

医院获得性尿路感染肠球菌耐药性与毒力基因型相关研究*

黄小丽^{1,2}, 赵瑞珂², 李艳萌², 余佳佳², 张险峰², 钱雪峰², 韩清珍², 徐杰^{2△} (1. 江苏省宿迁市泗洪县人民医院检验科 223900; 2. 苏州大学附属第一医院检验科/江苏省临床免疫研究所, 江苏苏州 215006)

【摘要】目的 研究医院获得性尿路感染肠球菌毒力因子和耐药分布, 以及两者间的关系, 为临床合理使用抗菌药物和控制感染提供依据。**方法** 分离出临床尿路感染标本中 74 株肠球菌进行菌株鉴定, 采用纸片扩散法(K-B法)做药物敏感试验; PCR 检测 *cyll-L*、*cyll-S*、*cyll-A*、*esp*、*acm*、*gelE*、*asa-I*、*cpd*、*ace* 毒力基因。**结果** 74 株肠球菌中有粪肠球菌 45 株(60.8%), 屎肠球菌 29 株(39.2%)。屎肠球菌对青霉素 G、氨苄西林、环丙沙星耐药率分别为 89.66%、89.66%、79.31%, 明显高于粪肠球菌。粪肠球菌对庆大霉素 120、四环素耐药率分别为 46.67%、53.33%, 略高于屎肠球菌。*cyll-L*、*cyll-S*、*cyll-A*、*esp*、*acm*、*gelE*、*asa-I*、*cpd*、*ace* 毒力基因的阳性率分别为 24.32%、44.59%、22.97%、44.59%、60.81%、22.97%、25.67%、22.97%、9.46%。屎肠球菌毒力基因分布与耐药性间差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 粪肠球菌是医院获得性尿路感染的主要肠球菌, 屎肠球菌表现为多重耐药, 粪肠球菌携带更多的毒力因子, 屎肠球菌毒力基因数与耐药性之间密切相关, 临床应注意抗菌药物的合理应用, 防止肠球菌耐药性的产生和传播。

【关键词】 尿路感染; 屎肠球菌; 粪肠球菌; 毒力基因; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.21.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)21-3140-04

Correlation of drug resistance with virulence genotypes of Enterococcus in hospital acquired urinary tract infection*

HUANG Xiao-li^{1,2}, ZHAO Rui-ke², LI Yan-meng², YU Jia-jia², ZHANG Xian-feng², QIAN Xue-feng², HAN Qing-zhen², XU Jie^{2△} (1. Department of Clinical Laboratory, Sihong County People's Hospital, Suqian, Jiangsu 223900; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Suzhou University/Jiangsu Provincial Research Institute of Clinical Immunology, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

【Abstract】Objective To investigate the distribution of virulence factors and drug resistance of Enterococcus in hospital-acquired urinary tract infections, and their correlation to provide the basis for rationally using antibacterial drugs and controlling infection. **Methods** 74 strains of Enterococcus isolated from clinical specimens of urinary tract infection were performed the bacterial strain identification and the antimicrobial susceptibility test was conducted by the K-B method. Virulence genes of *cyll-L*, *cyll-S*, *cyll-A*, *esp*, *acm*, *gelE*, *asa-I*, *cpd* and *ace* were detected by PCR. **Results** Among 74 strains of enterococcal, 45(60.8%) strains and 29(39.2%) strains were *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively. The resistance rates of Enterococci isolates to penicillin G, ampicillin and ciprofloxacin were 89.66%, 89.66% and 79.3%, which were significantly higher than that of *E. faecalis*. Among *E. faecalis*, the resistance rate was 46.67% to gentamicin, 53.33% to tetracycline, which were slightly higher than that of *E. faecium*. The positive rates of *cyll-L*, *cyll-S*, *cyll-A*, *esp*, *acm*, *gelE*, *asa-I*, *cpd*, *ace* were 24.32%, 44.59%, 22.97%, 44.59%, 60.81%, 22.97%, 25.67%, 22.97% and 9.46%, respectively. A significant correlation was found between distribution of virulence genes and antimicrobial resistance of *E. faecium* ($P < 0.05$). **Conclusion** *E. faecalis* is the predominant species in hospital-acquired urinary infection; the majority of *E. faecium* was multidrug-resistant; *E. faecalis* has more virulence genes than *E. faecium*. There is a close relationship between the virulence genes and the drug resistance. Thus it is necessary for clinic to pay attention to the reasonable use of antibacterial drugs so as to prevent the emergence and spread of Enterococcus.

