肠球菌耐药性与耐万古霉素基因初步检测

钱 纯,宁兴旺
(湖南中医药大学第一附属医院 检验科,湖南 长沙 410007)

摘 要: **目的** 了解肠球菌对六种常用抗生素的耐药情况,同时检测耐万古霉素肠球菌(VRE)的耐万古霉素基因型。 **方法** 用 K-B 纸片琼脂扩散法检测肠球菌对万古霉素、替考拉宁、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星以及庆大霉素等六种常用抗生素的敏感性。采用含 6 μg/mL 万古霉素的琼脂稀释筛选平板法(ADSP)筛选 VRE 菌株,并用多重聚合酶链反应(multiplex-PCR)检测 VRE 的耐万古霉素基因型。 **结果** 100 株临床分离肠球菌中以粪肠球菌(86%)和屎肠球菌(11%)为主。除万古霉素和替考拉宁外,屎肠球菌对其它几种抗生素的耐药率明显高于粪肠球菌($P<0.05$);庆大霉素高耐株检出率为 54%,其对常用抗生素的耐药率明显高于低耐株($P<0.05$)。用 ADSP 法筛选出 3 株(3%)耐万古霉素肠球菌,其中只有一株铅黄肠球菌为耐万古霉素基因型阳性(VanC2),其余两株均为 Van 基因阴性。 **结论** ADSP 法用于筛选 VRE 较 K-B 法检出率高;本次研究只分离出一株 VanC2 型 VRE,没有发现具有重要临床意义的 VanA 和 VanB 型 VRE;肠球菌对庆大霉素(120 μg/片)的耐药率为 54%,建议临床慎用;万古霉素、替考拉宁、氨苄西林及氨苄西林/舒巴坦均可作为治疗粪肠球菌感染的药物,但需密切注意肠球菌耐药情况。

关键词: 肠球菌; 耐药性; 耐万古霉素肠球菌; 基因型
中图分类号:R446.2 **文献标识码:**A **文章编号:**2095-1116(2011)04-0422-04

Detection of Enterococci Resistance and Vancomycin Resistant Gene

QIAN Chun, NING Xing-wang
(*Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan* 410007, *China*)

Abstract: **Objective** To study the resistance of Enterococci to commonly used antibiotics and detect the genotypes of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). **Motheds** Drug resistance of Enterococci to vancomycin, teicoplanin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, ciprofloxacin and gentamycin were detected by disc agar diffusion method. VRE were screened by agar dilution sieving plate (ADSP) containing 6 μg/mL of vancomycin, and their genotypes were determined using multiplex PCR. **Results** Among the 100 isolated strains of Enterococci, E. faecalis (86%) and E. faecium (11%) were the majority. The resistance rate of E. faecium was significantly higher than those of E. faecalis ($P<0.05$), except for vancomycin and teicoplanin. With ADSP, 3 VRE were screened from the 100 isolated Enterococci. With multiplex PCR, only one strain was determined as VanC2, and the others were negative. **Conclusions** ADSP is more sensitive than K-B method for VRE screening. Unfortunately, we didn't find any relevant genotype of VanA and VanB, but one strain of VanC2. The resistance rate of hyper-concentration gentamycin reached to 54%, indicating the cautious implement in clinic. Vancomycin, teicoplanin and ampicillin are effective drugs for Enterococcus infection, but close surveillance for the resistance of Enterococci is essential.

Key words: eterococcus; resistance; vncomycin-rsistant eterococci; genotype

肠球菌是人体肠道内的正常菌群。近年来,由 于广谱抗生素的大量使用,肠球菌作为条件致病菌

收稿日期:2010-09-06
通讯作者:钱纯,电话:0731-85600770,E-mail:chunqian08@163.com.

