

DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20194486

· 论 著 ·

粪肠球菌临床株对泰利唑胺体外抗菌活性的研究

白冰¹, 余治健¹, 徐广健¹, 王进², 马孝煜¹, 张朝钦¹, 郑金鑫¹, 邓启文¹, 李多云¹

(1. 深圳大学南山医院感染科及内源性感染诊治研究重点实验室, 广东 深圳 518052; 2. 长江水利委员会长江医院中医科, 湖北 武汉 430019)

[摘要] **目的** 评价泰利唑胺体外抗粪肠球菌的活性, 探讨泰利唑胺不敏感粪肠球菌的耐药机制及其多位点序列分型分布情况。**方法** 收集 2011 年 1 月 1 日—2016 年 6 月 30 日深圳市南山区人民医院临床分离的粪肠球菌菌株, 使用自动化仪器法及微量肉汤稀释法对分离菌株的耐药性进行检测。应用聚合酶链式反应(PCR)方法检测恶唑烷酮类抗生素耐药基因的携带情况, 并采用多位点序列分型(MLST)对分离菌株进行分型。**结果** 共获得 289 株粪肠球菌, 来源科室主要为外科(57.4%), 标本来源主要为中段尿(126 株, 43.6%)。289 株粪肠球菌对泰利唑胺敏感率为 94.1%, 对氨苄西林、呋喃西林和万古霉素有较高的敏感性(敏感率为 97.9%~99.7%)。MLST 结果显示, 共分为 47 个 ST 型, 优势 ST 分型为 ST16 和 ST179, 分别占 29.1%(84 株)和 24.9%(72 株), 在泰利唑胺不敏感粪肠球菌中, ST16 的比例高于 ST179($P < 0.05$)。共检出泰利唑胺不敏感粪肠球菌 17 株, 其携带 *optrA* 基因比例高于敏感株。**结论** 泰利唑胺对粪肠球菌的抗菌活性整体优于利奈唑胺, 但对携带 *optrA* 基因的粪肠球菌则未显示出良好的抗菌活性。

[关键词] 粪肠球菌; 泰利唑胺; 体外活性; 毒力因子; 耐药基因; 多位点序列分型

[中图分类号] R378.1

In vitro antimicrobial activity of tedizolid against clinically isolated *Enterococcus faecalis*

BAI Bing¹, YU Zhi-jian¹, XU Guang-jian¹, WANG Jin², MA Xiao-yu¹, ZHANG Zhao-qin¹, ZHENG Jin-xin¹, DENG Qi-wen¹, LI Duo-yun¹ (1. Department of Infectious Diseases and Shenzhen Key Laboratory for Endogenous Infection, Shenzhen Nanshan Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518052, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Changjiang Water Resources Commission Changjiang Hospital, Wuhan 430019, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate in vitro antimicrobial activity of tedizolid (TZD) against *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), and explore antimicrobial resistance mechanism and distribution of multilocus sequence typing (MLST) of tedizolid-non-susceptible *E. faecalis*. **Methods** *E. faecalis* isolates from Nanshan People's Hospital of Shenzhen City between January 1, 2011 and June 30, 2016 were collected, antimicrobial resistance of isolates was tested by automatic instrument method and micro-broth dilution method. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the carrying status of oxazolidinone antibiotic resistance genes, isolated strains were typed by MLST. **Results** A total of 289 strains of *E. faecalis* were obtained, strains were mainly from department of surgery (57.4%) and main specimen source was midstream urine (126 strains, 43.6%). Susceptibility rate of 289 *E. faecalis* strains to TZD was 94.1%, susceptibility rates to ampicillin, furacillin and vancomycin were all high (97.9% - 99.7%). MLST results showed that there were 47 ST types, the dominant ST were ST16 and ST179, accoun-

[收稿日期] 2018-12-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81601797); 深圳市科技创新委学科布局项目(JCYJ20170412143551332); 深圳市三名工程经费和深圳市南山区科技创新局资助项目(2018010、2018011、2018065); 深圳市卫计委科技计划项目(SZXFZ2017063、SZXJ2017032、SZXJ2018027)

