

DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20194014

· 论 著 ·

粪肠球菌分子分型特点及其与泰利霉素敏感性的关系

黄震^{1,2,3}, 胥志超^{1,3}, 张波^{1,3}, 王红燕^{1,3}, 陈重^{1,3}, 白冰^{1,3}, 潘伟光¹, 李桂秋¹, 徐广健¹, 余治健¹, 邓启文^{1,3}, 李多云^{1,3}

(1. 深圳大学医学院附属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. 深圳市宝安区人民医院肺科门诊, 广东 深圳 518101; 3. 深圳市医院感染质量控制中心, 广东 深圳 518052)

[摘要] **目的** 了解临床分离的粪肠球菌分子分型特征及其与泰利霉素药物敏感性之间的关系。**方法** 收集深圳市南山医院 2010—2016 年不同临床标本分离的粪肠球菌 320 株, 采用多位点序列分型技术进行分型, 用微量肉汤稀释法测定菌株对泰利霉素的最低抑菌浓度, 采用 PCR 检测耐药基因 *ermB* 的分布。**结果** 320 株粪肠球菌分为 48 个 ST 型和 56 株新的 ST 分型, 以 ST16、ST179 型为主。ST16 型 85 株 (26.6%), 其中 72 株 (84.7%) *ermB* 阳性, 29 株 (34.1%) 对泰利霉素敏感, 10 株 (11.8%) 中介, 46 株 (54.1%) 耐药; ST179 型 80 株 (25.0%), 其中 71 株 (88.8%) *ermB* 阳性, 15 株 (18.8%) 对泰利霉素敏感, 4 株 (5.0%) 中介, 61 株 (76.3%) 耐药。**结论** 该院粪肠球菌以 ST16、ST179 为优势菌株, 该两型菌群高比例携带 *ermB* 基因, 对泰利霉素耐药率较高。

[关键词] 粪肠球菌; 泰利霉素; 耐药; *ermB*; 多位点序列分型 (MLST)

[中图分类号] R446.5

Characteristics of molecular typing of *Enterococcus faecalis* and its relationship with susceptibility to telithromycin

HUANG Zhen^{1,2,3}, XU Zhi-chao^{1,3}, ZHANG Bo^{1,3}, WANG Hong-yan^{1,3}, CHEN Zhong^{1,3}, BAI Bing^{1,3}, PAN Wei-guang¹, LI Gui-qiu¹, XU Guang-jian¹, YU Zhi-jian¹, DENG Qi-wen^{1,3}, LI Duo-yun^{1,3} (1. Department of Infectious Disease of Nanshan District People's Hospital, Shenzhen Key Laboratory for Endogenous Infection, Shenzhen University School of Medicine, Shenzhen 518052, China; 2. Department of Lung Disease, Baoan District People's Hospital, Shenzhen 518101, China; 3. Healthcare-associated Infection Quality Control Center of Shenzhen, Shenzhen 518052, China)

[Abstract] **Objective** To reveal characteristics of molecular typing of clinically isolated *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and its relationship with susceptibility to telithromycin. **Methods** 320 strains of *E. faecalis* isolated from different clinical specimens in Nanshan Hospital of Shenzhen City from 2010 to 2016 were collected, genotyping of *E. faecalis* was performed by multilocus sequence typing (MLST), minimum inhibitory concentration of telithromycin to strains was determined by broth microdilution method, and distribution of drug-resistant gene *ermB* was detected by polymerase chain reaction (PCR). **Results** 320 strains of *E. faecalis* were divided into 48 ST types and 56 new ST types, mainly ST16 and ST179. 85 strains (26.6%) were ST16, 72 (84.7%) of which were positive for *ermB*, 29 (34.1%) were susceptible to telithromycin, 10 (11.8%) were intermediate, 46 (54.1%) were resistant to telithromycin; 80 strains (25.0%) were ST179, 71 (88.8%) of which were positive for *ermB*, 15 (18.8%) were susceptible to telithromycin, 4 (5.0%) were intermediate, and 61 (76.3%) were resistant to

[收稿日期] 2018-06-22

[基金项目] 深圳市科技计划项目 (JCYJ20170412143551332、JCYJ20170307153714512、JCYJ20170307153425389、JCYJ20170307153919735); 广东省卫生厅课题 (A2018163)

[作者简介] 黄震 (1985-), 男 (汉族), 江西省抚州市人, 主治医师, 主要从事细菌耐药研究。

[通信作者] 李多云 E-mail: liduoyun94@163.com

telithromycin. **Conclusion** ST16 and ST179 are dominant strains of *E. faecalis* in this hospital, they carry *ermB* gene in a high proportion and have high resistance rate to telithromycin.