所引起的感染率持续升高,尤其对于那些有严重基础疾病和机体免疫力低下的患者,容易侵入体内或易位,从而导致局部或全身感染。肠球菌对多种抗生素显示不同程度的耐药。1988 年,耐万古霉素肠球菌(Vancomycin-Resisitant Enterococci,VRE) 首次在英国伦敦分离得到。研究发现,VRE 有六种不同的基因型,分别为 VanA、VanB、VanC、VanD、VanE 和 VanG。目前,我国已分离得到 VanA、VanB 及 VanC 三种基因型[1]。为了解肠球菌对常用抗生素的耐药性,并检测 VRE 基因型,特对本院所分离得到的 100 株肠球菌进行检测及分析,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床菌株 来自 2005 年 8 月 ~2006 年 1 月湖南中医药大学第一附属医院门诊和住院患者临床标本共计 100 份。其中包括尿液(34%),生殖道分泌物(29%),痰(8%),胆汁(9%),血液(4%),胸水(1%)以及其他分泌物(15%)。

1.1.2 参考菌株 VanA、VanB、VanC1 及 VanC2 四株 VRE,购自中科院微生物菌种库。

1.1.3 标准菌株 粪肠球菌 ATCC29212、金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

1.1.4 药敏试纸 氨苄西林(AMP 10 μg/片)、氨苄西林/舒巴坦 (AMS 20 μg/片)、万古霉素(VAN 30 μg/片)、替考拉宁(TEC 30 μg/片)、环丙沙星(CIP 5 μg/片)、庆大霉素(GEN 10 μg/片)及庆大霉素(GEN 120 μg/片)均系英国 Oxoid 公司产品。

1.1.5 培养基 MH 琼脂购自杭州天和微生物制品公司,脑心浸液培养基自配。

1.1.6 PCR 试剂 TaqDNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子标准物购自宝生物工程公司,PCR 引物 VanA、VanB、VanC1 及 VanC2 由香港中文大学微生物学系惠赠。各引物基因序列分别是 VanA:5′-CAGCGGCCATCATACGG-3′,3′-GCTATTCAGCTGTACTC-5′;VanB:5′-GATGCGGAAGATACCGTGGCT-3′,3′-CATCGCCGTCCCCGAATTTCAAA-5′;VanC1:5′-CCTCCGCCATCATAGCT-3′,3′-GGTATCAAGGAAACCTC-5′;VanC2:5′-CGCAGGGACGGTGATTTT-3′,3′- CGCAGGGACGGTGATTTT-5′。

1.1.7 仪器 Vitek2 微生物鉴定系统(法国梅里埃);PCR 扩增仪(厦门安普利);电泳仪(上海西巴斯);紫外透射仪(北京六一)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株鉴定 所有实验菌株均按全国临床检验操作程序由 Vitek2 微生物鉴定系统鉴定。

1.2.2 K-B 纸片琼脂扩散法 挑取培养 18 ~24 h 的菌落,用无菌生理盐水稀释至菌液浓度达到 0.5 麦氏单位,用无菌棉签沾取适量菌液均匀涂布于 10% 的绵羊血平板(M-H),贴上药敏纸片。于 35℃ 孵育 24 h,用游标卡尺量取抑菌圈直径大小。K-B 纸片琼脂扩散法判断标准见表 1。每批实验均用金黄色葡萄球菌 ATCC25923 作质控。

表 1 CLSI/NCCLS 肠球菌纸片法药敏判断标准

抗菌药物	纸片含量(μg)	判断标准(mm)
氨苄西林	10	≤16R,≥17S
氨苄西林/舒巴坦	20	14 ~16
万古霉素	30	15 ~16
替考拉林	30	11 ~13
环丙沙星	5	16 ~20
庆大霉素	120	7 ~9

1.2.3 庆大霉素低耐株及高耐株(HLGR)鉴定[2] 分别用含量为 10 μg/片及 120 μg/片的庆大霉素药敏纸片对试验菌株进行药敏试验,如果 10 μg/片纸片抑菌环直径≤12 mm,并且 120 μg/片纸片抑菌环直径≥10 mm时,被测菌株为庆大霉素低耐株;如果 120 μg/片纸片抑菌环直径≤6 mm 时,被检测菌株则为 HLGR 株。

