DOI:10.16016/j.1000-5404.201507147

重庆某院耐万古霉素屎肠球菌的分子流行病学研究和感染危险因素分析

马维佳,贾晓炯,徐绣宇,张莉萍 (400016,重庆,重庆医科大学附属第一医院检验科)

[摘要] **目的** 探究耐万古霉素屎肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*,VREfm)的毒力基因、转座子分型和危险因素。**方法** 收集本院2012年1月至2014年2月经微量肉汤稀释法验证的耐万古霉素屎肠球菌18株,采用梅里埃VITEK2对13种抗生素进行MIC检测;通过多重PCR检测Van耐药基因和7种毒力基因,重叠PCR分析耐药转座子Tn1546结构,多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)方法确定菌株序列型别,并采用回顾性病例对照分析进行危险因素调查。**结果** 18株VREfm基因型和表型均符合VanA型;所有菌株对青霉素、氨苄西林、环丙沙星等表现耐药,对替加环素、利奈唑胺和奎奴普丁-达福普汀表现敏感;毒力基因*acm*、*esp*、*hyl*检测率分别为94.4%、88.9%、83.3%;耐药转座子结构共检测到4种类型;MLST结果显示共有5种ST型别,均属于克隆复合体CC17。毒力基因*esp*、转院患者、尿路感染和万古霉素使用是VREfm感染的独立危险因素。**结论** 收集到的18株VREfm均为多重耐药菌,且均属于克隆复合体CC17。毒力基因*esp*检出率较高,且与万古霉素耐药显著相关。

[关键词] 万古霉素;肠球菌;药物耐受性;危险因素
[中图法分类号] R372; R378.12; R915 [文献标志码] A

Molecular epidemiology and infection risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a hospital in Chongqing region

Ma Weijia, Jia Xiaojiong, Xu Xiuyu, Zhang Liping (Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the virulence genes, resistance transposon types and infection risk factors of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) isolates. **Methods** Eighteen VREfm isolates were collected in our hospital from January 2012 to February 2014, and all isolates were validated by broth dilution susceptibility testing. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the 13 antimicrobial agents were tested by using VITEK 2 compact. The Van resistance genes and virulence genes were detected by multiplex PCR. The resistant transposon Tn1546 were analyzed by overlapping PCR, and the sequence type was identified by multilocus sequence typing (MLST). A case-control study was conducted to investigate the risk factors for VREfm infection. **Results** All 18 strains of VREfm showed the genotype and phenotype of VanA, had a 100% rate of resistance to penicillin, ampicillin, ciprofloxacin, and a 100% rate of sensitivity to tigecycline, linezolid and quinupristin/dalfopristin. PCR analysis revealed that the presences of virulence genes were 94.4% in *acm*, 88.9% in *esp*, and 83.3% in *hyl* in the VREfm isolates. There were 4 different transposon types of Tn1546 identified. MLST analysis identified 5 different sequence types, and all belonged to clonal complex 17 (CC17). The presence of virulence genes *esp*, referred patients, urinary tract infection, and prior use of vancomycin were independent risk factors for the acquisition of VREfm. **Conclusion** All 18

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471992)
[通信作者] 张莉萍,E-mail:Liuzhangcq@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1340.021.html(2015-12-04)

strains of VREfm are multi-drug resistant, and belong to CC17. The high presence of virulence gene *esp* is significantly associated with VREfm.

[**Key words**] vancomycin-resistant; Enterococcus; resistance mechanism; risk factors

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471992). Corresponding author: Zhang Liping, E-mail: Liuzhangcq@yahoo.com

肠球菌已逐渐成为院内感染的重要病原菌,尤以粪肠球菌和屎肠球菌多见。据2013年中国CHINET细菌耐药监测报道,肠球菌属细菌分离率高居阳性球菌第2位,其中屎肠球菌约占43.4%,且对所测试药物的耐药率均较高[1]。随着我国糖肽类抗生素的广泛使用,万古霉素耐药肠球菌感染逐年增多。本研究通过对我院2012年1月至2014年2月收集到VREfm菌株其耐药基因和毒力基因检测、Tn1546结构分析、多位点序列分型、危险因素调查来初步探索耐万古霉素屎肠球菌的耐药机制和流行情况,为临床预防和控制菌株的流行与传播提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2012年1月至2014年2月在重庆医科大学附属第一医院收集的耐万古霉素屎肠球菌18株,均为非重复菌株。根据万古霉素的药物敏感性检测结果分为两组:①耐药组:万古霉素耐药的屎肠球菌18株;②敏感组:按耐药组与敏感组1∶4的比例,选取同一科室、同一病种、同期住院患者感染的万古霉素敏感屎肠球菌(vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium*, VSEfm)72株作为对照组。以上全部菌株经Vitek2 Compact和Vitek MS全自动细菌鉴定系统鉴定。

