

临床分离屎肠球菌 *pilA* 和 *hyl<sub>Efm</sub>* 基因流行病学研究

李佳俊, 黄文祥, 辛小娟, 余 轩, 尹 珍

(重庆医科大学附属第一医院感染科, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**检测屎肠球菌菌毛样结构蛋白基因 *pilA* 和类透明质酸酶基因 *hyl<sub>Efm</sub>* 在临床感染株中的分布, 探讨屎肠球菌感染率持续上升的原因。**方法:**采用多重 PCR 检测临床感染株、住院患者肠道定植株和健康志愿者肠道定植株的 *pilA* 和 *hyl<sub>Efm</sub>* 基因的分布; 然后通过接合实验确认 *pilA* 和 *hyl<sub>Efm</sub>* 基因在屎肠球菌间的传递方式; 最后采用分子杂交法确认转移后 *pilA* 和 *hyl<sub>Efm</sub>* 的质粒或染色体定位。**结果:**137 株屎肠球菌感染株中共筛查确认 120 株携带 *pilA* 基因, 阳性率为 88%; 21 株携带 *hyl<sub>Efm</sub>* 基因, 阳性率为 15%。分离鉴定住院患者肠道定植株、健康志愿者肠道定植株各 50 株, *pilA* 基因阳性菌株分别为 35 株 (阳性率 70%)、26 株 (阳性率 52%), 临床感染株与住院患者肠道定植株、健康志愿者肠道定植株 *pilA* 基因携带率差异具有统计学意义 ( $P < 0.0001$ ;  $P = 0.0080$ )。接合实验证实 *pilA* 和 *hyl<sub>Efm</sub>* 基因均能通过质粒的接合在不同菌株间进行传递, 并同时伴随耐药基因传递。Southern Slot 杂交发现 *pilA* 与 *hyl<sub>Efm</sub>* 基因可位于同一大质粒上, 不同菌株间此质粒大小存在差异 (145.5~291 kb)。**结论:**临床感染患者分离屎肠球菌大多携带 *pilA* 基因。*pilA* 和 *hyl<sub>Efm</sub>* 基因可通过同一个可移动大质粒在菌株之间进行传递, 同时伴随耐药基因的转移。**【关键词】**屎肠球菌; 菌毛样结构蛋白基因 *pilA*; 类透明质酸酶基因 *hyl<sub>Efm</sub>*; 质粒

【中图分类号】R378.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-04-22

Prevalence of genes involved in *pilA* and *hyl<sub>Efm</sub>* of clinical isolates of *enterococcus faecium*

Li Jiajun, Huang Wenxiang, Xin Xiaojuan, She Xuan, Yin Zhen

(Department of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the relationship between *pilA* and *hyl<sub>Efm</sub>* genes and the pathogenic mechanism of *enterococcus faecium*. **Methods:** A multiplex PCR was applied to detect the distribution of *hyl<sub>Efm</sub>* and *pilA*. The transfer mode between strains of *enterococcus faecium* was confirmed via filter matings. S1 nuclease and I-CeuI assay was performed to detect the position of *pilA* and *hyl<sub>Efm</sub>* genes. **Results:** Totally 137 strains of *enterococcus faecium* were isolated, 88% clinical isolates (120/137 isolates) carrying *pilA* genes and 15% clinical isolates (21/137 isolates) carrying *hyl<sub>Efm</sub>* gene. Fifty strains of inpatients and 50 strains of health controls were isolated respectively; 70% isolates (35/50 isolates) carrying *pilA* genes and 52% isolates (26/50 isolates) carrying *pilA* genes were respectively observed in inpatients and health controls. Highly significant differences in isolates carrying *pilA* genes among clinical group, inpatients group and health controls group were observed ( $P < 0.0001$ ,  $P = 0.0080$ ). Filter mating confirmed that *pilA* and *hyl<sub>Efm</sub>* genes can transfer between different strains through plasmid conjugation. Southern hybridization found both *pilA* and *hyl<sub>Efm</sub>* genes located at a large plasmid with size running between 145.5 kb and 291 kb. **Conclusion:** Positive rate of Pilus-like structures protein genes *pilA* of *enterococcus faecium* isolated from our hospital is consistently high. *pilA* and *hyl<sub>Efm</sub>* genes simultaneously encode on a large plasmid containing variable antibiotic resistance genes in different isolates of nosocomial *enterococcus faecium* strains.

