

线设计软件,在保守区段上设计 LAMP 引物,在此基础上建立溶组织梭菌的 LAMP 检测方法。通过实验发现:溶组织梭菌 LAMP 检测方法只针对溶组织梭菌扩增,对其他干扰菌不扩增,显示出良好的特异性。溶组织梭菌 LAMP 检测方法的最低检测限为  $1 \times 10^1$  CFU/mL 左右,说明溶组织梭菌 LAMP 检测方法灵敏度较高。通过进一步实验条件优化和标准化,还可以对溶组织梭菌实现定量测定。结果表明,本试验设计的溶组织梭菌 LAMP 检测方法具有良好的特异性和较高的灵敏度,而且操作简便、快速,有望用于气性坏疽的临床现场检验。

## 参考文献

- [1] Sheffield JS, Ramin SM. Tetanus in pregnancy[J]. Am J Perinatol, 2004, 21(4): 173-182.
- [2] Diez-Domingo J, Delgado JD, Ballester A, et al. Immunogenicity and reactogenicity of a combined adsorbed tetanus toxoid, low dose diphtheria toxoid, five component acellular pertussis and inactivated polio vaccine in six-year-old children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2005, 24(3): 219-224.
- [3] Langkamp DL, Hoshaw-Woodard S, Boye ME, et al. Delays in receipt of immunizations in low-birth-weight children: a nationally representative sample[J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 2001, 155(2): 167-172.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.
- [5] Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic Escherichia coli by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Microbiol Methods, 2007, 68(2): 414-420.
- [6] Xiao B, Zhu YH, Zou QM. A simple and sensitive technique—Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. Chin J Lab Med, 2005, 28(6): 761-763.
- [7] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loopprimers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [8] Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of Paracoccidioides brasiliensis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 234(1): 93-97.
- [9] Thekisoe OM, Kuboki N, Nambota A, et al. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LMAP) for diagnosis of trypanosomiasis[J]. Acta Trop, 2007, 102(3): 182-189.
- [10] Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E, et al. African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification(LAMP) of parasite DNA [J]. Int J Parasitol, 2008, 38(5): 589-599.
- [11] Kayoko O, Keiko Y, Kosuke T, et al. Detection of Salmonella enterica Naturally Contaminated Liquid Eggs by Loop-Mediated Isothermal Amplification, and Characterization of Salmonella Isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 6730-6735.
- [12] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Virol Methods, 2004, 115(1): 59-65.
- [13] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by a loop-mediated isothermal amplification method[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 243(1): 259-263.
- [14] Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples[J]. J Food Prot, 2005, 68(3): 551-556.
- [15] Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification[J]. Clin Chem, 2006, 52(2): 303-306.
- [16] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2): 145-157.

(收稿日期:2012-08-09)

## • 分子诊断学论著(全军检验大会优秀论文)•

# 258 株肠球菌耐药性分析及耐万古霉素基因检测

马 均, 张 彭, 褚美玲, 刘海洋, 任 微, 王 璐, 薛文成<sup>△</sup>  
(沈阳军区总医院检验科, 辽宁沈阳 110840)

**摘要:**目的 研究肠球菌的耐药率及耐万古霉素肠球菌(VRE)的耐药表型和基因型。方法 按照美国临床和实验室标准化研究所(CLSI)2009 年推荐的微量稀释法进行临床分离肠球菌对各类药物的最小抑菌浓度(MIC)检测, VRE 进一步用 E-test 药敏试验确认; PCR 法检测 VRE 的耐药基因。结果 2010 年 7 月至 2011 年 11 月沈阳军区总医院共检出粪肠球菌 95 株, 尿肠球菌 163 株。粪肠球菌对万古霉素、替考拉宁保持较高敏感度, 对氨苄西林、青霉素、呋喃妥因三种抗菌药物敏感度也在 65% 以上, 对其他抗菌药物敏感度低, 统计期内未检出耐万古霉素粪肠球菌菌株。尿肠球菌对多数抗菌药物表现为耐药, 对氯霉素敏感率为 70%, 对万古霉素、替考拉宁敏感度下降, 为 90.7%。期间检出 15 株 VRE, 其耐药表型为多重耐药, PCR 扩增结果显示, 15 株万古霉素耐药屎肠球菌 VanA 基因扩增均为阳性, 产物长度在 700~1 000 bp 之间, 约 783 bp, 符合预期; VanB、VanC 引物扩增均阴性。15 株万古霉素耐药屎肠球菌对多数抗菌药物耐药, 仅对氯霉素、四环素相对敏感, 对万古霉素 MIC > 256 mg/L, 对替考拉宁也表现为耐药。结论 尿肠球菌耐药性高于粪肠球菌, VRE 多为多重耐药, 给临床治疗带来困难, 医院应加强对其预防监测。