从18株耐万古霉素屎肠球菌的送检科室来看,主要来源于神经内科7株,呼吸内科4株,胃肠外科、泌尿外科各2株,神经外科、肾内科、重症监护室各1株;从标本类型来看,尿液14株,分泌物2株,腹水和脑脊液各1株。

1.2 体外药物敏感性实验

采用Vitek2 Compact全自动细菌鉴定系统以及配套AST-GP67药敏鉴定卡对18株耐万古霉素屎肠球菌用以下13种抗生素进行药敏检测:万古霉素(VAN)、替考拉宁(TEC)、利奈唑胺(LZD)、青霉素(PEN)、氨苄西林(AMP)、替加环素(TGC)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LEV)、奎奴普丁-达福普汀(Q/D)、红霉素(ERY)、四环素(TET)、高水平耐药的庆大霉素(HLG)、高水平耐药的链霉素(HLS)。采用微量肉汤稀释法对万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺的MIC进行检测,将万古霉素MIC≥32 mg/L的菌株判定为耐药,其判读标准及结果解释参照美国CLSI 2012年版规则[2]。

1.3 万古霉素耐药基因及毒力基因检测

用细菌基因组DNA试剂盒提取DNA,采用多重PCR方法对18株耐万古霉素屎肠球菌分别检测VanA、VanB、VanC1和VanC2/3四种耐药基因。同样采用多重PCR方法分别对18株耐万古霉素屎肠球菌和72株万古霉素敏感屎肠球菌检测7种毒力基因:*asa*1、*gelE*、*cylA*、*esp*、*hyl*、*sagA*、*acm*。耐药基因及毒力基因引物按文献[3-7]设计,并由上海立菲生物有限公司进行合成。PCR反应在PCR扩增仪中进行,反应体系的总体积为25 μL,其中10×buffer(含Mg^{2+})2.5 μL、dNTP(2.5 mmol/L)2.0 μL、*Taq* DNA聚合酶(10 U/μL)0.15 μL、正、反向引物(10 μmol/L)各1 μL、模板DNA 2 μL,最后用无菌蒸馏水补足。反应条件:预变性,95 ℃ 5 min;30个循环(变性:94 ℃ 30 s;退火:50 ℃ 1 min;延伸:72 ℃ 1 min);延伸,72 ℃ 10 min。PCR产物经上海立菲生物有限公司进行测序。

1.4 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)

提取18株耐万古霉素屎肠球菌基因组DNA,用PCR方法分别扩增屎肠球菌7组管家基因(adk、atpA、ddl、gdh、gyd、pstS、purkS)。PCR产物均送至上海立菲生物有限公司进行双向测序,产物序列与肠球菌MLST数据库(http://www.mlst.net/)数据进行比对,每个管家基因可得到相应的等位基因号(allele number),根据7个等位基因号的组合得到每株细菌的序列分型(sequence type,ST)。

1.5 重叠PCR方法扩增万古霉素耐药转座子Tn1546

采用重叠PCR方法扩增万古霉素耐药转座子Tn1546结构的基因片段,包括orf1-5、orf1-3、orf2-vanR、vanR-vanS、vanS-vanH、vanH-vanA-vanX、vanX-vanY和vanY-vanZ(各基因引物详见文献[3,8])。扩增条件:反应体系的总体积为30 μL,包括Premix Taq 15 μL,正、反向引物(0.4 μmol/L)各1.2 μL,DNA模

板1.5 μL,最后用无菌蒸馏水补足。反应条件:预变性,94 ℃ 5 min;30 个循环(变性:94℃ 30 s;退火:50℃ 30 s;延伸:72 ℃ 1 min);延伸,72 ℃ 10 min。将以上扩增的PCR产物送至上海立菲生物有限公司进行双向测序,产物序列与屎肠球菌 BM4147 菌株的Tn1546转座子序列进行比对。

