

论 著  
(临床研究)

## 尿路分离利奈唑胺不敏感粪肠球菌耐药机制及毒力基因研究

牛冬梅, 宋佳希, 周万青, 刘兴全

**【摘要】 目的** 探讨尿液分离利奈唑胺(LZD)不敏感粪肠球菌耐药机制及毒力基因携带情况。**方法** 收集临床中段尿分离粪肠球菌 72 株, 其中利奈唑胺不敏感和敏感菌株分别为 23 株和 49 株。采用微量肉汤稀释法检测菌株对常规药物最低抑菌浓度(MIC); 采用 E-test 复核利奈唑胺 MIC。采用 PCR 法结合 Sanger 测序技术检测 23 株利奈唑胺不敏感粪肠球菌 *optrA* 基因、*cfr* 基因及 23S rRNA V 区。采用 PCR 法检测粪肠球菌 6 种毒力基因 *cylA*、*esp*、*asa1*、*hyl*、*gelE* 和 *agg*; 统计分析 LZD 不敏感和敏感菌株毒力基因携带情况及差异。**结果** 23 株利奈唑胺不敏感粪肠球菌对利奈唑胺 MIC 分布 4~256  $\mu\text{g/mL}$ ; 其中 13 株检出 *optrA* 基因, 其余 10 株未检出; 23 株未检出 23S rRNA V 区突变及 *cfr* 基因。23 株 LZD 不敏感粪肠球菌中 21 株检出毒力基因, 以 *asa1* 基因检出率最高(17/23, 73.91%), 其次为 *esp*(16/23, 69.57%)、*cylA*(13/23, 56.52%)、*gelE*(10/23, 43.48%) 和 *agg*(4/23, 17.39%), 未检出 *hyl* 基因; 49 株尿液分离 LZD 敏感粪肠球菌中 48 株检出毒力基因, 以 *asa1* 基因检出率最高(42/49, 85.71%), 其次为 *cylA*(39/49, 79.59%)、*esp*(38/49, 77.55%)、*gelE*(35/49, 71.43%) 和 *agg*(10/49, 20.41%), 未检出 *hyl* 基因。利奈唑胺敏感菌株中 *cylA* 和 *gelE* 基因检出率均高于不敏感菌株, 差异有统计学意义( $\chi^2=4.15, 5.22, P<0.05$ ), 其余基因检出率在 2 组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 尿液分离利奈唑胺不敏感粪肠球菌中主要由 *optrA* 介导耐药; 利奈唑胺不敏感粪肠球菌菌株 *cylA*、*gelE* 基因携带率低于敏感菌株。

**【关键词】** 粪肠球菌; 利奈唑胺; 耐药机制; 毒力基因**【中图分类号】** R446.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2022)01-0023-04**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2022.01.005Resistance mechanism and virulence genes of linezolid insensitive *Enterococcus faecalis* isolated from urinary tractNIU Dong-mei<sup>1</sup>, SONG Jia-xi<sup>1</sup>, ZHOU Wan-qing<sup>2</sup>, LIU Xing-quan<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the resistance mechanism and virulence gene of linezolid insensitive *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) isolated from urine. **Methods** A total of 72 strains of *E. faecalis* were isolated from clinical urine samples. Among them, 23 strains were linezolid insensitive and 49 strains were linezolid sensitive. The minimal inhibitory concentration (MIC) of linezolid was checked by E-test. PCR combined with Sanger sequencing technique was used to detect the *optrA* gene, *cfr* gene and 23S rRNA V region of the 23 linezolid insensitive *E. faecalis* strains. Six virulence genes of enterococci including *cylA*, *esp*, *asa1*, *hyl*, *gelE* and *agg* were detected by PCR. And the difference of virulence genes between LZD insensitive and LZD sensitive strains was statistically analyzed. **Results** The MIC distribution of linezolid was 4-256  $\mu\text{g/mL}$  in 23 strains of linezolid insensitive *E. faecalis*. *OptrA* gene was detected in 13 strains, but not in the other 10 strains. 23S rRNA V region mutation and *cfr* gene were not detected in 23 strains. Among 23 strains of LZD insensitive *E. faecalis*, 21 strains were detected with