[作者简介] 白冰(1981-), 女(汉族), 北京市人, 主治医师, 主要从事细菌耐药相关研究。

[通信作者] 李多云 E-mail: liduoyun94@163.com

ting for 29.1% (84 strains) and 24.9% (72 strains) respectively, among TZD-non-susceptible *E. faecalis*, the proportion of ST16 was higher than that of ST179 ($P < 0.05$). A total of 17 strains of TZD-non-susceptible *E. faecalis* strains were isolated, the proportion of *optrA* gene carried by them was higher than that of susceptible strains. **Conclusion** TZD is superior to linezolid in antimicrobial activity against *E. faecalis*, but it has no good antimicrobial activity against *E. faecalis* carrying *optrA* gene.

[Key words] *Enterococcus faecalis*; tedizolid; in vitro activity; virulence factor; drug resistance gene; multilocus sequence typing

肠球菌已成为导致医院感染的重要病原菌,其中又以粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*, *E. faecium*)最常见。第一代恶唑烷酮类抗生素利奈唑胺(linezolid, LZD)于 2000 年首先在美国被批准用于临床,对大多数革兰阳性菌,特别是耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)显示出强大的抗菌活性,但应用于临床后不久就有耐利奈唑胺肠球菌的报道^[1-2]。多重耐药肠球菌对公众卫生安全构成严重威胁,泰利唑胺(tedizolid, TZD)作为第二代恶唑烷酮类抗生素于 2014 年 6 月由美国食品和药物管理局批准用于临床,治疗成人急性细菌性皮肤及软组织感染^[3-5]。然而,近年来也有对泰利唑胺不敏感肠球菌出现的相关报道^[6]。本研究调查了 2011—2016 年某院住院患者粪肠球菌对泰利唑胺的敏感性。尽管该院从未使用过泰利唑胺,但仍发现了泰利唑胺不敏感的粪肠球菌。因此,本研究对泰利唑胺不敏感粪肠球菌的耐药机制、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分布等做了进一步的分析和探讨。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2011 年 1 月 1 日—2016 年 6 月 30 日深圳市南山区人民医院临床分离的粪肠球菌菌株,剔除同一患者相同部位重复分离株。

1.2 菌株鉴定和药敏试验 参照第 9 版《全国临床检验操作规程》,采用 CATC 肠球菌选择培养基对试验菌株进行分离培养,采用 BD Phoenix-100 全自动细菌鉴定/药敏系统进行菌株鉴定,以及常用抗菌药物(氨苄西林、红霉素、环丙沙星、利福平、四环素、呋喃西林、万古霉素和利奈唑胺)的敏感性检测。采用 2016 年版美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的微量肉汤稀释法^[7]检测试验菌株对泰利唑胺的最低抑菌浓度(MIC),并再次确认氨苄西林、万古霉素和利奈唑胺的药敏结果,以粪肠球菌 ATCC 29212

作为质控菌株。泰利唑胺药敏结果判断标准:敏感为 $MIC \leq 0.5$ mg/L,不敏感为 $MIC > 0.5$ mg/L。

1.3 DNA 提取和耐药基因检测 耐药基因 23S rRNA V 区基因、耐药基因 *cfr*、*cfr(B)* 及 *optrA* 引物由北京六合华大基因公司合成^[8-11]。根据试剂盒说明书提取菌株基因组 DNA, -20 ℃ 保存备用。采用聚合酶链式反应(PCR)方法检测耐药基因,PCR 体系(50 μL): Dream Taq Green PCR Master Mix(2×) 25 μL, 上、下游引物各 1 μL, DNA 2 μL, 加 dd H₂O 补至 50 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min, PCR 产物于 4℃ 保存。PCR 反应产物均用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 根据有无阳性扩增产物及目的基因片段长度进行判断分析。