1.6 危险因素调查

危险因素调查是针对我院2012年1月至2014年2月 VREfm 感染的患者病例资料进行回顾性分析。选取18例耐万古霉素屎肠球菌的感染患者为病例组,72例万古霉素敏感屎肠球菌的感染患者为对照组。患者相关病例资料信息均来自于我院电子病历系统和LIS系统。统计变量包括:年龄、性别、病房类型、ICU入住、慢性基础疾病、手术史、侵入性置管、肠外营养以及先前抗生素使用等。

1.7 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件进行分析。计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法,计量资料采用两独立样本 t 检验或非参数秩和检验进行单因素分析,计算出 P 值、危险系数(OR 值)和95%可信区间(95% CI)。将以上单因素分析中 $P\leqslant 0.10$ 的变量采用 Logistic 回归模型中逐步前进法(条件)进行多因素分析,并得出 P 值、OR 值和95% CI。

2 结果

2.1 体外药物敏感性试验分析结果

18株耐万古霉素屎肠球菌对万古霉素和替考拉宁均呈现高水平耐药(VAN ≥ 128 μg/mL、TEC ≥ 32 μg/mL)。从药敏结果来看,所有菌株对青霉素、氨苄西林、环丙沙星、左氧氟沙星、红霉素表现耐药,对利奈唑胺、奎奴普丁达福普汀、替加环素表现敏感,其中14株对四环素表现为敏感,约占77.8%。所有菌株同时对3种以上抗菌药物表现为多重耐药(表1)。

表1 18株耐万古霉素屎肠球菌药敏结果

编号	最小抑菌浓度(mg/L)											HLG	HLS
	VAN	TEC	LZD	PEN	AMP	TGC	CIP	LEV	Q/D	ERY	TET		
1	256	128	2	>64	>32	<0.12	4	>8	0.5	>8	>16	R	S
2	512	64	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	R	S
3	256	32	2	>64	>32	<0.12	4	>8	0.5	>8	<1	R	S
4	512	64	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	>16	R	S
5	512	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	2.0	>8	2	S	S
6	256	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	R	S
7	256	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	2.0	>8	2	S	S
8	512	128	2	32	>32	<0.12	>8	>8	2.0	>8	<1	R	S
9	256	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	R	S
10	128	64	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	R	R
11	128	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	1.0	>8	2	R	R
12	128	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	S	S
13	512	128	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	R	S
14	256	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	R	S
15	256	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	>16	R	R
16	256	32	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	R	S
17	512	128	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	<1	R	S
18	512	64	2	>64	>32	<0.12	>8	>8	0.5	>8	>16	R	R

LZD:利奈唑胺;VAN:万古霉素;PEN:青霉素;AMP:氨苄西林;TGC:替加环素;CIP:环丙沙星;LEV:左氧氟沙星;Q/D:奎奴普丁-达福普汀;ERY:红霉素;TET:四环素;HLG:高水平耐药的庆大霉素;HLS:高水平耐药的链霉素;R:耐药;S:敏感

2.2 万古霉素耐药基因和毒力基因检测结果

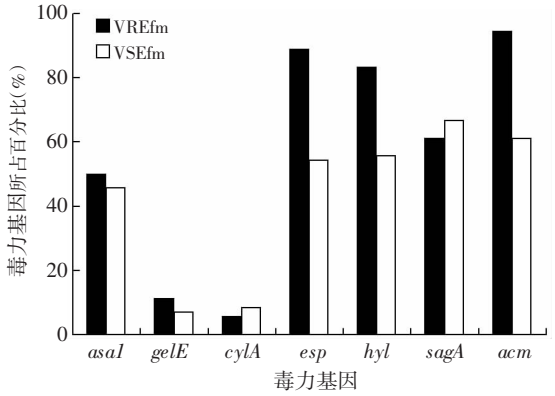
18 株 VREfm 菌株经 PCR 反应扩增,均为 VanA 耐药基因阳性表达,其产物测序结果与 GenBank 序列数据库比对完全一致(GenBank M97297),未检测到 VanB、VanC1 和 VanC2/3 等耐药基因表达。

