

# 肠球菌的耐药基因研究

任柳茵 崔雪萍 杨少芳

作者单位: 030006 太原市, 中国辐射防护研究院医院检验科(任柳茵)

030012 太原市, 山西省中医药研究院医院检验科(崔雪萍)

030012 太原市, 山西省临床检验中心(杨少芳)

通讯作者: 任柳茵, E-mail: renliuyin@163.com

**【摘要】** 目的 了解肠球菌属的耐药性趋势和耐药基因分布, 为临床合理用药提供依据。方法 采用 VITEK2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统对 2008 年 1 月至 2012 年 5 月间临床送检标本中分离的 319 株肠球菌进行鉴定和药敏试验, 采用 PCR 方法对 *ermB*、*mef*、*gyrA* 耐药基因进行研究。结果 319 株肠球菌中以屎肠球菌最多 205 株(64.26%), 其次为粪肠球菌 63 株(19.75%), 其他种类肠球菌 51 株(15.99%)。肠球菌常用抗生素药敏结果显示屎肠球菌和粪肠球菌耐药率最低的是万古霉素(1.0%, 1.6%), 其次是利奈唑胺和替考拉宁(3.9%, 3.2%), 耐药率最高的是红霉素(94.6%, 79.4%)。肠球菌中 *ermB* 基因阳性率为 73.4%(234/319), *gyrA* 基因阳性率为 67.1%(214/319), *mef* 基因均为阴性。结论 肠球菌获得 *gyrA* 基因和 *ermB* 基因是肠球菌对氟喹诺酮类药物和红霉素类药物耐药的主要原因。

**【关键词】** 肠球菌; 耐药性; *gyrA* 基因; *ermB* 基因; *mef* 基因

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.009

## The research of resistant gene of *Enterococcus*

REN Liu-yin<sup>1</sup>, CUI Xue-ping<sup>2</sup>, YANG Shao-fang<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, Hospital of China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, Taiyuan 030012, China <sup>3</sup>Shanxi Center for Clinical laboratories, Taiyuan 030012, China

**【Abstract】 Objective** To understand the variation of clinical distribution and resistance gene of *Enterococcus*, and to provide the basis for the clinical rational medication. **Methods** 319 strains clinical *Enterococcus* were collected from January 2008 to May 2012. All strains were tested, and the drug resistant test were detected by VITEK2 COMPACT. The resistant genes of *ermB*, *mef* and *gyrA* were detected by PCR. **Results** Among 319 strains *Enterococcus*, the most was *Enterococcus faecium* 205 strains (64.26%), the second was *Enterococcus faecalis* 63 strains (19.75%), and the others were 51 strains (15.99%). The lowest drug resistant rates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* were vancomycin (1.0%, 1.6%), linezolid were (3.9%, 3.2%). And the highest drug resistant rates were erythromycin (94.6%, 79.4%). The positive rates of *ermB* gene and *gyrA* gene were 73.4%(234/319) and 67.1%(214/319) respectively. And the *mef* gene all were negative. **Conclusion** Analysis showed that *Enterococcus* gain *gyrA* and *ermB* gene is the main reason of *Enterococcus* drug resistance to fluoroquinolones and erythromycin.

**【Key words】** *Enterococcus*; Drug resistance; *gyrA* gene; *ermB* gene; *mef* gene

肠球菌属原是人和动物肠道内的正常菌群之一, 近二十多年来已逐渐成为医院感染的重要致病菌, 不仅可以引起尿路感染、皮肤软组织感染, 还可引起危及生命的腹腔感染、败血症、心内膜炎和脑膜炎等<sup>[1]</sup>。国外有关研究<sup>[2]</sup>表明, 肠球菌在医院感染最常见的致病菌中上升为第二位, 也已经成为医院感染菌血症第三位的病因。肠球菌对多种抗生素具有很强的固有性耐药特征, 也更容易被诱导产生获得性耐药, 这使得肠球菌多重耐药现象越来越严重, 给