1.2.4 耐万古霉素肠球菌(VRE)的检测 采用 ADSP 法,挑取培养 18 ~24 h 的菌落,用无菌生理盐水稀释至菌液浓度达到 0.5 麦氏单位,无菌吸取 10 μL菌液滴加于含 6 μg/mL 万古霉素的琼脂平板上,35℃孵育 24 h。观察有菌生长者为耐万古霉素的肠球菌。每批实验用粪肠球菌 ATCC29212 作阴性对照,以四株 VRE 参考菌株作阳性对照。

1.2.5 耐万古霉素基因检测 采用多重聚合酶链反应(multiplex PCR)定性试验,检测 VRE 的耐万古霉素基因。

细菌 DNA 提取[3]:将细菌接种于 LB 培养基中,35℃摇床孵育过夜,取 1.5 mL 菌液倒入 eppendof 管中,12 000 r/min 离心 6 min,去上清,加入 100 μL裂解液,混匀,37℃ 孵育 30 min,100℃ 水浴 2 min后,加入等体积的 Tris 饱和重蒸酚和氯仿,混匀,12 000 r/min离心 5 min 后,取上清备用。

多重 PCR 反应体积 50 μL,含 8 种(4 对)引物各 10 pmol,4 种 dNTPs 各 0.2 mmol/L,1.5 mmol/L $MgCl_2$,KCl 50 mmol/L,Tris-HCl (pH 8.3),甘油 5%,模板 3 μL,1.2UTaqDNA 多聚酶。PCR 反应条件:94℃ 预变

性 5 min;94℃ 1 min,54℃ 1 min,72℃ 1 min,共 30 个循环,最后一个循环延伸 5 min。取 10 μL 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳(2 V/cm)。以 DL2 000 Marker 为分子量参照标准,紫外透射仪上观察结果。

2 结　果

2.1 检出肠球菌构成

100 株肠球菌以粪肠球菌和屎肠球菌为主,共 97 株(97.0%),其中粪肠球菌 86 株(86.0%),屎肠球菌 11 株(11.0%);铅黄肠球菌 2 株(2.0%),鹑鹑肠球菌 1 株(1.0%)。

2.2 K-B 纸片琼脂扩散法

检测出一株对万古霉素耐药的粪肠球菌 NO. C8,其抑菌环直径为 12.2 mm。

2.3 HLGR 肠球菌和 VRE 的检出率

对 100 株肠球菌进行了高浓度庆大霉素药敏测试,共分离出 54 株 HLGR 肠球菌,分离率为 54%;对 100 株肠球菌进行了 ADSP 法筛选,共分离出 3 株 VRE,分别是粪肠球菌 NO. C8,屎肠球菌 NO. 1511,铅黄肠球菌 NO. 2078,分离率为 3.0%。

2.4 肠球菌对六种抗生素耐药率的种间差异

粪肠球菌和屎肠球菌,铅黄肠球菌,鹌鹑肠球菌对氨苄西林、环丙沙星等 6 种抗生素的耐药性差异,见表 2。庆大霉素低耐株与高耐株对其他抗生素的耐药率:见表 3。经 ADSP 检出的三株 VRE 对六种抗生素的药敏情况:见表 4。经多重 PCR 检测,发现在三株 VRE 中,只有铅黄肠球菌 2078 是 VanC2 基因阳性,其余两株均为 Van 基因阴性,见图 1。

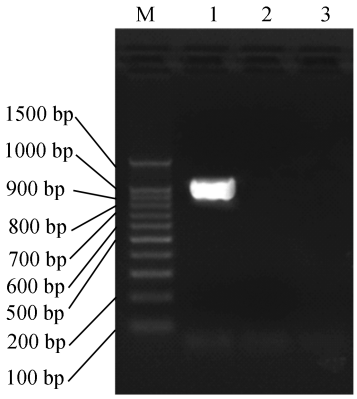

图 1　三株 VRE Van 基因经 multi-PCR 扩增后电泳图谱

M:marker;1:NO. 2078;2:NO. 1511;3:NO. C8

表 2　4 种类型肠球菌对 6 种常用抗生素的耐药率(株,%)