**【Key words】***enterococcus faecium*; pilus-like structures *pilA*; hyaluronidase *hyl<sub>Efm</sub>*; plasmid

肠球菌是医院感染主要的致病菌之一, 临床上以粪肠球菌感染居多 (约占 90%), 但在过去的二十

多年内, 屎肠球菌所引起的感染由原来的不到 10%, 上升到 30%~40%<sup>[1]</sup>。近十年来, 中国也出现类似现象, 屎肠球菌所引起的感染比率上升速度更快, 卫生部全国细菌耐药监测和 CHINET 2011 年度报告示屎肠球菌所引起的感染占肠球菌 45%~49%<sup>[2]</sup>。免疫缺陷病人的增加和抗生素广泛大量使用导致屎肠球菌耐药性增强, 促使肠球菌易于在肠道内定植, 为北美地区导致肠球菌医院感染上升的主要原因。我国屎肠球菌抗生素耐药特点却是耐万古霉素肠球

作者介绍: 李佳俊, Email: kajunin@163.com,

研究方向: 抗生素和细菌耐药。

通信作者: 黄文祥, Email: wenxiang\_huang@163.com。

基金项目: 重庆市教育委员会科技项目 (编号: KJ100311); 重庆市渝中区科委科研项目 (编号: cstc2008BB53937); 重庆市自然科学基金计划项目 (编号: cstc1110093)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150918.1241.002.html> (2014-06-09)

菌(VRE)的比例低<sup>[3]</sup>。因此,万古霉素耐药性增强并不是尿肠球菌感染率上升的主要原因,尿肠球菌的耐药性与致病关系仍不能确定。

由于细菌对宿主细胞的黏附是其侵入机体及引发宿主致病的关键一步,住院患者发生尿肠球菌感染前常伴发肠道尿肠球菌定植,而菌毛在革兰阳性菌中主要涉及对宿主细胞的黏附和侵袭,是一个重要的毒力因子<sup>[4]</sup>。PilA 和 PilB 是尿肠球菌类菌毛样结构的 2 个蛋白亚基<sup>[5]</sup>。PilB 被报道可能与尿肠球菌生物膜形成以及与尿路感染<sup>[6]</sup>相关。PilA 的作用却鲜有报道, Kim 等<sup>[7]</sup>发现尿肠球菌葡萄毛样结构蛋白基因 *pilA* 可位于一个携带类透明质酸酶基因 *hylEfm* 的大质粒(*pHylEfm*)上,尿肠球菌一旦获得此质粒,其在小鼠肠道中的定植能力明显提高<sup>[8]</sup>以及由其所致的小鼠腹膜炎致死率亦显著上升<sup>[9]</sup>且此质粒可在尿肠球菌间传递。因此,本研究推测 *pilA* 和 *hylEfm* 基因可能相互作用,促进尿肠球菌在肠道中的定植。本研究拟对我院 2009 至 2012 年临床分离的尿肠球菌感染株的 *pilA* 和 *hylEfm* 基因的分布状况及携带大质粒(*pHylEfm*)进行研究,探讨本地区尿肠球菌感染率上升的原因。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株及其来源 137 株尿肠球菌感染株来自重庆医科大学附属第一医院 2009 年 1 月至 2012 年 12 月住院患者的尿液、痰液、血液、伤口等分泌物、胸腹水以及胆汁等标本。常规分离菌株,采用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪进

行生化鉴定并保存。住院患者肠道定植株和健康志愿者肠道定植株分别来源于我院临床科室非尿肠球菌感染住院患者粪便标本及重庆市区健康志愿者粪便标本,具体分离、鉴定及保存见下述(方法 1.2.2)。尿肠球菌 TX0016(DO)及 TX0082<sup>[10]</sup>由德克萨斯州立大学医学院 Barbara 教授馈赠。尿肠球菌 CMU374、CQV01R 均为本实验所分离,详见表 1。

