

耐万古霉素肠球菌的基因型和同源性分析

郭大敏¹, 黄 汉², 廖 康^{2△}, 郭鹏豪², 陈怡丽² (1. 广东省佛山市南海区第八人民医院检验科 528216; 2. 中山大学附属第一医院检验科, 广州 510080)

【摘要】 目的 了解中山大学附属第一医院临床分离的耐万古霉素肠球菌(VRE)的基因型和同源性,为本地区 VRE 的感染治疗和预防控制提供依据。**方法** 收集临床分离的 VRE, E-Test 法确定万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺的最低抑菌浓度(MIC),多重 PCR 法检测万古霉素耐药基因,脉冲场凝胶电泳(PFGE)检测菌株的同源性。**结果** 共收集到 8 株 VRE 菌株,均为屎肠球菌,分离自腹腔引流液。8 株 VRE 均对万古霉素高度耐药(MIC \geq 256 mg/L),对替考拉宁中介或耐药,对利奈唑胺、替加环素和四环素敏感,耐药基因型均为 VanA;PFGE 分型分为 A、B 两个克隆,其中 7 株为 A 克隆,1 株为 B 克隆。**结论** 中山大学附属第一医院 VRE 菌株均携带 VanA 基因,且多重耐药,在院内有小范围的流行,但非单一克隆流行。

【关键词】 万古霉素; 耐药; 肠球菌; 基因型; 同源性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.05.027 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)05-0646-03

Study of genotypes and homology of vancomycin-resistant enterococcus GUO Da-min¹, HUANG Han², LIAO Kang^{2△}, GUO Peng-hao², CHEN Yi-li² (1. Department of Clinical Laboratory, Nanhai District Eighth People's Hospital, Foshan, Guangdong 528216, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

【Abstract】 Objective To understand the genotypes and homology of vancomycin-resistant enterococcus(VRE) isolated from the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University to provide the laboratory basis for clinical treatment, prevention and control of VRE infection in this area. **Methods** The clinically isolated VRE strains were collected. Furthermore, the minimal inhibitory concentrations (MIC) of vancomycin, teicoplanin and linezolid were determined by the E-test; the vancomycin-resistant genes were identified by the multiple-PCR, and the homology of VRE strains by the pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Results** All 8 VRE strains, identified as enterococcus faecium, were isolated from abdominal drainage fluid, which were highly resistant to vancomycin (MIC \geq 256 mg/L), mediate or resistant to teicoplanin, and sensitive to linezolid, tigecycline and tetracycline. The vancomycin-resistant genotypes were determined to be VanA-type; which were divided into the clone A and B by the PFGE classification, in which 7 strains were the clone A and 1 strain was the clone B. **Conclusion** The 8 VRE strains carry the Van gene and are multidrug-resistant, has a small range prevalence in our hospital, but is not the prevalence of single clone.

【Key words】 vancomycin; drug resistance; enterococcus; genotype; homology

肠球菌常引起泌尿系统感染、菌血症、感染性心内膜炎、腹腔感染及伤口感染等,是重要的条件致病菌。自 1988 年首次分离出耐万古霉素的肠球菌(VRE)以来,VRE 的感染率明显上升。2000 年欧洲 VRE 分离率达到 5.8%,而根据欧洲抗菌药物监测系统基于 31 个欧洲国家 1 300 家医院的监测数据显示,包括德国、希腊、爱尔兰、以色列和斯洛文尼亚在内的五个国家,肠球菌对万古霉素的耐药性明显增加,在斯洛文尼亚,耐药率从 2005 年的 0% 上升至 2006 年的 6%,这种快速播散是典型的暴发流行的结果^[1]。美国疾病控制与预防中心数据也显示,VRE 检出率由 1998 年的 0.3% 上升到 2000 年的 25.9%^[2]。而我国 2009 年细菌耐药性监测(CHINET)数据显示,VRE 分离率仅有 0.3%~3.5%^[3]。VRE 已逐渐成为全球公共卫生面临的重要威胁之一。本研究通过对中山大学附属第一医院临床分离的 VRE 进行基因型和同源性的分子研究,了解本地区 VRE 的耐药特点和流行情况,有助于临床治疗和感染防控措施的实施。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2011 年 12 月至 2013 年 5 月期间,共收集到

