

耐万古霉素肠球菌耐药表型检测和基因型分析

张侠家^{1,2}, 沈继录^{1,2}, 贾伟华³

摘要 目的 研究某院耐万古霉素肠球菌(VRE)的耐药特性、基因型及流行情况。方法 采用K-B纸片扩散法进行药敏试验;使用E-test法检测VRE对万古霉素的最低抑菌浓度(MIC),PCR法检测万古霉素的耐药基因,BLAST法对6株PCR产物测序结果比对分析其氨基酸序列。结果 193株肠球菌中检出6株万古霉素耐药屎肠球菌;该菌株对高单位庆大霉素、氨苄西林、环丙沙星、红霉素、利福平、替考拉宁均耐药,对呋喃妥因和利奈唑胺均敏感,对万古霉素的MIC值均>256 mg/L;基因型均为vanA;6株菌的vanA基因均有氨基酸发生了改变,其中5株菌均发生第83位氨基酸突变,由天冬酰胺(AAC)→天冬氨酸(GAC)。结论 我院VRE多为多重耐药,给临床治疗VRE感染带来困难,医院应加强预防监测,阻止其在院内的传播和流行。

关键词 万古霉素;耐药性;肠球菌;表型;基因型

中图分类号 R 378.1;R 446.5;R 453.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0662-03

肠球菌属可导致尿路感染、皮肤软组织感染,甚至会引起危及生命的腹腔感染、败血症、心内膜炎和脑膜炎。近年来,肠球菌耐药菌株的不断出现,耐药水平也迅速上升^[1]。随着1988年英国首次报道^[2-3]了耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococci*, VRE),世界各地陆续有VRE被发现,并且世界各国VRE检出率非常高,近年我国许多地区VRE也有一定检出率^[4]。现对安徽医科大学第一附属医院2011年分离到的6株VRE进行分析,为临床治疗VRE用药、控制院内传播及进行流行病学调查提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集安徽医科大学第一附属医院2011年1月~12月临床分离的193株肠球菌(剔除来自同一患者的重复株),其中粪肠球菌59例,

屎肠球菌131例,鸟粪肠球菌3例。

1.2 质控菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和粪肠球菌 ATCC 29212 均购自卫生部临床检验中心。

1.3 主要仪器设备 MicroScan WalkAway-96plus 全自动微生物分析系统购自美国西门子公司;电泳仪(天能 ESP 300)购自上海天能公司;PCR扩增仪购自德国 Biometra 公司;凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.4 培养基和试剂 M-H 琼脂培养基为英国 OXOID 公司商品;PCR 检测试剂 Ex Taq 酶、Ex Taq Buffer 及 dNTPs 均为日本 TaKaRa 公司商品。

1.5 抗菌药物 高单位庆大霉素(120 μg)、氨苄西林、环丙沙星、氯霉素、磷霉素、红霉素、利福平、呋喃妥因、利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素 11 种药物纸片均购自英国 OXOID 公司;E-test 纸条购自法国生物梅里埃公司。

1.6 药敏试验 采用 K-B 纸片法进行药敏试验,结果判断依据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)文件 2011 版标准。纸片法万古霉素耐药菌株再采用 E-test 纸条确认最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MIC)。耐药株选择标准: E-test 纸条测定对万古霉素的 MIC >256 mg/L。

1.7 PCR 引物 引物依据参考文献^[5-6]进行设计,由上海生物工程公司合成。见表 1。

1.8 肠球菌万古霉素耐药基因检测 应用 PCR 对 van 耐药的菌株进行耐药基因的扩增,包括: vanA、vanB、vanC₁ 和 vanC₂₋₃ 型基因;PCR 反应条件与过程如下:挑取纯培养菌落置入去离子水中配制成悬液,100 °C 煮沸 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,上清液即为模板液。PCR 反应体积为 50 μl,包括 4 μl 的模板液,上下游引物各 2 μl(10 μmol/L),4 μl dNTPs(200 μmol/L),0.25 μl Ex Taq 酶(1.6 U),5 μl Ex Taq Buffer,去离子水 32.8 μl。扩增条件:预变性 93 °C 2 min;变性 93 °C 1 min,退火 55 °C 1 min,延伸 72 °C 1 min,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 2 min,停止 4 °C。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,取出用 BIO-RAD 显像,拍照观察结果。

1.9 PCR 产物测序分析 PCR 阳性扩增产物送交

2014-02-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171618)

作者单位:安徽医科大学¹临床检验诊断学教研室、³第一临床学院,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

作者简介:张侠家,女,硕士研究生;