将 18 株 VREfm 实验组和 72 株 VSEfm 对照组分别进行毒力基因检测,其结果显示 7 种毒力基因在两组中分布各不相同。从 18 株 VREfm 实验组来看,检出率最高的毒力基因分别为 *acm* 94.4%(17/18)、*esp* 88.9%(16/18)、*hyl* 83.3%(15/18)、*sagA* 61.1%(11/18)、*asa*1 50.0%(9/18),而 *gelE* 和 *cylA* 的检出率仅为 11.1%(2/18)和 5.6%(1/18)。从基因分布来看,VREfm 实验组中约有 77.8 %(14/18)的菌株同时表达 *acm*、*esp* 和 *hyl* 3 种毒力基因,相反,VSEfm 对照组中 3 种基因同时表达阳性的菌株仅占 36.1% (26/72)。此外,VSEfm 对照组中约有 14.5%(10/72)的菌株 *acm*、*esp* 和 *hyl* 3 种毒力基因均未检出,而 VREfm 实验组中未检出上述 3 种基因的仅有一株。见表 2、图 1。

表 2 18 株耐万古霉素屎肠球菌毒力基因分布结果

编号	菌株号	毒力基因						
		esp	*hyl*	*asa*1	*gelE*	*cylA*	*sagA*	*acm*
1	N03194	+	+	−	−	−	−	+
2	N04065	+	+	+	−	−	+	+
3	N04216	+	+	−	−	−	−	+
4	N06208	−	−	−	+	−	+	−
5	N00284	+	+	+	−	−	−	+
6	P00512	+	+	+	−	−	−	+
7	N00514	+	−	+	−	−	+	+
8	N00760	+	+	+	−	−	−	+
9	P01140	+	−	−	+	−	+	+
10	N01518	+	+	+	−	−	+	+
11	N01690	+	+	−	−	−	−	+
12	N04213	+	+	+	−	−	−	+
13	P11120	−	+	+	−	+	+	+
14	N00010	+	+	−	−	−	+	+
15	P14242	+	+	−	−	−	+	+
16	N00328	+	+	−	−	−	+	+
17	N00578	+	+	−	−	−	+	+
18	N10432	+	+	+	−	−	+	+

esp:肠球菌表面蛋白;*hyl*:透明质酸酶;*asa*1:凝胶物质;*gelE*:明胶酶;*cylA*:细胞溶素;*sagA*:分泌抗原;*acm*:屎肠球菌胶原结合蛋白



*asa*1:凝胶物质;*gelE*:明胶酶;*cylA*:细胞溶素;*esp*:肠球菌表面蛋白;*hyl*:透明质酸酶;*sagA*:分泌抗原;*acm*:屎肠球菌胶原结合蛋白;VREfm:耐万古霉素屎肠球菌;VSEfm:万古霉素敏感屎肠球菌

图 1 7 种毒力基因在 VREfm 组和 VSEfm 组的分布情况

2.3 MLST 分析结果

MLST 结果显示,18 株耐万古霉素屎肠球菌共检出 5 种 ST 型别(ST17、ST18、ST78、ST262 和 ST341),均属于克隆复合体 CC17。其中 11 株(61.1%)为 ST17,3 株(16.7%)为 ST18,2 株(11.1%)为 ST78,ST262 和 ST341 各 1 株,见表 3。通过 MEGA 软件对 MLST 结果进行进化树分析,其结果显示,11 株 ST17 型别菌株属于同源,而 ST18 与 ST262 型别亲缘关系较近,分布于神经内科和呼吸内科;ST78 与 ST341 型具有一定亲缘关系,分布于神经内科。

