

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2017.04.013

· 论 著 ·

# 利奈唑胺耐药粪肠球菌感染患者临床分离株与定植株同源性分析

蒲彰雅, 余治健, 陈 重, 邓向斌, 白 冰, 李多云, 刘晓军, 韩雪莹, 林佛君, 邓启文

(广东医科大学附属深圳市南山区人民医院 深圳市内源性感染诊治研究重点实验室, 广东 深圳 518052)

**[摘 要]** **目的** 研究 1 例患者体内利奈唑胺(LZD)耐药粪肠球菌临床分离株与定植株同源性特点。**方法** 对 1 例肺部感染患者分离的 10 株粪肠球菌(其中 2 株分离自尿标本, 8 株分离自粪便标本)进行细菌耐药分析, 并通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)确定粪肠球菌之间的同源性。**结果** 患者进行 LZD 治疗前后, 尿标本分离出的 2 株粪肠球菌均为 LZD 耐药株(MIC 值分别为 8 mg/mL, 16 mg/mL), 粪便中培养挑取的 8 株(治疗前 6 株, 治疗后 2 株), 其中 LZD 敏感 4 株, 中介 2 株, 耐药 2 株(MIC 值波动在 0.25~12 mg/mL)。通过 PFGE 分型检测提示 10 株粪肠球菌具有同源性。**结论** 该例患者泌尿道和肠道检出的粪肠球菌具有同源性, 提示 LZD 耐药肠球菌可能长期定植于患者体内, 并可能发生移位导致耐药细菌感染。

**[关 键 词]** 利奈唑胺; 粪肠球菌; 临床耐药; 定植; 同源性

**[中图分类号]** R378.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)04-0343-04

## Homology analysis of clinically isolated and colonized linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* strains from a patient

PU Zhang-ya, YU Zhi-jian, CHEN Zhong, DENG Xiang-bin, BAI Bing, LI Duo-yun, LIU Xiao-jun, HAN Xue-ying, LIN Fo-jun, DENG Qi-wen (Shenzhen Key Laboratory for Endogenous Infection, The Affiliated Shenzhen Nanshan People's Hospital of Guangdong Medical University, Shenzhen 518052, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the homology characteristics of clinically isolated and colonized linezolid(LZD)-resistant *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) strains from a patient. **Methods** Ten *E. faecalis* strains (2 were isolated from urine specimens and 8 were from stool specimens) isolated from a patient with pulmonary infection were performed antimicrobial susceptibility testing, homology of *E. faecalis* was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Before and after patients received LZD therapy, 2 *E. faecalis* strains isolated from urine specimens were both resistant to LZD (MICs: 8 mg/mL, 16 mg/mL, respectively), among 8 strains from stool specimens (6 were isolated before therapy, and 2 were isolated after therapy), LZD susceptible, intermediate, and resistant strains were 4, 2, and 2 respectively (MICs: 0.25-12 mg/mL). 10 strains of *E. faecalis* were homologous by PFGE typing. **Conclusion** In this case, the detection of *E. faecalis* from urinary tract and intestinal tract is homologous, which suggested that LZD-resistant *Enterococcus* may be colonized in vivo for a long time, and may be shift to cause bacterial infection.

**[Key words]** linezolid; *Enterococcus faecalis*; clinical resistance; colonization; homology

[Chin J Infect Control, 2017, 16(4):343-345, 350]

[收稿日期] 2016-05-24

[基金项目] 深圳市科技创新委基础研究基金项目(JCYJ20150402152130173); 深圳市南山区科技项目(2015019, 2015022)

[作者简介] 蒲彰雅(1989-), 女(瑶族), 湖南省怀化市人, 硕士研究生, 主要从事细菌耐药性研究。

[通信作者] 邓启文 E-mail: qiwendeng@hotmail.com

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)广泛分布在自然界,常栖居在人、动物的肠道和女性生殖道,是常见的一种条件致病菌。近年来随着抗菌药物的广泛应用,不断有临床耐药菌株出现,尤其是耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)等多重耐药菌株的报道不断增加,已经成为社区获得性感染和医院感染的主要病原体之一<sup>[1]</sup>。利奈唑胺(linezolid, LZD)是第一种应用于临床的噁唑烷酮类抗生素,由于全新的分子结构和独特的抗菌机制,使其对包括 VRE 在内的大多数革兰阳性菌所致的感染具有较好的治疗作用,但随着 LZD 在临床上的应用,其耐药问题也逐渐出现,国内外不断有关于 LZD 耐药肠球菌的个例甚至是医院感染暴发的报道,多发生在暴露于利奈唑胺治疗以及延长疗程的患者中<sup>[2-4]</sup>。目前鲜有关于无 LZD 治疗史患者检出利奈唑胺耐药菌株的报道,对于这些患者其临床分离菌株与定植于患者体内菌株的同源性和突变规律有待进一步明确。本研究从 1 例从未使用过 LZD 的肺炎患者临床尿标本中分离出 LZD 耐药肠球菌,继之分别从尿和粪便中分离出多株 LZD 不敏感粪肠球菌,并通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行同源性分析,初步探讨利奈唑胺耐药粪肠球菌的临床分离株与定植株的同源性。