	氨苄西林	氨苄西林/舒巴坦	万古霉素	替考拉林	环丙沙星	庆大霉素(10μg/片)	庆大霉素(120μg/片)
粪肠球菌	29(33.7)	28(32.6)	1(1.2)	0(0.0)	28(32.6)	85(98.8)	46(53.5)
屎肠球菌	6(54.5)	5(45.5)	0(0.0)	0(0.0)	6(54.5)	11(100.0)	8(72.7)
铅黄肠球菌	2(50.0)	2(0.0)	1(50.0)	0(0.0)	2(50.0)	2(100.0)	2(50.0)
鹌鹑肠球菌	1(100.0)	1(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(0.0)

表 3　庆大霉素低耐株与高耐株对其他抗生素的耐药率(株,%)

	氨苄西林	氨苄西林/舒巴坦	万古霉素	替考拉林	环丙沙星
庆大霉素低耐株	2(11.1)	1(5.6)	0(0.0)	0(0.0)	2(11.1)
庆大霉素高耐株	25(46.3)	22(40.0)	0(0.0)	0(0.0)	24(44.4)

表 4　三株 VRE 对 6 种常用抗生素的药敏实验结果

	氨苄西林	氨苄西林/舒巴坦	万古霉素	替考拉林	环丙沙星	庆大霉素(10μg/片)	庆大霉素(120μg/片
NO. C8	R	R	R	I	I	R	R
NO. 1511	R	R	I	S	R	R	R
NO. 2078	R	R	I	S	R	R	R

注:S:敏感;R:耐受;I:中介

3 讨　论

本次研究的 100 株肠球菌中以粪肠球菌和屎肠球菌分离率最高,占总分离率的 97%,其中粪肠球菌占 86%,屎肠球菌占 11%,该构成比与国外报道[4]相似。因此,粪肠球菌和屎肠球菌对临床常用抗生素的耐药状况基本上可以反映肠球菌的整体耐药状况。从表 2 可以看出,屎肠球菌对除万古霉素和替考拉宁以外其他抗生素的耐药率明显高于粪肠

球菌。认为粪肠球菌对作用于核酸合成的药物如喹诺酮类的环丙沙星较敏感,对抑制细菌细胞壁合成的氨苄西林较敏感[5]。而替考拉宁作为糖肽类的抑制细胞壁合成的药物对两者均显示良好的抑菌作用,未发现有耐药株。

K-B 纸片琼脂扩散法检测结果显示所有菌株对万古霉素的替代品替考拉宁均敏感,而对万古霉素耐药率为 1%,说明,替考拉宁的体外抑菌活性大于万古霉素的体外抑菌活性[6]。用 ADSP 法检测到三株耐万古霉素的肠球菌(VRE),分离率为 3%,与国内临床对 VRE 的分离率为 1% ~4%[1]相符合。K-B 纸片琼脂扩散法受诸多因素影响,如:药敏纸片的质量,接种菌量的准确与否,抑菌圈测量工具的影响等。而 ADSP 法用于筛选 VRE 较 K-B 法的敏感性高,漏检率低。而且,该法操作简便易行,结果易于观察,适合于临床筛查 VRE。

某些肠球菌对氨基糖甙类具有低水平天然耐药性,用 10 μg/片的庆大霉素纸片可全部测出;还有一些肠球菌对氨基糖甙类可产生高水平获得性耐药,需要用 120 μg/片的庆大霉素纸片测出。本研究有 54%(54/100)的菌株对庆大霉素呈高水平耐药。从表 3 可以看出,HLGR 对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星的耐药率明显高于低耐株。建议在肠球菌的常规药敏实验中加做 120 μg/片的庆大霉素纸片,以加强对 HLGR 的监测。

ADSP 法筛选出的三株 VRE 粪肠球菌 NO. C8、屎肠球菌 NO. 1511 和铅黄肠球菌 NO. 2078 分别分离于胆汁标本、尿液标本和血液标本中,其中NO. C8 来自肝移植病人,NO. 1511 来自泌尿道结石病人,NO. 2078 来自门诊病人。三株 VRE 对万古霉素显示不同程度耐药的同时,对除替考拉宁外的其余五种抗生素均耐药。VRE 的多重耐药性的检测为临床鉴定和分离 VRE 有一定的意义。

