

论 著

(临床研究)

## 尿路感染中肠球菌耐药性及毒力基因分析

朱 宏,高 硕,周 辉,张之烽,沈 瀚,张 燕,周万青

**【摘要】 目的** 研究尿路感染中肠球菌的耐药性及毒力基因携带情况。**方法** 收集临床中段尿分离肠球菌 88 株(包括 41 株粪肠球菌和 47 株屎肠球菌),采用微量肉汤稀释法和纸片扩散法检测菌株的药物敏感性;PCR 法检测肠球菌 6 种毒力基因 *cylA*、*esp*、*asal*、*hyl*、*gelE* 和 *agg*。**结果** 粪肠球菌对红霉素耐药率较高(70.73%),对其他检测抗生素的耐药率均低于 35%,检出利奈唑胺耐药菌株 1 株。屎肠球菌对青霉素、氨苄西林、左氧氟沙星的耐药率较高(分别为 95.74%、95.74%、93.62%),对红霉素、环丙沙星、莫西沙星的耐药率接近 90%,对其他检测药物耐药率较低。屎肠球菌对青霉素、氨苄西林、喹诺酮类及呋喃妥因的耐药率明显高于粪肠球菌( $P<0.05$ )。所有检测菌株中呋喃妥因耐药率明显高于磷霉素(21.59% vs 1.14%,  $P<0.05$ )。41 株粪肠球菌中均检出毒力基因,以 *gelE*、*asal*、*esp* 和 *cylA* 为主,未检出 *hyl* 基因;47 株屎肠球菌中 40 株检出毒力基因,其中仅检出 *esp* 和 *hyl* 2 种毒力基因,未检出其他 4 种毒力基因。粪肠球菌中 *cylA*、*asal*、*gelE* 和 *agg* 毒力基因的携带率均明显高于屎肠球菌( $P<0.05$ ),*hyl* 基因携带率则明显低于屎肠球菌( $P<0.05$ )。**结论** 尿路感染中屎肠球菌较粪肠球菌具有更高的耐药性,而粪肠球菌携带的毒力基因更多,磷霉素在尿路感染肠球菌中具有较低的耐药。

**【关键词】** 肠球菌;耐药性;毒力基因;尿路感染

**【中图分类号】** R446.5

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-271X(2019)05-0466-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.05.004

## Analysis of drug resistance and virulence genes of enterococci isolated from urinary tract

ZHU Hong, GAO Shuo, ZHOU Hui, ZHANG Zhi-feng, SHEN Han, ZHANG Yan, ZHOU Wan-qing

(Department of Laboratory Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

**【Abstract】 Objective** To study the drug resistance and virulence gene of Enterococci isolates obtained from urinary tract. **Methods** 88 Enterococci strains (including 47 strains of *E.faecium* and 41 strains of *E.faecalis*) were isolated from clinical midstream urine samples. The drug sensitivity were detected by broth dilution and disk diffusion methods. Six toxic genes *cylA*, *esp*, *asal*, *hyl*, *gelE* and *agg* of enterococcus faecalis were detected by PCR. **Results** The resistance rate of *E.faecalis* to erythromycin was 70.73%, while less than 35% to other antibiotics detected, and one linezolid-resistant strain was detected. The resistance rate of *E.faecium* to penicillin, ampicillin, and levofloxacin were 95.74%, 95.74% and 93.62%, respectively. The resistance rate to erythromycin, ciprofloxacin and moxifloxacin was close to 90%, while the resistance rate to other tested drugs was low. The resistance rate of *E.faecium* to penicillin, ampicillin, quinolones and furantoids were significantly higher than those of *E.faecalis* ( $P<0.05$ ). The resistance rate of furantoin was significantly higher than that of phosphorubicin in all 88 tested strains (21.59% vs 1.14%,  $P<0.05$ ). Virulence genes were detected in 41 stains of *E.faecalis*, with mainly *gelE*, *asal*, *esp* and *cylA*, but no *hyl* gene detected. Forty strains of 47 *E.faecium* were detected with virulence genes, in which only *esp* and *hyl* were detected. The virulence genes of *cylA*, *asal*, *gelE*, and *agg* detected in *E.faecalis* were significantly higher than those in *E.faecium* ( $P<0.05$ ), while the detection rate of *hyl* gene in *E.faecalis* was significantly lower than that in *E.faecium* ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The drug resistance rate of *E.faecium* isolated from urinary tract was higher than that of *E.faecalis*, while the rate of virulence gene carried by *E.faecalis* was higher

基金项目:南京市医学科技发展项目(QRX17143)

作者单位:210008 南京,南京大学医学院附属鼓楼医院检验科

(朱 宏、高 硕、周 辉、张之烽、沈 瀚、张 燕、周万青)

通信作者:周万青, E-mail: zwwq\_096@163.com

than that of *E.faecium*. Phosphoromycin has low resistance in urinary tract infection with Enterococcus.