1.1.2 主要试剂及仪器 PCR 反应试剂(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);VITEK 2 Densichek Plus 比浊仪(法国生物梅里埃公司);Termo Cycle S1000 PCR 扩增仪、CHEF-Mapper XA 型脉冲场电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);地高辛(DIG)标记杂交试剂盒(瑞士 Roche 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 尿肠球菌 *pilA* 和 *hylEfm* 基因检测 水煮法提取细菌 DNA 模板,引物:*pilA* 基因<sup>[5]</sup>上游:5'-TTTTGTGTGACTAA-TCCAG-3',下游:5'-ATGGCAATAAATCGGTATGTA-3',扩增片段为 501 bp;*hylEfm* 基因<sup>[10]</sup>上游:5'-ACAGAAGAGCTGC-AGGAAATG-3',下游:5'-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA-3',扩增片段为 276 bp;目的基因 *pilA*、*hylEfm* 多重 PCR 反应体系参照文献<sup>[11]</sup>,TX0016、TX0082 分别作阳性对照和阴性对照。1%琼脂糖凝胶电泳(120 V)32 min 后凝胶成像仪观察 DNA 特异性条带并保存结果,引物合成及扩增产物测序工作均由上海英潍捷基有限公司完成。

1.2.2 非临床感染株的分离、鉴定及 *pilA*、*hylEfm* 的检测 非临床感染株的分离采用选择培养基—头孢氨苄-氨曲南-阿拉伯糖琼脂筛选<sup>[12]</sup>,选取显白色菌落使用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪进行生化鉴定并保存。*pilA*、*hylEfm* 基因检测方法同上。

1.2.3 质粒接合和转化 实验用菌信息见表 1。供体菌 A、供体菌 B 与受体菌 CQV01R、供体菌 A 与受体菌 B 的 3 组接合实验使用同一个操作规程<sup>[13]</sup>。在脑心浸润液琼脂上,菌 A 与 CQV01R 得到的接合子通过以下抗菌药物进行选择:红霉素(200 μg/ml)-利福平(100 μg/ml)、链霉素(2 000 μg/ml)-

表 1 接合实验中所使用的尿肠球菌菌株

Tab.1 *E.faecium* strains used for filter mating experiments

| 菌株                  | 本实验用名    | <i>pilA</i> | <i>hylEfm</i> | 耐药性                                                                    | 出处    |
|---------------------|----------|-------------|---------------|------------------------------------------------------------------------|-------|
| 供体菌                 |          |             |               |                                                                        |       |
| TX0016(DO)          | A        | +           | +             | ERY <sup>r</sup> ,STR <sup>r</sup>                                     | 文献[7] |
| CMU374 <sup>a</sup> | B        | +           | -             | VAN <sup>r</sup> ,GEN <sup>r</sup> ,AMP <sup>r</sup> ,LEV <sup>r</sup> | 本实验   |
| 受体菌                 |          |             |               |                                                                        |       |
| CQV01R <sup>b</sup> | CQV01R   | -           | -             | RIF <sup>r</sup>                                                       | 本实验   |
| 接合子细菌               |          |             |               |                                                                        |       |
| CQV01RxA            | CQV01RxA | +           | +             | ERY <sup>r</sup> ,STR <sup>r</sup>                                     | 本实验   |
| CQV01RxB            | CQV01RxB | +           | -             | VAN <sup>r</sup> ,GEN <sup>r</sup> ,ERY <sup>r</sup>                   | 本实验   |
| BxA                 | BxA      | +           | +             | ERY <sup>r</sup> ,STR <sup>r</sup> ,VAN <sup>r</sup> ,GEN <sup>r</sup> | 本实验   |

注:a,尿肠球菌 CMU374 于 2010 年 4 月 30 日分离自我院胃肠外科临床感染患者的穿刺液中,为尿肠球菌多重耐药菌。b,尿肠球菌 CQV01 分离自本地区社区志愿者的粪便中,为各种抗生素敏感菌,CQV01R 菌株为 CQV01 菌耐利福平的衍生菌,是通过使用抑菌浓度的利福平体外逐步诱导 CQV01 敏感菌产生对利福平产生耐药性。菌株 CQV01RxA 及 CQV01RxB 分别为供体菌 A 及供体菌 B 与受体菌 CQV01R 接合所得接合子细菌。BxA 为供体菌 A 与受体菌 B 接合所得接合子 + 或 -,表示此基因存在或不存在。ERY<sup>r</sup>,红霉素耐药;STR<sup>r</sup>,链霉素高水平耐药;VAN<sup>r</sup>,万古霉素耐药;GEN<sup>r</sup>,庆大霉素耐药;AMP<sup>r</sup>,氨苄西林耐药;LEV<sup>r</sup>,左氧氟沙星耐药;RIF<sup>r</sup>,利福平耐药

