	Total Colonies	Susceptible Colonies	Plasmid Elimination(%)
SDS	70	326	3	0.92
	80	346	3	0.88
Norfloxacin	0.3	318	37	11.6*
	0.18	345	2	0.58
Ofloxacin	0.24	369	2	0.54
	0.05	281	5	1.78
Ciprofloxacin	0.09	304	0	0
	0.05	304	10	3.2**
Lomefloxacin	0.09	306	3	0.9

*P<0.01, **P<0.05 vs SDS

Tab 4. Comparison of Plasmid Elimination in *S. aureus* 90013 by SDS and Quinolones

Agents	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Total Colonies	Susceptible Colonies	Plasmid Elimination(%)
SDS	100	271	136	50.2
	120	157	55	35.0
Norfloxacin	0.3	106	60	56.6*
	0.3	116	54	46.6**
Ofloxacin	0.42	285	2	0.70
	0.09	250	95	38.0
Ciprofloxacin	0.19	301	68	22.6
	0.38	127	95	74.8***
Lomefloxacin	0.19	204	75	36.8

* $P<0.01$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SDS; **** $P<0.01$ vs 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SDS.

自六十年代以来,众所周知各种理化因素影响质粒消除。特别是抗生素类的消除作用更引人关注。此外,维生素 C^[5]和大黄素^[6]等也有消除质粒的作用。1988 年 Junior, Jose Pinto 等^[7]报道 8-methoxysoralen 与紫外线共同作用,消除金葡萄的四环素质粒。有关吖啶黄消除 F' lac 质粒的动力学模型也有研究^[8]。喹诺酮类抗菌药是近年来临幊上应用较广泛而有效的抗菌药。1988 年 Fu 等^[9]报道喹诺酮类抗菌药可消除抗生素耐药质粒。本实验的结果发现诺氟沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星和盐酸洛美沙星均有消除耐药性的作用。这些消除剂的浓度为:诺氟沙星 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 氧氟沙星 0.12~0.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 盐酸环丙沙星 0.05~0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 盐酸洛美沙星 0.05~0.38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

由表 2,3 和 4 的统计学结果可得,在这 3 株菌中洛美沙星在合适浓度下对金葡萄的耐药性消除优于 SDS,且有显著性差异。在 90013 和 85040 两株菌中诺氟沙星对金葡萄的耐药性消除优于 SDS,且有显著性差异。在合适浓度下氧氟沙星和盐酸环丙沙星对金葡萄 85094 的耐药性消除优于 SDS,且有显著性差异。但也有 SDS 优于喹诺酮者,如诺氟沙星和 SDS 对菌株 85094, 氧氟沙星对 90013 等。由此可见,相同消除剂在不同菌株中处理结果有差异;相同的菌株用不同消除剂处理结果也有差异。

消除剂浓度对耐药性消除也有影响,但不与浓度成正比。见表 2,除洛美沙星外,其余药物的不同浓度有显著性差异,盐酸环丙沙星浓度增加,消除率反而降低。在表 3 中,盐酸洛美沙星和盐酸环丙沙星也同样随着药物浓度增加,消除率反而降低。在表 4 中,除洛美沙星随着消除剂浓度增加,消除率提高外,其余药物作用与之相反。因此,可以认为不同抑菌浓度的消除剂的质粒消除作用不同,因而在实验时应采用两种以上浓度。

在本实验条件下,不同喹诺酮类药物对金葡萄的 MIC 分别为:诺氟沙星 0.6~0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 氧氟沙星 0.3~0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 盐酸环丙沙星 0.19~0.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 盐酸洛美沙星 0.38~0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

实验所得的耐药性消除株与原始耐药株一起进行质粒检测,从而确定耐药质粒的位置。通过实验,在 3 株菌中有 3 种耐药质粒被定位,即红霉素、四环素和氯霉素耐药质粒。金葡萄 85094 菌株耐四环素。由图 1 分析可知,85094 菌株只有一条质粒带,85094 菌株在消除质粒的同时也消除四环素耐药性,证明此质粒编码四环素耐药性。金葡萄 85040 菌株耐四环素、红霉素及链霉素。由图 2 分析可知,85040 菌株有二条质粒带,85040 消除株 3 无红霉素耐药性,消除株 1 无四环素耐药性,电泳后都只剩一条带,可得出这样结论:a 号带为红霉素耐药质粒,b 号带为四环

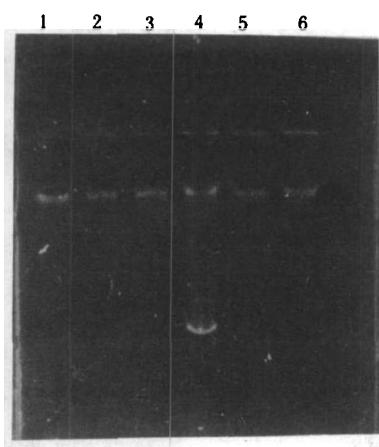


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of resistant curing strains and *S. aureus* 85094
1,2,3,5,6. curing strains; *S. aureus* 85094 (Tc^+); 4. original strains; *S. aureus* 85094 (Tc^+)

