

· 论著 ·

万古霉素对MRSA中SarA介导的生物膜形成的影响

南阳医学高等专科学校第一附属医院检验科 (河南 南阳 473000)

王馥香

【摘要】目的 研究万古霉素对MRSA的SarA基因表达水平和生物膜形成的影响。**方法** 自本院MRSA心内膜炎患者血培养中收集获得MERS菌株957, 并以此为母本菌株培养获得系列耐药菌株957-V8、957-V16和957-V32。然后采用荧光定量 PCR方法对这四种MRSA菌株中生物膜形成相关基因SarA mRNA水平进行检测, 并进行生物膜形成试验, 在570nm处测量结晶紫染色后生物膜的吸光度, 试验均重复3次。**结果** 体外诱导获得的系列耐药菌株957-V8、957-V16和957-V32的SarA基因mRNA水平显著高于原代957菌株相比, 而且SarA基因mRNA量随着菌株万古霉素MIC值的升高而升高; 四株菌株均可形成生物膜, 且诱导菌株957-V8、957-V16和957-V32生物膜的光密度值显著高于原代菌株957, 随着MIC值的升高, 菌株生物膜的光密度值逐渐升高。**结论** 万古霉素可以诱导MRSA的生物膜增厚, 并增强菌株的耐药性。

【关键词】 万古霉素; MRSA; SarA; 生物膜

【中图分类号】 R318.021

【文献标识码】 A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2019.02.031

Effect of Vancomycin on SarA-mediated Biofilm Formation in MRSA

WANG Fu-xiang, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan Province, China

【Abstract】Objective Evaluation of the effect of vancomycin on SarA gene expression and biofilm formation in MRSA. **Methods** MERS strain 957 was collected from the blood cultures of patients with MRSA endocarditis in this hospital. A series of drug resistant strains 957-V8, 957-V16 and 957-V32 were obtained by culturing the mother strain with 957. Then the fluorescent gene quantitative assay was used to detect SarA mRNA levels in these four MRSA strains. The biofilm formation assay was performed using crystal violet staining. The absorbance of biofilm after staining was measured at 570nm. The tests were repeated 3 times. **Results** The SarA mRNA levels of 957-V8, 957-V16 and 957-V32 strains obtained in vitro were significantly higher than those of the original 957 strain. With the increase of MIC of vancomycin, the mRNA of SarA gene was gradually increased. All four strains can form biofilms, and the optical densities of induced strains 957-V8, 957-V16 and 957-V32 biofilms were significantly higher than those of the original strain 957. With the increase of MIC value, the optical density of strain biofilm gradually increased. **Conclusion** Vancomycin can induce the increase of drug resistance and biofilm formation of Staphylococcus aureus, which is beneficial to the long-term existence of bacteria in vivo.

【Key words】 Vancomycin; MRSA; SarA; Biofilm.

近年来, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)已经成为医院感染的重要病原菌之一^[1]。目前, 万古霉素仍然是临床上治疗MRSA感染最常使用的抗菌药物。但随着万古霉素用量的增加, 新的挑战也逐渐显现—临床上已出现万古霉素耐药菌株的病例报道^[2]。葡萄球菌辅助调节因子A(SarA)基因座是一种主要的毒力决定因子, 它可能通过影响生物膜形成而影响MRSA对抗菌药物的敏感性^[3]。

研究抗菌素对金葡菌形成生物膜的过程中的影响对临床预防和治疗金葡菌生物膜相关感染以及了解生物膜引起的细菌耐药有重要意义。本研究中, 我们探讨了万古霉素对MRSA的SarA基因表达水平和生物膜形成的影响, 为进一步理解MRSA的耐药机制和新型抗菌

药物的开发提供了理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 原型MRSA菌株957为本院MRSA心内膜炎患者血培养中收集获得的分离株, 系列耐药菌株957-V8、957-V16和957-V32均为本实验室自行诱导培养获得。

1.2 方法 将MRSA阳性血培养患者中收集的原代菌株957在含有不同浓度梯度的万古霉素脑心浸液肉汤中逐步诱导培养, 最终获得一系列不同耐药水平的菌株, 然后采用E-test方法测定其MIC值。最终选择MIC值分别为8、16和32的菌株继续于分别含有8 μg/

作者简介: 王馥香, 女, 学士学位, 副主任技师, 主要研究方向: 微生物检验

通讯作者: 王馥香

ml、16 μ g/ml和32 μ g/ml万古霉素的脑心浸液平板上培养24h,获得一系列MIC值递增的同源性菌株,根据菌株的MIC值分别命名为957-V8、957-V16和957-V32。并采用荧光定量PCR方法对这四株MRSA菌株中生物膜形成相关基因SarA mRNA水平进行检测,并采用结晶紫染色法进行生物膜形成试验,在570nm处测量染色后生物膜的吸光度,试验均重复3次。

