

利奈唑胺非敏感肠球菌的临床特征及耐药机制分析

杨燕文 吴梦莹*

宁夏医科大学总医院, 宁夏 银川 75000

摘要:目的: 对利奈唑胺非敏感肠球菌(Linezolid-nonsusceptible Enterococcus, LNSE)的检出率、分布特征等要素进行了解, 并对其分子分型、主要的药物耐受机制展开具体分析, 在理论层面帮助 LNSE 的医院感染精准防控工作获得依据。方法: 选取 2012 年 1 月 1 日至 2022 年 12 月 31 日期间临床分离的 40 株 LNSE 作为研究对象, 以微量肉汤稀释法明确检测于相关仪器的 LNSE, 结合 WHONET 5.0 软件对 LNSE 的检出率进行统计分析, 并以 2022 年 CLSI 判断标准作为基准, 识别并判断检测得出的 LNSE。23S rRNA、cfr、optrA 及 L3、L4 核糖体位点利奈唑胺耐药基因采用 PCR 法进行检测, 扩增的 PCR 产物的验证使用基因测序方法; 采用多位点序列分型(Multiple locus sequence typing, MLST)分析 LNSE 菌株的同源性。结果: 从 2012 年 1 月 1 日到 2022 年 12 月 31 日共分离鉴定肠球菌 6924 株, 检测出 LNSE 菌株 40 株(粪肠球菌 26 株, 屎肠球菌 14 株), 检出率为 0.58% (40/6924)。23 株 LNSE 菌株检测到耐药基因, 17 株 optrA 基因, 14 株发生 23SrRNA 基因突变。有 8 株同时携带 optrA 基因和 23SrRNA 基因。编码 L3 核糖体蛋白 rplC 基因和编码 L4 核糖体蛋白 rplD 基因以及 cfr 基因未发生突变, 未发现任何耐药基因的 LNSE 有 12 株; 40 株 LNSE 菌株检测到 20 个不同的 ST 型, 其中主要型别是 ST16, 占 12.5% (5/40)。结论: LNSE 菌株检出以粪肠球菌为主, LRE 菌株的主要耐药机制是携带 optrA 基因, 其次是 23SrRNA 发生基因突变, 并检测到新的耐药基因表型 (optrA +/23SrRNA+)。

关键词: 利奈唑胺非敏感肠球菌; PCR、MLST、ST16、optrA

作为人体及其他动物肠道内生存的正常菌群, 肠球菌亦是引起医院感染的致病菌常见类型之一, 会导致患者出现各种不同类型的疾病, 如尿路感染等^[1]。耐多药菌株正随着菌群自身耐药性的加强和当前滥用抗生素现象的普遍存在而呈现增多的形势。第一个被应用于临床的恶唑烷酮类抗菌药是利奈唑胺, 药物作用机制在于对细菌蛋白质的合成过程进行抑制^[2], 在耐药革兰阳性菌感染治疗进程中, 临床医学领域将其视作最后一道防线。对于利奈唑胺, 目前的肠球菌已呈现出越来越强的耐药性, 这一问题急需通过科学有效的手段进行应对和处理; 该菌群的耐药机制关键因素涉及 23SrRNA 基因的突变、有关移动遗传元件 (MGE) 的获得性耐药基因如 cfr、cfr (B)、optrA、poxtA 等^[3]。恶唑烷酮耐药基因已在多种细菌中发现, 位于不同的移动遗传元件 (MGEs) 上, 包括质粒、转座子、感染性载体元件 (ICEs)、噬菌体和基因组岛。这些 MGEs, 以及由插入序列 (IS) 介导的、携带恶唑烷酮耐药基因的转座单元 (TUs), 不仅可以整合到上述 MGEs 中, 在 cfr、optrA 和 poxtA 基因的传播中起着重要作用, 不仅跨越菌株、物种、属的界限, 甚至跨