作者单位: 210001 南京, 南京中医药大学附属南京中医院检验科(牛冬梅、宋佳希、刘兴全); 210008 南京, 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科(周万青)

通信作者: 刘兴全, E-mail: 61735647@qq.com

virulence genes, of which *asa1* gene was the highest (17/23, 73.91%), followed by *esp* (16/23, 69.57%), *cylA* (13/23, 56.52%), *gelE* (10/23, 43.48%) and *agg* (4/23, 17.39%), and without the expression of *hyl* gene. Among 49 strains of LZD sensitive *E. faecalis*, 48 strains were detected with virulence genes, of which *asa1* gene was the highest (42/49), followed by *cylA* (39/49, 79.59%), *esp* (38/49, 77.55%), *gelE* (35/49, 71.43%) and *agg* (10/49, 20.41%). The detection rates of *cylA* and *gelE* genes in linezolid sensitive strains were higher than those in insensitive strains ( $\chi^2 = 4.15, 5.22, P < 0.05$ ). There was no significant difference in the detection rate of other genes between the two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The resistance of linezolid insensitive *E. faecalis* isolated from urine is mainly mediated by *optrA*, and the carrying rate of *cylA* and *gelE* in linezolid insensitive strains is lower than that in linezolid sensitive strains.

**[Key words]** *E. faecalis*; linezolid; resistant mechanism; virulence gene

## 0 引言

近年来,作为肠道正常菌群的肠球菌属已成为院内感染重要病原菌,可造成患者尿路感染、血流感染等<sup>[1]</sup>。其中粪肠球菌和屎肠球菌所造成的感染比例占肠球菌属 90%<sup>[2]</sup>。流调数据显示,肠球菌在尿路中的分离率占第一位<sup>[3]</sup>。由肠球菌造成的感染难治性与菌株天然耐药或获得性耐药,特别是万古霉素耐药、利奈唑胺耐药肠球菌的不断检出<sup>[3-4]</sup>,给临床抗感染诊疗带来挑战。利奈唑胺(linezolid, LZD)作为噁唑烷酮类抗生素,2001 年上市并用于万古霉素耐药肠球菌(vancomycin resistant enterococci, VRE)等多种革兰阳性菌的感染治疗。然而,近年来,利奈唑胺耐药粪肠球菌的临床检出呈逐年上升趋势<sup>[4]</sup>。研究发现,肠球菌所携带的多种毒力基因(*esp*、*gelE*、*asa1*、*cylA* 等)决定了菌株的致病性,同时对于生物膜形成也至关重要<sup>[5]</sup>。更为严重的是,携带多种毒力基因且对多种抗菌药物耐药菌株的出现<sup>[6]</sup>,增加临床治疗的难度。为了探明临床尿路感染中分离利奈唑胺不敏感粪肠球菌具体耐药机制及毒力基因的携带情况,本研究对临床尿路感染分离粪肠球菌携带毒力基因情况及与利奈唑胺耐药间的关系进行探讨,为临床治疗提供数据依据。

## 1 资料与方法

**1.1 菌株来源** 收集南京鼓楼医院 2014-2019 年临床中段尿样本中分离培养获得非重复粪肠球菌株 72 株,使用 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析仪鉴定到菌种。依据菌株对利奈唑胺最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)分为利奈唑胺不敏感菌株(MIC  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ )和敏感菌株(MIC  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ),分别为 23 株和 49 株。粪肠球菌 ATCC

29212 质控菌株、*cfr* 基因阳性对照头状葡萄球菌 SA10106 及 *optrA* 阳性菌株为南京鼓楼医院微生物室保存菌株<sup>[4]</sup>。

