

plasm P388D1 cells[J]. Ann Hematol, 2009, 88(8): 753-760.

(2): 435-444.

[25] Chen ZN, Mi L, Xu J, et al. Targeting radioimmunotherapy of hepato-cellular carcinoma with iodine (131I) metuximab injection: clinical phase I/II trials[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 65

(收稿日期: 2011-12-03)

• 综 述 •

耐万古霉素肠球菌的流行病学及临床检测方法研究进展

朱成宾, 窦 露 综述, 夏永祥 审校

(南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院检验科, 江苏南京 210006)

关键词: 耐万古霉素肠球菌; 实验室检测; 流行病学; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 06. 052 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)06-0746-03

随着抗菌药物的广泛应用, 肠球菌耐药株日益增多, 氨基糖苷类高水平耐药肠球菌 (high-level aminoglycoside-resistant enterococcus, HLAR) 和耐万古霉素肠球菌 (Vancomycin resistant enterococcus, VRE) 分离率更是快速增长^[1-3]。相关文献报道, 部分美国医院肠球菌所致重症监护病房患者感染中 28% 由 VRE 所引起^[4]。近年来, 美国国家医院感染监测系统已将其列为导致医院感染的第 4 大病原菌。VRE 的出现增加了临床治疗难度。研究显示, 粪肠球菌对抑制细菌核酸合成的药物 (如喹诺酮类) 和抑制细菌细胞壁合成的氨基西林较敏感, 而 VRE 对目前广泛应用的新型链阳菌素奎奴普丁/达福普具有耐药性^[5-6]。本文主要就 VRE 流行病学及临床检测方法研究进展作一综述。

1 肠球菌属基本特点

肠球菌属为革兰阳性球菌, 触酶阴性、水解 40% 胆汁七叶苷; 血琼脂平板上生长菌落呈灰白色、隆起、细小、α-溶血或 γ-溶血, 极个别菌株可见 β-溶血; 在含硫乙醇酸盐肉汤中的培养物趋向卵圆形, 呈球杆菌; 兼性厌氧, 部分菌种有动力。多数菌种产吡咯烷酮肽酶 (pyrrolidone peptidase, PYRase) 和亮氨酸氨基肽酶 (leucine aminopeptidase, LAPase); 不能合成吡啶, 不产生细胞色素酶。多数菌种细胞壁产生甘油磷壁酸, 作为 Lancefield D 群抗原而被识别, Lancefield 血清分型系统中列为 D 群链球菌^[7]。肠球菌属建立于 1984 年, 已由当时的粪肠球菌和屎肠球菌 2 个菌种, 增加至目前的鸟粪肠球菌、铅黄肠球菌、坚忍肠球菌、鹑鸡肠球菌和病臭肠球菌等至少 31 个菌种^[8]。

2 VRE 流行病学特点

法国和英国学者于 1986 首次报道了 VRE^[9-10]。目前 VRE 已在许多国家成为医院感染最常见病原菌。同时, 国际性 SENTRY 抗菌药物监测计划研究结果显示, VRE 在血液感染中的比例大幅度增加, 尤其是拉丁美洲和北美洲, 拉丁美洲从 1997 年的 0% 增加到 2002 年的 5%, 北美则从 13% 增加到 18%, 同期欧洲 VRE 感染率则保持在 4%~5%^[11]。但基于地区监测的泛欧抗菌药物耐药性监测项目 (Pan-European Antimicrobial Resistance. Using Local Surveillance, PEARLS) 的研究表明, VRE 在欧洲的耐药情况可能比预想严重^[12]。VRE 感染中, 屎肠球菌占了大部分, 但 90% 的肠球菌感染曾由粪肠球菌引起。

2.1 传染源 VRE 主要存在于 VRE 感染患者粪便、尿液和血液中, 也可存在于患者伤口、口腔、胃肠道和皮肤黏膜表面, 医疗器械也是其可能感染源。VRE 在欧洲的流行可能与欧洲各国在家禽饲养中使用含 avoparcin (一种糖肽类化合物) 的饲