中山大学附属第一医院临床分离的 8 株对万古霉素耐药的屎肠球菌,均分离自腹腔引流液。质控菌株为粪肠球菌 ATCC29212,金黄色葡萄球菌 ATCC25923, VanA 阳性参考菌株由浙江大学医学院附属第一医院检验科细菌室惠赠。

1.2 试剂和仪器 VITEK-2 细菌鉴定药敏仪为法国生物梅里埃公司产品;E-Test 药敏试条为瑞典 ABIODISK 公司产品;低熔点琼脂糖凝胶 Agarose (A3054-1G)、Lysozyme (L6876) 为美国 Sigma 公司产品;Proteinase K (D9033)、Sma I (D1085A)、TaqDNA 酶;DNA Marker 为大连 Takara 公司产品;PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成;ABI 9700 扩增仪为美国应用生物系统公司产品;Pulse Field Certified Agarose、BIO-RAD CHEF MAPPER XA 脉冲场电泳仪、Bio-Rad Gel Doc 凝胶成像系统为法国 BIO-RAD 公司产品。

1.3 药敏试验 用 VITEK-2 全自动微生物仪进行菌种鉴定和常规药敏试验。用 E-Test 法确定万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺的最低抑菌浓度(MIC)。质控菌株为粪肠球菌 ATCC29212,金黄色葡萄球菌 ATCC25923。药敏结果判断参照美国临床和实验室标准协会 M100-S22 标准。

1.4 耐药基因检测 提取细菌 DNA 制作 PCR 模板^[4]。引物序列 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'; VanC1(F):5'-GGT ATC AAG GAA ACC TC-3', VanC1(R):5'-CTT CCG CCA TCA TAG CT-3', 扩增片段分别为 732 bp、635 bp 和 822 bp^[5]。参照文献[4]进行 PCR 扩增, 阴性对照为粪肠球菌 ATCC 29212, 阳性对照为 VanA 阳性参考菌。扩增产物由上海生工生物公司进行 DNA 双脱氧法测序, 测序结果与 GenBank 中序列比较。

1.5 分离细菌 DNA 细菌 DNA 的分离采用脉冲场凝胶电泳 (PFGE), 先制备细菌 DNA, 酶切后产物在以下电泳条件: 温度 14 °C, 脉冲时间 5~35 s, 电压 6 V/cm, 转换角度 120°, 电泳时间 22 h。电泳结果由 Bio Numerics MANUAL version 6.6 软

件分析同源性。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 8 株 VRE 对万古霉素高度耐药 (MIC ≥ 256 mg/L), 对替考拉宁中介或耐药 (MIC 为 12~48 mg/L), 对利奈唑胺敏感 (MIC 为 0.75~2 mg/L), 对替加环素和四环素敏感, 对氨基西林、环丙沙星和左氧氟沙星耐药。见表 1。

2.2 耐药基因检测 8 株 VRE 均携带 VanA 基因。对菌株进行测序, 与 Genbank 中 VanA 基因序列 JN207930.1 比较, 均有 99% 同源性。

2.3 细菌 DNA 分离结果 PFGE 分型分为 A、B 两个克隆, 2~8 号菌为 A 克隆, A 克隆又分可分为 5 个亚型, 分别为 A1 (2、3 号菌)、A2 (7 号菌)、A3 (4、5 号菌)、A4 (6 号菌)、A5 (8 号菌); 1 号菌为 B 克隆。见图 2。