**[Key words]** enterococci; drug resistance; virulence genes; urinary tract infection

## 0 引言

肠球菌为革兰阳性球菌,是人类及动物肠道的正常菌群,也是重要的临床感染病原菌。临床上分离到的肠球菌主要为粪肠球菌和屎肠球菌,其所致的临床感染中 29.2% 为泌尿系统感染<sup>[1-3]</sup>。肠球菌所携带的毒力基因能帮助其突破宿主的免疫防御系统,定植甚至侵入尿道的上皮细胞,从而导致尿路感染的发生和发展,其中 *esp* 基因已经被证实能增强肠球菌的毒力<sup>[1]</sup>。本研究对尿路感染肠球菌的耐药性和毒力基因分布进行研究,为临床合理使用抗生素提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集南京大学医学院附属鼓楼医院 2017 年 12 月至 2018 年 8 月临床中段尿培养分离非重复肠球菌菌株 88 株,包括 41 株粪肠球菌和 47 株屎肠球菌。使用 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析仪鉴定到菌种。粪肠球菌 ATCC29212、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 均为本院微生物室保存。

**1.2 主要仪器和试剂** Vitek 2 Compact 及其配套 GP 鉴定卡、GP67 药敏卡(法国梅里埃公司);2×Taq Mix (DBI 公司);PCR 引物由上海生工公司合成;2720 型 PCR 扩增仪(Applied Biosystems 公司);琼脂糖干粉(法国 Biowest 公司);100 bp DNA Marker(大连 Takara 公司);电泳仪及 GelDoc XR 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);磷霉素药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司)。

**1.3 药敏试验** 采用 Vitek 2 Compact 及其配套 GP67 药敏卡检测常规药物敏感性;采用纸片扩散法检测菌株对磷霉素敏感性,判定标准参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)2017 版标准<sup>[4]</sup>。

**1.4 PCR 扩增毒力基因** 采用加热煮沸法提取细菌 DNA。将菌悬液置 99 °C 10 min, 12 000 r/min 5 min, 上清即为模板, -20 °C 备用。参照文献[5-6]合成肠球菌毒力基因的引物序列: *cylA*: F: 5'-ACTC-GGGGATTGATAGGC-3', R: 5'-GCTGCTAAAGCT-GCGCTT-3', 产物大小 688 bp; *esp*: F: 5'-AATT-GATTCTTTAGCATCTGG-3', R: 5'-AGATTCATCTTT-GATTCTTGG-3', 产物大小 510 bp; *asal*: F: 5'-GCAC-