2.4 万古霉素耐药转座子 Tn1546 结构分析

通过多对引物对耐药转座子 Tn1546 不同区域的扩增、拼接、测序和比对发现,18 株耐万古霉素屎肠球菌可分为 4 种转座子类型,其中 C 型所占比例最多(8/18),其余依次是 D 型(6/18)、A 型(2/18) 和 B 型(2/18),见表 3。从转座子 Tn1546 结构类型来看,A 型主要在 orf1 基因的下游存在部分缺失;B 型与 A 型存在相似的缺失,但 B 型在 vanX 及 vanY 基因之间的 8 731 号位点处反向插入了 1 个插入序列 1216V,该序列插入后造成了 8 732 ~ 8 832 区域片段的缺失;C 型主要是存在 orf1 基因的完全缺失,并在 8 745 号位点处反向插入了相同的插入序列 IS1216V,由于 vanX 与 vanY 基因之间存在不同的缺失片段,将 C 型分为 C1 和 C2 型,C1 型为 8 746 ~ 9 019 区域片段的缺失,C2 型为 8 746 ~ 8 832 区域片段的缺失;D 型主要是存在 orf1、orf2、vanR 和 vanS 基因的完全缺失,并在 8 684 号

位点处存在反向插入序列 IS1216V 以及 8 685 ~ 8 828 区域片段的缺失。

表 3 18 株耐万古霉素屎肠球菌的临床特征、分子流行病学结果

编号	标本号	分离日期	标本类型	病区分布	分子流行病学		
					STs	CC	Tn1546
1	N03194	2012-05	尿液	神经内科	18	17	C1
2	N04065	2012-06	尿液	呼吸内科	17	17	C2
3	N04216	2012-06	尿液	呼吸内科	17	17	D
4	N06208	2012-09	尿液	呼吸内科	18	17	A
5	N00284	2013-01	尿液	神经内科	78	17	C1
6	P00512	2013-01	腹水	胃肠外科	17	17	B
7	N00514	2013-01	尿液	神经内科	78	17	C1
8	N00760	2013-01	尿液	神经内科	262	17	C1
9	P01140	2013-01	分泌物	胃肠外科	17	17	D
10	N01518	2013-02	尿液	神经内科	17	17	C2
11	N01690	2013-03	尿液	神经内科	17	17	C2
12	N04213	2013-05	尿液	重症监护室	17	17	C2
13	P11120	2013-09	脑脊液	神经外科	17	17	A
14	N00010	2013-10	尿液	神经内科	341	17	D
15	P14242	2013-10	分泌物	呼吸内科	18	17	D
16	N00328	2013-11	尿液	肾脏内科	17	17	D
17	N00578	2013-11	尿液	泌尿外科	17	17	D
18	N10432	2013-12	尿液	泌尿外科	17	17	B

STs:MLST 序列分型;CC:克隆复合体;Tn1546:耐药转座子结构分型

2.5 危险因素分析

对 18 例实验组和 72 例对照组病例资料进行了相关危险因素的调查分析,其单因素分析结果显示:毒力基因(*esp*、*hyl*、*acm*)、转院患者、入住 ICU、尿路感染、肠外营养、引流管和万古霉素使用等变量其差异具有统计学意义($P<0.05$),是耐万古霉素屎肠球菌感染的主要危险因素。将单因素分析中 $P\leqslant0.10$ 的变量代入 Logistic 回归中进行多因素分析,其结果显示:毒力基因 *esp*($OR=6.65$;$P=0.027$),转院患者($OR=7.58$;$P=0.006$)、尿路感染($OR=4.89$;$P=0.038$)和万古霉素使用($OR=4.75$;$P=0.025$)是耐万古霉素屎肠球菌感染的独立危险因素(表 4、5)。