## 1 材料和方法

1.1 菌株来源 1 例肺部感染患者检出的 10 株粪肠球菌,其中 2 株分离自尿标本,8 株分离自粪便标本。

1.2 仪器和试剂 粪肠球菌质控株 ATCC 29212 购自广东省临床检验中心,利奈唑胺耐药粪肠球菌标准株 DENG 1(我科分离保存,Genebank 序列号 CP004081)和沙门菌 h9812(我院微生物室保存)作为对照菌株,VITEK 2 compact 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司),CTCA 培养基购自青岛高科园海博生物技术有限公司,LZD 为美国 Pfizer 公司产品,LZD E-test 条为法国梅里埃公司产品,细菌 DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini kit 为德国 QIAGEN 公司产品。

1.3 菌种鉴定和药敏试验 对于分离的菌株采用法国生物梅里埃 VITEK 2 compact 全自动微生物分析仪及配套的鉴定卡进行菌种的鉴定,菌株 LZD 的药敏试验通过 E-test 测定,严格按照说明书进行

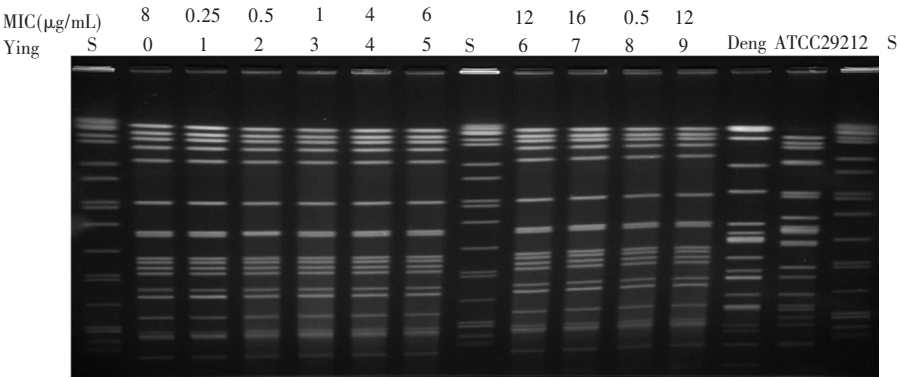
操作。依据 2013 年版美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准进行利奈唑胺的耐药结果判定<sup>[5]</sup>。粪肠球菌 ATCC 29212 为质控菌株。

1.4 细菌基因组 DNA 提取和 PFGE 患者分离的粪肠球菌 Ying 0-9,其菌株的基因组 DNA 采用 SmaI 酶消化法通过 PFGE 确定粪肠球菌菌株之间的同源性<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

2.1 细菌分离过程 共分离粪肠球菌 10 株(其中来源于尿 2 株,粪便 8 株)。患者为 1 例 64 岁老年女性,于 2015 年 8 月诊断为肺部感染入院治疗,入院前从未使用过利奈唑胺药物治疗。2015 年 9 月 16 日在治疗肺部感染过程中取患者尿标本,从中分离出 1 株 LZD 耐药的粪肠球菌(Ying 0)。2015 年 10 月 3 日患者因左侧化脓性颌下腺炎调整为利奈唑胺(600 mg 静脉注射 q12h)抗感染治疗 11 d,治疗前取粪便标本采用肠球菌选择性无抗和含有 2 mg/mL LZD 的 CTCA 培养基培养,挑取敏感、中介和耐药粪肠球菌共 6 株(其中 Ying 1-3 从无抗平板挑取,Ying 4-6 从含 LZD 平板挑取)。2015 年 10 月 21 日 LZD 治疗结束后再次从尿中分离出 1 株利奈唑胺耐药粪肠球菌(Ying 7),同时取粪便按照同样方法培养,分离出粪肠球菌株 Ying 8(无抗 CTCA 平板分离)和 Ying 9(含 LZD 的 CTCA 平板分离)。