料有关, 人食用此类家禽后, 肠球菌易在人体内定植^[13]。VRE 在欧洲的流行好发于肾内科和血液病科, 病原菌通常是含多克隆 vanA 基因型的屎肠球菌。

2.2 传播途径 接触传播是 VRE 的主要传播途径, 因此, 医疗过程中对手的消毒非常重要。研究显示, 室温条件下, VRE 在干棉球上的存活时间长达数周^[14]。肠球菌为正常菌群, 有必要对分离自尿路感染和褥疮等患者标本的肠球菌进行鉴定, 确定是否为 VRE, 防止 VRE 播散。VRE 对氯己定、苯扎氯铵、聚维酮碘等消毒剂具有很高的敏感性, 且含乙醇的制剂可强化杀菌作用, 使用上述消毒剂进行消毒处理有利于减少 VRE 播散。

2.3 危险因素 免疫功能低下、留置导管和长期使用多种抗菌药物的患者易发生 VRE 感染, 以重症监护病房患者多见。研究表明, 对抗菌药物耐药和患者胆汁分泌减少是导致 VRE 在人体肠道内定植和生长的重要因素^[15]。

2.4 感染控制

2.4.1 控制感染源 过早接受抗菌药物治疗是肠球菌定植和生长的重要危险因素。下列情况不提倡应用万古霉素: 外科手术患者常规预防用药; 中性粒细胞减少伴发热患者的经验性治疗, 除非有证据表明感染由革兰阳性球菌引起, 且所在医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin resistant Staphylococcus aureus, MRSA) 分离率较高; 只有 1 次血培养结果为凝固酶阴性葡萄球菌; β-内酰胺类耐药革兰阳性球菌培养阴性患者的长期经验性治疗; 预防中心静脉留置导管和外周血管内导管感染或细菌定植; 消化道选择性脱污染; 消除 MRSA 定植; 抗菌药物相关性肠炎的初始治疗。

2.4.2 切断传播途径 由于 VRE 主要通过接触传播, 消毒在切断传播途径中尤为重要。医护人员经常洗手是很有效的措施之一。对 VRE 感染患者应进行隔离治疗, 防止交叉感染。

3 VRE 的检测方法

3.1 耐药性检测 美国临床和实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 公布了糖肽类抗生素 (万古霉素) 药敏试验的判断标准: 纸片扩散法 (K-B 法) 抑菌环直径不小于 17 mm 为敏感, 不大于 14 mm 为耐药; 稀释法药敏试验, 即最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 法, MIC ≤ 4 μg/mL 为敏感, MIC ≥ 32 μg/mL 为耐药。肠球菌属中不同种细菌对抗菌药物的耐药性有差异, 如屎肠球菌万古霉素耐药率是粪肠球菌的 10 倍以上, 因此肠球菌菌种鉴定有助于流行病学研究和耐药性监测。

3.1 K-B 法 该方法是 CLSI 推荐方法, 采用 M-H 培养基,

且对操作步骤和结果判读制定了相关规则及标准。其原理是将含有定量抗菌药物的纸片贴在已接种待测菌的琼脂平板上,纸片中的药物向纸片周围区域扩散,形成递减的梯度浓度,在药物抑菌浓度范围内待检菌的生长被抑制,产生透明抑菌环,环越大, MIC 越小。K-B 法经济方便,操作简单,但不能提供定量结果,当细菌具有相同耐药性时,不能确切反映抑菌水平,易造成 VRE 漏检。

3.1.2 MIC 法 MIC 法是抗菌药物敏感试验参考方法。其原理是将抗菌药物用肉汤培养基或琼脂培养基进行系列倍比稀释后分别接种待测菌,经培养后,肉眼未见细菌生长时所对应的药物浓度即为 MIC。MIC 法可提供定量结果,是可用于 K-B 法检测结果的确证。