利福平(100  $\mu\text{g/ml}$ ),纯化后挑取生长的单一菌落,接种于含红霉素(200  $\mu\text{g/ml}$ )–链霉素(2 000  $\mu\text{g/ml}$ )的 BHI 琼脂平板上,生长的细菌即为接合子细菌 CQV01RxA。菌 B 与 CQV01R 所得接合子筛选组合:万古霉素(128  $\mu\text{g/ml}$ )–利福平(100  $\mu\text{g/ml}$ )、庆大霉素(1 000  $\mu\text{g/ml}$ )–利福平(100  $\mu\text{g/ml}$ ),纯化后的单一菌落接种于含有万古霉素(128  $\mu\text{g/ml}$ )–庆大霉素(1 000  $\mu\text{g/ml}$ )的脑心浸润液琼脂平板上,得接合子 CQV01RxB。菌 A 与菌 B 的筛选组合:链霉素(2 000  $\mu\text{g/ml}$ )–万古霉素(128  $\mu\text{g/ml}$ ),纯化后再在上述培养基中培养 1 次,挑取生长的单一菌落接种于含庆大霉素(1 000  $\mu\text{g/ml}$ )平板,得接合子 BxA;利用 PCR 法检测 *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* 基因是否转移,同时检测万古霉素耐药基因 *vanA*、红霉素耐药基因 *erm(B)*、庆大霉素耐药基因 *aac(6')-aph(2'')*、链霉素耐药基因 *ant(6')-I* 是否同时发生转移,上述 4 种耐药基因所需引物见表 2。

1.2.4 接合子细菌体外药敏实验 按美国临床和实验室标准协会 CLSI2012 版<sup>[17]</sup>标准,采用琼脂二倍稀释法对接合实验用菌进行关于高单位庆大霉素、链霉素、红霉素、氨苄西林、左氧氟沙星、万古霉素的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC<sub>s</sub>)测定。

1.2.5 毒力基因定位杂交 为明确 *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* 基因是否位于质粒上,使用 S1 酶、I–Ceu I 酶法进行基因定位<sup>[18]</sup>;参照脉冲场凝胶电泳方法制备细菌包埋凝胶,细胞壁裂解后使用 S1 核酸酶及 I–Ceu I 酶消化,S1 酶切体系:0.01 U S1 核酸酶(Sigma–Aldrich,St.Louis,MO)加入到 200  $\mu\text{l}$  酶切反应体系[50 mmol/L NaCl,30 mmol/L sodium acetate(pH 4.5),5 mmol/L ZnSO<sub>4</sub>];I–Ceu I 酶切反应体系参照文献[9],37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴酶切过夜。电泳参数:6 V/cm,脉冲时间5~35 s,14  $^{\circ}\text{C}$ 冷凝,120 $^{\circ}$ 夹角,时间 22 h。电泳结束后溴化乙锭染色、蒸溜水轻震脱色后凝胶成像系统观察并拍照。而后将胶上 DNA 片段转至尼龙膜,然后按罗氏地高辛杂交试剂盒说明操作进行杂交显

色,2 个基因所使用的探针引物同前。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包,计数资料采用率表示,结果采用 Fisher 确切概率法分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 屎肠球菌临床感染株 *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* 基因检测结果

经 PCR 扩增后的目的基因片段通过琼脂糖凝胶电泳鉴定结果见图 1。目的基因片段 *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* DNA 测序结果分别与基因库中的 *pilA* 基因(Sequence ID:gb|EU909697.1|)、*hylE<sub>fm</sub>* 基因(Sequence ID:gb|AF544400.1|)BLAST 比对,符合率分别达到 98%、99%,证实为 *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* 基因。137 株屎肠球菌感染株中 120 株 *pilA* 基因检测阳性,阳性率为 88%;21 株 *hylE<sub>fm</sub>* 基因检测阳性,阳性率为 15%;4 年来 *pilA* 的总阳性率已接近 90%,可见 *pilA* 基因在临床感染株中呈现高表达;详见表 3。