1.3 统计学分析 采用SPSS22.0软件对数据进行统计分析,组间比较采用t检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 测定四株MRSA的SarA表达水平 本实验使用荧光定量PCR方法对与生物膜形成相关基因SarA mRNA水平进行检测,结果显示体外诱导获得的系列耐药菌株957-V8、957-V16和957-V32的SarA基因mRNA水平显著高于原代957菌株相比,且随着万古霉素MIC值的升高,SarA基因mRNA量逐渐升高,见图1。

2.2 四株MRSA的生物膜形成试验 通过生物膜形成试验检测临床分离出的957及诱导获得的系列耐药菌株957-V8、957-V16和957-V32的生物膜形成能力,发现这四株菌株均可形成生物膜,但形成能力有强弱之分,诱导菌株957-V8(1.59 ± 0.02)、957-V16(2.09 ± 0.09)和957-V32(2.51 ± 0.07)生物膜的光密度值显著高于原代菌株957(0.43 ± 0.03),并且随着MIC值的升高,菌株生物膜的光密度值逐渐升高,见图2。

3 讨论

生物膜形成不仅促进了宿主组织的细菌定植,而且促进了抗微生物剂和宿主免疫应答介导的对细菌清除的抗性^[4]。此外,生物膜可以作为慢性感染病灶,

用于细菌的转移性扩散和毒素释放到血液中,导致显着的发病率和死亡率^[5]。因此,生物膜形成已经成为开发针对这些危及生命的感染的新型治疗工具的关键目标。

许多金黄色葡萄球菌毒力因子由一个称为SarA的主要调控基因座控制^[6]。SarA基因座由3个重叠的转录物组成,由3个不同的启动子驱动:P1,P3和P2。这些DNA结合蛋白与相应靶启动子上富含AT的反向重复序列或回文序列结合以控制多个基因的表达^[6]。SarA是生物膜发育的一个重要的正向调节因子,部分原因是其对蛋白酶生产的抑制活性^[7]。

本研究通过检测临床分离的MRSA菌株957及以该菌株为母本的系列诱导菌株的生物膜相关基因SarA的mRNA水平和生物膜形成能力,结果表明万古霉素可以诱导金黄色葡萄球菌毒力调控因子SarA表达的增加以及生物膜增厚,并诱导菌株耐药性的增强,给临床治疗带来了困难和挑战。

参考文献

- [1] Tong SY,Davis JS,Eichenberger E,et al. Staphylococcus aureus infections:epidemiology,pathophysiology, clinical manifestations,and management[J].Clin Microbiol Rev,2015,28(3):603-661.
- [2] Fusco DN,Alexander EL,Weisenberg SA,et al.Clinical failure of vancomycin in a dialysis patient with methicillin-susceptible vancomycin-heteroresistant S.aureus[J].Diagn Microbiol Infect Dis,2009,65(2):180-183.
- [3] Balamurugan P,Praveen Krishna V,Bharath D,et al.Staphylococcus aureus Quorum Regulator SarA Targeted Compound,2-[(Methylamino)methyl]phenol Inhibits Biofilm and Down-Regulates Virulence Genes[J]. Front Microbiol,2017,8(1):1290.
- [4] Otto M.Staphylococcal biofilms[J].Curr Top Microbiol Immunol,2008,322:207-228.
- [5] Kiedrowski MR,Horswill AR.New approaches for treating staphylococcal biofilm infections[J].Ann N Y Acad Sci,2011,1241:104-121.
- [6] Cheung AL,Nishina KA,Trotonda MP,et al.The SarA protein

family of Staphylococcus aureus[J].Int J Biochem Cell Bio,2008,40(3):355-361.

- [7] Zielinska AK,Beenken KE,Mrak LN,et al.sarA-mediated repression of protease production plays a key role in the pathogenesis of Staphylococcus aureus USA 300 isolates[J].Mol Microbiol,2012,86(5):1183-1196.

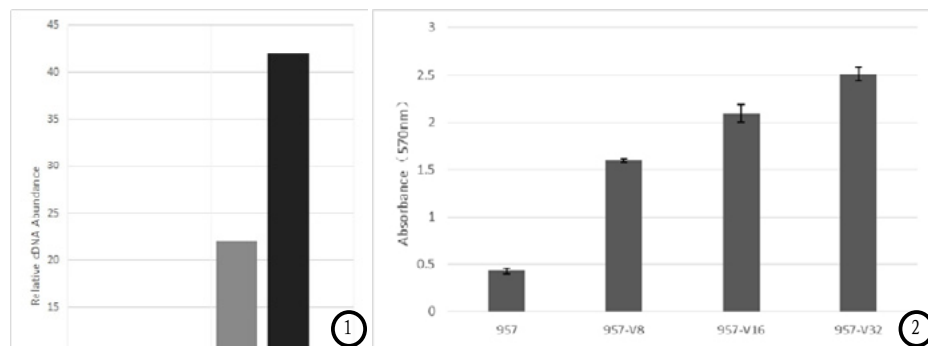


图1 957, 957-V8, 957-V16及957-V32的SarA mRNA表达水平;图2 957, 957-V8, 957-V16及957-V32的生物膜的光密度值

【收稿日期】2018-04-15