3.1.3 浓度梯度纸条扩散法(E 试验) 该方法融合了纸片法和 MIC 法的优点,既操作简单又可以提供定量结果。E 试验采用的药敏纸条中含有干化的浓度由高到低呈指数梯度分布的抗菌药物,将药敏纸条贴在已接种待测菌的平板上,经培养后,药物纸条周围扩散,形成卵圆形抑菌圈,无细菌生长处在纸条上相应的药物浓度,即为该药对待测菌的 MIC。E 试验成本较高,难以在临床广泛应用。

3.2 分子生物学检测 用于 VRE 检测的分子生物学方法主要包括探针杂交、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)等。应用最为广泛的是多重 PCR,该方法采用多对引物同时对模板 DNA 上的多个区域进行扩增。多重 PCR 技术难点在于如何合理设计引物,以保证多对引物间不形成引物二聚体,且引物与目标模板区域具有高度特异性。Revel-Vilk 等^[16]建立了可用于 VRE 检测的单管多重 PCR,鉴定出万古霉素耐药基因型,并与传统培养法比较,其敏感性和特异性分别为 97.9% 和 100.0%。尽管传统培养法检测 VRE 灵敏度高,但耗时长(至少 96 h),且不能确定 VRE 基因型,而从增菌肉汤中纯化 DNA 后进行多重 PCR 检测,仅需 36 h 即可实现 VRE 鉴定与分型,且成本较传统法低。目前,已发现 6 种 VRE 基因型:VanA~G。这些基因型主要通过质粒或染色体上相应的 van 操纵子表达^[17],其中 VanC、VanE 和 VanG 对万古霉素低水平耐药、对替考拉宁敏感。多重 PCR 可检出所有 van 基因,采用 dll 引物鉴别对粪肠球菌和屎肠球菌,也可检测由具有金黄色葡萄球菌特异性的热稳定性核酸酶(nuc)基因^[18-19]。长范围(long range)PCR 则可用于 Tn5382/1594-vanB 操纵子的检测^[20]。

Sloan 等^[21]的研究表明,421 个肛周拭子样本中 25 个 PCR 检测 VRE 阳性,而传统方法只有 11 个 VRE 阳性。PCR 的缺点在于过于敏感,可能会导致假阳性。目前应用较为广泛的是 PFGE 及限制性片段多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)。PFGE 利用大分子 DNA(一般超过 20 kb,在某些情况下可超过 40 kb)在电场作用下将改变无规则卷曲构象,沿电场方向伸直,从而能通过孔径小于分子大小的凝胶,可应用于分离、纯化大小在 10~2 000 kb 的 DNA 片段。RFLP 则利用限制性内切酶消化来源于具有不同基因背景的生物的 DNA 分子时,可形成不同限制性片段。因此,同种生物的不同个体 DNA 分子具有不同长度的限制性片段类型,即 RFLP。PFGE 和 RFLP 是目前研究 VRE 的金标准,但 PFGE 检测耗时长,不适合快速检测^[22];不同实验室间的可比性差,且国际数据库只提供有严格质量保证和质量控制的数据,如 PulseNet^[23];电泳条带的类型只能显示整个种系的一部分信

息。化学发光分析技术也可用于 VRE 检测,对 VanA、VanB、VanC-1 及 VanC2/3 基因型的测定敏感度可达 100%^[24]。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)和多位点串联重复序列分型(multilocus variable numbers tandem repeats analysis, MLVA)也可用于分离和识别屎肠球菌相关基因,且 MLST 可用于流行病学特征的长期监测^[25]。

4 展 望

随着万古霉素的临床应用日益广泛,VRE 的检出率逐年升高,已成为医院感染重要病原菌之一^[26]。因此,必须严格控制万古霉素的应用,加强 VRE 流行的宣传教育,积极采取控制措施。有必要建立快速、准确、易普及的 VRE 检测方法,以阻止 VRE 的传播和扩散,避免引起严重的院内感染和多药耐药菌株的产生。实验室采用正确的 VRE 监测方法,医院感染控制部门采用有效的分子流行病学研究方法对院内感染进行流行病学分析,临床医师合理使用万古霉素,均有利于减少由 VRE 引起的医院感染。