[**Key words**] *Enterococcus faecalis*; telithromycin; drug-resistance; *ermB*; multilocus sequence typing (MLST)

粪肠球菌是肠球菌最常见的菌种,作为一种条件致病菌可引起泌尿道感染、伤口感染、腹腔内感染、感染性心内膜炎及血流感染等^[1],其耐药机制复杂且可水平传播,给医院感染控制工作带来挑战。粪肠球菌对大环内酯-林可酰胺-链阳霉素 B (MLS_B) 耐药比较普遍^[2-3],此与甲基化酶改变 23S rRNA 上的 V 区药物作用靶位(A2058)有关,而最常见的甲基化酶基因为 *ermB*^[4-5]。泰利霉素作为酮内酯类抗生素的代表性药物,是首个获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准进入临床应用的酮内酯类抗生素^[6],较 MLS_B 多一个作用位点(II 区 A752),其与 rRNA 结合更牢固,从而抵消部分甲基化酶的作用^[7]。目前,国内暂未发现泰利霉素用于抗临床分离粪肠球菌研究的相关报道。多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术是用于分析细菌系统性进化同源性的工具,不同地区分布的优势 ST 型不同,其耐药特性也不同^[8]。本研究采用 MLST 分析粪肠球菌同源性情况,探讨不同基因分型的粪肠球菌中 *ermB* 基因分布情况及对泰利霉素敏感性的差异,为控制其医院传播提供实验室依据。

1 对象与方法

1.1 菌株及来源 320 株粪肠球菌分离自深圳市南山医院 2010—2016 年住院患者临床标本,标本来源为尿 139 株(43.4%),创口分泌物 57 株(17.8%),血 32 株(10.0%),胆汁 27 株(8.4%),其他部位(胸腔积液、腹腔积液、脓液、痰、渗出液、组织块、引流液、羊水、导管等)共 65 株(20.3%)。

1.2 菌株鉴定和药敏试验 所有菌株经 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统(法国梅里埃公司)鉴定,采用 2016 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的微量肉汤稀释法测定所有药物最低抑菌浓度(MIC)值,主要药物包括红霉素、泰利霉素、氨苄西林、万古霉素、利奈唑胺、呋喃妥因、多西环素和利福平,以粪肠球菌 ATCC 29212 作为质控菌株。泰利霉素的折点参考 2016 年 CLSI 推荐对金黄色葡萄球菌折点:敏感($\leq 1 \mu\text{g/mL}$),中介($2 \mu\text{g/mL}$),耐药($\geq 4 \mu\text{g/mL}$)。

1.3 基因组 DNA 提取与纯化 采用 DNeasy Blood & Tissue Kit DNA 提取试剂盒按照革兰阳性菌操作流程提取细菌基因组 DNA,提取的 DNA $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 耐药基因 *ermB* 检测 耐药基因 *ermB* 引物:*erm*(B)-F: CCGTTTACGAAATTGGAACAGG-TAAAGGCG; *erm*(B)-R: GAATCGAGACTTGAG-TGTGC,由北京六合华大基因公司合成。*ermB* 基因 PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,PCR 产物(359 bp)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。产物随机提取纯化后测序,比对后确定为目的基因。

1.5 MLST PCR 扩增粪肠球菌 7 对管家基因(*gdh*、*gyd*、*pstS*、*gki*、*aroE*、*xpt* 和 *yiiQ*),其引物、反应体系及反应条件参照 MLST 网站(<http://efaecalis.mlst.net/misc/info.asp>),PCR 产物纯化后进行测序,测序结果提交 MLST 网站(<http://mlst.net>)比对,与数据库中的粪肠球菌相应基因的等位基因进行比较,最终确定粪肠球菌分离株的 ST 型。

1.6 统计学分析 应用统计软件 SAS 9.45 进行分析,所有耐药率数据精确到小数点后一位,统计学处理中耐药率的比较采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 粪肠球菌的耐药率 粪肠球菌对泰利霉素中介 26 株,耐药 138 株,耐药率达 51.3%,对红霉素耐药率高达 95.6%,二者差异有统计学意义($\chi^2 = 161.92, P < 0.001$)。见表 1。对利奈唑胺、万古霉素、呋喃妥因、氨苄西林耐药率分别为 15.6%、0.6%、2.2%、0.6%,对多西环素、利福平及环丙沙星耐药率分别为 85.9%、95.3% 和 38.4%。

2.2 MLST 及 *ermB* 基因的分布 320 株粪肠球菌中,207 株(64.7%) *ermB* 基因阳性,分为 48 个 ST 型,56 株菌属于 MLST 数据库中未记载的新 ST 分型(NT),优势菌株为 ST16、ST179 和 ST30。ST16 型 85 株(26.6%),其中 72 株(84.7%) *ermB* 阳性,对泰利霉素敏感 29 株(34.1%),耐药 56 株

表 1 320 株粪肠球菌对泰利霉素及红霉素的药敏结果 (株)
Table 1 Antimicrobial susceptibility of 320 strains of *E. faecalis* to telithromycin and erythromycin (No. of isolates)

抗菌药物	S	I	R
泰利霉素	156	26	138
红霉素	14	56	250

S:敏感 I:中介 R:耐药

表 2 不同 MLST 粪肠球菌对红霉素及泰利霉素的 MIC 值及 *ermB* 基因携带情况

Table 2 MIC values of telithromycin and erythromycin to different MLST of *E. faecalis* as well as carriage of *ermB* gene

MLST	株数	红霉素(μg/mL)						泰利霉素(μg/mL)						<i>ermB</i>	
		≤0.5	1	2	4	≥8	MIC ₅₀ /MIC ₉₀	≤0.5	1	2	4	≥8	MIC ₅₀ /MIC ₉₀	+	-
ST16	85	0	2	4	1	78	≥128/≥128	25	4	10	36	10	4/8	72	13
ST179	80	1	6	3	0	70	≥128/≥128	15	0	4	48	13	4/8	71	9
ST30	13	1	1	1	0	10	≥128/≥128	11	0	1	1	0	≤0.5/1	8	5
ST28	7	0	0	0	0	7	≥128/≥128	6	0	1	0	0	≤0.5/2	2	5
ST403	4	0	0	0	0	4	≥128/≥128	1	0	1	2	0	2/4	3	1
ST480	3	0	1	0	0	2	32/≥128	1	1	0	1	1/4	1	2	
ST6	5	0	0	0	1	4	≥128/≥128	1	0	0	3	1	4/8	4	1
ST409	4	0	0	0	1	3	16/≥128	4	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	3	1
ST4	3	0	0	0	0	3	≥128/≥128	1	1	1	0	0	1/2	3	0
ST40	3	0	1	1	1	0	2/4	3	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	0	3
ST44	3	0	0	0	0	3	128/≥128	3	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	1	2
ST11	6	3	0	0	0	3	0.5/≥128	6	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	0	6
ST21	4	1	1	1	0	1	1/64	4	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	0	4
ST314	2	0	0	2	0	0	2/2	2	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	0	2
ST41	2	0	0	0	0	2	64/64	2	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	0	2
ST47	2	0	0	1	0	1	2/64	2	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	1	1
ST476	2	0	0	0	0	2	≥128/≥128	0	0	0	1	1	4/8	2	0
ST541	3	0	1	1	0	1	2/≥128	2	0	0	1	0	≤0.5/4	1	2
ST79	2	0	2	0	0	0	1/1	2	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	1	1
ST191	2	0	0	2	0	0	2/2	2	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	0	2
ST387	2	1	0	1	0	0	≤0.5/2	2	0	0	0	0	≤0.5/≤0.5	0	2
NT	56	6	4	8	2	36	128/≥128	39	0	4	11	2	0.06/4	20	36
其他	27	1	2	3	1	20	128/≥128	15	1	4	5	2	0.25/4	14	13
合计	320	14	21	28	7	250	128/≥128	149	7	26	109	29	2/4	207	113

红霉素折点: S≤0.5 μg/mL, I 1~4 μg/mL, R≥8 μg/mL; 泰利霉素折点: S≤1 μg/mL, I 2 μg/mL, R≥4 μg/mL

2.3 不同 MLST 及是否携带 *ermB* 基因粪肠球菌对红霉素及泰利霉素的药敏结果 比较优势亚型 ST16、ST179 和 ST30 型及其他 ST 型别粪肠球菌对红霉素及泰利霉素的药敏结果,经 χ^2 检验发现,

(65.9%);ST179 型 80 株,其中 71 株 *ermB* 阳性,对泰利霉素敏感 15 株(18.8%),耐药 65 株(81.3%);ST30 型 13 株(4.1%),其中 8 株 *ermB* 阳性,对泰利霉素敏感 11 株(84.6%),耐药 2 株(15.4%);其余 ST 型 142 株,56 株携带 *ermB* 基因,对泰利霉素耐药 41 株(28.9%)。不同 MLST 粪肠球菌对红霉素及泰利霉素的 MIC 值及 *ermB* 基因携带情况见表 2。

不同 ST 亚型粪肠球菌对红霉素及泰利霉素的药敏结果差异均有统计学意义($P < 0.001$),见表 3。*ermB* 阳性的粪肠球菌对红霉素与泰利霉素的敏感率均低于 *ermB* 阴性组(均 $P < 0.001$),见表 4。

表 3 不同 MLST 粪肠球菌对红霉素及泰利霉素的药敏结果比较

Table 3 Comparison of erythromycin and telithromycin susceptibility of different MLST types of *E. faecalis*

MLST	红霉素(株)			χ^2	P	泰利霉素(株)			χ^2	P
	S	I	R			S	I	R		
ST16	0	7	78	33.900	<0.001	29	10	46	85.591	<0.001
ST179	1	9	70			15	4	61		
ST30	1	2	10			11	1	1		
其他	12	38	92			101	11	30		

表 4 是否携带 *ermB* 基因粪肠球菌对红霉素及泰利霉素的药敏结果比较Table 4 Comparison of erythromycin and telithromycin susceptibility of *E. faecalis* with or without *ermB* gene

<i>ermB</i>	红霉素(株)			χ^2	P	泰利霉素(株)			χ^2	P
	S	I	R			S	I	R		
阳性	1	10	196	94.933	<0.001	53	23	131	126.099	<0.001
阴性	13	46	54			103	3	7		

3 讨论

粪肠球菌是人类肠道常见的共生菌,也是导致各种医院感染常见的病原体。粪肠球菌对多种抗菌药物天然耐药,且可通过转座子等获得耐药基因,使耐药属性在细菌间水平传播,给临床治疗带来巨大挑战^[9]。随着大环内酯类药物在临床上的广泛使用,肠球菌属对大环内酯类抗生素耐药较严重^[9]。世界范围内已有多项研究将酮内酯泰利霉素用于治疗粪肠球菌感染,其效果均优于第一、二代大环内酯类药物^[10-11]。本研究结果显示,粪肠球菌对泰利霉素总耐药率达 51.3%,高于文献^[10-11]研究,但低于对红霉素的耐药率(泰利霉素对粪肠球菌的抗菌效果优于红霉素)。本研究发现粪肠球菌对常用抗阳性球菌药物万古霉素、呋喃妥因、氨苄西林均保持高敏感性,但对利奈唑胺的耐药性高达 15.6%,高于其他研究^[12]报道;同时,粪肠球菌对多西环素、利福平均保持高耐药性。故临床上粪肠球菌感染应多选用氨苄西林、万古霉素、呋喃妥因或利奈唑胺。

采用 MLST 分析发现,该院粪肠球菌可分为 48 个 ST 型和 56 株 MLST 数据库未登记的 ST 型(NT),ST16 和 ST179 为绝对优势菌群,其同属 CC16 克隆复合群(Clonal complex),其次为 ST30、ST28 及 ST11 等。ST16 和 ST179 较其他 ST 型对泰利霉素的敏感性亦较差,耐药率分别达 65.9%、81.3%。检测耐药基因 *ermB*,发现在 ST16 和