GCTATTACGAACTATGA-3', R: 5'-TAAGAAAGAA-CATCACCACGA-3', 产物大小 375 bp; *hyl*: F: 5'-GACTGACGRCCAAGRRRCCAA-3', R: 5'-ACAGA-AGAGCTGCAGGAAATG-3', 产物大小 276 bp; *gelE*: F: 5'-TATGACAATGCTTTTTGGGAT-3', R: 5'-AG-ATGCACCCGAAATAATATA-3', 产物大小 213 bp; *agg*: F: 5'-CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC-3', R: 5'-TAGCTTTTTTCATTCTTGTGTTTGT-3', 产物大小 406 bp。其中 *cylA*、*esp*、*asal*、*hyl* 和 *gelE* 的反应体系为 50 μL, 包括 2×Taq Mix 25 μL, *cylA*、*esp*、*asal*、*hyl* 和 *gelE* 的上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 13 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。 *agg* 的反应体系为 20 μL, 包括 2×Taq Mix 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 由溴化乙锭染色后观察并判读结果。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。计数资料以  $n(\%)$  形式表达, 耐药率的比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 药敏试验结果** 粪肠球菌对红霉素耐药率较高(70.73%), 对环丙沙星、莫西沙星、左氧氟沙星和高浓度庆大霉素耐药率均为 34.15%, 对青霉素、氨苄西林、呋喃妥因耐药率较低(<10%), 未检出万古霉素、替加环素和磷霉素耐药菌株, 仅检出利奈唑胺耐药菌株 1 株。屎肠球菌对青霉素、氨苄西林、左氧氟沙星的耐药率均高于 90%, 对红霉素、环丙沙星、莫西沙星的耐药率近 90%, 对高浓度链霉素、高浓度庆大霉素和呋喃妥因耐药率在 40% 左右, 检出万古霉素耐药菌株 2 株和磷霉素耐药菌株 1 株, 未检出利奈唑胺、替加环素耐药菌株。屎肠球菌对青霉素、氨苄西林、喹诺酮类及呋喃妥因的耐药率明显高于粪肠球菌( $P < 0.05$ )。呋喃妥因耐药率明显高于磷霉素(21.59% vs 1.14%,  $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 肠球菌毒力基因检测结果** 88 株肠球菌中 *cylA*、*esp*、*asal*、*hyl*、*gelE* 和 *agg* 毒力基因的分布见表 2, 电泳图谱见图 1。其中, 粪肠球菌中 *cylA*、*asal*、*gelE* 和

*agg* 毒力基因的携带率均明显高于屎肠球菌 ( $P<0.05$ ), *hyl* 基因携带率则明显低于屎肠球菌 ( $P<0.05$ )。粪肠球菌和屎肠球菌的毒力基因组合携带情况见表 3, 其中屎肠球菌中有 7 株未检出任何毒力基因。

表 1 粪肠球菌和屎肠球菌耐药情况比较[耐药株数(%)]

抗菌药物	粪肠球菌 ( <i>n</i> =41)	屎肠球菌 ( <i>n</i> =47)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
万古霉素	0(0)	2(4.26)	1.79	>0.05
青霉素	2(4.88)	45(95.74)	72.66	<0.05
红霉素	29(70.73)	40(85.11)	2.67	>0.05
环丙沙星	14(34.15)	42(89.36)	28.85	<0.05
莫西沙星	14(34.15)	41(87.23)	26.33	<0.05
高浓度链霉素	8(19.51)	18(38.30)	3.71	>0.05
替加环素	0(0)	0(0)	—	—
利奈唑胺	1(2.44)	0(0)	1.16	>0.05
氨苄西林	2(4.88)	45(95.74)	72.66	<0.05
高浓度庆大霉素	14(34.15)	19(40.43)	0.37	>0.05
左旋氧氟沙星	14(34.15)	44(93.62)	34.47	<0.05
磷霉素	0(0)	1(2.13)	0.88	>0.05
呋喃妥因	3(7.32)	16(34.04)	9.24	<0.05

表 2 粪肠球菌和屎肠球菌毒力基因携带情况[阳性株数(%)]

毒力基因	粪肠球菌 ( <i>n</i> =41)	屎肠球菌 ( <i>n</i> =47)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
<i>cylA</i>	33(80.49)	0(0)	60.53	<0.05
<i>esp</i>	31(75.61)	36(76.60)	0.01	>0.05
<i>asal</i>	36(87.80)	0(0)	69.84	<0.05
<i>hyl</i>	0(0)	14(29.79)	14.52	<0.05
<i>gelE</i>	31(75.61)	0(0)	54.86	<0.05
<i>agg</i>	9(21.95)	0(0)	11.49	<0.05

表 3 粪肠球菌和屎肠球菌的不同毒力基因组合携带情况

肠球菌	毒力基因携带情况	菌株数量
粪肠球菌( <i>n</i> =41)	<i>cylA</i> 、 <i>esp</i> 、 <i>asal</i> 和 <i>gelE</i>	13
	<i>cylA</i> 、 <i>esp</i> 和 <i>asal</i>	10
	<i>cylA</i> 、 <i>esp</i> 、 <i>asal</i> 、 <i>gelE</i> 和 <i>agg</i>	5
	<i>gelE</i>	4
	<i>cylA</i> 、 <i>asal</i> 、 <i>gelE</i> 和 <i>agg</i>	2
	<i>cylA</i> 、 <i>asal</i> 和 <i>gelE</i>	2
	<i>cylA</i> 和 <i>asal</i>	2
	<i>cylA</i> 、 <i>esp</i> 、 <i>asal</i> 和 <i>agg</i>	1
	<i>esp</i> 和 <i>gelE</i>	1
	<i>asal</i> 和 <i>gelE</i>	1
屎肠球菌( <i>n</i> =40)	<i>esp</i>	26
	<i>esp</i> 和 <i>hyl</i>	10
	<i>hyl</i>	4