**1.2 主要仪器和试剂** Vitek 2 Compact 全自动鉴定药敏分析系统及配套 GP 鉴定卡、GP67 药敏卡(法国梅里埃公司);利奈唑胺 E-test(安图公司);2×Taq Mix (DBI 公司);PCR 扩增仪(ABI 公司);蛋白酶 K (Merck 公司);琼脂糖干粉(法国 Biowest 公司);100 bp DNA Marker(大连 Takara 公司);Gelrad 染色液(美国 BIOTIUM 公司);电泳仪及 GelDoc XR 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);PCR 引物合成及扩增产物测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

**1.3 药敏试验** 采用 Vitek 2 Compact 全自动鉴定药敏分析系统及配套 GP67 药敏卡进行药物敏感性检测;对检出利奈唑胺不敏感菌株采用 E-test 进行复核,结果判读依据 CLSI 2019 标准<sup>[7]</sup>进行。

**1.4 耐药基因扩增及测序** 采用加热煮沸法提取细菌 DNA<sup>[8]</sup>,挑取纯培养菌落于内含 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液的 1.5 mL 离心管内,56 °C 水浴 2 h,后置 95 °C 水浴 10 min,13 000×g 离心 30 s,上清液即为基因检测模板。参考文献[8]合成介导利奈唑胺耐药决定基因 *cfr*、*optrA* 和 23S rRNA V 区扩增引物并进行 PCR 扩增分析。引物序列见表 1。采用 25  $\mu\text{L}$  体系:2×Taq Mix 12.5  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,共 30 个循环;72 °C 7 min。阳性扩增产物由上海生工生物公司进行 Sanger 测序分析,并经 BLAST 比对分析。

**1.5 毒力基因 PCR 扩增** 参考文献[9-10]合成肠球菌毒力基因 *cylA*、*esp*、*asa1*、*hyl*、*gelE* 和 *agg* 扩增引物并进行 PCR 扩增检测。引物序列见表 1。其中

*cylA*、*esp*、*asa1*、*hyl* 和 *gelE* 基因为 50 μL 多重检测体系:2×Taq Mix 25 μL, DNA 模板 2 μL, *cylA*、*esp*、*asa1*、*hyl* 和 *gelE* 的上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 13 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 7 min。*agg* 为 25 μL 反应体系:2×Taq Mix 12.5 μL, DNA 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 7 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, Gelrad 染色后观察结果。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 进行数据分析, 率的比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法, 以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 耐药基因扩增及测序所用引物序列

基因名称	引物序列 (5'→3')	产物 大小(bp)
<i>cfr</i>	F: TGAAGTATAAAGCAGGTGGGAGTCA	746
	R: ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	
<i>optrA</i>	F: AGGTGGTCAGCGAACTAA	1395
	R: ATCAACTGTTCCCATTTCA	
23S rRNA V	F: GCGGTCGCCTCCTAAAAG	390
	R: ATCCCGGTCCTCTCGTACTA	
<i>cylA</i>	F: ACTCGGGGATTGATAGGC	688
	R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	
<i>esp</i>	F: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510
	R: AGATTATCTTTGATTCTTGG	
<i>asa1</i>	F: GCACGCTATTACGAACATATGA	375
	R: TAAGAAAGAACATCACCACGA	
<i>hyl</i>	F: GACTGACGRCCAAGRRCRCAA	276
	R: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	
<i>gelE</i>	F: TATGACAATGCTTTTGGGAT	213
	R: AGATGCACCCGAAATAATATA	
<i>agg</i>	F: CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC	406
	R: TAGCTTTTTCATTCTTGTTGTT	

2 结 果

**2.1 药敏结果** 23 株利奈唑胺不敏感粪肠球菌对利奈唑胺的 MIC 分布为 4~256 μg/mL, 其中 MIC 4 μg/mL 为 2 株, MIC 6 μg/mL 为 2 株, MIC 8 μg/mL 为 1 株, MIC 12 μg/mL 为 5 株, MIC 16 μg/mL 为 3 株, MIC 24 μg/mL 为 3 株, MIC 32 μg/mL 为 4 株, MIC 48 μg/mL 为 1 株, MIC 256 μg/mL 为 2 株。所有菌株对万古霉素均敏感。