表 4 耐万古霉素屎肠球菌危险因素的单因素分析结果

危险因素	VREfm 病例组 ($n=18$)	VSEfm 对照组 ($n=72$)	*OR* 值	*P* 值
毒力基因				
*asa*1	9(50.0)	33(45.8)	1.18(0.42~3.32)	0.80
gelE	2(11.1)	5(6.9)	1.68(0.30~9.43)	0.62
cylA	1(5.6)	6(8.3)	0.65(0.07~5.74)	0.68
esp	16(88.9)	39(54.2)	6.77(1.45~31.62)	0.007
hyl	15(83.3)	40(55.6)	4.00(1.06~15.03)	0.03
sagA	11(61.1)	48(66.7)	0.79(0.27~2.28)	0.78
acm	17(94.4)	44(61.1)	10.82(1.36~8.56)	0.009
宿主相关危险因素				
年龄≥60 岁	14(77.8)	49(68.1)	1.64(0.49~5.55)	0.57
男性	13(72.2)	48(66.7)	1.30(0.42~4.07)	0.78
外科病房	13(72.2)	43(59.7)	1.75(0.56~5.45)	0.42
转院患者	14(77.8)	27(37.5)	5.83(1.74~19.55)	0.003
入住 ICU	9(50.0)	17(23.6)	3.24(1.11~9.45)	0.04
高血压	6(33.3)	21(29.2)	1.21(0.40~3.66)	0.78
糖尿病	5(27.8)	16(22.2)	1.35(0.42~4.34)	0.76
冠心病	3(16.7)	8(11.1)	1.60(0.38~6.76)	0.69
恶性肿瘤	7(38.9)	15(20.8)	2.42(0.80~7.30)	0.13
手术史	11(61.1)	39(54.2)	1.33(0.46~3.82)	0.60
尿路感染	15(83.3)	35(48.6)	5.29(1.41~19.85)	0.009
肠外营养	5(27.8)	6(8.3)	4.23(2.12~15.96)	0.04
机械通气	6(33.3)	11(15.3)	2.77(0.86~8.95)	0.10
导尿管	14(77.8)	39(54.2)	2.96(0.89~9.87)	0.11
引流管	12(66.7)	29(40.3)	2.97(1.00~8.80)	0.06
静脉置管	7(38.9)	21(29.2)	1.55(0.53~4.53)	0.57
先前抗生素使用				
青霉素类	6(33.3)	15(20.8)	1.90(0.61~5.90)	0.35
头孢菌素类	11(61.1)	38(52.8)	1.41(0.49~4.04)	0.60
氨基糖苷类	5(27.8)	18(25.0)	1.15(0.36~3.69)	0.77
碳青霉烯类	6(33.3)	10(13.9)	3.10(0.95~10.15)	0.08
喹诺酮类	3(16.7)	9(12.5)	1.40(0.34~5.81)	0.70
利奈唑胺	2(11.1)	2(2.8)	4.38(0.57~33.44)	0.18
万古霉素	9(50.0)	14(19.4)	4.14(1.39~12.36)	0.01

表 5 耐万古霉素屎肠球菌危险因素的 Logistic 回归分析结果

危险因素	*P* 值	*OR* 值	95% 置信区间
毒力基因 *esp*	0.027	6.65	1.24~35.61
转院患者	0.006	7.58	1.81~31.85
尿路感染	0.038	4.89	1.09~21.85
万古霉素使用	0.025	4.75	1.21~18.57

采用逐步前进法(条件),$P\leqslant0.10$ 进入,$P\geqslant0.15$ 删除

3 讨论

肠球菌是临床较常见的一类条件致病菌,可导致人体多个部位的感染,近年来抗菌药物的广泛应用以及各种侵入性医用装置的使用,导致肠球菌对多种抗生素产生耐药以及其引起的医院感染逐渐增多[9]。自从20世纪80年代英国伦敦首次报道分离出万古霉素耐药肠球菌(VRE)以来,其感染率呈逐渐上升趋势,继而多个国家都出现了VRE的报道,相关研究也显示VRE多见于屎肠球菌[10-11,17]。目前万古霉素耐药肠球菌已成为医院感染的重要病原菌,而且该菌的传播流行对医院感染的预防和控制带来极大困难。

本研究初步探索了重庆医科大学附属第一医院2012年1月至2014年2月耐万古霉素屎肠球菌的耐药机制、菌株流行以及危险因素情况。本研究结果显示,18株实验菌均为VanA型耐药基因表达,从药敏结果来看,这些菌株对万古霉素和替考拉宁均表现高水平耐药,对青霉素、氨苄西林、环丙沙星、左氧氟沙星、红霉素均表现为耐药,值得注意的是,这些菌株对利奈唑胺、奎奴普丁-达福普汀、替加环素均表现为敏感。从MLST结果分析来看,18株实验菌共有5种ST型别(ST17、ST18、ST78、ST262和ST341),均属于同一个克隆复合体(clonal complex)CC17。CC17复合克隆体是医院中存在的优势菌群,分布在世界各地,通常表现对氨苄西林及喹诺酮类抗生素耐药,同时是多种毒力因子的致病岛,可携带*esp*和*hyl*等毒力基因,并且也有研究报道CC17复合克隆体与院内感染的爆发流行有关[12]。国内相关报道也显示,中国地区CC17复合克隆体的流行多与肠球菌对万古霉素获得性耐药有关[13]。此外,从菌株进化分析结果来看,ST17型菌株所占比例最高,达61.1%(11/18),来源于不同的临床科室,呈现散在的分布趋势,属于优势克隆。在其余7株实验菌型别中ST18(3株)与ST262(1株)型别亲缘关系较近,且主要分布在神经内科和呼吸内科;而ST78(2株)与ST341(1株)型别亲缘关系较近,均分布于神经内科,提示这4种型别存在相对集中的分布趋势。值得注意的是,神经内科所分离的耐万古霉素屎肠球菌比例高达44.4%(8/18),菌株之间具有一定的亲缘关系,这也提示我院神经内科耐万古霉素屎肠球菌分布相对较集中,建议临床应加强相关感染的控制和预防,从而进一步控制细菌耐药的产生和传播。

