

• 临床检验研究论著 •

肠球菌的耐药特征及高水平庆大霉素耐药基因流行分布

王 蓉, 吴农欣[△], 陈 端, 单 斌
(襄阳市中心医院, 湖北襄阳 441021)

摘 要:目的 了解临床分离的肠球菌的耐药特征以及高水平庆大霉素耐药肠球菌(HLGRE)的耐药基因流行分布。方法 采用 Vitek-2 全自动微生物鉴定和药敏分析系统对肠球菌进行耐药情况分析, 运用聚合酶链反应(PCR)方法检测 HLGRE 的耐药基因, 并对部分 PCR 扩增产物进行 DNA 测序。结果 89 株肠球菌中, 对高水平庆大霉素耐药的屎肠球菌和粪肠球菌分别占 50% 和 25.6%, 对 82 株肠球菌进行高水平庆大霉素耐药基因的检测显示: aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia 基因是 HLGRE 的唯一耐药基因, 未检测到 aph(2'')-Ib 和 aph(2'')-Id 基因。结论 准确及时发现肠球菌的耐药性和应用分子生物学技术检测高水平庆大霉素耐药基因可以为临床医师治疗肠球菌感染提供可靠依据。

关键词: 肠球菌属; 庆大霉素类; 基因, 耐药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)06-0693-02

The antimicrobial resistance pattern of *Enterococcus* and its high-level gentamicin resistance genes distribution

Wang Rong, Wu Nongxin[△], Chen Duan, Shan Bin

(Central Hospital of Xiangyang City, Xiangyang, Hubei 441021, China)

Abstract: **Objective** To investigate the antimicrobial resistance pattern of 89 enterococcal isolates and determine the prevalence of the high-level gentamicin resistance genes. **Methods** Vitek-2 automatic microbial analysis system was used to identify the organisms and study the antimicrobial resistance. Polymerase chain reaction (PCR) was applied for detecting high-level gentamicin resistance genes. Some suspected PCR products were confirmed by DNA sequencing. **Results** Totally 89 clinical strains of *Enterococcus* were isolated. High-level gentamicin resistance was found in 25.6% of *Enterococcus faecalis* and 50% of *Enterococcus faecium* respectively. 82 strains of *Enterococcus* were tested for the presence of high-level gentamicin resistance genes. Aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia was the only high-level gentamicin resistance gene detected, aph(2'')-Ib and aph(2'')-Id were not detected. **Conclusion** Understanding the resistance pattern of high-level aminoglycoside resistance and applying molecular biological techniques to detect high-level gentamicin resistance genes in *Enterococcus* infection are important for rational treatment of infections caused by *Enterococcus*.

Key words: *Enterococcus*; Gentamicins; genes, drug resistance

肠球菌为人体肠道的正常菌群, 是条件致病菌。随着免疫抑制剂的广泛应用, 侵袭性治疗的增加使得肠球菌属所致感染不断增加, 肠球菌已成为医院感染的重要病原菌^[1]。对于该菌引起的感染, 临床上多采用氨基糖苷类与作用于细胞壁的抗菌药物的联合应用来进行协同治疗。但高水平庆大霉素耐药肠球菌(HLGRE)的出现使这一联合作用失效^[2]。国外对 HLGRE 耐药基因型的研究报道较多, 但国内较少, 为此, 笔者收集了昆明医学院附属第一医院的肠球菌共 89 株, 用聚合酶链反应(PCR)方法检测了高水平庆大霉素耐药基因, 了解了该医院肠球菌的耐药特征。

1 材料与方法

1.1 标本来源 89 株肠球菌来自 2012 年 11 月 1 日至 2013 年 6 月 1 日昆明医学院第一附属医院临床分离的标本(包括尿液、血液、腹水、脓液、痰、和宫颈分泌物), 其中 53 株粪肠球菌和 29 株屎肠球菌用于耐药性分析和高水平庆大霉素耐药基因的检测。

1.2 药敏试验质控菌株 粪肠球菌 ATCC51299(对高水平庆大霉素耐药)、粪肠球菌 ATCC29212(对高水平庆大霉素敏感)、大肠埃希菌 ATCC25922, 均购自卫生部临检中心。

1.3 仪器与试剂 Vitek-2 微生物鉴定系统购自法国生物梅里公司; DNA 扩增仪购自美国 PE 公司; Tanon 3500 紫外凝胶成像系统及配套软件购自上海天能科技有限公司; 5417R 高速冷冻离心机; 5 U/mL Taq DNA 酶, 10 mmol/L dNTPs 购自

generay 生物工程公司; 小量质粒 DNA 抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 引物由上海生工生物工程公司合成, 引物序列及扩增产物大小见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