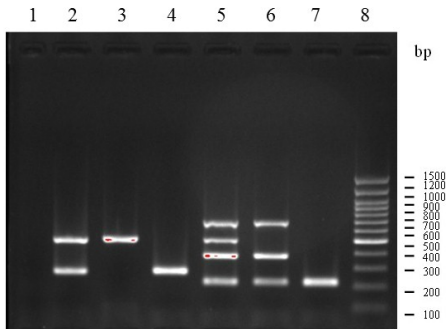
**2.3 毒力基因 *cylA* 与粪肠球菌耐药性的关系** 虽毒力基因 *cylA* 仅在粪肠球菌中检出, 且阳性率达 80.49%, 但分析发现其携带与否与粪肠球菌的耐药性差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 4。

表 4 粪肠球菌中携带与不携带 *cylA* 基因菌株的耐药性对比[耐药株数(%)]

抗菌药物	携带 <i>cylA</i> 基因 ( <i>n</i> =33)	不携带 <i>cylA</i> 基因 ( <i>n</i> =8)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
万古霉素	0(0)	0(0)	—	—
青霉素	2(6.06)	0(0)	0.51	>0.05
红霉素	24(72.73)	5(62.50)	0.33	>0.05
环丙沙星	13(39.39)	1(12.50)	2.07	>0.05
莫西沙星	13(39.39)	1(12.50)	2.07	>0.05
高浓度链霉素	7(21.21)	1(12.50)	0.31	>0.05
替加环素	0(0)	0(0)	—	—
利奈唑胺	1(3.03)	0(0)	0.25	>0.05
氨苄西林	2(6.06)	0(0)	0.51	>0.05
高浓度庆大霉素	11(33.33)	3(37.50)	0.05	>0.05
左旋氧氟沙星	13(39.39)	1(12.50)	2.07	>0.05
磷霉素	0(0)	0(0)	—	—
呋喃妥因	2(6.06)	1(12.50)	0.39	>0.05

3 讨 论

本研究数据显示, 尿路分离屎肠球菌耐药率明显高于粪肠球菌, 与全国耐药监测结果具有一致性<sup>[7]</sup>。其中屎肠球菌对青霉素、氨苄西林、左旋氧氟沙星的耐药率最高, 分别为 95.74%、95.74% 和 93.62%, 同时对环丙沙星、莫西沙星和红霉素的



1: 阴性对照; 2: *esp* 和 *hyl*; 3: *esp*; 4: *hyl*; 5: *cylA*、*esp*、*asal* 和 *gelE*; 6: *cylA*、*asal* 和 *gelE*; 7: *gelE*; 8: Marker

图 1 肠球菌部分毒力基因 PCR 产物电泳图



耐药率也很高,近 90%,与文献报道较为一致<sup>[8-9]</sup>。而粪肠球菌除 1 株利奈唑胺耐药的菌株外,其余抗生素的耐药性均低于屎肠球菌,而且除红霉素外,其余抗生素的耐药率均低于 35%,与文献报道的耐药数据基本一致<sup>[10-11]</sup>。对磷霉素和呋喃妥因 2 种针对尿路感染的药物比较发现肠球菌对磷霉素药物的敏感性要好于呋喃妥因,且仅发现 1 株屎肠球菌对磷霉素耐药,而这株磷霉素耐药的屎肠球菌仅携带 *esp* 基因。