肠球菌对万古霉素的耐药是基于细胞壁肽糖前体末端的D-丙氨酸-D-丙氨酸发生变化,导致万古霉素无法与之结合而不能抑制细胞壁的合成。根据VRE对万古霉素和替考拉宁的耐药水平、诱导性及转移性的不同,可将VRE基因型分为6种:VanA、VanB、VanC(C1、C2、C3)、VanD、VanE和VanG。其中VanA型是对万古霉素及替考拉宁均为高水平耐药,VanB型是对万古霉素存在不同水平耐药,而对替考拉宁表现敏感,目前临床上爆发的VRE多属于VanA型[14-15]。由于VanA型耐药基因位于转座子Tn1546上,导致其更容易转移至其他肠球菌,从而促使万古霉素耐药在不同菌株之间传播和流行。有研究表明,虽然VanA型耐药基因在不同菌株之间是高度保守的,但其转座子Tn1546的整体结构上已存在不同的插入序列(IS)元件的插入和相关区域片段的缺失[16]。在本研究中发现,不同的克隆型别中均存在orf1基因的部分和完全缺失,同样vanX和vanY基因之间均存在IS1216V的反向插入,这说明在转座子中存在基因的水平转移和结构重排。然而,国外文献中广泛报道的在orf1基因中IS1216V序列的反向插入[3]以及orf2与vanR基因之间IS1542的插入[8],并没有在此次研究中发现。值得注意的是,我们发现了3种新的Tn1546转座子型别(A、C和D型),目前这3种型别在国内外文献中尚未报道。

我们通过对7种毒力基因的检测发现,在VREfm实验组中,*esp*、*hyl*和*acm*的检出率明显高于VSEfm对照组,其差异具有统计学意义。这说明屎肠球菌的上述3种毒力因子与其耐药存在相关性。国外研究报道,*esp*基因是导致肠球菌感染和耐药的重要毒力因子[18],与本研究中危险因素调查结果一致。该基因是临床菌株中最普遍存在的毒力因子,同时也是致病岛(pathogenicity,PAI)上重要的组成部分,相关实验也进一步证实了该基因能在尿路感染中发挥重要作用[17]。本研究结果显示,*esp*基因在VREfm临床分离株中检出率达88.9%,此外,*esp*基因阳性的菌株均对3种以上抗生素表现出多重耐药,这与国外相关报道一致[18]。

回顾性病例资料结果显示,转院患者是导致VREfm感染风险系数最高的独立危险因素($P=7.58$;$P=0.006$),从病例分析来看,约占77.8%的患者有先前院外治疗史,这类患者通常有住院时间长、基础疾病多且重、临床治愈率较低的特点,此外,在不同医院的治疗环境中,功能状态较差患者更容易受到多种院内致病菌的感染,其原因也可能与抗生素的选择性压力有关。因此,建议临床医生应更加谨慎地为转院患者选择抗生素种类以及制定感染防治措施。本研究还显示在万古霉素耐药组中存在尿路感染的患者比率高达