2.2 细菌耐药及同源性分析 在使用 LZD 治疗前后,尿标本分离的 Ying 0 和 Ying 7,药敏试验提示均为利奈唑胺耐药菌株,同时对环丙沙星、头孢西丁、妥布霉素、呋西地酸、庆大霉素(高浓度)、四环素、复方磺胺甲噁唑、利福平、奎奴普汀/达福普汀等耐药,但对呋喃妥因、氨苄西林、万古霉素、替考拉宁敏感,且 LZD 治疗后耐药菌株的 MIC 值明显升高, MIC 值分别为 8 mg/mL 和 16 mg/mL。在使用 LZD 前粪便培养分离的 Ying 1-6,其中 3 株敏感,2 株中介,1 株耐药, MIC 值波动在 0.25~12 mg/mL;菌株 Ying 8-9,在 LZD 治疗结束 5 d 后粪便培养分离,1 株敏感,1 株耐药( MIC 值为 12 mg/mL),10 株菌株通过 PFGE 分型检测具有高度同源性,见图 1。提示该患者尿标本检出的 LZD 不敏感菌株可能是肠道细菌移位所致,并长期定植于体内。



注:LZD 检测 MIC 值结果,其中 S 为 H9812 标准株,ATCC 29212 为粪肠球菌质控株,Deng 为我科分离保存利奈唑胺耐药粪肠球菌 Deng 1,0-9 代表粪肠球菌株 Ying 0-9

图 1 患者尿和粪便标本分离的 10 株粪肠球菌 PFGE 图

Figure 1 PFGE mapping of 10 strains of *E. faecalis* isolated from urine and stool specimens

3 讨论

利奈唑胺属于完全人工合成的噁唑烷酮类抗生素,不存在利奈唑胺耐药的天然储备库,该药主要通过 与细菌 50S 亚基 23S rRNA V 区结合,阻止 mRNA 与核糖体结合抑制细菌蛋白质的合成从而产生抗菌作用<sup>[7]</sup>。粪肠球菌有 4 个拷贝 23S rRNA 基因,屎肠球菌有 6 个 23S rRNA 拷贝基因数,曾经一度认为这种复杂的基因结构形式很难出现利奈唑胺耐药的肠球菌,但是,随着 LZD 在临床上应用的日益广泛,不断有 LZD 耐药肠球菌的报道出现,甚至是小范围内的医院感染暴发,多发生有 LZD 暴露史在抗菌药物选择压力下出现,尤其是患者既往有广谱抗菌药物使用史、免疫抑制、基础疾病、器官移植、侵入性置管等情况下更易造成 LZD 耐药菌株的出现,既往研究表明,细菌耐 LZD 作用机制主要由于下面几个方面:细菌 23S rRNA V 区基因的点突变;编码核糖体蛋白 L3 和 L4 蛋白氨基酸变异;多耐药基因 *Cfr* 基因的获得<sup>[3, 8]</sup>。

目前研究多集中于临床分离 LZD 耐药致病菌株的耐药机制研究,对于既往无 LZD 暴露史,长期定植于患者体内的耐药菌株的定植规律及耐药机制的相关报道较少。学者 Marra AR 等<sup>[9]</sup>曾报道 1 例呼吸机相关肺炎铜绿假单胞菌感染患者的中心静脉置管中分离出 1 株 LZD 耐药粪肠球菌,既往无 LZD 用药史,同时期无医院内多重耐药菌株的传播,考虑其为定植菌株,并未予以特殊治疗,但其耐药机制并未进一步阐明。该院也曾从 1 例反复发作肺炎

(1 年内反复发作 5 次)的急性白血病患者气管分泌物中分离出 LZD 不敏感粪肠球菌 10 株,其 1 年前曾因革兰阳性菌感染接受 LZD 治疗,之后未有 LZD 暴露史,通过 PFGE 分型提示高度同源性,基因测序显示 23S rRNA V 区存在 G2424U、G2576U 突变<sup>[10]</sup>。本例患者从未使用 LZD 治疗,但是从尿和粪便标本中同时分离出 LZD 不敏感菌株,在 LZD 治疗后,不敏感菌株的 MIC 值明显升高,PFGE 分型检测提示高度同源。这些数据表明 LZD 不敏感菌株可长期定植于患者体内,在一定条件下发生移位导致感染发生并在药物选择性压力下出现高水平耐药可能。患者具有 LZD 耐药菌的定植可以使用 LZD 进行治疗,该患者在 LZD 治疗后泌尿道和肠道的 LZD 耐药菌负荷均显著下降,但耐药定植菌对临床结局的影响程度有待进一步研究。对于从无 LZD 接触史的患者体内检出定植的 LZD 不敏感菌株,其定植规律有待进一步阐述,以及是否存在现有耐药机制无法解释的新的耐药特点需要更多的研究资料证实。

目前肠球菌耐药现象日益严峻,一个重要的原因在于抗菌药物的不合理使用,LZD 已成为治疗包括 VRE 在内的难治性革兰阳性菌感染和控制医院感染的理想药物,关注细菌对 LZD 的定植规律和耐药机制有助于延长抗菌药物的使用寿命。本研究初步揭示了既往无 LZD 暴露史的患者体内 LZD 不敏感菌株的同源性特点,提示临床工作中需要密切关注 LZD 不敏感菌株的定植情况和 MIC 值动态变化,防止不恰当的使用造成耐药菌株的选择移位及医院感染的暴发。