1.4 方法

1.4.1 菌株鉴定 采用 Vitek-2 全自动微生物鉴定分析系统对临床菌株进行鉴定(并鉴定到种), 待检测结果为肠球菌后, 将菌株分离并冷冻保存(同时用传统的微量生化管对该菌株进行再次鉴定以确保其可靠性)。

1.4.2 药敏试验 采用 Vitek GP535 药敏卡对收集菌株进行药敏试验。该药敏试验包含有替考拉宁、利奈唑烷、奎奴普丁/达福普汀等 14 种抗菌药物。实验操作按说明书进行。

1.4.3 肠球菌质粒 DNA 提取 将从临床标本中分离并冷冻保存的肠球菌纸片接种到血琼脂平板上进行复苏, 取单个菌落置于 5 mL LB 增菌液中振荡过夜, 然后取 2 mL 增菌液离心 2 min, 用小量质粒 DNA 抽提纯化试剂盒提取和纯化肠球菌质粒 DNA。

1.4.4 PCR 反应体系为 50 μ L, 4 种 dNTP 为 10 mmol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, Taq DNA 酶 5 U/ μ L, 模板 DNA 2 μ L。PCR 条件设置: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 35 次; 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。6 μ L 扩增产物与上样缓冲液混匀后加入 2% 琼脂糖凝胶, 在 100 mV 电压下电泳 45 min, 然后用凝胶成像系统观察并采集

图像。

1.4.5 DNA 序列分析 扩增产物送大连宝生物公司进行正、反两个方向的测序反应。

2 结 果

2.1 肠球菌构成比 从临床标本中分离到的 89 株肠球菌中以屎肠球菌和粪肠球菌为主,其中对庆大霉素高水平耐药的屎肠球菌和粪肠球菌共有 62 株,占总数的 75.6%。屎肠球菌占 50%(41/82),粪肠球菌占 25.6%(21/82)。

2.2 肠球菌对常用抗菌药物的耐药率 见表 1。

表 1 肠球菌对常用抗菌药物的耐药率(%)		
抗菌药物	屎肠球菌(n=53)	粪肠球菌(n=29)
青霉素	94.3	37.9
氨苄青霉素	94.3	37.9
红霉素	92.5	79.3
环丙沙星	90.6	27.6
氯霉素	81.1	96.6
利福平	86.8	89.7
呋喃妥因	92.5	89.7
四环素	79.2	93.1
庆大霉素	94.3	89.7
高浓度庆大霉素	77.4	72.4
利奈唑胺	0.0	0.0
奎奴普丁/达福普汀	0.0	100.0
万古霉素	0.0	0.0
替考拉宁	0.0	0.0

2.3 HLGRE 耐药基因分析 进行耐药基因分析的 HLGRE 中有 60 株含有 aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia 基因,阳性率为 96.8%(60/62)。屎肠球菌有 41 株,均含有 aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia 基因;粪肠球菌有 19 株含有 aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia 基因,有 2 株粪肠球菌未检测到该基因。82 株肠球菌均未能检测到 aph(2″)-Ib 和 aph(2″)-Id 基因。见图 1。20 株对高水平庆大霉素敏感的粪肠球菌和屎肠球菌中,有 10 株含有 aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia 基因,阳性率为 50%,另 10 株该基因阴性。纳入研究的肠球菌均未能检测到 aph(2″)-Ib 和 aph(2″)-Id 基因。

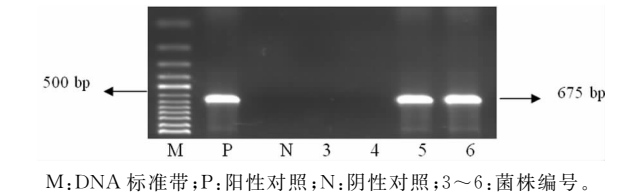


图 1 aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia 耐药基因 PCR 产物凝胶电泳图像

2.4 DNA 测序分析 测得 PCR 产物的 DNA 序列与 GenBank 的序列(GenBank 号:M 13771)99%~100%一致。

3 讨 论

本研究中所分离的 89 株肠球菌中主要以屎肠球菌为主(占 59.6%),其次为粪肠球菌(占 32.6%),此结果与周青等[3]、黄支密等[4]的分离结果刚好相反。肠球菌主要引起泌尿系统感染[5-6],有文献报道,肠球菌居泌尿系统感染菌的第 2 位[7],仅次于大肠埃希菌,