沈继录,男,博士,副主任技师,硕士生导师,责任作者,E-

mail:shenjilu@126.com

上海生物工程公司测序。以屎肠球菌 (taxid:1352) 为阳性对照 将测序结果在 GenBank 序列数据库进行基因同源性分析 (BLAST)。

表1 van 基因 PCR 引物序列及产物大小

基因	引物序列	产物大小 (bp)
vanA	F:5'-GCTATTGAGCTGTACTC-3' R:5'-CAGCGCCATCATAACGG-3'	783
vanB	F:5'-CATCGCCGTCCCGAATTCAAA-3' R:5'-GATCGGGAAGATACCGTGGCT-3'	297
vanC ₁	F:5'-GGTATCAAGGAACCTC-3' R:5'-CTCCGCCATCATAGCT-3'	822
vanC _{2,3}	F:5'-CTCCTACGATTCTCTG-3' R:5'-CGAGCAAGACCTTTAAG-3'	429

2 结果

2.1 6株耐万古霉素屎肠球菌 (vancomycin-resistant Enterococci Faecium, VREFm) 药敏试验 K-B 纸片法测定 6 株 VREFm 对 11 种抗菌药物的耐药率,结果显示 VREFm 对高单位庆大霉素、氨苄西林、环丙沙星、氯霉素、红霉素、利福平 100% 耐药;对磷霉素耐药性呈现出差异;对呋喃妥因和利奈唑胺均敏感,对替考拉宁耐药。见表 2。

2.2 6株 VREFm 基因检测 6 株耐药屎肠球菌经 PCR 扩增后均为 vanA 阳性基因,片段 783 bp。未检测出 vanB、vanC₁ 和 vanC_{2,3} 型基因。见图 1。

2.3 6株 PCR 产物基因测序 从 vanA 基因表达阳性菌株中,进行 vanA 基因的测序,发现 6 株菌 vanA 基因均有氨基酸的突变,其中 5 株菌均发生第 83 位氨基酸突变 Asn (AAC) → Asp (GAC),见表 3。

3 讨论

万古霉素是治疗革兰阳性菌感染的一种重要的

糖肽类抗生素,被认为是治疗严重肠球菌感染的“最后一道防线”。然而近年来,随着万古霉素在临床应用治疗肠球菌感染逐渐增多,使得 VRE 感染率迅速增加^[7] 给临床治疗带来了困难。本研究对我院 2011 年分离的 193 株肠球菌进行药敏试验,结果筛选出 6 株 VRE 耐药率占 3.1%,低于国内外的相关报道^[2,8] 并且药敏试验显示 6 株 VRE 全部是屎肠球菌。屎肠球菌对大多数抗菌药的耐药率高于粪肠球菌,并且屎肠球菌对大多数抗生素天然耐药,提示屎肠球菌耐药形势比粪肠球菌严峻^[9],使临床治疗 VRE 感染更加棘手。

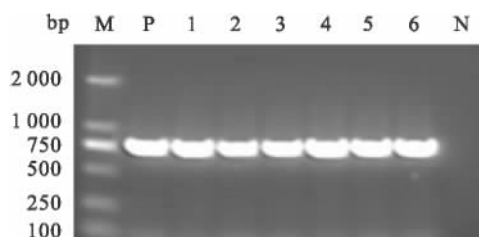


图1 vanA 基因的 PCR 产物电泳图

M: DL 2 000 DNA Marker; P: 阳性对照; N: 阴性对照; 1: 1201765; 2:1010793; 3:1115947; 4:1109048; 5:1010678; 6:1111261

表2 6株 VREFm 对 11 种抗菌药物的耐药率 (%)

抗菌药物	株数 (n)	耐药率
高单位庆大霉素	6	100.0
氨苄西林	6	100.0
环丙沙星	6	100.0
氯霉素	6	100.0
磷霉素	2	33.3
红霉素	6	100.0
利福平	6	100.0
呋喃妥因	0	0
利奈唑胺	0	0
替考拉宁	6	100.0
万古霉素	6	100.0

表3 6株 VREFm 的 vanA 基因氨基酸突变情况

菌株编码	vanA 基因氨基酸突变位点						
	第 75 位	第 76 位	第 78 位	第 79 位	第 80 位	第 81 位	第 83 位
1210765							天冬氨酸 (Asn)
1010793							天冬氨酸 (Asp)
1115947	甲硫氨酸 (Met)	组氨酸 (His)	亮氨酸 (Leu)	亮氨酸 (Leu)	缬氨酸 (Val)		天冬氨酸 (Asn)
1109048	缬氨酸 (Val)	谷氨酸 (Glu)	异亮氨酸 (Ile)	苏氨酸 (Thr)	半胱氨酸 (Cys)		天冬氨酸 (Asp)
1010678	甲硫氨酸 (Met)	组氨酸 (His)	亮氨酸 (Leu)	亮氨酸 (Leu)	缬氨酸 (Val)	赖氨酸 (Lys)	天冬氨酸 (Asp)
1111261	异亮氨酸 (Ile)	丝氨酸 (Ser)	组氨酸 (His)	苏氨酸 (Thr)	亮氨酸 (Leu)	亮氨酸 (Leu)	天冬氨酸 (Asp)
							天冬氨酸 (Asp)
							天冬氨酸 (Asp)
	甲硫氨酸 (Met)	组氨酸 (His)	亮氨酸 (Leu)	亮氨酸 (Leu)	缬氨酸 (Val)	赖氨酸 (Lys)	天冬氨酸 (Asn)
	亮氨酸 (Leu)	甘氨酸 (Gly)	异亮氨酸 (Ile)	酪氨酸 (Tyr)	亮氨酸 (Leu)	亮氨酸 (Leu)	天冬氨酸 (Asp)