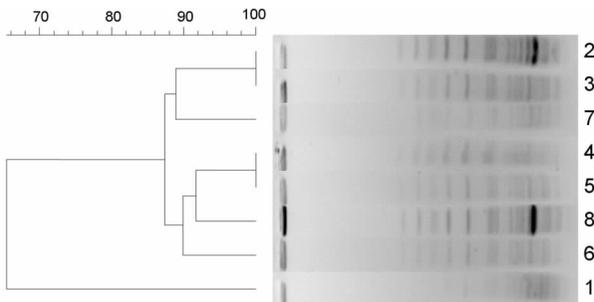
表 1 8 株 VRE 对常用抗菌药物的 MIC 和基因型 (mg/L)

菌株编号	基因型	PFGE 分型	万古霉素	替考拉宁	利奈唑胺	替加环素	四环素	氨基西林	环丙沙星	左氧氟沙星
1	VanA	B 克隆	R(≥256)	R(24)	S(1.5)	S(≤0.12)	S(≤1)	R(≥32)	R(≥8)	R(≥8)
2	VanA	A 克隆	R(≥256)	R(48)	S(1.5)	S(≤0.12)	S(≤1)	R(≥32)	R(≥8)	R(≥8)
3	VanA	A 克隆	R(≥256)	I(16)	S(1.5)	S(≤0.12)	S(≤1)	R(≥32)	R(≥8)	R(≥8)
4	VanA	A 克隆	R(≥256)	R(24)	S(1.5)	S(≤0.12)	S(≤1)	R(≥32)	R(≥8)	R(≥8)
5	VanA	A 克隆	R(≥256)	I(16)	S(1.5)	S(≤0.12)	S(≤1)	R(≥32)	R(≥8)	R(≥8)
6	VanA	A 克隆	R(≥256)	I(12)	S(2)	S(≤0.12)	S(≤1)	R(≥32)	R(≥8)	R(≥8)
7	VanA	A 克隆	R(≥256)	I(16)	S(1.5)	S(≤0.12)	S(≤1)	R(≥32)	R(≥8)	R(≥8)
8	VanA	A 克隆	R(≥256)	I(16)	S(0.75)	S(≤0.12)	S(≤1)	R(≥32)	R(≥8)	R(≥8)



注: M 为 DNA 标记物; 1~8 为待测菌株的阳性扩增产物; + 为已测序 VanA 基因的阳性对照; - 为阴性对照 (粪肠球菌 ATCC 29212)。

图 1 VRE 耐药基因 PCR 电泳图



注: 左图上边数字代表同源性大小; 右图数字代表菌株编号; A 型为 2~8 号, 分为 5 亚型 (2、3 号为 A1 型, 7 号为 A2, 4、5 号为 A3 型, 6 号为 A4 型, 8 号为 A5 型); B 型为 1 号。