【Key words】 urinary tract infections; *E. faecium*; *E. faecalis*; virulence gene; drug resistance

尿路感染(UTI)是在住院患者中最常见的院内感染, 并且大部分的泌尿道感染都与肠球菌有关, 这与尿路器械操作、留置导尿、尿路结构异常有关, 是重要的医院感染病原菌。肠球菌属共包括 18 个菌属, 从人类分离到的主要是粪肠球菌和屎

肠球菌两种, 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%), 泌尿系统次之(29.2%)^[1]。由于临床上抗菌药物的广泛使用, 导致多重耐药菌株广泛流行, 给临床的治疗带来困难。本研究对医院获得性尿路感染肠球菌耐药和毒

* 基金项目: 江苏省卫生厅医学科研项目(Q201401); 江苏省研究生培养创新工程项目(KYLX-1261); 苏州市“科教兴卫”青年课题项目(kjxw2014008)。

作者简介: 黄小丽, 女, 硕士, 主管检验师, 主要从事临床细菌耐药与致病机制研究。△ 通讯作者, E-mail: xuj2007@lzu.edu.cn。

力基因型的分布及相互关系进行研究,为临床合理使用抗菌药物和控制感染提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源 选择 2013 年 10 月至 2014 年 9 月苏州大学附属第一医院住院患者(住院时间不低于 7 d)的尿路感染标本中分离的肠球菌,共 74 株。同一患者同类标本同一时期分离到的同种菌株不重复计入。

1.1.2 鉴定与药物敏感试验 分离出的细菌均经法国 Bio-Merieux 公司 VITEK II Compact 鉴定,保存于-70℃。有效期内用于抗菌药物体外敏感试验的药物敏感试验纸片:青霉素 G(P)、万古霉素(VAN)、环丙沙星(CIP)、替考拉宁(TEC)、氨苄西林(AMP)、庆大霉素 120(CN)、四环素(TET)、利奈唑胺(LZD),均购自英国 OXOID 公司。

1.2 方 法

1.2.1 药物敏感试验 采用纸片扩散法(K-B 法),结果参照 2011 版美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准,对 74 株尿路感染肠球菌进行药物敏感性判定。

1.2.2 DNA 模板的制备 水煮法制备 DNA 模板,99℃,煮 10 min,12 000 r/min,离心 5 min,取上清液作为 PCR 模板,-20℃放置备用。

1.2.3 PCR 反应体系及条件 反应体系 25 μL,进行 30 个循环,退火温度、扩增长度及引物序列见表 1。cylL-L、cylL-S、cylL-A、esp、acm、gelE、asa-I、cpd、ace 基因的引物^[2-4]均由华大基因有限公司合成。PCR 产物凝胶电泳根据条带长度进行判定。

1.3 统计学处理 Excel 2010 与 IBM SPSS 21.0 数据处理,统计分析,菌株耐药统计分析时设定为“1”,敏感设定为“0”;毒力基因有为“1”,无为“0”。利用 SPSS 21.0 软件双变量相关性分析,对分离株的多种药耐药率和毒力基因数关系进行分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肠球菌对 8 种常见抗菌药物耐药情况 74 株肠球菌分离出 45 株粪肠球菌(60.8%)和 29 株屎肠球菌(39.2%),两种肠球菌对 8 种常见抗菌药物显示出差异性的耐药率,见表 2。屎肠球菌对青霉素 G、氨苄西林、环丙沙星高度耐药,耐药率依次为 89.66%、89.66%、79.31%;粪肠球菌对庆大霉素 120、四环素耐药率略高于屎肠球菌;74 株肠球菌对万古霉素、利奈唑胺和替考拉宁全敏感。

2.2 肠球菌分离株毒力基因分布 毒力基因分布结果显示:74 株肠球菌毒力基因 cylL-L、cylL-S、cylL-A、esp、acm、gelE、asa-I、cpd、ace 的总阳性率分别为 24.32%、20.27%、22.97%、