1.4 MLST 采用 MLST 分析肠球菌分离株的分子分型, 参考粪肠球菌 MLST 数据库(<http://efaecalis.mlst.net/>)提供的分型方案, 7 个管家基因(*gdh*、*gyd*、*pstS*、*gki*、*aroE*、*xpt* 和 *yqiL*)^[12-13] 引物由北京六合华大基因公司合成。PCR 反应体系为 50 μL, 内含 2× ExTaq Mix 25 μL, 10 μmol/L 的正、反向引物各 2.5 μL, 模板 DNA 2.0 μL, 加 ddH₂O 补至 50 μL。PCR 反应程序: 94℃ 5 min 变性, 94℃ 30 s → 52℃ 30 s → 72℃ 60 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经纯化后, 进行双向测序。序列分析用 SeqMan(DNAStar Inc., Madison, WI, USA)软件对等位基因序列进行拼接和校正, 将整理好的序列提交至 MLST 数据库, 确定每个管家基因的序列号。7 个管家基因序列号的组合即为该菌株序列型别(ST)。对于未能完全匹配的序列和 ST, 重复 3 次确认无误后记为 NT。应用 eBURST V3 软件确定分离菌株与数据库其他菌株的关系, 构建克隆群时以 2 个等位基因的差异为定义克隆群的标准。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 率的比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌来源及患者分布 共收集粪肠球菌 289 株,来源科室主要为外科(57.4%),其中泌尿外科检出最多(64 株),其次为肝胆外科及重症监护病房(ICU),均检出 31 株。标本来源主要为中段尿(126 株,43.6%),其次是伤口分泌物(60 株,20.8%)、穿刺液(33 株,11.4%)、血(30 株,10.34%)、无菌体液(10 株,3.5%)、呼吸道分泌物(9 株,3.1%)、组织

(6 株,2.1%)、导管(2 株,0.7%)。

2.2 粪肠球菌对泰利唑胺体外敏感性 检出的粪肠球菌中大多对常用的多种抗菌药物耐药。其中对红霉素、利福平和四环素耐药最为突出,耐药率均在 50% 以上。泰利唑胺对粪肠球菌的敏感率为 94.1%。粪肠球菌对氨苄西林、呋喃西林和万古霉素仍显示出很高的敏感性(敏感率为 97.9%~99.7%)。而且,几乎所有的泰利唑胺非敏感粪肠球菌对氨苄西林、呋喃西林和万古霉素都是敏感的。粪肠球菌对常用抗菌药物的敏感性见表 1。

表 1 粪肠球菌对常用抗菌药物的敏感性

Table 1 Susceptibility of *E. faecalis* to commonly used antimicrobial agents

抗菌药物	敏感率 (%)	MIC 折点 (mg/L)	TSEF (株)	TNSEF (株)	菌株数	抗菌药物	敏感率 (%)	MIC 折点 (mg/L)	TSEF (株)	TNSEF (株)	菌株数
氨苄西林	99.7	≤8	271	17	288	四环素	14.2	≤4	39	2	41
		≥16	1	0	1			8	6	0	6
红霉素	9.0	≤0.5	25	1	26	呋喃妥因	97.9	≤32	266	17	283
		1~4	58	3	61			64	4	0	4
		≥8	189	13	202			≥128	2	0	2
环丙沙星	52.9	≤1	149	4	153	万古霉素	99.3	≤4	270	17	287
		2	38	1	39			8~16	2	0	2
		≥4	85	12	97			≥32	0	0	0
利福平	4.5	≤1	11	2	13	利奈唑胺	80.3	≤2	231	1	232
		2	25	0	25			4	37	9	46
		≥4	236	15	251			≥8	4	7	11

TSEF:泰利唑胺敏感粪肠球菌;TNSEF:泰利唑胺不敏感粪肠球菌

2.3 粪肠球菌对泰利唑胺体外敏感性与其 MLST 之间的关系 采用 MLST 技术对 289 株粪肠球菌进行同源性分析,共分为 47 个 ST 型(其中有 48 株的 ST 型与粪肠球菌 MLST 数据库不匹配,标记为 NT)。优势 ST 分型为 ST16 和 ST179,分别占 29.1%(84 株)和 24.9%(72 株),见图 1。在泰利唑胺不敏感粪肠球菌中,ST16 的比例高于 ST179($P < 0.05$),见图 2。