**关键词:**肠球菌, 尿; 肠球菌, 粪; 万古霉素; 抗药性, 细菌

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)20-2507-03

**Antibiotic resistance of 258 Enterococci isolates and detection of Vancomycin resistant genes**Ma Jun, Zhang Peng, Chu Meiling, Liu Haiyang, Ren Wei, Wang Lu, Xue Wencheng<sup>△</sup>

(General Hospital of Shenyang Command, Shenyang, Liaoning, 110016, China)

**Abstract: Objective** To analyze the drug resistance of enterococci and study the phenotype and genotype of vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Methods** The method Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recommended in 2009 was applied in this study. For clinical isolates of enterococci, minimum inhibitory concentration (MIC) were tested for all types of drug, and vancomycin-resistant enterococci was confirmed by E-test; the VRE resistance gene was detected by PCR assay. **Results** From July 2010 to November 2011, in the General Hospital of Shenyang Military Region, 95 strains of the Enterococcus faecalis and 163 strains of Enterococcus faecium were detected. Enterococcus faecalis had a high sensitivity to vancomycin and teicoplanin. To ampicillin, penicillin, furadantin, the sensitivity is also more than 65%. To other antibiotic, the sensitivity is low, during the reference period vancomycin-resistant Enterococcus faecalis strains were not detected. Enterococcus faecium performed drug-resistant to major antibiotics, the sensitivity to chloramphenicol was 70%. For vancomycin and teicoplanin the sensitivity decreased to 90.7%. 15 strains of VRE were detected during the period, and the resistance phenotype were multi-drug resistant mostly. PCR amplification results show that 15 strains of vancomycin-resistant Enterococcus faecium the VanA gene amplification were positive, and the product was 700 to 1 000 bp in length, approximately 783 bp, which was consistent with the expectations, but VanB, VanC primers's amplification were negative. 15 vancomycin-resistant faecium were resistance to most antibiotics, only relatively sensitive to chloramphenicol and tetracycline sensitive, vancomycin MIC > 256 mg/L, to teicoplanin showed resistance. **Conclusion** The drug-resistance rates of Enterococcus faecium was higher than Enterococcus faecalis. 15 isolates of VRE all were multi-drug resistance strains. Enterococcus faecalis VRE was mostly multi-drug resistant and difficult for clinical treatment, the hospital should strengthen its prevention and monitoring.

**Key words:** Enterococcus faecium; Enterococcus faecalis; vancomycin; drug resistances bacterial

肠球菌属是医院内感染的常见条件致病菌,可导致人体多脏器感染,由于抗菌药物的广泛应用,导致多重耐药菌株广泛流行,病死率可达21.0%~27.5%<sup>[1]</sup>。20世纪80年代末开始,耐万古霉素肠球菌(VRE)菌株在世界各地陆续被发现,欧洲地区VRE检出率在5%左右<sup>[2]</sup>,国内有关VRE的报道也逐年增加<sup>[3~4]</sup>。本院从2010年开始出现VRE,近来有逐渐增加的趋势,回顾性分析近一年来肠球菌的检出及耐药性变迁,开展对VRE基因型的检测,对指导临床用药,加强院内感染控制有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** 沈阳军区总医院2010年7月至2011年11月从尿液、血液、分泌物等标本中检出的粪肠球菌95株、屎肠球菌163株,共258株。质控菌株为粪肠球菌ATCC 29212、屎肠球菌ATCC 51299(辽宁省临检中心提供)。

**1.1.2 仪器与试剂** 珠海迪尔生物公司生产的DL-96Strep试剂盒,法国生物梅里埃公司生产的API鉴定板,AB BIOMERIEUX万古霉素E-Test测试纸条,北京中西远大科技有限公司生产的DY-A电泳仪,罗氏公司生产的LightCycler480II高通量实时荧光定量PCR系统。