### 2.2 非临床感染株 *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* 基因携带率

从临床住院患者及社区志愿者粪便中分离到的屎肠球菌非感染株各 50 株,*pilA* 基因阳性菌分别为 35 株(阳性率 70%)、26 株(阳性率 52%),2 个群组中均未发现 *hylE<sub>fm</sub>* 基因携带。经 Fisher 精确检验,将临床感染株 *pilA* 基因阳性携带率结果分别与住院患者肠道定植株、健康志愿者肠道定植株 *pilA* 基因阳性携带率结果进行两两比较,临床感染株与住院患者肠道定植株、临床感染株与健康志愿者肠道定植株 *pilA* 基因携带率差异有统计学意义( $P=0.000\ 1$ ;  $P=0.008$ ),显示临床分离的感染株中 *pilA* 基因呈相对高携带状态。

### 2.3 质粒的接合、转化实验

接合子细菌为模板,经 *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* 引物扩增后得到的产物行测序并比对确认。产物琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2(左),*pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* 基因由供体菌 A 转移至受体菌 CQV01R;供

表 2 本实验所用 PCR 引物  
Tab.2 PCR primers used in this study

| 引物名称                    | 预计产物大小 (bp) | 引物序列 (5'–3')                                            | 出处     |
|-------------------------|-------------|---------------------------------------------------------|--------|
| <i>vanA</i>             | 732         | 上游:GGGAAAACGACAATTGC<br>下游:GTACAATGCGGCCGTTA            | 文献[14] |
| <i>aac(6')-aph(2'')</i> | 348         | 上游:CAGAGCCTTGGAAGATGAAG<br>下游:CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC   | 文献[15] |
| <i>erm(B)</i>           | 616         | 上游:GAAAAGGTACTCAACCAAATA<br>下游:AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC | 文献[16] |
| <i>ant(6')-I</i>        | 597         | 上游:ACTGGCTTAATCAATTTGGG<br>下游:GCCTTTCCGCCACCTCACCG      | 文献[15] |

表 3 2009 至 2012 年临床分离屎肠球菌毒力因子 *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* 基因携带率 (%)

Tab.3 Distribution of Virulence genes *pilA*、*hylE<sub>fm</sub>* in *enterococcus faecium* isolated from 2009–2012 (%)

| 目的基因                                       | 2009年 (n=44) (%) | 2010年 (n=46) (%) | 2011年 (n=28) (%) | 2012年 (n=19) (%) | 总计 (n=137) (%) |
|--------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|
| <i>pilA</i> (+)                            | 40/44 (91)       | 38/46 (83)       | 26/28 (93)       | 16/19 (84)       | 120/137 (88)   |
| <i>hylE<sub>fm</sub></i> (+)               | 4/44 (9)         | 10/46 (22)       | 6/28 (21)        | 1/19 (5)         | 21/137 (15)    |
| <i>pilA</i> 、 <i>hylE<sub>fm</sub></i> (+) | 4/44 (9)         | 10/46 (22)       | 6/28 (21)        | 1/19 (5)         | 21/137 (15)    |

注:表示此基因阳性。n,菌株数。

体菌 B 将 *pilA* 基因传递至 CQV01R; 供体菌 A 将 *hylEfm* 传递至 B, 可知 *pilA*、*hylEfm* 基因可在屎肠球菌之间可通过接合方式进行传递。相同方法对 *vanA*、*erm(B)*、*aac(6')-aph(2'')*、*ant(6')-I* 进行检测结果如图 2(右)所示, 受体菌 A 将 *erm(B)*、*ant(6')-I* 传递给受体菌 CQV01R; 受体菌 B 将 *vanA*、*aac(6')-aph(2'')*、*erm(B)* 传递至 CQV01R; *ant(6')-I* 可由 A 菌传递至 B 菌, 说明耐药基因亦可伴随 *pilA*、*hylEfm* 在屎肠球菌之间进行传递。