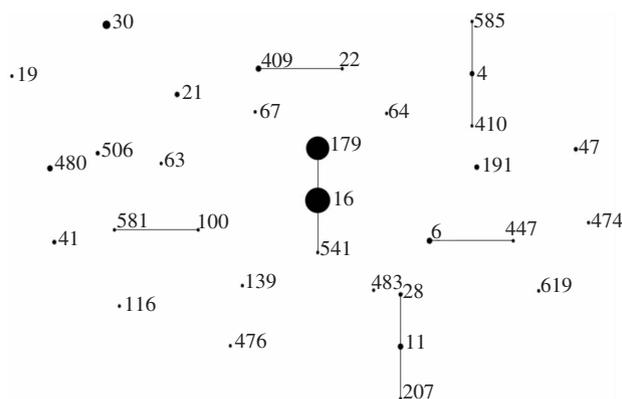
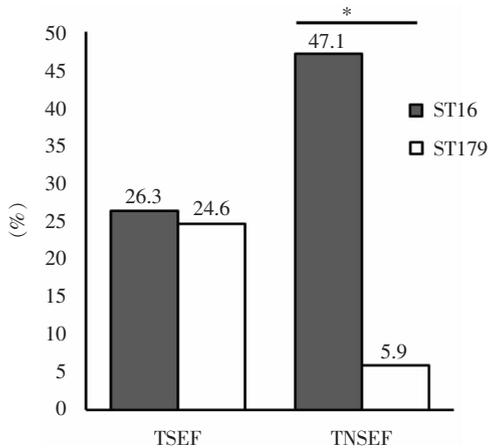


图 1 289 株粪肠球菌 MLST 分布情况

Figure 1 Distribution of MLST of 289 *E. faecalis* strains

2.4 粪肠球菌对泰利唑胺体外敏感性与其耐药机制之间的关系 238 株粪肠球菌中均未发现 23S rRNA V 区突变,也未检出 *cfp* 和 *cfp*(B) 基因。共检出 11 株携带 *optrA* 基因的粪肠球菌,其中 9 株对泰利唑胺不敏感。



TZE: 泰利唑胺敏感粪肠球菌; TNSEF: 泰利唑胺不敏感粪肠球菌; *: 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

图 2 泰利唑胺敏感及不敏感粪肠球菌菌株中 ST16 与 ST179 分型菌株占比的比较

Figure 2 Comparison of the proportion of ST16 and ST179 strains in TZE-susceptible and TZE-non-susceptible *E. faecalis* strains

3 讨论

肠球菌是医院感染的主要病原体之一,因其具有获得编码抗生素耐药性基因的能力,且对多种抗菌药物天然耐药,给临床治疗造成许多困难。本研究中泰利唑胺对肠球菌 MIC 值与利奈唑胺相比更低,提示泰利唑胺具有更好的活性。与欧美国家的报道^[14]不同,本研究中并未检出耐万古霉素粪肠球菌,而且几乎所有粪肠球菌对氨苄西林、呋喃妥因、万古霉素、泰利唑胺均有良好的敏感性。值得一提的是,本研究中检出的所有利奈唑胺或泰利唑胺不敏感的粪肠球菌菌株均对氨苄西林、万古霉素和呋喃妥因敏感,因此,在对粪肠球菌感染的治疗中这三种药相较于更昂贵的利奈唑胺或泰利唑胺是更好的选择。

既往研究^[15]显示,粪肠球菌中 ST16 在医院感染中更为多见,而 ST179 在社区感染中较为多见。在本研究中,粪肠球菌的主要 MLST 为 ST16 和

ST179,分型为 ST16 的粪肠球菌对泰利唑胺敏感率低于分型为 ST179 的菌株。提示社区感染的粪肠球菌比医院感染的菌株具有更高的泰利唑胺敏感性,但仍需进一步流行病学调查以证实。