图 2 8 株 VRE 的 PFGE 结果图

2.4 患者的临床资料 8 例患者检出 VRE 前均有胃肠道手术史; 均使用了广谱抗菌药物; 6 例患者曾入住 ICU; 住院时间

长, 检出 VRE 前住院天数 10~70 d。

3 讨 论

VRE 耐药机制主要是由于耐药操纵子编码的酶使 C 末端的 D-Ala 残基被 D-Lac 或 D-Ser 取代, 消除了万古霉素作用靶点。目前 VRE 的基因型主要有 6 种: VanA、VanB、VanC、VanD、VanE、VanG, 根据文献[6]报道, 欧美和中国均以 VanA 基因型为主。本实验的 8 株 VRE 均检测到 VanA 型基因, 与国内外的基因型分布一致。VanA 型菌株的特点是对万古霉素和替考拉宁都呈诱导性高水平耐药 (MIC ≥ 64 mg/L; MIC ≥ 16 mg/L), 从表 3 可见 8 株 VRE 对万古霉素、替考拉宁的药敏结果与报道一致。治疗可考虑选择利奈唑胺、替加环素等药物, 其体外药敏试验亦提示对 VRE 菌株敏感。药敏试验亦提示 VRE 菌株对四环素高度敏感, 但国内缺乏应用四环素治疗 VRE 的临床资料, 其疗效有待进一步研究。2、3 号菌和 4、5 号菌分别有 100% 同源性, 它们临床分离时间相近, 2、3 号菌只相隔 1 d, 4、5 号菌相隔 6 d。而 8 株 VRE 均来自胃肠外科的腹腔引流液。本院 VRE 的分离率低。肠球菌可引起多系统的感染, 如医源性尿道感染、手术伤口感染、导管相关性血流感染等, 以粪肠球菌和屎肠球菌为主, 后者更易出现多重耐药及万古霉素耐药。2008 年中国 CHINET 检测 3 207 例肠球菌, 分离出 VRE 粪肠球菌只 6 例, 而 VRE 屎肠球菌就有 43 例。本院 2012 年共分离 191 株屎肠球菌和 198 株粪肠球菌, 其中 VRE 屎肠球菌有 4 株, VRE 粪肠球菌 0 株, VRE 分离率分别占 2% 和 0%, 低于 2009 年中国 CHINET 对十几家教学医院的耐药监测数据 (耐万古的屎肠球菌和粪肠球菌为 3.5% 和 0.3%)^[7]。从药敏试验看, 8 株 VRE 多重耐药, 且耐药表型相同。只有三种敏感的抗菌药物, 即利奈唑胺、替加环素和四环素可供临床治疗选择。利奈唑胺是一类全合成的新型噁唑啉酮类, 是针对 G⁺ 菌的广谱抗菌药物。其作用于 50S 核糖体亚

基 P 位点, 机制独特, 与其他药物无交叉耐药性, 作为治疗 VRE 感染的主要药物有一定优势。替加环素为甘氨酸环素抗菌药物, 能针对多重耐药的 G⁺ 和多种 G⁻ 菌, 属于强效的四环素类, 对通过主动外排和核糖体保护机制抵抗四环素的细菌仍有效。应用这两种抗菌药物来治疗 VRE 感染, 其疗效已在临床上证实, 但这两种高档抗菌药物未必能在各层次医疗单位及患者中应用。四环素虽低档, 但本院以及浙大附一院 9 株 VRE 屎肠球菌都对其敏感, 对于无法承担高昂医疗费用的 VRE 感染患者, 可以结合药敏结果, 考虑应用四环素来治疗。但国内应用四环素治疗 VRE 的报道还未见, 其临床疗效有待进一步研究。

目前, VRE 可分为 VanA、VanB、VanC、VanD、VanE 和 VanG 这几种表型和基因型。不同型决定了对万古霉素和替考拉宁的不同耐药性。除了 VanC 型(三种亚型 C1、C2、C3)是低水平的万古霉素天然耐药, 其余 5 种为获得性耐药。院内流行的有 VanA、VanB 和 VanC, 前两种最常见。VanA 型菌株对万古霉素和替考拉宁都呈诱导性高水平耐药 (MIC \geq 64 mg/L; MIC \geq 16 mg/L); VanB 型菌株只对万古霉素呈不同耐药水平的诱导性耐药, 对替考拉宁敏感^[8]。多重 PCR 检测万古霉素耐药基因在国际上使用广泛, 作为金标准在分子水平上确定万古霉素耐药。通常检测 VanA、VanB 和 VanC1 三种基因型。本次实验 8 株 VRE 的耐药表型和耐药基因型一致, 均为 VanA 型。VanA 耐药基因可以通过质粒或转座子水平转移, 甚至还可以通过接合作用将带有耐药基因的质粒转移到其他致病力更强的革兰阳性菌。从 2002 年发现第一例万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌 (VRSA) 至 2009 年, 美国共报道了 9 例 VRSA, 给临床治疗造成极大困难。因此做好院内 VRE 感染的监测, 做好消毒隔离措施以控制 VRE 的传播, 阻止 VRSA 的出现。