**2.2 耐药基因结果** 23 株利奈唑胺不敏感粪肠球菌中 13 株检出 *optrA* 基因, 其余 10 株未检出该基因; 所有

菌株未检出 *cfr* 基因及检出 23S rRNA V 区突变。

**2.3 毒力基因结果** 72 株粪肠球菌检出 *asa1* (81.9%, 59/72)、*esp* (75%, 54/72)、*cylA* (72.2%, 52/72)、*gelE* (62.5%, 45/72) 和 *agg* (19.4%, 14/72) 基因, 未检出 *hyl* 基因。23 株 LZD 不敏感菌株以 *asa1* (73.9%, 17/23) 基因检出率最高, 其次为 *esp*、*cylA*、*gelE* 和 *agg*; 49 株 LZD 敏感菌株中 *asa1* (85.7%, 42/49) 基因检出率最高, 其次为 *cylA*、*esp*、*gelE* 和 *agg*。LZD 敏感菌株中 *cylA* 和 *gelE* 基因检出率高于 LZD 不敏感菌株, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 尿路分离粪肠球菌毒力基因携带情况 [阳性株数 (%) ]

毒力基因	LZD 不敏感 粪肠球菌 (n = 23)	LZD 敏感 粪肠球菌 (n = 49)	χ <sup>2</sup> 值	P 值
<i>cylA</i>	13 (56.5)	39 (79.6)	4.15	<0.05
<i>esp</i>	16 (69.6)	38 (77.6)	0.53	>0.05
<i>asa1</i>	17 (73.9)	42 (85.7)	1.47	>0.05
<i>hyl</i>	0	0	—	—
<i>gelE</i>	10 (43.5)	35 (71.4)	5.22	<0.05
<i>agg</i>	4 (17.4)	10 (20.4)	0.09	>0.05

3 讨 论

革兰阳性球菌耐利奈唑胺主要由 23S rRNA 等位基因 V 区核苷酸突变, 核糖体 L3 和 (或) L4 的突变, 以及菌株携带氯霉素-氟甲砜霉素耐药基因 (chloramphenicol-florfenicol resistance, *cfr*)<sup>[8, 11-12]</sup>, 从而导致利奈唑胺药物无法结合作用靶位而造成菌株耐药。而在肠球菌中的耐药决定基因研究中发现, *optrA* 决定基因<sup>[4]</sup> 以及由新型 *poxtA* 基因<sup>[13]</sup> 介导的耐药检出越来越多, 从而揭示革兰阳性菌对利奈唑胺耐药机制的多元化。本课题组前期研究发现, 获得 *cfr* 基因或 23S rRNA G2576T 突变是导致凝固酶阴性葡萄球菌对利奈唑胺耐药的主要机制<sup>[11]</sup>, 并存在江苏地区内的克隆传播<sup>[8]</sup>。而在肠球菌属尤其是粪肠球菌耐药监测中发现, 利奈唑胺耐药率呈逐年上升趋势, *optrA* 是主要决定基因<sup>[4]</sup>。本次调查尿路分离利奈唑胺不敏感粪肠球菌中发现, 23 株不敏感菌株中 19 株 MIC 大于等于 8 μg/mL, 其中 13 株检出 *optrA* 基因。由此可见, 造成尿路感染利奈唑胺耐药粪肠球菌主要由 *optrA* 基因介导耐药。当然, 可能存在其他未知机制共同介导。