屎肠球菌和粪肠球菌对常用抗菌药耐药率差异较大,前者对青霉素和氨苄西林耐药率高达 94.3%,而后者对这两种抗菌药耐药率仅为 37.9%。原因在于青霉素和氨苄西林对粪肠

球菌具有良好抑菌作用,而屎肠球菌青霉素结合蛋白与青霉素的亲嗜性明显降低,对 β-内酰胺类抗菌药的敏感性低,因此,青霉素和氨苄西林是治疗粪肠球菌感染较好的药物,对于屎肠球菌所致感染时应避免使用该类药物。粪肠球菌对环丙沙星的耐药率(27.6%)明显低于屎肠球菌(90.6%),其耐药机制主要为药物靶位-拓扑异构酶Ⅱ的改变和药物的主动外排[8]。粪肠球菌和屎肠球菌对呋喃妥因耐药率均高,因此用于治疗肠球菌属引起的泌尿系统感染效果可能会不佳。在本次研究中,粪肠球菌和屎肠球菌对庆大霉素、利福平耐药率均高于国内文献报道[9]。此外,对作用于蛋白质合成的红霉素耐药率高达 79.3%和 92.5%,明显高于国外文献报道。屎肠球菌对氯霉素和四环素的耐药率分别为 81.1%和 79.2,明显低于粪肠球菌(96.6%、93.1%),这与路娟等[10]的研究结果一致。由于粪肠球菌体内存在 lsa 基因编码的蛋白,对奎奴普丁/达福普汀有天然的耐药性,因此应该避免使用该药用于临床。

本研究中,HLGR 菌株对利奈唑胺、万古霉素和替考拉宁均敏感,尚未出现耐药现象,但仍需谨慎用,以防耐药株出现。

62 株 HLGRE 菌株中,有 60 株 aac(6′)-aph(2″)基因阳性,占 96.8%,为本次试验检出的 HLGRE 菌株的唯一耐药基因。在 10 株非 HLGRE 肠球菌中也检测到 aac(6′)-aph(2″),该基因很有可能是以“沉默基因”形式存在,这有待更进一步的研究。aac(6′)-aph(2″)能导致对氨基糖苷类药物非常高的耐药性,从而大大减弱药物间的协同作用,使对几乎所有的氨基糖苷类抗菌药物耐药。在该基因缺失的情况下,庆大霉素都能用于针对肠球菌的联合用药治疗。

由于不同菌种的肠球菌属对多种抗菌药物的耐药性有明显不同,因此,应将临床分离的肠球菌属鉴定到种的水平,而且要尽早进行药敏试验,以便临床医师快速准确地选择抗菌药物进行治疗,提高疗效。同时应该加强耐药基因的检测,控制耐药菌株的传播,避免医院感染的发生及暴发流行。

参考文献

[1] 王社梁,钱小毛. 肠球菌临床感染及其耐药性分析[J]. 检验医学, 2009,24(1):61-63.

[2] Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci[J]. Clin Infect Dis, 2000,31(2):586-589.

[3] 周青,杨祚升,唐曼娟,等. 254 株肠球菌的分布及耐药性分析[J]. 中国现代医学杂志, 2006,16(11):1682-1684.

[4] 黄支密,石晓霞,糜祖煌,等. 肠球菌抗生素耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2006,16(1):1-5.

[5] 任南,文细毛,徐秀华,等. 全国医院感染监控网医院感染肠球菌耐药分析[J]. 中国现代医学杂志, 2002,12(24):41-42.

[6] 徐修礼,李涛,孙怡群,等. 肠球菌的分离率及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2004,14(8):947-949.

[7] 华喻,刘华,颜英俊,等. 尿路感染病原菌分布及耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2003,13(10):982-984.

[8] 马越,姚蕾,陈鸿波,等. 临床常见细菌的耐药性问题[J]. 中国抗生素杂志, 2002,27(3):129-137.

[9] 朱德妹,汪复,张婴元. 2004 年上海地区细菌耐药监测[J]. 中国感染化疗杂志, 2005,5(4):195-200.

[10] 路娟,刘文博,姜英,等. 粪肠球菌和屎肠球菌的耐药特征[J]. 中华医院感染学杂志, 2006,16(10):1169-1171.