

临床肠球菌属耐药特点和毒力基因的研究进展^{*}

王 立 综述,刘长庭 审校(解放军总医院南楼呼吸科 100853)

【关键词】 肠球菌; 耐药; 毒力基因

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.09.053 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)09-1259-03

近年来,肠球菌引起的临床各系统感染正呈现逐年上升的趋势,已成为医院感染的重要致病菌,可引起肺炎、心内膜炎、菌血症、尿路感染等多系统感染,尤其在免疫力低下及高龄患者中发病率较高。美国已发生高耐药肠球菌(包括耐万古霉素屎肠球菌)的暴发流行,欧洲在近 10 年来肠球菌的感染率也在逐年上升。在我国,根据上海地区的耐药性检测报告^[1],临床分离的革兰阳性菌中,肠球菌属已成为第 2 位高发的致病菌。近年来,肠球菌对抗菌药物的耐药性增加,产 β -内酰胺酶的肠球菌及耐高浓度氨基糖苷类肠球菌的比例增加,特别是出现耐万古霉素肠球菌,给临床治疗带来困难。

1 肠球菌属的临床情况

肠球菌属共包括 18 种,从人类分离到的主要是粪肠球菌与屎肠球菌两种。肠球菌在临床上可以引起不同部位的感染,以呼吸道感染率最高(30.7%),泌尿系次之(29.2%),生殖系及伤口感染分别为 16.5%和 13.0%。

细菌对于抗菌药物耐药包含固有耐药和获得性耐药两部分。肠球菌属对许多抗菌药物固有耐药,对青霉素类中度或低度敏感,对糖肽类抗菌药物如万古霉素、去甲万古霉素、替考拉宁敏感。但是由于获得性耐药机制的存在,现在发现肠球菌属中,对以阿莫西林为代表的青霉素类、甚至以万古霉素为代表的糖肽类抗菌药物均产生了不同程度耐药的菌株。自 1986 年英国首先报道发现万古霉素耐药肠球菌(VRE)感染以来,世界各地都有报道分离到 VRE^[2]。在美国,其感染率已经从 1989 年的 0%上升到 2003 年 23%^[3],并逐渐蔓延至全美^[4]。在欧洲,自 2000 以来,VRE 的发病率也在不断上升。目前,VRE 耐药机制和致病力改变的研究已成为肠球菌临床研究的重点。

2 肠球菌属的多种耐药机制

2.1 肠球菌对 β -内酰胺类的耐药机制是由于青霉素结合蛋白(PBPs)与青霉素的亲和力下降,使青霉素不能与靶位 PBPs 结合。粪肠球菌与屎肠球菌至少各有 5 种,甚至可能多达 9 种的 PBPs。由于粪肠球菌和屎肠球菌携带 PBP 方面的差异,导致了二者对临床上青霉素、氨苄西林等药物的敏感性有所不同。粪肠球菌对大多数 β -内酰胺类耐药的机制在于,其与 PBP-1 与 PBP-3 亲和力下降,并且在耐药菌株中伴有 PBP-3 的过量生产,临床上所见的对 β -内酰胺类抗菌药物高耐药菌株可能与此耐药机制有关。屎肠球菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药机制主要是其与 PBP-1 与 PBP-2 的亲和力下降^[5]。对于高耐药的屎肠球菌,几乎全部属于临床株,表现为 PBP-5 与阿莫西林的亲和力下降,有学者认为这种现象主要是基因突变所致^[6],

也有学者认为这与 PBP-5 的过度产生有关^[7]。还有一种关于 β -内酰胺类耐药研究的新理论,Mainardi 等^[8]在实验室分离到一种不具备 PBPs 的新的菌株,在这类突变株中, β -内酰胺类的跨膜是依赖于 LD-转肽酶作用,而非 β -内酰胺类敏感株所通常的 DD-转肽酶作用^[9]。但是这种机制至今没有在临床株中发现。