2.4 接合子细菌药敏实验

本研究对接合实验所涉及细菌进行药敏实验发现, 通过接合, 受体菌 CQV01R 从供体菌 A 获得了红霉素及链霉素耐药性, 而对于氨苄西林、左氧氟沙星及万古霉素的耐药性没有明显的变化; CQV01R 从 B 菌中获得了万古霉素、红霉素及庆大霉素的耐药性, 而未获得 B 菌的耐氨苄西林及耐左氧氟沙星特性; B 菌获得 A 菌的链霉素耐药性。值得一提的是, 实验验证后酸药敏 CQV01R 菌所获得的万古霉素耐药性较供体菌 B 在 MIC 值来说, 下降了 1 个梯度, 从 128  $\mu\text{g/ml}$  降至 64  $\mu\text{g/ml}$ , 提示接合过程耐药性发生一定程度的变化。详见表 4。

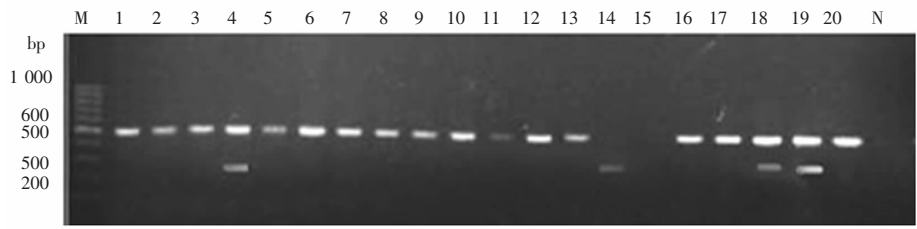
2.5 *pilA* 与 *hylEfm* 基因共存于 1 个大质粒

从图 3A(左)中可以看出, 本实验中所用到的 6 株屎肠球菌均能通过 S1-PFGE 法分离得到 3~5 个质粒条带; 图 3A(中)中可看出 *pilA* 探针能杂交于所有临床株及接合子菌质粒条带上, 但质粒大小存在差异, 最大的为 A 菌(242.5~291 kb),

最小的为接合子细菌 CQV01RxB(约 145.5 kb)。供体菌 A 与接合子细菌 CQV01RxA、BxA 的杂交结果提示受体菌 CQV01R 及菌 B 通过接合方式获得相同大小的质粒; 对于接合子 CQV01RxB, 图中提示 *pilA* 杂交于 2 个不同大小的质粒, 1 个是与 B 菌质粒(含 *pilA* 基因)大小一致, 1 个与受体菌 CQV01R 质粒(约 145.5 kb)大小一致。从图 3A(右)提示对于 *hylEfm*, *hylEfm* 探针能杂交于供体菌 A、接合子细菌 CQV01RxA 及 BxA 中且质粒大小一致, 有趣的是, *hylEfm* 与 *pilA* 基因杂交于相同大小的质粒上。图 3B 可看出经 I-Ceu I 消化可得出 6 个染色体条带, 23S rRNA 探针可杂交于所有的 6 条染色体条带, 而 *pilA*、*hylEfm* 探针的杂交结果显示 2 个基因均不能与染色体条带相吻合。

表 4 接合实验细菌关于多种抗菌药物的 MIC 值  
Tab.4 MICs of enterococcus faecium strains used in filter mating experiments

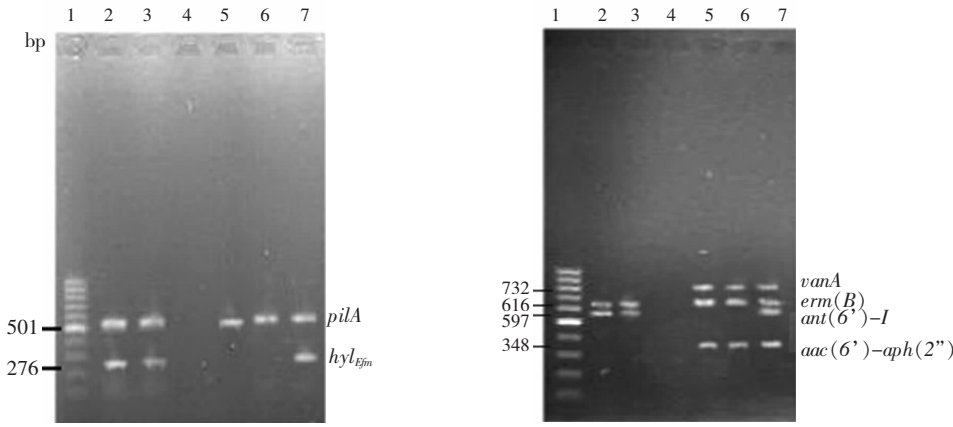
| Strain   | MIC( $\mu\text{g/ml}$ ) |     |       |      | HLR |     |
|----------|-------------------------|-----|-------|------|-----|-----|
|          | LEV                     | AMP | VAN   | ERY  | GEN | STR |
| A        | 2                       | 4   | 1     | >256 | -   | +   |
| CQV01R   | 0.5                     | 2   | 0.125 | 0.25 | -   | -   |
| CQV01RxA | 0.5                     | 2   | 0.25  | >256 | -   | +   |
| B        | 128                     | 128 | 128   | >256 | +   | -   |
| CQV01RxB | 0.5                     | 2   | 64    | >256 | +   | -   |
| BxA      | 128                     | 128 | 128   | >256 | +   | +   |