44.59%、60.81%、13.51%、25.67%、22.97%、9.46%(表 3)。除了 esp、acm 两毒力基因的阳性率是屎肠球菌大于粪肠球菌,其余毒力基因的阳性率均是粪肠球菌大于屎肠球菌。74 株肠球菌中 acm 基因携带率最高,为 60.81%,esp 次之为 44.59%,ace 携带率最低。统计分析显示,粪肠球菌和屎肠球菌不同毒力基因的检出率之间除了 gelE、ace、esp 毒力基因差异无统计学意义(P>0.05)外,其余差异均有统计学意义(P<0.05)。74 株肠球菌中含有一种毒力基因或多种不同毒力基因,其构成比见表 4;含有一种毒力基因比率最高为 41.89%(31/74),含有两种的毒力基因的比率次之(19/74),含有 4 种毒力基因的比率最少为 2.70%(2/74)。

2.3 毒力基因分布与耐药性之间的关系 毒力基因分布与耐药性关系 SPSS 21.0 软件双变量相关性分析结果显示,屎肠球菌毒力基因分布数与耐药性间呈负相关,相关系数(r)为-0.601,差异有统计学意义(P<0.01)。表明:屎肠球菌毒力基因分布数越多的菌株,出现多重耐药的几率就越小,即其耐药性降低。粪肠球菌毒力基因分布数与耐药性间的 r 为 0.086,差异无统计学意义(P=0.086),粪肠球菌携带毒力基因数的多少与抗菌药物的耐药性之间不存在关联。

表 1 本研究所用的引物

基因类型	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)	退火温度(℃)
cylL-L-F	AACTAAGTGTGAGGAAATG	159	52
cylL-L-R	AAAGACACAACACTACAGTTAC		
cylL-S-F	AGAACTTGTGTGGTCCCTTC	134	52
cylL-S-R	GCTGAAAATAATGCACCTAC		
cylL-A-F	ACAGGTTATGCATCAGATCT	507	52
cylL-A-R	AATTCACCTCTTGAGCAATC		
esp-F	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG	500	50
esp-R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG		
acm-F	GGCCAGAAACGTAACCGATA	353	51
acm-R	CGCTGGGGAAATCTTGTA		
gelE-F	AATTGCTTTACACGGAACGG	548	52
gelE-R	GAGCCATGGTTTCTGGTTGT		
asa-I-F	GCACGCTATTACGAACATATGA	375	52
asa-I-R	TAAGAAAGAACATCACCACGA		
cpd-F	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC	782	52
cpd-R	TACGGCTCTGGCTTACTA		
ace-F	GGAATGACCGAGAACGATGGC	616	52
ace-R	GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG		

表 2 尿路感染的粪肠球菌与屎肠球菌的耐药率

抗菌药物	粪肠球菌(n=45)		屎肠球菌(n=29)		肠球菌(n=74) 总耐药率(%)	P	备注
	分离菌株(n)	耐药率(%)	分离菌株(n)	耐药率(%)			
青霉素 G	24	53.33	26	89.66	65.75	0.001	青霉素类
氨苄西林	22	48.89	26	89.66	64.86	0.000	青霉素类
万古霉素	0	0.00	0	0.00	0.00	—	糖肽类
庆大霉素 120	21	46.67	11	37.93	43.24	0.464	氨基糖苷类

续表 2 尿路感染的粪肠球菌与尿肠球菌的耐药率

抗菌药物	粪肠球菌(n=45)		尿肠球菌(n=29)		肠球菌(n=74)	P	备注
	分离菌株(n)	耐药率(%)	分离菌株(n)	耐药率(%)	总耐药率(%)		
利奈唑胺	0	0.00	0	0.00	0.00	—	噁唑烷酮类
四环素	24	53.33	6	20.69	40.54	0.005	四环素类
环丙沙星	23	51.11	23	79.31	62.16	0.014	氟喹诺酮类
替考拉宁	0	0.00	0	0.00	0.00	—	糖肽类

注：—表示未统计。

表 3 肠球菌毒力基因分布

毒力基因型	粪肠球菌(n=45)		尿肠球菌(n=29)		肠球菌(n=74)	P
	阳性菌株	阳性率(%)	阳性菌株	阳性率(%)	总阳性率[n(%)]	
cylL-L	15	33.33	3	10.34	18(24.32)	0.024
cylL-S	13	28.89	2	6.90	15(20.27)	0.021
cylL-A	15	33.33	2	6.90	17(22.97)	0.008
esp	16	35.56	17	58.62	33(44.59)	0.055
acm	20	44.44	25	86.21	45(60.81)	0.000
gelE	8	17.78	2	6.9	10(13.51)	0.186
asa-I	17	37.78	2	6.90	19(25.67)	0.003
cpd	14	31.10	3	10.34	17(22.97)	0.039
ace	5	11.11	2	6.90	7(9.46)	0.534

