

• 临床检验研究论著 •

肠球菌临床感染情况和药物敏感性分析及耐万古霉素肠球菌耐药基因研究

刘 敏,董跃明,徐爱群,雷 红,董 梅[△]
(解放军第 309 医院检验科,北京 100091)

摘 要:目的 分析肠球菌的临床分离情况,研究肠球菌抗菌药物敏感性和耐万古霉素肠球菌(VRE)耐药基因。方法 采用 VITEK COMPACT 分析仪进行菌种鉴定和药敏测定;采用 WHONET 5.5 进行数据分析;采用 PCR、基因测序及序列在线比对检测 VRE 耐药基因。结果 共分离 167 株菌,屎肠球菌 113 株,粪肠球菌 47 株;标本类型前三位分别为尿液(34.1%)、血液(16.8%)和腹水(15.6%);ICU 分离率在临床科室中居首。屎肠球菌对青霉素 G、氨苄西林、红霉素、环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率高达 90% 以上,且明显高于粪肠球菌($P < 0.05$)。检出 11 株 VRE,携带 vanA 耐药基因。未发现利奈唑胺耐药株。结论 肠球菌总体耐药形势严峻,屎肠球菌的分离率和耐药率高于粪肠球菌,应控制多重耐药株尤其 VRE 的传播。

关键词:肠球菌属;微生物敏感性试验;抗药性;微生物;基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)18-2392-02

Clinical distribution, antimicrobial susceptibility and vancomycin resistance gene of Enterococcus

Liu Min, Dong Yueming, Xu Aiqun, Lei Hong, Dong Mei[△]

(Department of Clinical Laboratory, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: **Objective** To analyze the clinical distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci, and research the resistance gene of vancomycin-resistant enterococci. **Methods** Bacteria identification and antimicrobial susceptibility test were carried by VITEK COMPACT system. Data were analyzed by WHONET5.5 software. Resistance gene of VRE was detected by PCR, gene sequencing and BLAST online. **Results** 167 strains of Enterococci had been isolated, including 113 *Enterococcus faecium*s and 47 *Enterococcus faecalis*. The top three specimens were urine(34.1%), blood(16.8%) and ascites(15.6%). The top clinic departments from which the strains isolated was ICU(24.6%). Drug resistance of *Enterococcus faecium*s was harder than which of *Enterococcus faecalis*. The percentage of *Enterococcus faecium*s resistant to penicillin-G, ampicillin, erythromycin, ciprofloxacin and levofloxacin was more than 90%, and was higher than which of *Enterococcus faecalis* significantly($P < 0.05$). There were 11 stains of Enterococci resistant to vancomycin, being confirmed carrying the vanA resistance gene. All the strains were susceptible to linezolid. **Conclusion** The antimicrobial resistance is serious in Enterococci, the isolating rate and resistance rate of *Enterococcus faecium*s are higher than which of *Enterococcus faecalis*. Clinicians and laboratory staff should pay attention to prevent the dissemination of resistance.

Key words: enterococcus; microbial sensitivity tests; drug resistance, microbial; genes

肠球菌是医院感染的重要病原菌,多引起免疫力低下宿主的机会感染^[1]。本院细菌分离情况显示肠球菌,尤其屎肠球菌分离率高,并且已发现耐万古霉素肠球菌。从药敏结果密切观察特定地区(本地)的耐药倾向关系到流行病学防控。本文着重对本院肠球菌的临床分离情况,包括感染部位,标本来源,科室分布,感染危险因素等进行统计分析,研究肠球菌的抗菌药物敏感性和耐万古霉素肠球菌(VRE)的耐药机制,尤其关注可传递的高水平 VanA 和 VanB 耐药基因,以期指导耐药传播的有效控制。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2011 年 1 月至 2012 年 7 月分离自解放军第 309 医院确诊为肠球菌感染患者的非重复肠球菌。标准菌株为粪肠球菌 ATCC29212。

1.2 菌株鉴定及药物敏感性测定 采用 VITEK-2 COMPACT 全自动微生物鉴定及药敏分析仪进行菌种鉴定和体外抗菌药物敏感性测定。按照 2012 年 CLSI 抗菌药物敏感性试验执行标准选择药物分析,包括 A 组青霉素和氨苄西林, B 组万古霉素、利奈唑胺、奎奴普丁/达福普丁, U 组四环素、环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因; O 组红霉素、利福平、氯霉素。氨基糖苷类高水平耐药(HLAR)包括链霉素高水平耐药(HLSR)