肠球菌感染及其致病性与其携带毒力因子有关。目前认为肠球菌黏附和致宿主细胞损伤相关的毒力基因主要有: *esp* 基因编码肠球菌表面蛋白, 对于细菌黏附、定植、侵袭免疫系统及生物膜形成均发挥重要作用<sup>[14]</sup>; *asa1* 基因编码一种肠球菌表面结合蛋白, 介导细菌的聚集和质粒的传递, 增加在宿主细胞的附着能力; *hyl* 基因编码透明质酸酶, 协助细菌在组织内扩散; *gelE* 基因编码明胶酶, 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<sup>[15]</sup>; *cylA* 基因编码细胞溶血素, 可溶解细胞, 发挥毒性作用并加重肠球菌感染的严重程度<sup>[16]</sup>, 同时与尿路感染粪肠球菌的生物膜形成有关<sup>[17]</sup>; *agg* 基因编码胶原黏附蛋白等。本研究对造成尿路感染粪肠球菌携带毒力基因调查发现, 主要携带 *asa1* (81.9%, 59/72)、*esp* (75%, 54/72)、*cylA* (72.2%, 52/72)、*gelE* (62.5%, 45/72) 和 *agg* (19.4%, 14/72) 基因。所携带毒力基因的功能发挥可能与尿路感染过程中细菌生物膜形成及侵袭性感染有关<sup>[14-18]</sup>。而对 LZD 不敏感和敏感菌株的毒力基因分析发现, LZD 敏感菌株中 *cylA* 和 *gelE* 基因检出率高于 LZD 不敏感菌株, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示, 敏感菌株较不敏感菌株所携带的毒力基因更多, 其致病性更强; 而菌株在获得利奈唑胺耐药的同时, 可能丢失部分的毒力基因和致病性减弱。具体的机制有待增补菌株数量及深入研究。

综上, 造成尿路感染粪肠球菌对利奈唑胺不敏感主要由 *optrA* 基因介导; 尿路分离利奈唑胺不敏感粪肠球菌在 *cylA* 和 *gelE* 基因携带率上低于敏感菌株, 具体机制仍需进一步研究。本研究数据对于更好地研究利奈唑胺耐药粪肠球菌在尿路中致病机制奠定理论依据。

## 【参考文献】

- [1] Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, et al. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002) [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 462-463.
- [2] Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* [J]. *Microbiology (Reading)*, 2009, 155 (Pt 6): 1749-1757.
- [3] Zhou W, Zhou H, Sun Y, et al. Characterization of clinical enterococci isolates, focusing on the vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in China; based on the data from 2013 to 2018 [J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1): 356.
- [4] Zhou W, Gao S, Xu H, et al. Distribution of the *optrA* gene in *Enterococcus* isolates at a tertiary care hospital in China [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019, 17: 180-186.
- [5] Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, et al. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2338.
- [6] Chilambi GS, Nordstrom HR, Evans DR, et al. Evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during colonization and infection in immunocompromised pediatric patients [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(21): 11703-11714.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. CLSI supplement M100 [S]: Wayne, PA: CLSI, 2019.
- [8] 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.
- [9] Zheng JX, Bai B, Lin ZW, et al. Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China [J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(1): 60-67.
- [10] 牛冬梅, 徐红静, 周万青, 等. 血液分离肠球菌毒力基因及生物膜形成相关性分析 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(7): 1105-1109.
- [11] Zhou W, Niu D, Cao X, et al. Clonal dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* with G2603T mutation in domain V of the 23S rRNA and the *cfr* gene at a tertiary care hospital in China [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 97.
- [12] 高硕, 周万青, 朱宏, 等. 利奈唑胺耐药金黄色葡萄球菌耐药机制分析 [J]. *临床检验杂志*, 2020, 38(8): 613-616.
- [13] Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A, et al. Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(7): 1763-1769.
- [14] Paganelli FL, Willems RJ, Leavis HL. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? [J]. *Trends Microbiol*, 2012, 20(1): 40-49.
- [15] Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, et al. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(16): 5690-5698.
- [16] Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin [J]. *Toxins (Basel)*, 2013, 5(5): 895-911.
- [17] Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, et al. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract [J]. *Acta Med Okayama*, 2005, 59(3): 79-87.
- [18] 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.

(收稿日期: 2021-01-14; 修回日期: 2021-04-18)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)