表 4 74 株肠球菌不同毒力基因构成比

毒力基因种类	菌株数	构成比(%)
0	5	6.77
1	31	41.89
2	19	25.68
3	3	4.05
4	2	2.70
5	4	5.41
6	4	5.41
7	3	4.05
8	3	4.05
合计	74	100.00

3 讨论

肠球菌广泛分布于自然界中,是健康人上呼吸道和肠道的常居菌,也是近年医院感染的常见病原菌。本研究分离出长期住院患者(≥7 d)尿路感染 74 株肠球菌,其中粪肠球菌 45 株(60.8%),尿肠球菌 29 株(39.2%),与国内临床上报道的粪肠球菌分离率(60%~70%)高于尿肠球菌(30%~40%)的结果基本相一致^[5-7]。

肠球菌药物敏感试验结果显示:肠球菌对青霉素类耐药率最高,达 65.75%,对糖肽类和噁唑烷酮类则 100%敏感。肠球菌对糖肽类高水平耐药,自 1988 年就有报道,并已在全球范围内逐渐播散。本试验未分离出耐万古霉素肠球菌(VRE),说

明本地区的肠球菌还对糖肽类抗菌药物保持高度敏感性。医院感染中常见的粪肠球菌和尿肠球菌有着不同的耐药特点。本研究发现,尿肠球菌对青霉素 G、氨苄西林、环丙沙星高度耐药,耐药率分别为 89.66%、89.66%、79.31%;粪肠球菌对庆大霉素 120、四环素耐药率略高于尿肠球菌;本试验结果与全国结果相近^[8]。

肠球菌具有一系列特异性毒力因子,常常由位于染色体上的致病岛基因编码^[9]。这些毒力基因有助于细菌突破宿主的免疫防御系统,定植于泌尿道甚至侵入尿道上皮细胞,从而导致泌尿道感染^[10]。肠球菌毒力基因中,acm 分离率最高,为 60.81%,尿肠球菌中 acm 分布率达 86.21%。esp 基因分离率次之,为 44.59%,尿肠球菌中 esp 基因分布率达 58.62%。除了这两毒力基因的分离率是尿肠球菌多于粪肠球菌外,其余均是粪肠球菌多于尿肠球菌。尿肠球菌的 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 型的胶原蛋白的黏附能力,被认为与尿肠球菌的临床侵袭性高度相关^[1]。这种基因的高携带率为肠球菌黏附、定植于尿道中提供了依据。esp 基因被证实与毒力增强和生物被膜的形成有关^[1]。细菌生物膜在慢性和迁延性感染中起着重要的作用^[11]。

cylL-L、cylL-S、cylL-A 这 3 种基因为溶血素基因,该基因位于质粒或染色体上的致病岛区域,编码肠球菌溶血素,其产生过程很复杂^[12]。粪肠球菌的 cylL-L、cylL-S、cylL-A 溶血素基因阳性率分别为 33.33%、28.89%、33.33%,远高于尿肠球菌的 10.34%、6.90%、6.90%。这也与分离出的粪肠球菌大部分有 β 溶血环有关。

gelE 基因编码明胶酶 E,该酶是一种 Zn 金属蛋白酶,可以酶解宿主细胞壁和细胞间质中的胶原蛋白,与肠球菌向周围感染有关^[13]。本研究中 gelE 基因在粪肠球菌中的阳性率远大于尿肠球菌,这与国外部分研究报道结果一致^[14-15]。也有关于尿肠球菌中 gelE 基因阳性率较低报道^[16],也曾有报道尿肠球菌中未分离出 gelE 基因^[17]。

asa-I、cpd、ace 基因分别与编码聚集物质、性激素类物质、黏胶蛋白有关。本研究中分离出此 3 种基因的阳性率粪肠球菌明显高于尿肠球菌。这也与国际上的一些学者做出的结果相一致^[18-20]。虽然有学者认为,ace 基因可以作为针对人尿路感染的一个药物治疗靶点^[21],但是本研究结果显示 ace 的 P 值为 0.534,差异无统计学意义。