和庆大霉素高水平耐药(HLGR)。其筛选试验用于检测氨基糖苷类、青霉素或万古霉素与一种氨基糖苷类药物的协同作用。万古霉素耐药株采用 E 试验条检测 MIC 确认其耐药性。

1.3 基因检测 目的基因为 VanA 和 VanB,提取 VRE 菌株基因组 DNA,进行 PCR 检测^[2],引物序列为 vanA-F: 5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3'; vanA-R: 5'-GTA CAA TGC GGC CGT TA-3'; vanB-f: 5'-ATG GGA AGC CGA TAG TC-3'; vanB-r: 5'-GAT TTC GTT CCT CGA CC-3'。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收后进行 DNA 序列测定,与目的片段进行在线序列比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

1.4 统计学处理 用 WHONET5.5 分析软件和 SPSS16.0 软件进行统计分析,屎肠球菌与粪肠球菌耐药率分别采用 Person 卡方检验、连续性校正法和 Fisher 精确概率检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 菌种分布和标本类型 167 株菌中有屎肠球菌[113 (67.7%)],粪肠球菌[47(28.1%)],鹌鹑肠球菌[4(2.4%)],耐久肠球菌[2(1.2%)],铅黄肠球菌[1(0.6%)]。泌尿系统感染患者尿液(清洁中段尿和导尿)居标本类型首位[57

(34.1%)],其次为血液[28(16.8%)]、腹水[26(15.6%)]、下呼吸道[15(9.0%)]标本中分离的菌株。

2.2 菌株来源科室分布 重症监护室居首位[41(24.6%)],其他依次为结核科[24(14.4%)]、普通外科[19(11.4%)]、肝胆外科[16(9.6%)]等。

2.3 耐药率分析 本院屎肠球菌和粪肠球菌总体耐药率比较见表 1。考虑感染部位和菌种特点时具有如下特点:(1)分离自泌尿系感染患者的肠球菌对 U 组药物敏感性分别为:四环素 54.8%、环丙沙星 9.7%、左氧氟沙星 11.3%、呋喃妥因 25%。(2)屎肠球菌耐药率高于粪肠球菌的抗菌药物为青霉素 G、氨苄西林、呋喃妥因、红霉素、环丙沙星、左氧氟沙星和高浓度庆大霉素。粪肠球菌耐药率高于屎肠球菌的抗菌药物为:奎奴普汀/达福普汀和四环素。(3)对万古霉素耐药的 11 株菌(10 株屎肠球菌,1 株粪肠球菌)均对利奈唑胺敏感。(4)1 株对万古霉素耐药的粪肠球菌对奎奴普汀/达福普汀敏感。(5)屎肠球菌和粪肠球菌的 HLAR 分离率均大于 50%,且屎肠球菌对 HLGR 耐药率明显高于粪肠球菌($P<0.05$)。(6)未发现产 β 内酰胺酶肠球菌。

表 1 屎肠球菌和粪肠球菌的抗菌药物耐药率(%)

抗菌药物	屎肠球菌($n=113$)	粪肠球菌($n=47$)	P
呋喃妥因	64.6	0.0	0.000
红霉素	92.9	70.2	0.000
环丙沙星	94.7	46.8	0.000
奎奴普汀/达福普汀	0.9	78.7	0.000
利奈唑胺	0.0	0.0	—
青霉素 G	97.3	19.0	0.000
四环素	38.9	74.5	0.000
万古霉素	8.8	2.1	0.235
左旋氧氟沙星	94.7	48.9	0.000
氨苄西林	96.5	0.0	0.000
高浓度庆大霉素	72.6	53.2	0.018
高浓度链霉素	65.5	53.2	0.145

—:无数据。

2.4 VRE 耐药基因检测 经 PCR 及其扩增产物测序和 Genbank 在线序列比对证实 11 株 VRE 均检出 vanA 基因,为 VanA 型耐药,未检出 vanB 基因。

2.5 感染危险因素 病例资料显示:尿液分离的肠球菌 57 株中有 38 例患者有留置导尿管。28 例血液标本中,有 2 株为中心静脉导管相关性血流感染。有 5 例患者从外周血和其他部位(尿液、腹水或胆汁标本中)分离出耐药谱相同的肠球菌。