临床用药带来很大麻烦。肠球菌对大环内酯类和氟喹诺酮类抗菌药物的耐药性一直居高不下, 其耐药机制与 *gyrA*、*ermB* 和 *mef* 基因有关。因此, 本文对本院和山西省中医药研究院医院 2008 年 1 月至 2012 年 5 月分离自临床的 319 株肠球菌的药敏情况及耐药基因进行分析研究, 为临床合理用药提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 收集 2008 年 1 月至 2012 年 5 月临床送检的血液、尿液、痰液等各类标本, 按照《全国

临床检验操作规程》第 3 版<sup>[3]</sup>进行菌株的分离,剔除同一患者同一类标本中重复分离的菌株,共得到 319 株肠球菌。

**1.2 菌株的培养与鉴定** 将标本接种在血平板、中国兰平板 35℃ 孵育 18~24 h,挑取血平板上灰白色、不透明、表面光滑、直径 0.5~1.0 mm 大小的圆形  $\alpha$  溶血或不溶血菌落,经初步鉴定为氧化酶阴性、触酶阴性,分离纯化后采用全自动微生物分析系统及革兰阳性细菌鉴定卡(GPI)对分离到的菌株进行鉴定。质控按照《全国临床检验操作规程》第 3 版每周做一次室内质控。

**1.3 药物敏感性试验** 按 CLSI 推荐的方法挑取平板上新鲜分离的细菌菌落在 0.9% NaCl 管中配置成 0.5 Mc 单位的浊度,用无菌棉签涂到 4 mm 厚的 MH 平板上,贴上药敏纸片,37℃ 孵育 18~24 h,读取抑菌环直径。药敏纸片规格如下:万古霉素 30  $\mu$ g,利奈唑胺 30  $\mu$ g,替考拉宁 30  $\mu$ g,呋喃妥因 300  $\mu$ g,磷霉素 200  $\mu$ g,氨苄西林 10  $\mu$ g,氯霉素 30  $\mu$ g,环丙沙星 5  $\mu$ g,利福平 5  $\mu$ g,红霉素 15  $\mu$ g,高水平庆大霉素 100  $\mu$ g。

**1.4 质控菌株** 粪肠球菌 ATCC29212 购于卫生部临床检验中心。

**1.5 主要仪器与试剂** 法国梅里埃全自动微生物分析仪 VITEK II、杭州博日 PCR 扩增仪、美国伯乐凝胶成像系统、引物由上海生工生物工程有限公司合成,见表 1。中国兰琼脂、血琼脂、MH 琼脂均购自郑州安图试剂有限公司,药敏纸片为英国 OXOID 公司产品。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物	序列	产物(bp)
ermB	F1 <sup>[4]</sup>	5' -TGCTATTCCAAATCCGTAATG-3'	745
	R1 <sup>[4]</sup>	5' -CTCTGGTATGGCCGGTAAGT-3'	
mef	F1 <sup>[5]</sup>	5' -AGTATCATTAATCACTACTG-3'	924
	R1 <sup>[6]</sup>	5' -TAAAATGGCACCGAAAG-3'	
gyrA	F1 <sup>[7]</sup>	5' -CGCGATGCACGAGCTGAAAAA-3'	225
	R1 <sup>[7]</sup>	5' -ATTTCGGTATACCGCATGGCTG-3'	

**1.6 PCR 试验** (1)模板 DNA 的制备:将平皿上的单个菌落用 50  $\mu$ l 溶菌酶洗涤,混匀后 37℃ 孵育 10 min,然后加入 50  $\mu$ l 蛋白酶 K 和 0.1 mol/L Tris

(pH=7.5)100  $\mu$ l,混匀后 37℃ 孵育 10 min,即制成 PCR 扩增模板。(2)PCR 扩增及产物分析:扩增反应总体积为 10  $\mu$ l,PCR Master Mix 5  $\mu$ l,20 pmol/L 引物各 0.5  $\mu$ l,模板 DNA 1.0  $\mu$ l,加灭菌双蒸水至体积 10  $\mu$ l。PCR 反应条件见表 2。采用琼脂糖凝胶电泳法分析扩增产物。1.5%琼脂糖凝胶电泳中 80 V 电压电泳 50 min 后 0.5  $\mu$ g/mL 溴化乙啶染色 25 min,采用凝胶成像系统观察结果。