越家族和属的界限。此外, 这些 MGEs 通常携带额外的耐药基因, 支持恶唑烷酮耐药基因的共选择和持续存在^[4]。目前, 已鉴定出几种耐药性或降低对恶唑烷酮敏感性的机制, 可以总结如下: (i) 23S rRNA 和/或 L3 和/或 L4 核糖体蛋白的突变; (ii) rlmN 基因活性的丧失; (iii) 主动外排; (iv) 包括 Cfr 和 Cfr 样甲基转移酶以及 ABC-F 蛋白 OptrA、PoxtA 和 PoxtA2 的转移性机制^[5]。

细菌耐药性的获取与提升速度均受耐药基因存在、传播等环节的影响, 二者之间的变化成正比。耐药基因越多、传播越快, 肠球菌耐药性也会随之呈现快速且明显的提升, 肠球菌相关感染性疾病的治疗难度将会因此加剧。除了有助于不同菌群之间克隆关系研究, 细菌分型方法的应用也有助于病原菌与感染源之间相互关系的明确、病原菌流行与交叉感染的控制等发挥推动作用。本文研究选取我院在 2012 年 1 月 1 日至 2022 年 12 月 31 日期间临床分离的 40 株 LNSE 作为研究对象, 旨在探讨其检出率与耐药性。结合多位点序列分型 (MLST), 测定并分析耐药菌株与 LNSE 菌株之间的相关指标信息, 涵盖耐药菌株的同源性对 LNSE 菌株间的亲

缘关系、LNSE 菌株间的克隆相关性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

1.1.1 临床菌株

收集宁夏医科大学总医院 2012 年 1 月 1 日到 2022 年 12 月 31 日临床分离的利奈唑胺非敏感肠球菌 (LNSE) 和利奈唑胺敏感肠球菌 (Linezolid-susceptible Enterococcus, LSE), 均为非重复分离菌株。

1.1.2 质控菌株

标准菌株为粪肠球菌 ATCC29212, 来源于实验室购买保存。

1.2 主要试剂和仪器

鉴定仪器为 Vitek 2 Compact; 试剂有 GP 鉴定卡、GP67 药敏卡 (法国生物梅里埃公司); 2×HieffTM PCR Master Mix (南京诺维赞); PCR 引物由上海生工合成; 分子量 DL2000marker (南京诺维赞); Genered 核酸染料 (美国 Biotium 公司); 50×TAE 缓冲液 (博奥拓达); MALDI-TOF 细菌质谱鉴定仪 (法国生物梅里埃公司); PowerPac 水平电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Gel Doc XK 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 药敏试验

以常规细菌培养法在 2012 年 1 月至 2022 年 12 月期间培养临床微生物标本的细菌, 并以 Vitek 2 Compact 全自动细菌及药敏仪、MALDI-TOF 细菌质谱鉴定仪鉴定其中存在的肠球菌属。以革兰阳性药敏卡开展该菌群的常规药敏试验、测定该菌群对利奈唑胺的最低抑菌浓度 (MIC); 结合 CLSI M100 推荐的药敏方法 - 微量肉汤稀释法进行应用, 明确检测于上述仪器检的 LNSE 菌株。

1.4 细菌 DNA 的提取

将纯培养菌落进行挑取、放入 0.5mL 离心管, 放置在 100 °C 温度条件下进行 10min 的水浴处理, 再做 30s 的 13000 × g 离心处理。处理之后, 离心管内的上层清液就是基因检测模板液, 将其妥善保存于 -20 °C 环境内, 为后续环节做好准备。

1.5 PCR 扩增及测序

以 PCR 法对 23SrRNA 第 5 功能区基因、cfr 基因、optrA 基因以及 L3、L4 核糖体位点进行扩增处理, 以相关文献 [6-7] 所述作为依据和标准, 进行引物的合成操作。反应

体系为 25 μL, 其中的构成包含 12.5 μL 的 2×HieffTM PCR Master Mix, 2 μLDNA 模板, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 8.5 μL 的 ddH₂O。用 PCR 法进行处理时, 设定的温度条件与时常分别为 94 °C 下持续 5min, 94 °C 下持续 30 s, 58 °C 下持续 45 s, 72 °C 下持续 45 s, 共计 30 个循环; 72 °C 下持续 7min。经过琼脂糖凝胶电泳进行扩增处理的 PCR 产物将被送至上海生工公司以作双向测序, 测序的结果将在 GenBank 进行查询。