目前,VRE 耐药表型和基因型均可分为 vanA、vanB、vanC、vanD、vanE、vanG、vanL、vanM 和 vanN 9 型^[10] 其中 vanA 型为主要类型,对万古霉素和替考拉宁均耐药,其次为 vanB 型,表现为对万古霉素不同程度耐药而对替考拉宁敏感,vanC 型对万古霉素敏感而对替考拉宁耐药。我院检出的 6 株 VRE 基因型均是 vanA 型,并且 6 株菌 vanA 基因均有氨基酸的突变,其中 5 株菌均发生第 83 位氨基酸突变 Asn(AAC)→Asp(GAC)。6 株 vanA 基因表达阳性菌株,对万古霉素耐药,其编码基因发生突变可能导致其编码的蛋白高表达,从而导致对万古霉素 MIC 的进一步提升,具体机制还有待进一步研究。vanA 是肠球菌中最常见的耐糖肽类抗菌药物的耐药型,也是迄今为止唯一一个能在金黄色葡萄球菌中检出的耐药类型;vanA 型耐药基因可由质粒介导传递给金黄色葡萄球菌,产生耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)。VRSA 的毒力和侵袭力更大,使目前存在的抗菌药物面临极大挑战。因此,要规范化使用抗菌药物,要不断完善实验室对 VRE 的检测,做到快速分离和鉴定,如果发现 VRE 应及时与医院有关部门取得联系,做好消毒隔离工作,定期检测医院耐药菌株对常用抗菌药物的耐药情况,防止 VRE 在医院内的交叉感染和传播。

参考文献

[1] 张 姝,莫 非,黄志卓等. 肠球菌属耐药基因检测及耐药性

分析[J]. 中华医院感染学杂志 2012 22(3):457-60.
 [2] Sader H S, Farrell D J, Jones R N. 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] Simor A E, Williams V, McGeer A, et al. Prevalence of colonization and infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus and of clostridium difficile infection in Canadian hospitals[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013 34(7):687-93.
 [4] 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):92-7.
 [5] 马 均,张 彭,褚美玲等. 258 株肠球菌耐药性分析及耐万古霉素基因检测[J]. 国际检验医学杂志 2012 33(20):2507-9.
 [6] 王 宏,黄 健,谢忆虹等. 肠球菌耐万古霉素基因及耐消毒剂基因检测的研究[J]. 实验与检验医学 2011 29(6):602-4.
 [7] 李 茹,徐晓刚,李 敏等. 耐万古霉素肠球菌的基因检测[J]. 中华检验医学杂志 2010 33(5):430-6.
 [8] 王国富,吴利先,薛士鹏. ICU 肠球菌属 esp 基因分布及对万古霉素耐药的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志 2012 12(13):2724-6.
 [9] 姚 杰,徐元宏,魏志华等. 粪肠球菌和屎肠球菌临床分离株的耐药性检测及比较[J]. 安徽医科大学学报 2010 45(2):266-8.
 [10] Tzavaras I, Siarkou V I, Zdragas A, et al. Diversity of vanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from broilers, poultry slaughterers and hospitalized humans in Greece[J]. *J Antimicrob Chemother* 2012 67(8):1811-8.

Detection of phenotype and analysis of genotype in vancomycin-resistant *Enterococci*

Zhang Xiajia^{1,2}, Shen Jilu^{1,2}, Jia Weihua³

^{(1)Dept of Clinical Laboratory Diagnostics, ²The First Clinical College Anhui Medical University Hefei 230032;}

³Dept of Medical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To research the resistant characteristics, genotype and prevalence of vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE). **Methods** K-B disc diffusion method was used to determine the susceptibility, minimum inhibitory concentration (MIC) for vancomycin of VRE was detected by E-test method; VRE was then subjected to PCR for resistance related genes; 6 strains sequencing results of PCR product were contrastively analyzed the amino acid sequence by BLAST. **Results** 6 VREFm strains were found from 193 strains enterococci; 6 VREFm strains were completely resistant to high unit gentamicin, ampicillin, ciprofloxacin, teicoplanin, but were sensitive to linezolid and macrodantin, MIC for vancomycin was more than 256 mg/L; Genotypes were vanA; Amino acids in vanA gene have changed with Asn83→Asp(AAC→GAC). **Conclusion** VRE in our hospital is mostly multi-drug resistant, which bringS difficulty in clinical treatment for its infection. So the hospital should strengthen the prevention and monitoring, to prevent the spread of VRE strains in the hospital and popular.

Key words vancomycin; drug resistance; enterococci; phenotype; genotype