参考文献

- [1] van den Braak N, Ott A, van Belkum A, et al. Prevalence and determinants of fecal colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus* in hospitalized patients in The Netherlands[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2000, 21(8): 520-524.
- [2] 廖国林, 刘建, 李芳, 等. 肠球菌属医院感染分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(13): 1735-1736.
- [3] 黎敏, 邱喜辽, 王俊霖, 等. 4 925 株医院感染细菌分布及耐药性分析[J]. *重庆医学*, 2010, 39(24): 3360-3362.
- [4] National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance(NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004[J]. *Am J Infect Control*, 2004, 32(8): 470-485.
- [5] 田翠萍. 肠球菌的耐药性分析及抗感染用药的探讨[J]. *临床医药实践杂志*, 2007, 16(12): 1170-1171.
- [6] 陈志. 基因芯片技术的最新进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(3): 249-251.
- [7] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 770-774.
- [8] 李金钟. 肠球菌分类与鉴定新进展[J]. *临床检验杂志*, 2006, 24(3): 228.
- [9] Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, et al. Vancomycin-resistant enterococci[J]. *Lancet*, 1988, 1(8575-8576): 57-58.
- [10] Leclercq R, Derlot E, Duval J, et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*[J]. *N Engl J Med*, 1988, 319(3): 157-161.
- [11] Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002)[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004, 50(1): 59-69.
- [12] Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, et al. Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24(2): 119-124.
- [13] Werner G, Hildebrandt B, Klare I, et al. Linkage of determinants for strep to gramin A, macrolide-lincosamide-streptogramin B, and chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium* and dissemination of this cluster among strepto-

- gramin-resistant enterococci[J]. Int J Med Microbiol, 2000, 290(6):543-548.
- [14] Ramadhan AA, Hegedus E. Survivability of vancomycin resistant enterococci and fitness cost of vancomycin resistance acquisition [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(7):744-746.
- [15] Rice LB, Hutton-thomas R, Lakticova V, et al. Beta-lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci[J]. J Infect Dis, 2004, 189(6):1113-1118.
- [16] Revel-Vilk S, Tamary H, Broide E, et al. Serum transferrin receptor in children and adolescents with inflammatory bowel disease [J]. Eur J Pediatr, 2000, 159(8):585-589.
- [17] Zirakzadeh A, Patel R. Epidemiology and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci[J]. Curr Opin Infect Dis, 2005, 18(6):507-512.
- [18] Lautenbach E, Gould CV, La Rosa LA, et al. Emergence of resistance to chloramphenicol among vancomycin-resistant enterococcal (VRE) bloodstream isolates[J]. Int J Antimicrob Agent, 2004, 23(2):200-203.
- [19] Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12):5857-5860.
- [20] Ballard SA, Pertile KK, Lim M, et al. Molecular characterization of vanB elements in naturally occurring gut anaerobes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(5):1688-1694.
- [21] Sloan LM, Uhl JR, Vetter EA, et al. Comparison of the Roche LightCycler vanA/vanB detection assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6):2636-2643.
- [22] Abele-Horn M, Voegel U, Klare I, et al. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(11):4009-4013.
- [23] Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance-United States[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(3):382-389.
- [24] Nagasawa Z, Manome I, Nagayama A. A rapid antimicrobial susceptibility test based on chemiluminescence assay and its application to screening of genotypes in vancomycin-resistant enterococci [J]. J Infect Chemother, 2004, 10(4):220-226.
- [25] Top J, Schouls LM, Bonten MJ, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of Enterococcus faecium isolates [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10):4503-4511.
- [26] Wang JL, Hsueh PR. Therapeutic options for infections due to vancomycin-resistant enterococci[J]. Expert Opin Pharmacother, 2009, 10(5):785-796.