本次研究收集到的 8 株耐万古霉素屎肠球菌 (VREFm) 均引起腹腔感染, 这可能与 8 位患者行过腹腔镜手术, 肠瘘而发生定植菌移位引起的腹腔感染有关。VRE 感染风险因素包括: 接受有创治疗 (静脉插管, 导尿等), 免疫功能低下, 长期住院 (尤其 ICU 住院者), 使用三代头孢和万古霉素、器官移植以及感染前有 VRE 定植等^[9]。而 8 位感染 VRE 的患者均有胃肠道严重基础疾病, 免疫力低下; 感染前均接受过手术; 且住院时间较长; 大部分患者曾入住 ICU; 多数患者感染前使用过广谱抗菌药物或万古霉素。对于这些有 VRE 感染风险因素的高危患者, 一定要加强预防并随时监测, 早期发现 VRE 感染和携带者, 控制 VRE 的传播。

VRE 的流行可通过菌株的克隆传播 (如交叉感染) 和/或通过质粒介导 (水平) 传播。肠球菌在医院环境生存力强, 极易附着在物体表面, 有利于耐药菌株的克隆传播。此 8 位患者均来自胃肠外科, 且 8 株 VRE 的耐药表型和基因型均相同, 根据肠球菌同源性分析的参考方法明确本院胃肠外科发生了 VRE 的流行, 但非单克隆菌株的暴发流行。VRE 的暴发流行

在国外报道较多, 美国超过 95% VRE 为屎肠球菌, 主要在 ICU 引起暴发流行, 国内报道少, Zhu 等^[10]报道过北京 2006~2007 年 VRE 在 ICU 病房的多克隆暴发流行。总之, 要做好 VRE 感染后的防控措施, 临床上应合理使用抗菌药物, 强调手卫生和隔离措施, 实验室应对 VRE 及时、准确检测, 并加强 VRE 监测, 以防止 VRE 的暴发流行。

参考文献

- [1] 王贺, 徐英春, 谢秀丽, 等. 万古霉素耐药肠球菌的同源性及其耐药机制分析[J]. 中国医学科学院学报, 2008, 30(5): 521-524.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004[J]. Am J Infect Control, 2004, 32(8): 470-485.
- [3] 马冰, 孙长义, 秦东春. 河南地区耐万古霉素肠球菌表型和基因分型[J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(20): 33-35.
- [4] Almyroudis NG, Lesse AJ, Hahn T, et al. Molecular epidemiology and risk factors for colonization by vancomycin-resistant Enterococcus in patients with hematologic malignancies[J]. Infect Cont Hosp Ep, 2011, 32(5): 490-496.
- [5] Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically enterococci by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(1): 24-27.
- [6] Hsieh YC, Lee WS, Ou TY, et al. Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant Enterococcus faecium with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29(1): 25-30.
- [7] 杨青, 俞云松, 倪语星, 等. 2009 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, 2010, 10(6): 421-425.
- [8] 耐万古霉素肠球菌防治专家委员会. 耐万古霉素肠球菌感染防治专家共识[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2010, 4(2): 224-231.
- [9] 刘颖梅, 曹彬. 耐万古霉素肠球菌感染与治疗[J]. 临床药物治疗杂志, 2010, 8(3): 12-15.
- [10] Zhu X, Zheng B, Wang S, et al. Molecular characterisation of outbreak-related strains of vancomycin-resistant Enterococcus faecium from an intensive care unit in Beijing, China[J]. J Hosp Infect, 2009, 72(2): 147-154.

(收稿日期: 2015-06-20 修回日期: 2015-09-25)

(上接第 645 页)

- [9] 郝新忠, 黄之杰, 程莹, 等. 成都市 0~6 岁儿童 25-羟维生素 D 水平调查[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(5): 819-822.

- [10] 李薇, 曹丽, 张亚果, 等. 成都市 3~6 岁儿童 25-羟维生素 D 营养状况的调查[J]. 中国儿童保健杂志, 2014, 22(5): 479-481.

(收稿日期: 2015-06-28 修回日期: 2015-09-10)