## 2 结果

**2.1 肠球菌的耐药率** 细菌鉴定结果表明 319 株肠球菌中以屎肠球菌最多 205 株(64.26%),其次为粪肠球菌 63 株(19.75%),铅黄肠球菌 17 株(5.33%),母鸡肠球菌 17 株(5.33%),坚韧肠球菌 10 株(3.14%),鸟肠球菌 7 株(2.19%)。药敏试验结果显示肠球菌常用抗生素中耐药率最低的是万古霉素(1.0%,1.6%),其次是利奈唑胺(3.9%,3.2%)和替考拉宁(3.9%,3.2%),耐药率最高的是红霉素(94.6%,79.4%);屎肠球菌对氨苄西林、高水平庆大霉素、红霉素、环丙沙星的耐药率分别为 84.4%、72.2%、94.6%、87.3%,均高于粪肠球菌。见表 3。

表 3 肠球菌对常用抗生素的耐药情况[n(%)]

抗生素	屎肠球菌 (n=205)	粪肠球菌 (n=63)
万古霉素	2(1.0)	1(1.6)
利奈唑胺	8(3.9)	2(3.2)
替考拉宁	8(3.9)	2(3.2)
呋喃妥因	84(41.0)	5(7.9)
磷霉素	46(22.4)	7(11.1)
氨苄西林	173(84.4)	10(15.9)
氯霉素	15(7.3)	15(23.8)
环丙沙星	179(87.3)	28(44.4)
高水平庆大霉素	148(72.2)	29(46.0)
利福平	167(81.5)	34(54.0)
红霉素	194(94.6)	50(79.4)

**2.2 PCR 结果** 319 株肠球菌中,ermB 基因阳性率为 73.4%(234/319),gyrA 基因阳性率为 67.1%(214/319),mef 基因均为阴性,见图 1、图 2。

## 3 讨论

肠球菌作为医院感染重要的致病菌,近年来无

表 2 PCR 反应条件

基因	预变性	变性	退火	延伸	循环(次)	最后延伸
ermB	93℃,3 min	93℃,1 min	62℃,1 min	65℃,4 min	35	65℃,3 min
mef	94℃,2 min	94℃,1 min	52℃,1 min	72℃,1 min	35	72℃,10 min
gyrA	94℃,2 min	94℃,2 min	52℃,50 sec	72℃,50 sec	35	72℃,5 min

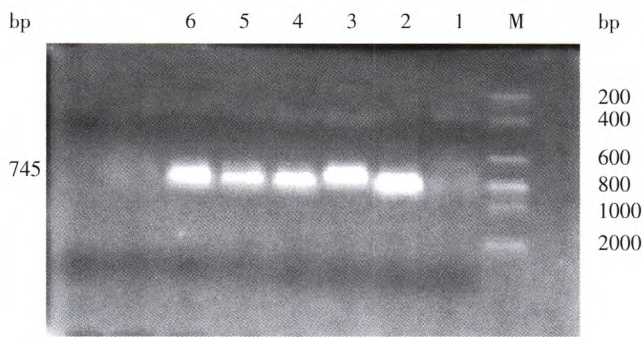


图 1 *ermB* 基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

注: M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为阴性对照, 2~5 为 *ermB* 基因 PCR 产物 (745 bp), 6 为阳性对照 (745 bp)

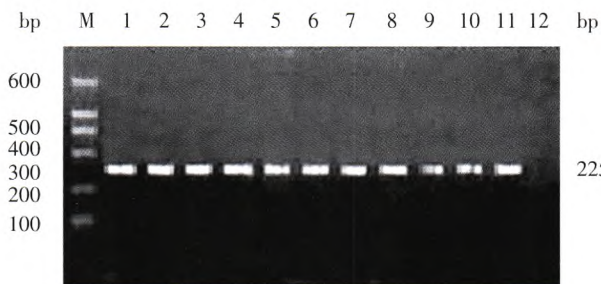


图 2 *gyrA* 基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 11 为阳性对照 (225 bp); 12 为阴性对照; 1~10 为 *gyrA* 基因 PCR 产物 (225 bp)