(收稿日期:2011-10-09)

• 综 述 •

整合子系统与铜绿假单胞菌多药耐药关系的研究进展

侯舒毅¹综述, 宋秀宇^{1,2△}审校

(1. 福建医科大学第一临床医学院, 福州 350005; 2. 厦门大学附属第一医院, 福建厦门 361003)

关键词: 铜绿假单胞菌; 整合子; 耐药机制; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.053

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)06-0748-03

细菌耐药性是虽备受关注, 但抗菌药物滥用仍导致细菌不断产生多药耐药性(MDR)甚至泛耐药性(XDR)。早期研究表明, 整合子可以介导耐药基因在细菌中水平传播, 是细菌, 尤其是革兰阴性菌 MDR 的重要原因。铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)是临床常见的条件致病菌, 现就近年来针对整合子与 *P. aeruginosa* 耐药关系的研究进展作简要综述。

1 整合子的分类、结构与功能

1.1 整合子的分类 根据整合子载体的不同, 可将整合子分为移动性整合子(MIs)和染色体整合子(CIs)^[1]。MIs 指整合子结合在可移动元件上, 例如转座子、质粒, 能够捕获、整合外源基因盒, 并在同一种属或不同种属细菌间水平转移。MIs 可整合基因盒数相对较少(2~8 个), 主要编码耐药基因, 覆盖了目前使用的大部分抗菌药物。根据编码整合酶的基因序列不同, 通常分为 5 类, 其中 I 类整合子传播最广, 在革兰阴性菌中的检出率可达 22%~59%, 在革兰阳性菌中偶尔也有发现。

CIs 首次发现于霍乱弧菌基因组的小型环形染色体。CIs 可携带很少甚至缺乏基因盒, 但部分种类 CIs 可携带大量基因盒(在海洋弧菌中超过 217 个), 这类整合子又被称为超级整合子(SI)。2007 年, Boucher 等^[2]分析的弧菌 1 677 个基因盒中, 75%左右的功能未知, 说明整合子具有组成和功能多样性, 剩

下的 25%基因盒参与编码与细菌代谢、毒力及耐药相关蛋白。与耐药基因相关的药物曾应用于弧菌感染治疗, 而药物选择压力导致耐药基因整合进入 CIs, 且无法从染色体中被清除, 成为耐药基因储存库, 可被 MIs 重新剪切、整合, 再次介导高水平耐药。大部分编码 TA 系统的基因存在于 CIs, 特别是大的 SI 上, 推测 TA 在保持 SI 基因盒序列稳定中起作用, 可避免大规模基因丢失^[3]。

1.2 整合子的结构 整合子一般包括分别位于 5'端和 3'端两个保守末端(CS), 以及多个基因盒成串排列于 5'-CS 和 3'-CS 之间构成的可变区。5'-CS 是高度保守的核心区, 包含编码 DNA 整合酶的基因序列(IntI)、基因重组位点(attI、attC)和整合子可变区启动子 Pc。3'-CS 含有 3 个开放阅读框(ORF): 季铵盐化合物和溴乙锭耐药基因(qacEΔ1)、磺胺耐药基因(sulI)以及 1 个未知功能的短的 ORF(ORF5)。3'-CS 在重排、组合或结合转导过程中易出现丢失现象, 其序列存在一定的差异^[4]。基因盒是较小的可独立移动的 DNA 片断, 通常包括 1 个 ORF 和位于其下游的 attC 位点, 基因盒的整合方式包括特异性整合和非特异性整合, 非特异性整合因其周围只有 1 个重组位点而不能被切除, 能使细菌永久性获得新基因; 有些整合子在 5'-CS 和 3'-CS 之间没有基因盒插入。

△ 通讯作者, E-mail: songxyxm@hotmail.com。