**1.1.3 PCR引物** 由大连宝生物工程有限公司合成,引物序列结构vanA为P1:5'-GCT ATT CAG CTG TAC TC-3',P2:5'-CAG CGG CCA TCA TAC GG-3(783bp);vanB为P1:5'-CAT CGC CGT CCC CGA ATT TCA AA-3',P2:5'-GAT GCG GAA GAT ACC GTG GCT-3(297 bp)。vanC为P1:5'-GGT ATC AAG GAA ACC TC-3',P2:5'-CTT CCG CCA TCA TAG CT-3'(822 bp)。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株鉴定及药敏试验** 采用珠海迪尔生物公司生产的DL-96Strep试剂盒对临床分离菌株进行鉴定及药物最小抑菌浓度(MIC)测定,按照2009年美国临床和实验室标准化研究所(CLSI)推荐的MIC稀释法标准完成操作和结果判读。采用法

国生物梅里埃公司生产的API鉴定板对VRE进行鉴定,AB BIOMERIEUX万古霉素E-test纸条作为VRE的确证试验。

**1.2.2 PCR反应体系** 反应总体积50 μL,包括引物各0.5 μmol/L,dNTPs各200 μmol/L,MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L,KCl 150 mmol/L,Tris-HCl(pH9.0)10 mmol/L,Triton-100 0.1%,Taq DNA聚合酶1 U/模板5 μL。PCR反应条件:(1)预计小于500 bp的产物片段:93℃预变性2 min,93℃30 s,53℃30 s,72℃1 min,35个循环,最后72℃延长2 min。(2)预计小于500 bp的产物片段:93℃预变性2 min,93℃1 min,55℃1 min,72℃1 min,35个循环,最后72℃延长2 min。

**1.2.3 扩增产物检测** 使用含0.5 mg/mL溴化乙啶的琼脂糖凝胶在100 V电压条件下电泳40~50 min,全自动凝胶图像分析系统显像观察并拍照。

## 2 结果

**2.1 2010~2011年度粪肠球菌、屎肠球菌耐药性分析** 期间分离粪肠球菌95株、屎肠球菌163株。粪肠球菌对万古霉素、替考拉宁菌敏感,对氨苄西林、青霉素、呋喃妥因三种抗菌药物敏感度在65%以上,对其他抗菌药物敏感度较低,未出现耐万古霉素菌株。屎肠球菌对多数抗菌药物表现为耐药,对氯霉素敏感率为74.4%,对万古霉素、替考拉宁敏感度下降,为90.7%。较以往明显偏低,检出15株VRE。总体耐药情况见表1。

表1 2010年7月至2011年11月粪肠球菌及屎肠球菌药敏统计(%)

抗菌药物	粪肠球菌(n=95)			屎肠球菌(n=163)		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
氨苄西林	20.5	0.0	79.5	92.7	0.0	7.3
呋喃妥因	24.1	7.4	68.5	95.9	1.0	3.1
红霉素	82.4	3.5	14.1	95.4	0.0	4.6
环丙沙星	71.4	1.8	26.8	99.5	0.3	0.2
链霉素(高浓度)	46.5	0.0	53.5	62.5	0.0	37.5
氯霉素	35.3	8.2	56.5	13.5	12.1	74.4
青霉素	30.7	0.0	69.3	93.9	0.0	6.1

续表 1 2010 年 7 月至 2011 年 11 月粪肠球菌及

屎肠球菌药敏统计(%)

抗菌药物	粪肠球菌(n=95)			屎肠球菌(n=163)		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
庆大霉素(高浓度)	67.4	0.0	32.6	74.4	0.0	25.6
四环素	72.7	1.8	16.4	53.9	4.8	41.3
替考拉宁	0.0	0.0	100.0	9.3	0.0	90.7
万古霉素	0.0	0.0	100.0	9.3	0.0	90.7
氯氟沙星	71.7	4.9	23.4	93.9	4.1	2.0
左氧氟沙星	70.7	1.7	27.6	94.4	0.9	4.7

表 2 万古霉素耐药菌株耐药表型分析(n)