论从分离数量还是所占比例都在迅速增长, 美国医院感染监视系统已将其列为引起医院感染的革兰阳性球菌中仅次于葡萄球菌的第二大病原菌<sup>[8]</sup>。本文研究结果显示临床分离的肠球菌株多为多重耐药菌株, 其中屎肠球菌对氨苄西林、环丙沙星、利福平的耐药率分别为 84.4%、87.3%、81.5%, 对高水平庆大霉素的耐药率为 72.2%, 对红霉素的耐药率高达 94.6%, 显示从这两所医院分离的肠球菌株对大环内酯类和氟喹诺酮类抗生素耐药性比较严重。

肠球菌对大环内酯类药物的耐药机制包括 *ermB* 基因介导的药物靶位的改变和 *mef* 基因介导的抗生素的主动外排等。本文研究中 *ermB* 基因携带率较高 (73.4%), *ermB* 基因编码红霉素甲基化酶, 使细菌的红霉素作用靶位发生改变, 从而导致细菌对大环内酯类、林可霉素耐药。已发现 *ermB* 基因家族有 20 多种基因亚型, 其中 *ermB* 基因存在于耐 MLSB 的葡萄球菌、链球菌和肠球菌中<sup>[9]</sup>。肠球菌的一些耐药基因 (*mef* 基因) 编码转运外排蛋白, 可以把抗生素泵出细胞, 使细胞内抗生素浓度降低, 导致耐药。大环内酯类外排基因 (*mef* 基因) 已经分离出 *mefA* 和 *mefE* 基因, 其外排泵的特异性底物是 14 元环 (红霉素和克拉霉素) 和 15 元环 (阿奇霉素) 大环内酯类抗生素, 本文研究中未检测到 *mef* 基因, 说明

肠球菌中红霉素耐药与外排基因 *mef* 无明显关系。这与国内外<sup>[4,10,11]</sup>的研究结果一致。

肠球菌对氟喹诺酮类抗菌药物的耐药机制主要表现在两个方面: 药物靶位—拓扑异构酶 II 的改变和主动外排, 目前发现的细菌拓扑异构酶 II 是两种结构上相关的酶: DNA 螺旋酶和拓扑异构酶 IV, DNA 螺旋酶是由两个完全不同的 A、B 亚基组成的四联体, A、B 亚基分别由染色体 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码, *gyrA* 基因突变介导较高水平的耐药<sup>[12]</sup>。本文研究结果显示, 67.1% 的肠球菌携带 *gyrA* 基因, 虽然屎肠球菌和粪肠球菌的耐药程度不同, 但其 *gyrA* 基因的突变位点一致, 并且尚有少数菌株未发生突变, 说明 *gyrA* 基因突变是肠球菌对氟喹诺酮耐药的重要原因, 但不是唯一的原因。

总之, 在抗菌药物选择压力下, 逐年增加的耐药菌株给临床治疗带来了极大的困难。肠球菌的耐药机制复杂, 仍需做进一步的深入研究。

#### 4 参考文献

- 1 Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, et al. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol*, 2005, 43:462-463.
- 2 Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13:686-692.
- 3 卫生部医政司. 全国临床检验操作规程. 第 3 版. 南京: 江苏省临床检验中心, 2006, 736-753.
- 4 Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrobial agents chemother*, 2005, 49: 4798-4800.
- 5 Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial agents chemother*, 1996, 40:2562-2566.
- 6 Daly MM, Doktor S, Flamm R, et al. Characterization and prevalence of *MefA*, *MefE*, and the associated *msr (D)* gene in streptococcus pneumoniae clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:3570-3574.
- 7 Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al. Rapid detection of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae gyrA* gene associated with decreased susceptibilities to quinolones. *J Clin Microbiol*, 1996, 34: 2255-2258.
- 8 Titz-de-Almeida R, Rollo Filho M, Nogueira CA, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Enterococci* recovered from Brazilian intensive care units. *Braz J Infect Dis*, 2004, 8:197-205.
- 9 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for

Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement M100-S17. January, 2007.