1.6 LNSE 的同源性分析

LNSE 菌株的同源性分析方法应用的是多位点序列分型 (Multiple locus sequence typing, MLST), 以 MLST 网站 (<https://pubmlst.org/efaecalis/>) 作为 7 个内源性管家基因序列的参考, PCR 反应体系与上述一致。PCR 扩增产物将被送至上海生工公司以作双向测序。最小生成树的构建将以 BioNumerics 软件进行。

2 结果

2.1 肠球菌属菌种构成比

从 2012 年 1 月 1 日到 2022 年 12 月 31 日我院共检出 6924 株肠球菌, 其中屎肠球菌 4162 株, 占 60.1%; 粪肠球菌 1826 株, 占 26.37%; 鹌鸡肠球菌 275 株, 占 3.97%; 铅黄肠球菌 258 株, 占 3.73%; 鸟肠球菌 152 株, 占 2.2%; 棉子糖肠球菌 104 株, 占 1.5%; 海氏肠球菌 89 株, 占 1.29%; 其他肠球菌 58 株, 占 0.84%。

2.2 LNSE 菌株的药敏分析

从 2012 年 1 月 1 日到 2022 年 12 月 31 日共分离鉴定肠球菌 6924 株, 其中对利奈唑胺敏感的肠球菌为 6884 株, 检测到 40 株 LNSE 菌株 (粪肠球菌 26 株, 屎肠球菌 14 株), 检出率为 0.58% (40/6924), 其中 LIE 共 28 株, 检出率为 0.4% (28/6924); LRE 共 12 株, 检出率为 0.17% (12/6924), 粪肠球菌对利奈唑胺总的耐药率为 0.4% (8/1826), 屎肠球菌对利奈唑胺总的耐药为 0.1% (4/4162)。分离出 12 株 LRE 菌株, MIC 值为 8-32 μg/ml。LNSE 菌株表现为出多重耐药表型, 对环丙沙星、左氧氟沙星、高浓度庆大霉素、红霉素、四环素的耐药率均 > 40%, 对替考拉宁的耐药率为 0, 对万古霉素的耐药率 < 4%。

2.3 LNSE 菌株的科室和标本类型分布

LNSE 菌株科室分布中肝胆外科占 25% (10/40), 急诊科占 17.5% (7/40), 重症监护室占 10% (4/40), 其他分

别为泌尿外科、胃肠外科、小儿外科、心内科、妇科等，标本类型中尿液占 35% (14/40)，胆汁占 20% (8/40)，分泌物占 17.5% (7/40)，血液占 7.5% (3/40)，引流液占 7.5% (3/40)，其他占 12.5% (5/40)。

2.4 LNSE 菌株的耐药基因检测结果

选取了 23SrRNA、cfr、L3、L4、optrA 跟利奈唑胺耐药相关的基因做检测，发现有 23 株菌株产生耐药基因，可分为单耐药基因和双耐药基因两类。单耐药基因：17 株为 optrA 基因，14 株为 23SrRNA 基因突变。双耐药基因：同时携带 optrA 基因和 23S rRNA 基因有 8 株。编码 L3 核糖体蛋白 rplC 基因和编码 L4 核糖体蛋白 rplD 基因以及 cfr 基因未发生突变，未发现任何耐药基因的 LNSE 有 12 株。电泳分析图谱见图 1a、1b 和图 2a、2b。

2.5 LNSE 菌株的 MLST 分析

将 40 株 LNSE 中 26 株粪肠球菌的七个管家基因 (gdh、gyd、pastS、gki、aroE、xpt、yqiL) 和 14 株屎肠球菌的七个管家基因 (adk、atpA、ddl、gdh、gyd、purK、pstS) 上传 MLST 官网进行比对，共有 20 个 ST 型，其中粪肠球菌中发现 ST16 型为 5 株，ST25 型为 3 株，ST506 型为 2 株，其他分别为 ST969、ST954、ST300、ST330、ST480、ST179、ST714、ST191、ST217、ST241、ST436、ST65、ST256、ST475、ST1184。屎肠球菌中只发现 2 株 ST78 和 1 株 ST17。粪肠球菌 A6 株和屎肠球菌 B1、B2、B3、B7、B10、B12、B13 和 B14 株在网站上未被找到，这可能表明新的 ST 类型，需要进一步的验证和确认，必须提交给 pubMLST 平台以获得新序列类型的新等位基因。