抗菌药物	菌株 1	菌株 2	菌株 3	菌株 4	菌株 5	菌株 6	菌株 7	菌株 8	菌株 9	菌株 10	菌株 11	菌株 12	菌株 13	菌株 14	菌株 15
氨苄西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
呋喃妥因	R	R	R	R	R	R	R	R	—	R	R	R	R	R	R
红霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	—	R	R	R
环丙沙星	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
链霉素(高浓度)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
氯霉素	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
青霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
庆大霉素(高浓度)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
四环素	S	I	R	S	S	R	I	S	S	S	S	S	I	I	S
替考拉宁	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
万古霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
氯氟沙星	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
左氧氟沙星	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
万古霉素[MIC (E-test), mg/L]	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256

R: 耐药; S: 敏感; I: 中介; —: 无数据。

### 3 讨 论

本次调查显示屎肠球菌分离率、耐药性明显高于粪肠球。屎肠球菌对多数抗菌药物耐药率均在 80%~90% 以上, 对高浓度庆大霉素的耐药率超过了 70%, 仅对氯霉素、万古霉素、替考拉宁相对敏感, 但敏感度较以往明显偏低, 在 70%~80% 以上。提示常用抗菌药物经验性用药已不宜用于该菌感染的治疗, 应以体外药敏鉴定结果为治疗依据。与屎肠球菌相比, 粪肠球菌整体耐药性较低, 对氨苄西林、呋喃妥因、青霉素等耐药率不到 30%, 对万古霉素、替考拉宁仍为 100% 敏感。

本次调查, 在沈阳军区总医院检出 15 株 VRE, 基因型均为 VanA。VRE 有 6 种耐药基因型, 包括 VanA、VanB、VanC、VanD、VanE、VanG, 其中 VanC 型是天然耐药, 其他 5 种基因型是获得性耐药, 以 VanA、VanB 型最为常见。耐药表型分析显示, VRE 对万古霉素和替考拉宁均为高浓度耐药, 且同时对青霉素类、氨基糖苷类药物耐药, 对四环素耐药性也显著下降, 仅对氯霉素保持较高敏感率。可见 VanA 型菌株多重耐药严重; 四环素与氯霉素体外药物试验虽敏感, 但副作用极大, 临床治疗效果不佳。有文献报道 VRE 的耐药基因可通过质粒转移给其他肠球菌属或其他种类的细菌如金黄色葡萄球菌, 产生多重耐药性<sup>[5]</sup>。因此各医院应把加强院内感染控制, 预防 VRE 的扩散做为当务之急。

微生物实验室是阻断 VRE 院内扩散传播的第一道防线, 迅速准确鉴定出 VRE, 对临床治疗和医院感染控制都很有意义。VRE 显色培养基可缩短 VRE 的检测时间, 在不具备基因

2.2 耐万古霉素肠球菌耐药基因检测 PCR 扩增结果显示, 15 株万古霉素耐药屎肠球菌 VanA 基因扩增均为阳性, 产物长度约为 783 bp, 符合预期; VanB、VanC 引物扩增均阴性。

2.3 VRE 耐药表型 按照 2009 年 CLST 判断标准, 对 15 株万古霉素耐药屎肠球菌微量肉汤稀释法检测结果进行判读, 显示上述 15 株菌株对多数抗菌药物耐药, 仅对氯霉素、四环素相对敏感, 对万古霉素 MIC>256 mg/L, 对替考拉宁也表现为耐药, 见表 2。

检测条件的单位, 依据菌株对万古霉素耐药表型及耐药程度的分析, 结合对替考拉宁耐药情况, 可对基因型进行初步推断, 及时对可能出现的获得性 VanA、VanB 型菌株进行预防控制。同时临床应加强对抗菌药物使用的管理, 注重万古霉素使用的适应证, 这对耐药菌株的预防控制至关重要。

### 参 考 文 献

- [1] Sanchez-Silos RM, Perez-Ginido C, Martin P, et al. Pathogenicity of Enterococcus spp. Characteristics of 169 hospital isolates[J]. Enferm Infect Microbiol Clin, 2000, 18(4): 165-169.
- [2] Sader HS, Farrell DJ, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from skin and skin-structure infections in European medical centres[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(1): 28-32.
- [3] 李春艳, 杨青. 肠球菌耐药性及万古霉素耐药基因研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2244-2246.
- [4] 余晓君, 陈荣, 周红平. 耐万古霉素肠球菌表型测定及基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(12): 1328-1330.
- [5] Zhu W, Clark NC, McDougal LK. Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus isolates associated with inc18-like vanA plasmids in Michigan[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2): 452-457.

(收稿日期: 2012-08-09)