10 王德, 苏琪, 王丽. 184 株肠球菌的临床分布及耐药性分析. 中国抗生素杂志, 2010, 35: 160-163.

11 刘昱东, 王辉, 杜娜, 等. 利奈唑胺、替加环素、达托霉素、头孢吡普

等抗菌药物对 MRSA 的抗菌活性. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8: 10-14.

12 Amin NA, J Alal S, Wretlind B. Alterations in GyrA and ParC associated with fluoroquinolone resistance in Enterococcus faecium. Anti-microb Agents Chemother, 1999, 43: 947-949.

(收稿日期: 2012-12-31)

(本文编辑: 李霖)

## 消 息

### 临床 POCT 检测与生物应急发展论坛

POCT(point of care testing)是检验医学自动化和简单化发展的产物,在我国大多被译为即时检验或床旁检验等。随着当今高科技的综合应用以及高效快节奏社会运转模式的需要,POCT 越来越受到了人们的青睐,得到快速发展。与此同时其功能领域也越来越宽,目前已扩大到医学健康领域、海关检疫、农牧业、林业、消防、环境和食品检测等多种领域,部分同行统称为“临床 POCT 和生物应急领域”。

论坛期间将重点讨论 POCT 与生物应急产业相关收费标准,组织管理,质量控制,产品研发、注册、推广体系的建设,产品研发与技术创新以及产学研用合作发展等热点话题。同期讨论建立“临床 POCT 与生物应急产业技术创新联盟”及联盟经营理念和经营法则的落实;科技部“免疫试剂评价体系与示范基地建立”项目的落实等内容。

届时 200 余位来自于政府机构、学会协会、科研高校、临床检验、生产企业以及第三方服务机构与行业媒体等专业人士与会。

#### 1 会议内容

明确临床 POCT 和生物应急概念及内容范畴;解读现行政策与标准对产业发展的指导意义与不足;探析产业发展前景与产学研用合作新机制;分享讨论 POCT 临床应用现状及质量管理规范;集中介绍行业研发进展、技术创新与质量控制新方法。

#### 2 演讲嘉宾(按字母排序)

- 方邦江(上海中医药大学附属龙华医院急诊科);
- 韩焕新(长征医院转化医学中心);
- 居漪(上海市临床检验中心);
- 阚颀(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所);
- 康熙雄(首都医科大学附属北京天坛医院实验诊断中心);
- 林民峰(爱尔兰欧迪诊断公司);

- 刘锡光(湖北中医药大学检验学院);
- 潘柏申(上海复旦大学附属中山医院);
- 王加义(中生金域生物技术有限公司);
- 王煜非(上海市第一人民医院实验中心);
- 吴太虎(军事医学科学院卫生装备研究所);
- 杨瑞馥(军事医学科学院微生物流行病学研究所);
- 张国军(首都医科大学附属北京天坛医院检验科);
- 张贺秋(军事医学科学院基础所生物诊断研究室);
- 周诚(中国食品药品检定研究院)等。

#### 3 会议时间及地点

会议时间: 2013 年 4 月 9 日-10 日

会议地点: 上海好望角大饭店(地址: 上海市肇嘉浜路 500 号)

#### 4 联系方式

- 参会咨询: 张依寒
- E-mail: yihan.zhang@bioon.net
- 电话: 86(21)54481353
- 传真: 13361952955
- 大会咨询: 刘兆辉
- E-mail: zhaohui.liu@bioon.com
- 电话: 86(21)54485309-8003
- 传真: 18616601826
- 赞助咨询: 刘兆辉
- E-mail: zhaohui.liu@bioon.com
- 电话: 86(21)54485309-8003
- 传真: 18616601826
- 媒体合作: 张依寒
- E-mail: yihan.zhang@bioon.net
- 电话: 86(21)54481353
- 传真: 13361952955