肠球菌毒力基因主要有 6 种,分别为细胞溶解素(由 *cylA* 基因编码,可溶解细胞)、表面蛋白(由 *esp* 基因编码,是肠球菌表面分子量最大蛋白质,对感染初期肠球菌的定植有重要作用)、聚集物质(由 *asal* 基因编码,为肠球菌表面一种结合糖蛋白,能使细菌聚集,增加在宿主细胞的附着能力)、透明质酸酶(由 *hyl* 基因编码,协助细菌在组织内扩散)、明胶酶(由 *gelE* 基因编码,该酶是一种 Zn 金属蛋白酶,溶解宿主细胞的胶原蛋白或组织蛋白,使宿主细胞丧失完整性,有利于肠球菌及其致病物质向组织周围扩散)和胶原黏附蛋白(*agg* 基因),均在肠球菌致病中发挥重要作用<sup>[5,7]</sup>。

本研究致尿路感染肠球菌中出现多种毒力基因的組合。88 株肠球菌中 *esp* 基因检出率最高(76.14%,67/88),依据前述 *esp* 基因所编码表面蛋白功能及研究发现携带 *esp* 基因的临床菌株大多具有生物膜形成能力,其能增强菌株对非生物表面的黏附和生物膜细菌间的黏附作用,增加生物膜的致病性和稳定性<sup>[12]</sup>。可能在尿路感染中更有利于菌株的黏附与定植。粪肠球菌携带除 *hyl* 以外的其他所有基因,其中以同时携带 *cylA*、*esp*、*asal* 和 *gelE* 基因和同时携带 *cylA*、*esp* 和 *asal* 基因的分离株菌最多,可见粪肠球菌可表达多种毒力基因并造成宿主的感染。而屎肠球菌仅携带 *esp* 和 *hyl* 2 种基因。肠球菌中 *hyl* 基因与链球菌同源,在肺炎链球菌中表达可增强其侵入性,因此该基因可能在肠球菌的侵袭性致病机制中发挥一定作用<sup>[1]</sup>。另外,本研究发现,肠球菌菌种所携带的毒力基因的情况与耐药性相反,这可能与毒力基因减少,细菌的致病性降低,而低致病性菌株可在免疫力低下的宿主中定植或共栖的更久,使其本身获得耐药基因的概率大大升高<sup>[13]</sup>。而且,抗生素本身就是诱导细菌耐药的一大重要因素<sup>[14]</sup>。虽毒力基因 *cylA* 仅在粪肠球菌中检出,且阳性率达 80.49%,但分析发现其携带与否与

粪肠球菌的耐药性差异无统计学意义。

综上,本研究发现尿路感染屎肠球菌较粪肠球菌具有更高的耐药性,而毒力基因的表达却存在明显不同。临床针对不同菌种的药物治疗上需以临床药敏结果为依据,并综合考虑毒力基因的表达情况实施抗感染治疗。

#### [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] Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus [J]. Virulence, 2012, 3 (5): 421-433.
- [3] Salminen S, Von Wright A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects [M]. 3rd ed. Virginia: CRC Press, 2004:396.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 27th informational supplement (M100-S27)[S]. Wayne, PA: CLSI, 2017.
- [5] 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.
- [6] 李东冬,沈定霞,郭玲,等.血液分离肠球菌毒力基因检测及生物膜形成测定[J].中华微生物学和免疫学杂志,2013,33(11):865-867.
- [7] 魏泽庆,沈萍,陈云波,等. Mohnarin 2010 年报告:血流感染细菌构成及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(3):465-570.
- [8] 王文娟,马承泰,纪方方,等.肠球菌致尿路感染的院内分布特点与耐药性分析[J].实用医药杂志,2017,6(34):501-505.
- [9] 高岚美,潘玉红,邹红,等.中段尿培养 215 株肠球菌耐药性分析[J].海峡预防医学杂志,2016,22(1):105-107.
- [10] 王效雷,罗婕,丁兆霞,等.119 例尿管相关性尿路感染的病原体分布及耐药性分析[J].东南国防医药,2015,17(1):46-48.
- [11] 石晓卉,刘琪,于湘友.外科重症监护室临床细菌分布及耐药性监测[J].东南国防医药,2014,16(4):349-352.
- [12] 宋娟,华川.临床感染粪肠球菌致病岛毒力相关基因的研究现状[J].西南军医,2015,17(4):422-425.
- [13] 黄小丽,赵瑞珂,李艳萌,等.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[J].检验医学与临床,2015,12(21):3140-3143.
- [14] 陆君卓,程磊.持留菌的控制与清除研究进展[J].医学研究生学报,2018,31(1):77-82.

(收稿日期:2019-01-22; 修回日期:2019-05-30)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕锋)