

论 著
(基础研究)

鹌鸡肠球菌对万古霉素耐药性监测及耐药基因研究

谢 晖, 周万青, 沈 瀚

【摘要】 目的 调查临床分离鹌鸡肠球菌对万古霉素的耐药情况及耐药机制。方法 采用 VITEK 2 系统 GP67 卡对 2019 年 1-12 月南京大学医学院附属鼓楼医院临床分离 15 株鹌鸡肠球菌进行药敏试验, 采用 E-test 法复核菌株对万古霉素最低抑菌浓度 (MIC); 采用 PCR 及测序技术分析万古霉素耐药决定基因 *vanA*、*vanB*、*vanC1* 及 *vanC2/3*; 采用 Illumina HiSeq 2000 测序技术对菌株基因组 DNA 进行双端测序 (PE), 利用生物信息学对菌株全基因组序列分析及耐药基因、毒力基因分析。

结果 15 株鹌鸡肠球菌对万古霉素的 MIC 值集中在 4 mg/L 和 8 mg/L, 所占比例分别为 40% 和 33.3%, 检出 1 株 (6%) 万古霉素高水平耐药株 EG17906 (MIC 为 256 mg/L), 该菌株除对万古霉素和替考拉宁耐药外, 对其余常用抗生素均敏感; 15 株菌株均检出 *vanC1* 基因, EG17906 菌株同时检出 *vanA* 基因; EG17906 菌株经全基因组测序分析, 基因组大小为 3765 197 bp, 鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C) 所占的比率 GC 含量为 40.4%, 总基因数为 3754, 基因组含有 3592 个编码序列, 60 个 tRNA 编码基因以及 10 个完整的 rRNA 基因编码操纵子。耐药基因预测分析该菌株携带 *VanC1XY*、*VanHAX*、*erm(A)*、*erm(A)*、*tet(O)*、*cat(pC221)*。全基因组序列提交至美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库, GeneBank 号为 JABMDB000000000。结论 鹌鸡肠球菌携带 *vanC1* 对万古霉素呈低水平耐药, 而同时携带 *vanA* 基因可造成菌株高水平耐药, 需引起重视。

【关键词】 鹌鸡肠球菌; 万古霉素耐药; *vanA* 基因; 全基因组测序

【中图分类号】 R446.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)03-0249-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.03.006

Surveillance of vancomycin resistance and studies on resistance genes of *Enterococcus gallinarum*

XIE Hui, ZHOU Wan-qing, SHEN Han

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

【Abstract】 Objective To investigate clinical isolation of *Enterococcus gallinarum* against vancomycin and its resistance mechanism. **Methods** 15 strains of *Enterococcus gallinarum* isolated from Nanjing Gulou Hospital from January to December 2019 were tested for drug sensitivity using VITEK 2 system GP67, and the minimum inhibitory concentration (MIC) against vancomycin was verified by e-test. PCR and sequencing techniques were utilized to analyze vancomycin resistance gene *vanA*, *vanC1* and *vanC2/3*. Illumina HiSeq 2000 sequencing technologies were used for genomic DNA sequencing of the bacterial strain and Paired end (PE) sequencing was performed. Bioinformatics was used only for genomic sequencing of the bacterial strain and analysis of drug-resistant genes and virulence genes. **Results** The MIC values of 15 strains of *Enterococcus gallinarum* against vancomycin were concentrated in 4 mg/L and 6 mg/L, accounting for 40% and 33.3%, respectively. Among them, 1 strain (6%) with high vancomycin resistance EG17906 (MIC was 256 mg/L) was detected, which was sensitive to other common antibiotics except vancomycin and teicoplanin. The gene of *vanC1* was detected in all the 15 strains, while *vanA* gene was detected in the EG17906 strain. The whole genome sequencing analysis of EG17906 strain showed that the genome size was 3765197 bp, GC content was 40.4%, and the total number of genes was 3754. The

genome contained 3592 coding sequences, 60 tRNA coding genes and 10 complete rRNA coding operons. Drug resistance gene prediction analysis the strain carries *VanC1XY*, *VanHAX*, *erm(A)*, *erm(A)*, *tet(O)*, *cat(pC221)*. The com-

基金项目:南京市医学科技发展项目(YKK17056)

作者单位:210008 南京,南京大学医学院附属鼓楼医院检验科
(谢 晖,周万青,沈 瀚)

通信作者:沈 瀚, E-mail: shenhan10366@sina.com

plete gene sequence is submitted to the NCBI database, GeneBank is No. JABMDB000000000. **Conclusion** Enterococcus gallinarum with low level of vancomycin resistance, while vanA gene can cause a high level of drug resistance, which should be paid attention.

[Key words] Enterococcus gallinarum; vancomycin resistance; vanA gene; whole genome sequencing

0 引 言

肠球菌是临床常见革兰阳性条件致病菌,可导致人体多器官感染。鹌鸡肠球菌(*Enterococcus gallinarum*, EG)作为肠球菌中少见菌种,近年来临床感染及分离率不断增加^[1-3],可造成泌尿道、腹腔、胆道感染以及败血症等。而耐万古霉素肠球菌(vancomycin resistant enterococci, VRE)的不断检出^[4-5],给临床该类感染带来极大挑战。造成耐药的决定基因包括 vanA、vanB、vanC、vanD、vanM 等,不同基因的表达可表现对万古霉素和替考拉宁的不同药敏结果^[6],常见 vanA 介导屎肠球菌大多对万古霉素和替考拉宁呈高水平耐药。鹌鸡肠球菌一般携带染色体介导的万古霉素低水平耐药 vanC 基因,虽然体外药敏试验可呈现低水平耐药或敏感结果,但不建议临床使用。目前,已有对万古霉素高水平耐药鹌鸡肠球菌菌株临床报道,可能与 vanA 基因的获得有关^[7]。因此,本研究调查我院临床分离鹌鸡肠球菌的耐药性及携带万古霉素耐药相关基因情况,为鹌鸡肠球菌耐药监测及耐药基因的流行提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株 收集我院 2019 年 1-12 月临床分离非重复鹌鸡肠球菌 15 株,主要分离自分泌物(2 株)、腹水(3 株)、胆汁(4 株)、尿液(3 株)及血液样本(3 株)。所有菌株均经 Vitek 2 Compact GP 板卡鉴定并经 VITEK MS 质谱复核。粪肠球菌 ATCC51299、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、粪肠球菌 ATCC29212 为本实验室保存菌株。

1.2 主要试剂与仪器 Vitek 2 Compact 全自动鉴定仪及配套 GP 鉴定卡、GP67 药敏卡(法国生物梅里埃公司);万古霉素 E-test 试纸条(郑州安图生物公司);DNA 提取试剂盒及胶回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];2×Taq Mix(DBI 公司);营养肉汤(上海科玛嘉微生物技术有限公司);PCR 引物由上海生工生物有限公司公司合成;2720 Thermal

Cycler PCR 仪、ABI 3730XL 基因测序仪(ABI 公司);Gel-Doc XR 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 药敏试验 采用 Vitek 2 Compact 配套 GP67 药敏卡检测菌株对常规药物敏感性。采用 E-test 法复核万古霉素最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),判定标准参照美国临床和实验室标准协会 CLSI 2019^[8]。

1.4 DNA 提取 挑取纯培养菌落接种到营养液体培养基中,37 ℃ 180 r/min 16 h,采用 DNA 提取试剂盒提取菌液基因组 DNA,具体操作依据试剂盒说明书进行。所提核酸用于全基因组测序及基因扩增。

1.5 PCR 扩增和序列分析 参照文献[9]方法合成万古霉素耐药相关基因 vanA、vanB、vanC1 及 vanC2/3,引物序列见表 1。反应体系 20 μL:2×TaqMix 10 μL, DNA 模板 2 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 6 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 30 个循环;72 ℃ 7 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,阳性扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,采用柱层析法纯化后经 ABI 3730XL 基因测序仪进行 Sanger 双向测序,正反向测序片段采用 DNAMAN8 软件拼接,结果经碱基局部对准检索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)与 GenBank 进行比对,该部分由上海生工生物工程公司完成。

表 1 万古霉素耐药基因的引物序列及产物大小

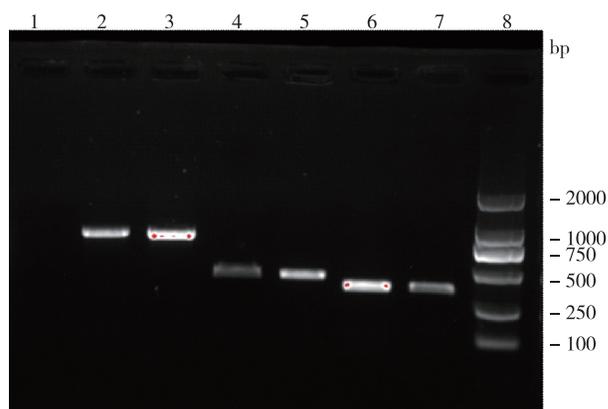
目的基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
vanA	F: GGG AAA ACG ACA ATT GC	732
	R: GTA CAA TGC GGC CGT TA	
vanB	F: ATG GGA AGC CGA TAG TC	635
	R: GAT TTC GTT CCT CGA CC	
vanC1	F: GAA AGA CAA CAG GAA GAC CGC	796
	R: ATC GCA TCA CAA GCA CCA ATC	
vanC2/3	F: CGG GGA AGA TGG CAG TAT	484
	R: CGC AGG GAC GGT GAT TTT	

1.6 全基因组测序分析 采用 Illumina HiSeq 2000 测序技术进行全基因组 DNA 测序,委托上海泽塔生物科技有限公司完成。简要步骤:对样本 DNA 进行双端测序(Paired-end, PE),构建 450 bp 文库;对测序结果进行质量剪切后,利用 MicrobeTrakr plus v. 0.9.1 软件对序列进行拼接,得到最优的组装结果。采用 GeneMarkS+v. 4.11 基因注释软件对测序结果进行预测。将预测得到的基因序列分别与 KEGG、COG、GO 数据库进行 BLAST 比对,获得预测基因的注释信息。利用 Center for Genomic Epidemiology 网站 (<http://www.genomicepidemiology.org>) 中的 ResFinder3.2 及 PlasmidFinder 软件对耐药基因及质粒分型进行预测分析。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 15 株鸢鸡肠球菌对青霉素、氨苄西林、高浓度庆大霉素、左氧氟沙星耐药率分别为 20%、33.3%、33.3%、26.7%;对万古霉素的 MIC 值集中在 4 mg/L 和 8 mg/L,所占比例分别为 40% 和 33.3%,MIC 中位数为 4 mg/L,检出 1 株(6%)万古霉素高水平耐药株编号 EG17906(MIC 为 256 mg/L);所有菌株对利奈唑胺敏感。编号 EG17906 菌株对替考拉宁(MIC 为 24 mg/L)耐药,对青霉素、氨苄西林、高浓度庆大霉素、左氧氟沙星均敏感。

2.2 耐药基因检测 15 株鸢鸡肠球菌中均检出 *vanC1* 基因;编号 EG17906 同时检出 *vanA* 基因。电泳结果见图 1。



1: 阴性对照; 2, 3: *vanC1*; 4, 5: *vanA*; 6, 7: *vanC2/3*; 8: Marker

图 1 万古霉素耐药基因 PCR 产物电泳图

2.3 全基因组测序分析 EG17906 基因组大小为

3765197 bp, 鸟嘌呤(Guanine, G)和胞嘧啶(Cytosine, C)所占的比率 GC 含量为 40.4%,总基因数为 3754,基因组含有 3592 个编码序列,60 个 tRNA 编码基因以及 10 个完整的 rRNA 基因编码的操纵子,有 160 个重叠群,其中 N50 含量达到 190271,同时有 8 个 L50。耐药基因预测分析该菌株携带 *VanC1XY*、*VanHAX*、*erm(A)*、*erm(A)*、*tet(O)*、*cat(pC221)*。全基因组序列提交至美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)数据库, GeneBank 号为 JABM-DB000000000。

3 讨 论

本研究结果显示,鸢鸡肠球菌对青霉素、氨苄西林、高浓度庆大霉素、左氧氟沙星的耐药率在 35% 以下;对万古霉素大多呈现为敏感或低水平耐药(MIC 值集中在 4 mg/L 和 8 mg/L),与该菌株天然携带 *vanC1* 基因相关。但仍有文献报道检出高水平耐药菌株^[10]。本研究亦检出万古霉素高水平耐药菌株编号 EG17906(MIC 为 256 mg/L),该菌株对万古霉素(MIC 为 256 mg/L)和替考拉宁(MIC 为 24 mg/L)耐药,对青霉素、氨苄西林、高浓度庆大霉素、左氧氟沙星均敏感。所有菌株对利奈唑胺敏感。

鸢鸡肠球菌的定植和感染流行率呈相关^[11]。健康志愿者粪便样本鸢鸡肠球菌的携带率约为 9%^[12];另两个研究显示住院患者直肠拭子中鸢鸡肠球菌分离率分别为 5.2%^[13] 和 1.2%^[14]。而据日本 2005-2014 年回顾性研究,在肠球菌导致的血流感染中鸢鸡肠球菌占 2.7%,是万古霉素耐药致肠球菌血流感染的第三大病因^[15]。

肠球菌对糖肽类药物耐药可表现为 VanA 表型、VanB 表型和 VanC 表型。VanA 表型一般由 *vanA* 基因介导,造成菌株对万古霉素和替考拉宁呈高水平耐药, VanB 表型一般由 *vanB* 基因介导,造成菌株对万古霉素耐药而对替考拉宁敏感, VanC 表型菌株一般对万古霉素呈现出低水平的固有耐药,由 *vanC* 基因介导。*vanA* 基因可存在于可接合传递的质粒上,并造成肠球菌间或葡萄球菌耐药基因的获得而造成上述菌株对糖肽类药物的高水平耐药。作为染色体携带 *vanC* 基因的鸢鸡肠球菌,一般对万古霉素呈低水平耐药或体外敏感。但不断有文献报道同时携带 *vanA* 和 *vanC* 基因菌株造成的临床