M. Marker DL1000; 1~18. 临床分离屎肠球菌; 19. TX0016(阳性对照); Lane 20. *hylEfm* 突变; N. TX0082(阴性对照)

图 1 *pilA*、*hylEfm* 基因多重 PCR 产物鉴定结果

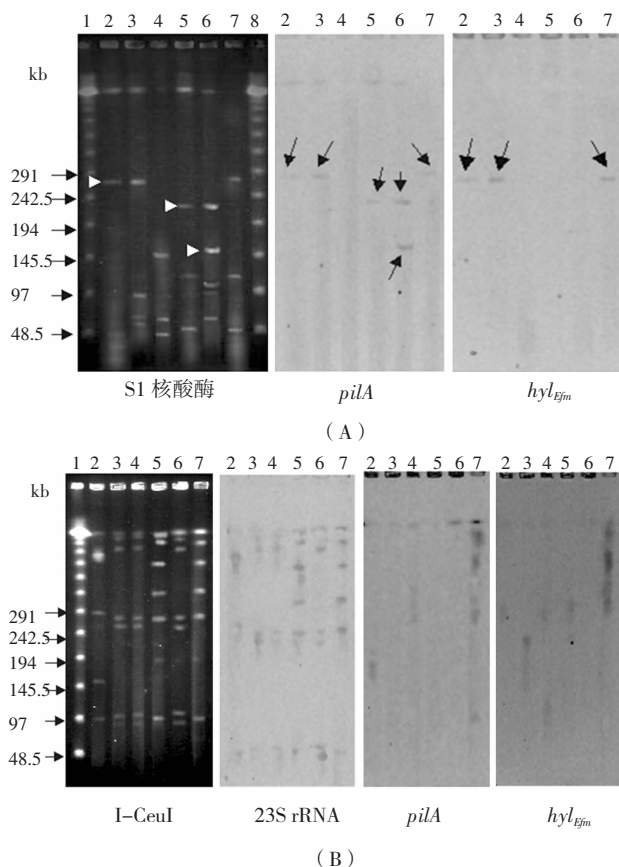
Fig.1 Multiple PCR products of *pilA* and *hylEfm* gene and identification



1. Marker DL1000; 2. TX0016; 3. CQV01RxA; 4. CQV01R; 5. CMU374; 6. CQV01RxB; 7. BxA

图 2 接合实验菌株 *pilA*、*hylEfm* 基因及耐药基因的多重 PCR 检测结果

Fig.2 Multiple PCR products of *pilA* and *hylEfm* and resistance gene



1. lambda ladder PFG Marker; 2. TX0016; 3. CQV01RxA; 4. CQV01R; 5. CMU374; 6. CQV01RxB; 7. BxA

注: A 图左白色箭头表示分离得到的质粒条带, 并可与不同探针进行杂交; 中图黑色箭头表示 *pilA* 探针与相应质粒杂交条带; 右图中黑色箭头表示 *hylEfm* 探针与相应质粒杂交条带。

图 3 接合实验菌株 S1 酶 (A)、I-CeuI 酶 (B) 酶切脉冲场电泳及 *pilA*、*hylEfm* 杂交结果

Fig.3 Results of PFGE use S1 nuclease, I-CeuI digests and hybridizations of *pilA*, *hylEfm*