3 讨论

医院感染的第一大菌种是葡萄球菌，当前肠球菌已成为仅次于该菌群的医院感染第二大革兰阳性菌，原因在于其细胞壁厚度高、多重耐药性表现显著且频繁。对于多重耐药革兰阳性菌引起的严重感染，临床以恶唑烷酮类抗生素 1——利奈唑胺作为最主要的治疗方式。多数肠球菌对该药物的敏感性依旧存在，但国内外针对其耐药菌株的研究报道并不少见。根据 CHINET 中国细菌耐药监测网公布的相关数据可知，在 2018 年，对于利奈唑胺的耐药率，粪肠球菌呈现 1.9% 的水平；2012 年至 2021 年期间我院测定得出 0.4% 的耐药率，经由 40 株 LNSE 菌株的临床分离操作，属于 LRE 的株数为 12 (MIC 值为 8–32 $\mu\text{g/ml}$)，属于 LIE 的株数为 28。根据

文献资料提出的建议，MIC 值在 8mg/L 至 16 mg/L 区间内应属于低水平耐药，MIC 在 64 mg/L 以上则属于高水平耐药 3。其中低水平耐药有发展成高水平耐药的可能性，进而发展成“超级细菌” 4。因而有必要对我院 LRE 菌株的分子分型、主要耐药机制展开针对性的研究分析。

就当前而言，对于利奈唑胺的耐药性，23SrRNA V 区的 G2576T 点突变是粪肠球菌最为常见的耐药机制 [12]。Wang 等于 2015 年第一次发现存在于我国人、动物源肠球菌内的 optrA 耐药基因；在 cfr 基因被报道之后，它是第 2 个被研究报道的可转移性 LZD 耐药基因。该耐药基因编码是 ABC-F 家族中包含的 ABC 转运蛋白类型之一，基于核糖体保护机制的运行，有效介导肠球菌对恶唑烷酮类（如利奈唑胺、泰地唑胺）以及酰胺醇类（如氯霉素、氟苯尼考）的耐药性，能够在不同的肠球菌之间实现快速、轻易的传播。由本文研究结果可知，呈现 optrA 基因阳性的株数为 17，占比为 42.5%，其中 LRE 为 7 株，LIE 为 10 株。23SrRNA 发生基因突变为 14 株，其中 8 株为 LRE，6 株为 LIE。同时携带 optrA 基因和 23SrRNA 基因有 8 株 (EF03、EF05、EF14、EF20、EF21、EF22、EF24、EF25)，其中 7 株为 LRE，1 株为 LIE，可见我院 LRE 菌株耐药性的机制主要在于 optrA 基因、23SrRNA 基因的同时携带。后续将需要持续深入地筛选这些可能利于利奈唑胺耐药性传播速度与发展速度的 optrA 基因危险因素。

细菌形成生物膜，被认为是能够强化其适应性耐药水平的过程。因而在研究肠球菌对利奈唑胺的敏感性时，不应将形成生物膜这一特点进行忽视或排除。在本文对 LNSE 对利奈唑胺形成耐药的研究中，生物膜有否参与这一过程，有待后续研究的分析与验证。因本研究选取的 LRE 样本量为少数，为深入探讨耐药传播机制，后续的实验探究将会有意识地增加样本量，以保障研究的有效性。