(下转第 350 页)

关键<sup>[8-11]</sup>。《医疗机构医疗废物管理培训教材》以及岗位培训制度的制定,顺利地保障了国家级医疗机构医疗废物培训基地的培训工作。通过培训能准确地传播医疗机构医疗废物管理相关知识,进一步推广标准化的医疗机构医疗废物管理模式及技术,加强消除 POPs 的理念,提高医疗机构对医疗废物的管理水平和处置能力,使学员了解医疗废物管理的最新要求与正确管理方法。

[参 考 文 献]

[1] 中华人民共和国国务院. 医疗废物管理条例[Z]. 北京, 2003.

[2] 陈扬, 李培军, 孙阳昭, 等. 我国医疗废物领域履行 POPs 公约对策研究[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(3): 123 - 126, 157.

[3] 世界卫生组织. 医疗废物[EB/OL]. (2015 - 11)[2017 - 02 - 10]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs253/zh/>.

[4] 单淑娟, 熊飏, 赵烁, 等. 医疗机构医疗废物管理项目进展介绍[J]. 中国护理管理, 2011, 11(7): 57 - 58.

[5] 中华人民共和国卫生部. 医疗废物分类目录[Z]. 北京, 2003.

[6] 梁洪蒙, 单淑娟. 国内医院医疗废物管理中存在的问题及建议[J]. 中国护理管理, 2011, 11(12): 77 - 78.

[7] 桑翠, 柏艳, 马昌丽. 医疗废物分类存在问题与原因分析[J]. 中

华医院感染学杂志, 2009, 19(8): 1010.

[8] Sima B, Monika K, Kiran P, et al. Evaluation of awareness regarding biomedical waste management in institute of ophthalmology, Ahmedabad, Gujarat[J]. Natl J Integr Res Med, 2013, 4(2): 32 - 35.

[9] Sarker MA, Harun-Or-Rashid M, Hirosawa T, et al. Evaluation of knowledge, practices, and possible barriers among healthcare providers regarding medical waste management in Dhaka, Bangladesh[J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 2590 - 2597.

[10] Nagaraju B, Padmabathi GV, Puranik DS, et al. A study to assess knowledge and practice on bio-medical waste management among the healthcare providers working in PHCs of Bagepalli Taluk with the view to prepare informational booklet[J]. Int J Med Biomed Res, 2013, 2(1): 28 - 35.

[11] Ismail IM, Kulkarni AG, Kamble SV, et al. Knowledge, attitude and practice about bio-medical waste management among personnel of a tertiary health care institute in Dakshina Kanna-da, Karnataka[J]. Al Ameen J Med Sci, 2013, 6(4): 376 - 380.

(本文编辑:李春辉)

(上接第 345 页)

[参 考 文 献]

[1] Mendes RE, Flamm RK, Hogan PA, et al. Summary of linezolid activity and resistance mechanisms detected during the 2012 LEADER surveillance program for the United State[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(2): 1243 - 1247.

[2] O'Driscoll C, Murphy V, Doyle O, et al. First outbreak of linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an Irish hospital, February to September 2014[J]. J Hosp Infect, 2015, 91(4): 367 - 370.

[3] Ntokou E, Stathopoulos C, Kristo I, et al. Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(8): 1819 - 1823.

[4] Thiesen CM, Bjørang O, Skrede T, et al. Emergence of mutation-based linezolid-resistant invasive *Enterococcus faecalis* in a haemodialysis patient in Norway[J]. APMIS, 2014, 122(1): 83 - 84.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. CLSI, 2013, M100 - S23.

[6] Bourgeois-Nicolaos N, Massias L, Couson B, et al. Dose dependence of emergence of resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* in vivo[J]. J Infect Dis, 2007, 195(10): 1480 - 1488.

[7] Shinabarger DL, Marotti KR, Murray RW, et al. Mechanism of action of oxazolidinones; effects of linezolid and eperezolid on translation reactions[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(10): 2132 - 2136.

[8] Pogue JM, Paterson DL, Pasculle AW, et al. Determination of risk factors associated with isolation of linezolid-resistant strains of vancomycin-resistant *Enterococcus* [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2007, 28(12): 1382 - 1388.

[9] Marra AR, Major Y, Edmond MB. Central venous catheter colonization by linezolid-resistant, vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(5): 1915 - 1916.

[10] Yu ZJ, Chen Z, Cheng H, et al. Recurrent linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a patient with pneumonia [J]. Int J Infect Dis, 2015, 30: 49 - 51.

(本文编辑:陈玉华)