3 讨 论

肠球菌较少引起呼吸道感染,而本研究显示有 9% 的标本为下呼吸道标本,说明肠球菌已成为本院院内感染菌之一。与文献[3-5]报道粪肠球菌感染率高于屎肠球菌不同,本院屎肠球菌分离率远高于粪肠球菌,提示屎肠球菌院内感染率高。本院 ICU、结核科和普通外科肠球菌分离率高,分析与 ICU 患者侵入性操作较多、结核患者免疫力低(本院为全军结核病研究所)和普外科基础疾病等因素相关。病例资料显示留置导尿管和中心静脉导管等侵入性操作是本院肠球菌的重要感染危险因素。原发感染灶中细菌不能及时清除而入血是引起血流感染的重要危险因素。病原菌的及时鉴定和药物敏感性检测可帮助临床医生及早的有效治疗,从而大大减少病原菌入血引起败血症的几率。

U 组药物敏感性较低,说明传统治疗泌尿系感染的药物有效性堪忧。屎肠球菌对共计 7 种常用抗菌药物的耐药率明显高于粪肠球菌,且多重耐药率高。屎肠球菌对奎奴普汀/达福

普汀的敏感性较高,但目前国内还未上市。利奈唑胺仍可作为包括 VRE 在内的肠球菌感染的最后防线。本研究中屎肠球菌的 HLGR 分离率明显高于粪肠球菌,HLSR 亦大于 65%,说明屎肠球菌感染时氨基糖苷类联用方案将受到限制,粪肠球菌感染时尚可考虑,刘晶等[6]有类似报道。Sood 等[7]认为屎肠球菌对多种抗菌药物的高耐药性可能造成屎肠球菌感染率的上升,这与本院屎肠球菌的高耐药率和高感染率相一致。

万古霉素等糖肽类抗菌药物是治疗肠球菌感染的敏感药物,但自 1988 年第 1 次报道肠球菌对糖肽类抗菌药物高水平耐药以来,糖肽类耐药菌已在全球范围内逐渐播散[8-9]。目前全世界已发现多种耐药机制(VanA,-B,-C,-D,-E,-G,-L),本研究发现本院 VRE 的耐药机制是肠球菌携带 vanA 耐药基因。VanA 型耐药以对万古霉素和替考拉宁的高水平耐药为特点,可由转座子 Tn1546 介导。已有研究报道体外或体内模型证明 vanA 基因可从肠球菌传递给金黄色葡萄球菌[10],VRE 和耐万古霉素金黄色葡萄球菌分离自同一患者的报道显示 MRSA 通过 VRE 的 Tn1546 获得了对万古霉素的耐药性[11]。因此,一旦发生耐万古霉素肠球菌后及时采取严格的隔离措施,可防止 VRE 在医院内的蔓延。

本院肠球菌总体耐药形势严峻,屎肠球菌的感染率和多重耐药率均高于粪肠球菌,抗感染治疗应根据菌种鉴定和体外药物敏感性合理选用抗菌药物,以减缓耐药性的升高,应采取有效措施控制耐药株尤其是耐万古霉素肠球菌的传播[12]。

参考文献

[1] 杨青,俞云松,倪语星,等. 2010 年中国 CHINET 肠球菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(2):92-97.

[2] Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(1):24-27.

[3] 刘红军,邓文国,刘倩,等. 777 株临床分离肠球菌的分布及耐药性分析[J]. 西部医学,2012,24(2):380-382.

[4] 陈泳,张丽华,郭主声,等. 424 株临床分离肠球菌属细菌的耐药性变异[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(1):36-38.

[5] 谢小芳,周惠琴,沈海英,等. 632 株肠球菌属的临床分布及耐药分析[J]. 临床输血与检验,2012,14(2):116-118.

[6] 刘晶,赵金辉,赵娟. 粪肠球菌和屎肠球菌耐药特点分析[J]. 中国实验诊断学杂志,2007,11(8):1121-1122.

[7] Sood S, Malhotra M, Das BK, et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance[J]. Indian J Med Res, 2008, 128(2):111-121.

[9] 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.

[9] Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, et al. Vancomycin-resistant enterococci. [J]. Lancet, 1988, 1(8575/8576):57-58.

[10] Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus[J]. FEMS Microbiol Lett, 1992, 72(2):195-198.

[11] Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(11):4580-4587.

[12] 师志云,赵志军,李刚,等. 临床分离肠球菌属耐药性及耐药基因的研究[J]. 中华检验医学杂志,2011,34(5):442-444.