耐药数与毒力基因数之间的相关性显示:尿肠球菌毒力基因数与耐药性之间呈负相关。尿肠球菌越耐药,携带的毒力基因数越少。这可能和 PAIs 基因突变,毒力基因减少,细菌的致病性减弱,低致病性菌株可以更长时间在免疫力低下的人中

定植或共栖存在,从而增加细菌获得耐药基因的概率。粪肠球菌毒力基因分布数与耐药性间的 r 为 0.086,差异无统计学意义($P>0.05$)。表明粪肠球菌携带毒力基因数的多少与抗菌药物的耐药性之间不存在关联。这与国内祝进等^[22]的实验结果一致。

综上所述,医院获得性尿路感染性肠球菌中粪肠球菌感染多于屎肠球菌感染。粪肠球菌毒力基因分布大于屎肠球菌,进一步证实了该菌在尿路感染中的地位。屎肠球菌中的毒力基因数与耐药性之间密切相关,尿路感染肠球菌分离出的屎肠球菌大多表现为多重耐药,这与抗菌药物的选择压力下耐药性相关质粒的获得与丢失有关。屎肠球菌中 *acm*, *esp* 基因分离率最高,增强了屎肠球菌在尿路中的黏附、定植与迁延能力,引起医院获得性尿路感染,易于在院内传播和扩散。所以医院要关注和加强肠球菌的耐药与毒力基因携带情况的监测,规范、合理使用抗菌药物,防止耐药菌株的产生和传播。

参考文献

[1] 王立,刘长庭. 临床肠球菌属耐药特点和毒力基因的研究进展[J]. 检验医学与临床,2014,11(9):1259-1261.

[2] Persing DH, Tenover FC. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications[M]. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2010:547-552.

[3] Camargo IL, Gilmore MS, Darini AL. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil[J]. Clin Microbiol Infect, 2006,12(11):1123-1130.

[4] Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, et al. Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of North west of Iran[J]. Open Microbiol J, 2012,6:34-39.

[5] 吴敏,陈清,胡族琼,等. 粪肠球菌和屎肠球菌临床分离株的毒力因子与耐药性分析[J]. 热带医学杂志,2008,8(5):433-435.

[6] 郭晓霞. 肠球菌的感染特性及耐药性特点分析[J]. 海峡药学,2012,24(2):208-209.

[7] 陈泳,张丽华,郭主声,等. 424 株临床分离肠球菌属细菌的耐药性变异[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(1):36-38.

[8] 朱德妹,汪复,胡付品. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2011,11(5):321-329.

[9] Mannu L, Paba A, Daga E, et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin[J]. Int J Food Microbiol, 2003,88(2):291-304.

[10] Salminen S, Von Wright A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects[M]. 3rd ed. Virginia: CRC Press, 2004:396.

[11] Tapiainen T, Hanni AM, Salo J, et al. *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infec-

tions in children[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014,33(1):111-115.

[12] Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin[J]. Toxins, 2013,5(5):895-911.

[13] Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, et al. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins[J]. J Bacteriol, 2003,185(12):3613-3623.

[14] Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2001,67(4):1628-1635.

[15] Sabia C, De Niederhäusern S, Guerrieri E, et al. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources[J]. J Appl Microbiol, 2008,104(4):970-979.

[16] Billström H, Lund B, Sullivan Å, et al. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008,32(5):374-377.

[17] Vankerkhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*[J]. J Clin Microbiol, 2004,42(10):4473-4479.

[18] Waar K, Muscholl-Silberhorn AB, Willems RJ, et al. Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates[J]. J Infect Dis, 2002,185(8):1121-1127.

[19] Abriouel H, Omar NB, Molinos AC, et al. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples[J]. Int J Food Microbiol, 2008,123(1):38-49.

[20] Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy[J]. Food Control, 2008,19(9):886-892.

[21] Lebreton F, Riboulet-Bisson E, Serror P, et al. Ace, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence[J]. Infect Immun, 2009,77(7):2832-2839.

[22] 祝进,白永凤,陆军,等. 粪肠球菌毒力基因及耐药性分析[J]. 放射免疫学杂志,2012,25(3):276-279.