试验中采用多重 PCR 检测 VRE 的基因型,只有其中的铅黄肠球菌 NO. 2078 是 VanC2 基因型阳性,其余两株均为阴性,这可能与本次研究只使用了 VanA、VanB、VanC1 及 VanC2 四对引物有关系,阴性菌株的基因型有待进一步 DNA 序列分析。有资料显示[7],VanA 和 VanB 型 VRE 为屎肠球菌及粪肠球菌表现,其抗药性表现为:VanA 对万古霉素和替考拉宁高度耐药,且可被万古霉素、替考拉宁所诱导;VanB 对万古霉素显示不同程度耐药,但是对替考拉宁敏感,并且只被万古霉素诱导。VanC 为非诱导型,又分为 3 个亚类,即 VanC1,VanC2 和 VanC3,见于鹌鹑肠球菌,铅黄肠球菌和黄色肠球菌,未见于屎肠球菌。VanC 型 VRE 能引起人体的感染,其耐药属于内源性,对万古霉素和替考拉宁呈固有的低度耐药。分析铅黄肠球菌 NO. 2078 的 K-B 法药敏试验结果显示,其对万古霉素的抑菌环直径为 15 mm,根据 CLSI 标准属于中介范围,其表型与基因型一致。本次研究未检测出具有重要临床意义。

万古霉素、替考拉宁、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦和环丙沙星可作为治疗粪肠球菌感染的药物。建议临床对氨基糖苷类药物的合理应用,因为肠球菌在经不合理治疗时可能出现获得性耐药。万古霉素或替考拉宁是目前治疗庆大霉素高耐株的理想药物。治疗耐万古霉素肠球菌引起的感染比较困难,没有特定的规律,可供选择的有四环素、氯霉素、喹诺酮类、利福平,泌尿系统感染可考虑呋喃妥因[8]。目前一种半合成新药奎奴普丁/达福普丁对 VRE 显示有较强的杀菌作用[9]。总之,在治疗肠球菌引起的感染时,应根据分离株的耐药特点来选择相应的治疗方案,合理使用抗生素,采取有效措施控制感染流行。同时开展肠球菌的耐药性监测,对遏止肠球菌耐药株的增长,减缓其耐药率的增加,指导临床合理选用抗菌药物均有重要意义[10]。

参考文献:

[1] 糜祖煌. 肠球菌的耐药性及耐药基因检测[J]. 现代实用医学,2004,16(7):385-386.

[2] 汪 谦. 临床医学实验方法学[M]. 北京:科学出版社,2002. 824-845.

[3] 应春妹,向敏杰,倪语星. VanC 型耐万古霉素肠球菌基因分型[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2001,21:81-82.

[4] Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vamcomycin-resistant entero-cocci: why are they here, and where dothey come from[J]. Lancet Infections Diseases, 2001, 1: 314-325.

[5] 田翠萍. 肠球菌的耐药性分析及抗感染用药的探讨[J]. 临床医药实践杂志,2007,16(12):1170-1171.

[6] 张 欣. 万古霉素和替考拉宁[J]. 国外医学. 抗生素分册,1999,20:67.

[7] 唐先兵,司书毅,张月琴. 耐万古霉素肠球菌耐药机制的研究进展[J]. 国外医学. 药学分册,2003,30(3):166-171.

[8] 颜英俊,刘 华,喻 华,等. 肠球菌耐药趋势研究及抗感染用药建议[J]. 现代检验医学杂志,2005,20(1):64-66.

[9] 张丽娟,刘亚刀,赵月辉. 耐万古霉素肠球菌临床微生物及流行病学特征[J]. 中华医院感染学杂志,2000,10(5):399.

[10] 韦志英. 肠球菌对万古霉素的耐药分析[J]. 中华实用医药杂志,2006,23(6):160-162.

(此文编辑 蒋湘莲)