77.8%,差异具有统计学意义,其原因可能与患者接受泌尿系统的侵入性操作有关,如长期卧床患者接受导尿管留置,该操作可能会破坏患者机体的防御功能,促进定植菌的转移,从而增加耐药菌株感染的机会。临床资料也显示,18 例患者中有 9 例明确使用过万古霉素进行抗感染治疗,使用率高达 50%,此外,从药房数据分析来看,2012 – 2013 年我院神经内科的万古霉素使用量明显增加,也与 VREfm 菌株在神经内科分布最多(38.89%,7/18)相一致。其原因可能是由于位于接合性质粒上 VanA 耐药基因能够通过水平转移增加其传播性,而且长期使用该药也能增加肠球菌对万古霉素的耐药性。由此可见,万古霉素的不合理使用可能是导致耐药菌株出现的一个重要外因。

综上所述,本研究分析了我院分离的耐万古霉素屎肠球菌的耐药表型、毒力基因分布、转座子类型以及危险因素特点。18 株 VREfm 基因型和表型均为 VanA 型,且均属于克隆复合体 CC17,同时本研究还发现毒力基因 *esp*、转院患者、尿路感染和万古霉素使用是万古霉素耐药肠球菌感染的独立危险因素。因此,我们建议临床医生应严格把握抗菌药物的适应证,注重抗生素的合理使用,同时不断深入探究耐万古霉素肠球菌耐药机制和区域流行病学特点,从而加强耐药监控工作,为临床正确选择抗菌药物,提高临床治愈率,控制细菌耐药的产生和传播提供重要指导建议。

参考文献:

[1] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 365 – 374.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S23 [S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

[3] Oh J Y, An S, Jin J S, *et al*. Phenotypic and genotypic differences of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry in Korea[J]. J Microbiol, 2007, 45(5): 466 – 472.

[4] Teng F, Kawalec M, Weinstock G M, *et al*. A secreted antigen, SagA, exhibits broad-spectrum binding to extracellular matrix proteins and appears essential for growth[J]. Infect Immun, 2003, 71(9): 5033 – 5041.

[5] Nallapareddy S R, Singh K V, Murray B E. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis[J]. Infect Immun, 2008, 76(9): 4120 – 4128. DOI: 10.1128/IAI.00376-08

[6] Rice L B, Carias L, Rudin S, *et al*. A potential virulence gene, hlyEfm, predominates in of clinical origin[J]. J Infect Dis, 2003, 187(3): 508 – 512. DOI: 10.1086/367711

[7] Heikens E, Bonten M J, Willems R J. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of E1162[J]. J Bacteriol, 2007, 189(22): 8233 – 8240. DOI: 10.1128/JB.01205-07

[8] Yu H S, Seol S Y, Cho D T. Diversity of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci isolated from humans and poultry in Korea[J]. J Clin Microbiol 2003; 41(6): 2641 – 2643.

[9] 吕萍, 沈叙庄. 肠球菌的耐药性研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2006, 27(3): 132 – 135.

[10] Uttley A H, Collins C H, Naidoo J, *et al*. Vancomycin-resistant enterococci[J]. Lancet, 1988, 1(8575 – 6): 57 – 58.

[11] Pootoolal J, Neu J, Wright G D. Glycopeptide antibiotic resistance[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002, 42: 381 – 408.

[12] Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 52(3): 297 – 308. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x

[13] Qu T T, Yang Q, Shen P, *et al*. Novel vancomycin-resistance transposon, plasmid replicon types, and virulence factors of vancomycin-resistant Enterococci in Zhejiang, China [J]. Microb Drug Resist, 2012, 18(2): 183 – 188. DOI: 10.1089/mdr.2011.0140

[14] 李万祥, 刘秘, 吕火烊. 肠球菌耐万古霉素机制研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(5): 600 – 603.

[15] Song J Y, Cheong H J, Seo Y B, *et al*. Clinical and microbiological characteristics of vancomycin-resistant enterococci with the VanD phenotype and vanA genotype[J]. Jpn J Infect Dis, 2013, 66(1): 1 – 5. DOI: 10.7883/yoken.66.1

[16] Darini A L, Palepou M F, Woodford N. Effects of the movement of insertion sequences on the structure of VanA glycopeptide resistance elements in *Enterococcus faecium*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(5): 1362 – 1364.

[17] Arias C A, Murray B E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance[J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(4): 266 – 278. DOI: 10.1038/nrmicro2761

[18] Billstrom H, Lund B, Sullivan A, *et al*. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(5): 374 – 377. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.04.026

(**收稿**:2015-07-24;**修回**:2015-10-25)

(编辑 邓强庭)