感染^[10],表明糖肽抗性的表型和基因型特征可能并不总是一致的。而在本研究调查中,同样存在 *vanA* 和 *vanC1* 介导高水平万古霉素耐药的鹌鸡肠球菌,提示这种耐药菌株存在全球性的流行性。本院存在 *vanA* 介导耐药屎肠球菌的播散流行,对于鹌鸡肠球菌 *vanA* 基因的获得是否与屎肠球菌有关尚待研究。耐药表型与耐药基因一般呈现一致性。而目前耐药基因的确定一般采用 PCR 扩增及测序。本研究分离菌株经 PCR 检出 *vanA* 和 *vanC1* 基因,同时对该菌株进行全基因组测序同样验证了上述基因的存在,并发现 *vanA* 基因周围存在表达调控基因。

虽然目前临床未将万古霉素作为鹌鸡肠球菌的临床首选治疗药物,但仍不能放松对鹌鸡肠球菌在万古霉素等药物中的监测,以更早地发现可能存在的菌株播散,预防可能存在的耐药基因的水平传递或菌株的克隆播散。这一事实突出了严格执行抗生素政策以及更严格遵守感染控制措施,以防止耐抗生素细菌出现和传播的重要性。

【参考文献】

- [1] 周辉,高硕,张之烽,等. 2013~2018年分离的3913株肠球菌菌种分布及药敏试验结果分析[J]. 山东医药, 2019, 59(36): 85-87.
- [2] Amaro P, Ferreira J, Viegas R, et al. Multifocal joint infection caused by *Enterococcus gallinarum* [J]. Mod Rheumatol Case Rep, 2020;1-4. doi: 10.1080/24725625.2020.1847429.
- [3] Shahin AV, Elkhayat AI, Greene JN. Endogenous Vancomycin-Resistant *Enterococcus gallinarum* Endophthalmitis in Hematologic Malignancy[J]. Infect Dis Clin Pract (Baltim Md), 2020, 28(5).
- [4] Mahros MA, Abd-Elghany SM, Sallam KI. Multidrug-, methicillin-, and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat meat sandwiches: An ongoing food and public health concern[J]. Int J Food Microbiol, 2021, 346: 109165. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109165.
- [5] 轩慧勇,陈万昭,夏利宁. 万古霉素耐药肠球菌研究进展[J]. 动物医学进展, 2021, 42(4): 77-82.
- [6] 朱宏,高硕,周辉,等. 尿路感染中肠球菌耐药性及毒力基因分析[J]. 东南国防医药, 2019, 21(5): 466-469.
- [7] Prahara J, Sujatha S, Parija SC. Phenotypic & genotypic characterization of vancomycin resistant *Enterococcus* isolates from clinical specimens [J]. Indian J Med Res, 2013, 138(4): 549-556.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 29th informational supplement (M100-S29) [S]. Wayne, PA: CLSI, 2019.
- [9] 周万青,宋熙晶,生媛,等. 多中心耐利奈唑胺凝固酶阴性葡萄球菌耐药机制及同源性分析[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(1): 29-33.
- [10] Biavasco F, Paladini C, Vignaroli C, et al. Recovery from a single blood culture of two *enterococcus gallinarum* isolates carrying both *vanC-1* and *vanA* cluster genes and differing in glycopeptide susceptibility [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2001, 20(5): 309-314.
- [11] Monticelli J, Knezevich A, Luzzati R, et al. Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens* [J]. J Infect Chemother, 2018, 24(4): 237-246.
- [12] Rice EW, Boczek LA, Johnson CH, et al. Detection of intrinsic vancomycin resistant enterococci in animal and human feces [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003, 46(2): 155-158.
- [13] Maschieto A, Martinez R, Palazzo IC, et al. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004, 99(7): 763-767.
- [14] Cereda R, Pignatari AC, Hashimoto A, et al. In Vitro Antimicrobial Activity Against Enterococci Isolated in a University Hospital in São Paulo, Brazil [J]. Braz J Infect Dis, 1997, 1(2): 83-90.
- [15] Suzuki H, Hase R, Otsuka Y, et al. A 10-year profile of enterococcal bloodstream infections at a tertiary-care hospital in Japan [J]. J Infect Chemother, 2017, 23(6): 390-393.

(收稿日期:2020-07-15; 修回日期:2021-04-20)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕镗烽)