2.2 近年来,已经有 6 类 VRE 被报道,其中 VanA 和 VanB 是被报道最多的。针对上述菌种进行的基因序列和功能分析说明,这些基因簇所引起的耐药,主要源自于相应的酶的编码的改变^[10-11]。1988 年,Leclercq 等发现 VRE 耐药是由质粒介导的,其后 Arthur 等^[12]发现这类耐药是由编码 VanA 的一些基因序列所决定,被命名为 Tn1546。Tn1546 属于 Tn3 家族,其播散主要依赖于质粒和接合转座子等基因原件的接合作用。VanB 则是另外一种被命名为 Tn1547 的不同序列所编码^[13]。基于基因序列的差异 VanB 可以被分为 3 种亚型, VanB1-3^[14]。其中 VanB-2 是被报道最多的,其耐药作用与转座基因 Tn1549/Tn5382 相关^[15]。因为有质粒和各种转座基因的参与,作者认为,VRE 的传播不仅是耐药基因克隆扩增的结果,耐药基因在菌株间的平行转移也发挥着重要的作用。而且,这种平行转移作用,很容易使耐药基因转移给其他的革兰阳性菌,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。万古霉素也是治疗 MRSA 感染的重要药物。迄今为止,已经有 5 种耐万古霉素金葡菌(VRSA)被发现^[16]。Weigel 等^[17]报道,VRSA 很可能是从屎肠球菌中获得 vanA 耐药基因的。

类似于前文所述的 LD-转肽作用在 β -内酰胺类抗菌药物的跨膜过程中的机制,Cremniter 等^[18]认为 LD-转肽作用所产生的跨膜障碍也是肠球菌属对糖肽类耐药的机制之一,但是这个理论目前也仅处于体外实验阶段。

2.3 肠球菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药机制主要由于氨基糖苷钝化酶对氨基糖苷类抗菌药物修饰灭活^[19]。其中研究较多的是氨基糖苷类双功能修饰酶[AAC(6')-APH(2'')],由于这类酶多位于转座子上,可以在不同菌株间传播,所以对于临床耐药菌的暴发流行意义极大。其他机制还包括药物核糖体靶点结构的改变、细胞膜对抗菌药物通透性的改变以及外排泵机制。

3 肠球菌属的基因研究进展

3.1 克隆复合体 17(CC17)与胶原蛋白黏附基因(acm)医院相关性屎肠球菌基因群,是基于众多人类和动物源性肠球菌属菌株,通过多点序列分析所确定特异性的基因谱系,被命名为 CC17。这个谱系与临床株密切相关,这些菌株以对阿莫西林

^{*} 基金项目:解放军总装备部装备预研基金重点项目(9140A26040312JB10078)。

和喹诺酮类高度耐药为特点, 包含有上百个“医院特异性”基因, 诸如噬菌体基因、质粒序列、膜蛋白及抗菌药物调节基因和可能的致病序列(如 esp 基因)。

Willems 等^[20]研究认为 purK 等位基因是 CC17 家族具有传染性的标志。Meng 等的研究中, 通过 MLST 的方法确定了 60 例屎肠球菌菌株, 其中 39 株临床株中 29 株拥有 CC17 序列, 而非临床株的 21 例全部不具备 CC17, 说明 CC17 与肠球菌属临床致病的相关性。

屎肠球菌 acm 基因会表达一种固定在细胞壁上的胶原蛋白黏附素-Acm 蛋白。Acm 相关的 I 型胶原蛋白的黏附能力, 被认为与屎肠球菌的临床侵袭性高度相关。近期发现, 除了 I 型胶原蛋白, 对层粘连蛋白和纤维蛋白的黏附能力也与屎肠球菌, 特别是含有 CC17 的屎肠球菌致病性相关。

Zhao 等^[21]对 60 株源自人类感染灶、粪便及动物的菌株, 在 15 种含糖蛋白、氨基酸等不同组分的细胞外基质和血浆成分的培养基中进行研究, 发现大多数菌株的黏附表型为纤维蛋白、纤维蛋白原和层粘连蛋白。在致病性与非致病性的各种屎肠球菌菌株中, 共有 6 种 ECM 蛋白: Fn, Fg, Ln, CV, Tf 和 Lf, 其中只有 Fn 和 Ln 与临床株高度相关, 而且, 这两种表型与 CC17 也具有高度的相关性。

Nallapareddy 等^[22]分析了 90 株屎肠球菌, 发现 Acm 蛋白主要存在于临床株, 而在非临床株很少发现(12/47), acm 基因则主要是以转座子基因的身份出现。另外, 该研究还证实了临床株和胶原蛋白黏附性高度相关, 并且细胞表面的 acm 蛋白数与黏附水平高度相关($r=0.879$)。以上的结果, 说明 acm 与肠球菌属的致病性相关。在 Sreedhar 的试验中, 脉冲凝胶电泳表明多个菌株表达胶原蛋白黏附性, 而多位点序列分型证明大多数上述菌株具有 CC17 结构, 所以 acm 基因的研究, 有助于解释屎肠球菌医院感染和 CC17 的关联性。

3.2 毒力基因 hyl(hyaluronidase)和 esp(enterococcal surface protein) 含有 CC17 的屎肠球菌亚种可能包含有特定的序列如 hyl 和 esp, 其与临床株的播散和毒力增强具有很强的相关性。无论在人类还是在动物源性的肠球菌属菌株中, esp 基因的存在, 被证实与毒力增强和生物被膜得形成有关。而且 esp 基因, 只发生于含有 CC17 的临床株^[23]。既往在粪肠球菌 esp 基因的研究中^[24], 认为这种基因则可以在临床株和动物源菌株的某一特定致病基因簇中发现。在对屎肠球菌 esp 基因的上下游区域进行序列分析后, 认为屎肠球菌具备一个与粪肠球菌不同的致病基因决定簇^[25]。在屎肠球菌, Esp 蛋白表达于细菌表面, 视生长条件表现出不同的黏附性, 参与生物被膜的形成^[26]。近年来, 通过基因敲除的办法, 已经证实 esp 基因缺失的菌株不能产生生物被膜^[27]。

2003 年, 另一种毒力基因, 一种和链球菌同源的产透明质酸酶基因 hyl 被发现^[28]。在屎肠球菌临床株中, hyl 基因较非临床株表达更多。尽管在屎肠球菌的研究中, 透明质酸酶对毒力改变的作用尚未得到确定, 但在肺炎链球菌中, 其对细菌侵入鼻咽粘膜的作用是确定的, 所以其至少可能对细菌侵袭力的改变具有影响。

3.3 屎肠球菌毒力改变研究的其它进展 相对于粪肠球菌, 多数屎肠球菌菌株对于中性粒细胞的吞噬作用有天然的抵抗, 这些可能被认为是其致病性所固有的特性。一些毒力因子, 包

括屎肠球菌所产生的 SagA 抗原和 Acm 表面抗原, 与人类细胞外基质蛋白成分相关联。相对于特异性的黏附蛋白 Acm, SagA 被认为与纤维蛋白原、I 型胶原蛋白、IV 型胶原蛋白、纤维蛋白和层粘连蛋白广泛相关。尽管这两种蛋白在屎肠球菌毒力方面的作用尚未被完全知晓, 但对细胞外基质蛋白的黏附是屎肠球菌致病的首要且必要的条件^[29-30]。屎肠球菌通过产生过氧化氢致细胞损伤已经在动物实验中得到证实。但是, 在人类宿主中其毒力作用还有待于进一步研究。明胶酶作为基质金属蛋白酶的一种, 在屎肠球菌毒力方面的作用已经在动物实验中得到验证。一种 fsr 操纵子以细胞密度依赖的方式调节明胶酶。近来明胶酶在屎肠球菌毒力的传播方面已经被报道。

总之, 世界范围内的耐药肠球菌的广泛传播和暴发流行已经越来越引起人们的重视, 随着分子生物学、流行病学和微生物学的进展, 含有 CC17 的特异性的肠球菌亚种已经进入研究的视野。这一亚种基本为临床株, 以对阿莫西林及喹诺酮类耐药为基本特征, 可能存在毒力基因 Hyl 和 Esp 过表达。目前的多数研究提示, 这种被命名为 ST17 屎肠球菌的菌株, 以 CC17 结构为基础, 在适当的临床条件下, 通过多个环节完成致病和耐药的过程, 这些环节包括天然耐药、耐药基因、毒力基因的转导等多种机制。随着分子生物技术的发展, 越来越多的耐药和毒力基因的结构将被了解, 有助于针对 CC17 屎肠球菌的感染和传播制订出相应的策略。