图 1a 40 株 LNSE 菌株 optrA 耐药基因电泳图谱分析

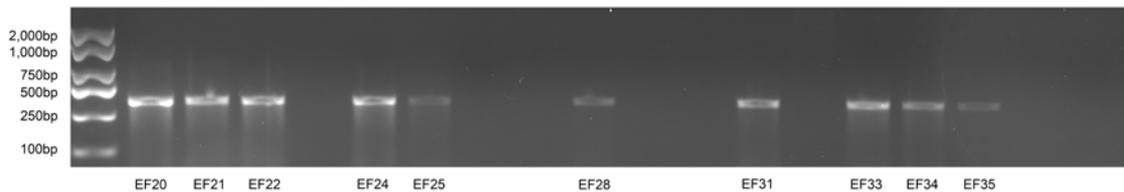


图 1a 40 株 LNSE 菌株 optrA 耐药基因电泳图谱分析

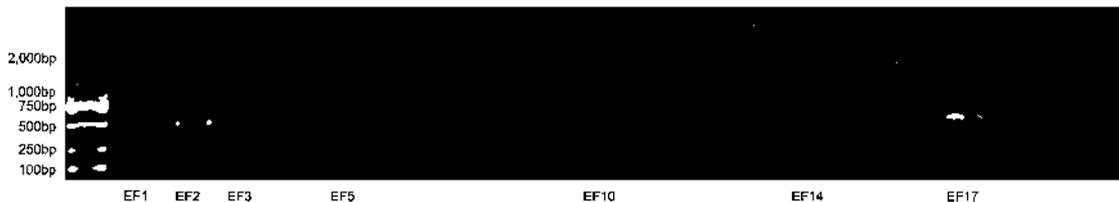


图 2a 40 株 LNSE 菌株 23SRNA 耐药基因电泳图谱分析

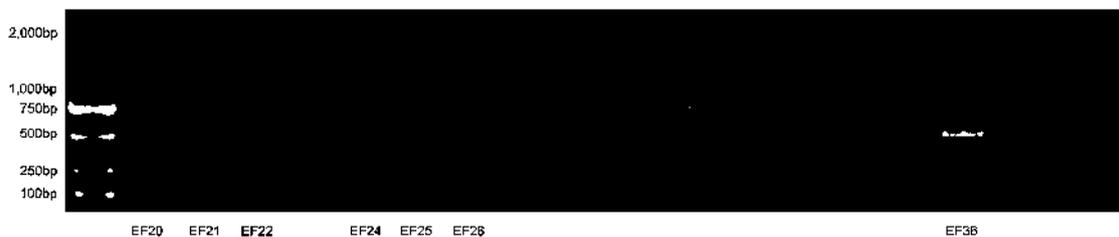


图 2b 40 株 LNSE 菌株 23SRNA 耐药基因电泳图谱分析

参考文献:

[1]BYAPPANAHALLI M N,NEVERS M B,KORAJKIC A,et al.Enterococci in the environment[J].Microbiol Mol Biol rev,2012,76(4) :685-706.

[2]LONG K S,WESTER B.Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the

[3]KURODA M,SEKIZUKA T,MATSUI H,et al.Complete Genome Sequence and Characterization of Linezolid-Resistant Enterococcus faecalis Clinical Isolate KUB3006 Carrying a cfr(B)-Transposon on Its Chromosome and optrA-Plasmid[J].Front Microbiol,2018,9:2576.

[4]Schwarz S, Zhang W, Du XD, Kr ü ger H, Feßler AT, Ma S, Zhu Y, Wu C, Shen J, Wang Y. Mobile Oxazolidinone Resistance Genes in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. Clin Microbiol Rev. 2021 Jun 16;34(3):e0018820.

[5]Brenciani A, Morroni G, Schwarz S, Giovanetti E. Oxazolidinones: mechanisms of resistance and mobile genetic elements involved. J Antimicrob Chemother. 2022 Sep 30;77(10):2596-2621.

[6] Tsiodras S,Gold HS,Sakoulas G,et al.Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus [J]. Lancet,2001,358(9277) :207-208.

[7] Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, et al. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(11):2329-2335.

作者简介:

杨燕文(1982—)男,汉族,宁夏,硕士,宁夏医科大学总医院,副主任技师,主要研究脑血管疾病。

基金项目:宁夏医科大学校级科研项目(XY2024047)。