有研究^[16]提示 23S rRNA V 区突变可能是泰利唑胺耐药的主要机制,特别是 2576 核苷酸从 A 到 T 的突变是临床肠球菌中最常见的突变,但在本研究中并未发现 23S rRNA V 区突变菌株。本研究检出的 17 株泰利唑胺不敏感的粪肠球菌中有 11 株携带外源性质粒介导的耐药基因 *optrA*(编码 ABC 家族 F 亚家族蛋白)。结合既往曾有报道^[11]显示,携带 *optrA* 基因的粪肠球菌对泰利唑胺具有耐药性,推测携带 *optrA* 基因是本研究中粪肠球菌对泰利唑胺不敏感的主要机制。但另外 6 株泰利唑胺不敏感的粪肠球菌并未检出相关耐药基因,是否存在其他未知机制有待进一步研究。

多重耐药粪肠球菌的出现给临床治疗带来了很大的挑战,恶唑烷酮类药物的合理使用和适当的医院感染防控非常重要。在本研究中,泰利唑胺对携带 *optrA* 基因的粪肠球菌菌株未显示出明显的优势。随着利奈唑胺使用的日益增长,第二代恶唑烷酮类药物泰利唑胺不敏感粪肠球菌菌株的出现也有逐渐增加的风险。由于本研究为单中心数据,且该院尚未使用泰利唑胺,仍需要更多的临床试验进一步验证泰利唑胺对粪肠球菌感染的疗效。

[参考文献]

- [1] Bourgeois-Nicolaos N, Massias L, Couson B, et al. Dose dependence of emergence of resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* in vivo[J]. J Infect Dis, 2007, 195(10): 1480 - 1488.
- [2] 蒲彰雅,余治健,陈重,等. 利奈唑胺耐药粪肠球菌感染患者临床分离株与定植株同源性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(4): 343 - 345, 350.
- [3] Rybak JM, Roberts K. Tedizolid phosphate: a next generation oxazolidinone[J]. Infect Dis Ther, 2015, 4(1): 1 - 14.
- [4] Moellering RC Jr. Tedizolid: a novel oxazolidinone for gram-positive infections[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(1): S1 - S3.
- [5] Locke JB, Zurenko GE, Shaw KJ, et al. Tedizolid for the management of human infections: in vitro characteristics[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(Suppl 1): S35 - S42.
- [6] Klupp EM, Both A, Belmar Campos C, et al. Tedizolid susceptibility in linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(12): 1957 - 1961.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards

- for antimicrobial susceptibility testing. 25th informational supplement, M100 - S26[S]. Wayne, PA: CLSI, 2016.
- [8] Ntokou E, Stathopoulos C, Kristo I, et al. Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(8): 1819 - 1823.
- [9] Liu Y, Wang Y, Wu C, et al. First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(3): 1650 - 1654.
- [10] Deshpande LM, Ashcraft DS, Kahn HP, et al. Detection of a new *cfr*-like gene, *cfr*(B), in *Enterococcus faecium* isolates recovered from human specimens in the United States as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10): 6256 - 6261.
- [11] Wang Y, Lv Y, Cai J, et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(8): 2182 - 2190.
- [12] Bai B, Hu K, Li H, et al. Effect of tedizolid on clinical *Enterococcus* isolates: in vitro activity, distribution of virulence factor, resistance genes and multilocus sequence typing[J]. FEMS Microbiol Lett, 2018, 365(3), doi: 10.1093/femsle/fnx284.
- [13] Nallapareddy SR, Duh RW, Singh KV, et al. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 868 - 876.
- [14] O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management[J]. Infect Drug Resist, 2015, 8: 217 - 230.
- [15] Zheng JX, Bai B, Lin ZW, et al. Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China[J]. J Med Microbiol, 2017, 60: 60 - 67.
- [16] Gawryszewska I, Żabicka D, Hryniewicz W, et al. Linezolid-resistant enterococci in Polish hospitals: species, clonality and determinants of linezolid resistance[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(7): 1279 - 1286.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:白冰,余治健,徐广健,等.粪肠球菌临床株对泰利唑胺体外抗菌活性的研究[J].中国感染控制杂志,2019,18(11):1009 - 1013. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20194486.

Cite this article as:BAI Bing, YU Zhi-jian, XU Guang-jian, et al. In vitro antimicrobial activity of tedizolid against clinically isolated *Enterococcus faecalis* [J]. Chin J Infect Control, 2019, 18(11): 1009 - 1013. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20194486.