ST179 型粪肠球菌中 *ermB* 基因的阳性率较高,分别为 84.7%、88.8%,耐药基因 *ermB* 的存在对降低泰利霉素的敏感性起重要作用。

目前,国内外已有多个报道对临床及环境分离的粪肠球菌 MLST 及特征进行研究。李岩等^[13]在辽宁某医院分离的优势菌群亦为 ST16、ST179,且其毒力基因 *cylA*、*gelE*、*esp* 和 *asa1* 携带率在 70% 以上。研究^[14-15]表明,ST16 还具有更容易形成强生物膜和更高的特地唑胺(tedizolid)耐药率等特性。国外粪肠球菌 MLST 相关研究亦显示 CC2、CC16、CC21、CC30、CC40 及 CC87 是世界范围内播散的优势菌株^[16],上述克隆群在本院亦有发现,而 Ruiz-Garbajosa 等研究^[17]更是将 ST16 描述为“适应医院的菌群之一”,意味着 ST16 更容易产生多重耐药。该院粪肠球菌以 ST16 和 ST179 为主,且标本来源以尿、创口分泌物为主,尿路的侵入性操作或导管的使用增加、无菌意识薄弱、伤口处理不当均有导致其流行的可能,在临床治疗中也应根据 CC16 的特点合理选用抗菌药物。

粪肠球菌的耐药机制复杂,本研究仍存在局限性。*erm* 基因有数十种亚型,粪肠球菌主要携带 *ermB* 基因,本研究仅对 *ermB* 基因携带情况进行研究,亦不排除其他 *erm* 基因同时存在并引起泰利霉素耐药的可能。本院 MLST 以 ST16 及 ST179 分型为主,*ermB* 的高携带率仅是红霉素、泰利霉素高耐药率机制之一,其他机制仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Madsen KT, Skov MN, Gill S, et al. Virulence factors associated with *Enterococcus faecalis* infective endocarditis: a mini review[J]. Open Microbiol J, 2017, 31(11): 1-11.
- [2] Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in *enterococci*[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014, 12(10): 1221-1236.
- [3] Hershberger E, Donabedian S, Konstantinou K, et al. Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology[J]. Clin Infect Dis, 2004, 38(1): 92-98.
- [4] Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, et al. Macrolide resistance genes in *Enterococcus spp* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(4): 967-971.
- [5] Shoji T, Takaya A, Sato Y, et al. RlmCD-mediated U747 methylation promotes efficient G748 methylation by methyltransferase RlmAII in 23S rRNA in *Streptococcus pneumoniae*; interplay between two rRNA methylations responsible for telithromycin susceptibility[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(18): 8964-8972.
- [6] Zeitlinger M, Wagner CC, Heinisch B, et al. Ketolides - the modern relatives of macrolides : the pharmacokinetic perspective[J]. Clin Pharmacokinet, 2009, 48(1): 23-38.
- [7] Takaya A, Kitagawa N, Kuroe Y, et al. Mutational analysis of reduced telithromycin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated clinically in Japan[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 307(1): 87-93.
- [8] Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology[J]. Trends Microbiol, 2003, 11(10): 479-487.
- [9] 陈栋江, 阮志浩, 吴庆, 等. 粪肠球菌 *ermB* 基因与转座子 Tn1545 和 Tn917 关系的探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(6): 763-766.
- [10] Sánchez-Molina MI, Martín D, Valladares C, et al. Susceptibility of *Enterococcus* genus to new antimicrobial agents[J]. Rev Esp Quimioter, 2004, 17(2): 184-188.
- [11] Mikamo H, Yin XH, Ninomiya M, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of telithromycin [J]. Chemotherapy, 2003, 49(1-2): 62-65.
- [12] 杨青, 俞云松, 林洁, 等. 2005—2014 年 CHINET 肠球菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(2): 146-152.
- [13] 李岩, 王晶, 张桂, 等. 2012—2014 年辽宁省大连市某医院分离粪肠球菌耐药性及多位点序列分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(5): 391-396.
- [14] 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, 2018, 67: 60-67.
- [15] 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): 1-7.
- [16] Kuch A, Willems RJ, Werner G, et al. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe[J]. Antimicrob Chemother, 2012, 67(3): 551-558.
- [17] Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination[J]. Clin Microbiol, 2006, 44(6): 2220-2228.

(本文编辑:周鹏程、左双燕)

本文引用格式:黄震, 胥志超, 张波, 等. 粪肠球菌分子分型特点及其与泰利霉素敏感性的关系[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(8): 708-712. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20194014.

Cite this article as: HUANG Zhen, XU Zhi-chao, ZHANG Bo, et al. Characteristics of molecular typing of *Enterococcus faecalis* and its relationship with susceptibility to telithromycin[J]. Chin J Infect Control, 2019, 18(8): 708-712. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20194014.