参考文献

- [1] 朱德妹, 汪复, 张婴元. 2004 年上海地区细菌耐药性监测[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(4): 195-200.
- [2] Leclercq R, Derlot E, Duval J, et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*[J]. N Engl J Med, 1988, 31(3): 157-161.
- [3] Centers for disease control and prevention(CDC). nosocomial enterococci resistant to vancomycin—United states, 1989-1993[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1993, 42(30): 597-599.
- [4] National Nosocomial Infections Surveillance System. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004[J]. Am J Infect Control, 2004, 32(8): 470-485.
- [5] Fontana R, Amalfitano G, Rossi L, et al. Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci[J]. Clin Infect Dis, 1992, 15(3): 486-489.
- [6] Rybkine T, Mainardi JL, Sougakoff W, et al. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance[J]. J Infect Dis, 1998, 178(1): 159-163.
- [7] Zorzi W, Zhou XY, Dardenne O, et al. Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*[J]. J Bacteriol, 1996, 178(16): 4948-4957.

- [8] Mainardi JL, Legrand R, Arthur M, et al. Novel mechanism of beta-lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium* [J]. J Biol Chem, 2000, 275(22): 16490-16496.
- [9] Mainardi JL, Morel V, Fourgeaud M, et al. Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium* [J]. J Biol Chem, 2002, 277(39): 35801-35807.
- [10] Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(1): 21-25.
- [11] Moy TH, Mylonakis E, Calderwood SB, et al. calderwood SB&-ausubel FM, cytotoxicity of Hydrogen peroxide produced by *enterococcus faecium* [J]. Infect Immun, 2004, 78(2): 4512-4520.
- [12] Arthur M, Molinas C, Depardieu F, et al. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147 [J]. J Bacteriol, 1993, 175(1): 117-127.
- [13] Quintiliani R, Evers S, Courvalin P. The vanB gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci [J]. J Infect Dis, 1993, 167(5): 1220-1223.
- [14] Patel R, Uhl JR, Kohner P, et al. DNA sequence variation within vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 genes of clinical *Enterococcus* isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(1): 202-205.
- [15] Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, et al. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(5): 1105-1110.
- [16] Appelbaum PC. The emergence of vancomycin intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(suppl 1): 16-23.
- [17] Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, et al. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(1): 231-238.
- [18] Cremniter J, Mainardi JL, Josseume N, et al. Novel mechanism of resistance to glycopeptide antibiotics in *enterococcus faecium* [J]. J Biol Chem, 2006, 281(43): 32254-32262.
- [19] Yazgi H, Ertek M, Erol S, et al. A comparison of high-level aminoglycoside resistance in vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant *Enterococcus* species [J]. J Int Med Res, 2002, 30(5): 529-534.
- [20] Willems RJ, Homan W, Top J, et al. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals [J]. Lancet, 2001, 357(9259): 853-855.
- [21] Zhao M, Sillanpää J, Nallapareddy SR, et al. Adherence to host extracellular matrix and serum components by *Enterococcus faecium* isolates of diverse origin [J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 301(1): 77-83.
- [22] Nallapareddy SR, Singh KV, Okhuysen PC. A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen [J]. Infect Immun, 2008, 76(9): 4110-4119.
- [23] Hammerum AM, Jensen LB. Prevalence of esp, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(11): 4396.
- [24] Creti R, Imperi M, Bertuccini L, et al. Di Rosa R&-baldasari L survey for virulence determinants among *enterococcus faecalis* isolated from different sources [J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 1): 13-20.
- [25] Leavis HL, Willems RJ, van Wamel WJ, et al. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium* [J]. PLoS Pathog, 2007, 3(1): e7.
- [26] Van Wamel WJ, Hendrickx AP, Bonten MJ, et al. Post-huma G&-willems RJ growth condition-dependent Esp expression by *enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation [J]. Infect Immun, 2007, 75(2): 924-931.
- [27] Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162 [J]. J Bacteriol, 2007, 189(22): 8233-8240.
- [28] Rice LB, Carias L, Rudin S, et al. A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin [J]. J Infect Dis, 2003, 187(3): 508-512.
- [29] Teng F, Kawalec M, Weinstock GM, et al. An *enterococcus faecium* secreted antigen, SagA, exhibits broad-spectrum binding to extracellular matrix proteins and appears essential for *E. faecium* growth [J]. Infect Immun, 2003, 71(9): 5033-5041.
- [30] Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by AcM, a new member of the MSCRAMM family [J]. Mol Microbiol, 2003, 47(6): 1733-1747.