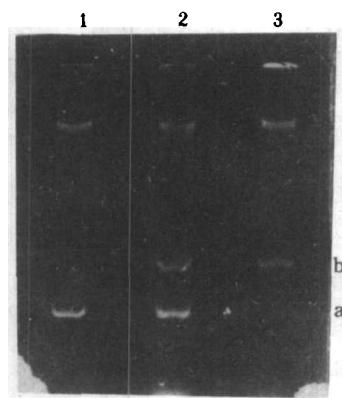


Fig 2. Agarose gel electrophoresis of resistant curing strains and *S. aureus* 85040

1. curing strain (Tc^+); 2. *S. aureus* 85040 (Tc^+, Em^+); 3. curing strain (Em^+)
噬菌体 90013 菌株耐四环素、氯霉素及红霉素。金黄色葡萄球菌 90013 菌株耐四环素、氯霉素及红霉素，由图 3 可得，原始菌有 5 条质粒带，而消除株 1 有 4 条质粒带，无氯霉素耐药性；耐药性消除株 2 有 4 条质粒带，无红霉素耐药性；耐药性消除株 3 有 4 条质粒带，无四环素耐药性；耐药性消除株 5 有 3 条质粒带，其四环素、氯霉素耐药性被消除；耐药性消除株 6 有 2 条质粒带，其四环素、红霉素耐药性被消除，且分子量较大而表型未知的一条带也被消除；耐药性消除株 7 只有 2 条质粒带，此消除株的红霉素、四环素及氯霉素耐

药性均被消除。从而认为 a 号带为红霉素耐药质粒，b 号带为氯霉素耐药质粒，c 号带为四环素耐药质粒。除上述 3 株菌外，其它试验菌经同样操作，取 1000 以上单菌落进行实验均未得消除株。

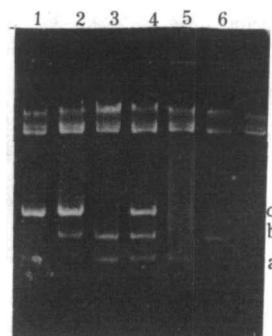


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of *S. aureus* 90013 and resistant curing strains
1. curing strain ($Tc^+Em^+Cm^+$); 2. curing strain ($Tc^+Em^+Cm^+$);
3. curing strain ($Tc^+Em^+Cm^+$); 4. *S. aureus* 90013 ($Tc^+Em^+Cm^+$);
5. curing strain ($Tc^+Em^+Cm^+$); 6. curing strain ($Tc^+Em^+Cm^+$);
7. curing strain ($Tc^+Em^+Cm^+$)

喹诺酮类药物作为化学治疗剂对临床应用有双重意义，即在抑菌作用的同时，还有消除耐药质粒作用，无疑对喹诺酮药物的广泛应用提供了良好的前景。

3 小结

(一) 以喹诺酮类药物处理 10 株抗生素耐药性金黄色葡萄球菌，结果有 3 株菌的耐药性及质粒被消除，从而定位红霉素、四环素和氯霉素耐药质粒。

(二) 以喹诺酮类药物诺氟沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星和盐酸洛美沙星作为消除剂，同时以 SDS 为对比，证明不同浓度消除剂及不同菌株对质粒的消除作用存在差异。

参考文献

- Stanisich VA. Identification and analysis of plasmids at the genetic level, In: Bennett PM et al. Methods in Microbiology: Plasmid Technology. London: Academic Press, 1984:5
- 国家医药管理局医药工业情报中心站. 新药指南. 北京: 中国医药科技出版社, 1989:38

- 3 Lennette EH et al. Manual of clinical microbiology, 4th ed., Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985;967
- 4 陈小英,冯瑞山,陈知本. 金黄色葡萄球菌抗生素耐药质粒 DNA 的抽提及检测. 南京药学院学报, 1985; 18 (2): 53
- 5 Amáble Cuevas CF. Loss of penicillinase plasmids of *S. aureus* after treatment with L-ascorbic acid. *Mutation Research*, 1988; 207: 107
- 6 陈小英. 大黄素对金黄色葡萄球菌抗生素耐药质粒的消除作用. 南京药学院学报, 1985; 18(2): 48
- 7 Junior, Jose Pinto de Siqueira et al. Elimination of a *S. aureus* plasmid by 8-methoxysoralen plus near UV light. CA 1988; 109: 333
- 8 Sykora, Peter et al. A kinetic model for plasmid curing. *Plasmid*, 1989; 21(2): 85
- 9 Fu KP et al. Elimination of antibiotic-resistant plasmid by quinolone antibiotics. CA, 1988; 109: 401

Elimination of Antibiotic-resistant Plasmids by Quinolones in *Staphylococcus aureus*

Yao Qin, Chen Xiaoying, Chen Zhiben

Biological Research Center

Elimination of antibiotic-resistant plasmids in *S. aureus* by quinolones and SDS was reported. It was demonstrated that among ten tested strains of *S. aureus*, tetracycline, chloromycetin and erythromycin resistance plasmids were found in three strains 85094, 85040 and 90013. By comparing elimination rates for quinolone and SDS, it was revealed that the effect on plasmid elimination was variable under the condition of different concentrations of curing agents and different strains.

Key words *S. aureus*; Plasmid elimination; Quinolone

高校中医函授招生

选用全国统编高校函授教材,由专家教授对中医自学高考全面辅导。凡高、初中以上文化的医疗卫生人员和中医爱好者均可报名。来函至 230001 合肥市阜阳路 48 号安徽省高校联合培训部即可寄简章。