### 3 讨论

肠球菌作为一种机会性致病菌可导致尿路感染、腹腔感染、胆道感染、菌血症、感染性心内膜炎以及伤口感染等多种感染<sup>[18]</sup>。1990 年后, 引起临床感染的肠球菌属中屎肠球菌与粪肠球菌的比例约为 1:9, 而如今在我国及欧美地区此比例已接近或超过 1:1<sup>[2,19]</sup>。目前, 导致屎肠球菌感染率持续上升原因的探讨主要集中屎肠球菌耐药性增强以及获得新的毒力因子致毒力增强两个方面, 但本地区屎肠球菌的耐药性与致病性的关系尚未确定。

为了探究屎肠球菌感染率上升的原因, 国内外展开了大量的研究。在欧洲, 研究发现了与屎肠球

菌克隆复合群 (clonal complex-17, CC17) 相关的 *esp<sub>fm</sub>* 基因<sup>[9]</sup>, 这个基因可通过接合方式进行传递, 并且体外实验发现其与生物被膜形成相关<sup>[20]</sup>。最近, 在 CC17 中发现高表达的 *acm* 基因, 它编码一个细胞壁锚定胶原黏附素, 在鼠心内膜炎感染模型中起重要作用, 但此基因在鼠腹膜炎模型中并不能增强其毒力<sup>[21]</sup>, 提示在屎肠球菌引起的其它类型感染中, *acm* 的表达并不重要。本课题组在前期研究中通过构建屎肠球菌 *hylEfm* 基因突变株, 并用鼠腹膜炎和新西兰兔心内膜炎动物模型比较了突变前后野生株和突变株毒力改变情况, 结果显示 *hylEfm* mutant 的毒力发生了明显下降, *hylEfm* 基因可能是屎肠球菌抵抗宿主内环境以及致病较为重要的因子<sup>[22]</sup>。但 *hylEfm* 在屎肠球菌致病性及定植方面的作用机制尚不清楚。

G<sup>+</sup>菌典型菌毛是革兰阳性菌与宿主细胞相互作用的重要功能结构, 在细菌黏附、定殖和侵袭过程中发挥关键作用<sup>[4]</sup>。Hendrickx 在屎肠球菌 E1165 基因组中发现 4 个菌毛基因组 (PGE, pilin gene cluster), 其中 PGE1 和 PGE3 分别编码菌毛样结构蛋白 PilA 和 PilB, 进一步研究发现临床分离携带这 2 种基因比例明显高于非临床分离株<sup>[5]</sup>。屎肠球菌 *pilB* 基因编码一个次要菌毛亚单位, 通过对屎肠球菌基因敲除证实 *pilB* 可能与屎肠球菌生物膜形成以及尿路感染相关<sup>[6]</sup>。

本研究通过比较屎肠球菌临床感染株与非临床感染株 *pilA* 基因携带率差异, 显示临床分离的感染株中 *pilA* 基因呈相对高携带状态, 与国外文献报道一致<sup>[5]</sup>, 说明其可能是屎肠球菌感染过程中 1 个重要因子。由分子生物学可知, S1 核酸酶能将共价闭合环状质粒 DNA 切开为线性双链, 经 PFGE 可以分离不同大小的质粒, 并通过条带的形式呈现。I-Ceu I 酶的酶切位点特异性位于 23S rRNA 基因序列上, 针对 TX0016 菌株 23S rRNA 基因序列设计探针, 并与酶切条带进行杂交, 由于 23S rRNA 序列仅位于染色体上, 通过此方法可以验证 *pilA*、*hylEfm* 基因是否位于染色体外, 通过 S1-PFGE、Southern blot 及 I-Ceu I 酶法确认发现临床分离的屎肠球菌中 *pilA* 基因位于一个可移动的大质粒上, 此质粒大小浮动于 145.5~291 kb 之间 (图 3A 左), 另外, *pilA* 基因与 *hylEfm* 基因可同时位于此大质粒上 (图 3A), 大质粒在传递过程中伴随着诸如万古霉素耐药基因 *vanA*、红霉素耐药基因 *erm(B)* 以及庆大霉素耐

药基因 *aac*(6')-*aph*(2'')、链霉素耐药基因 *ant*(6')-I 的同时传递(图 2 右),说明此质粒在医院环境中可通过接合方式使 *pilA* 基因在屎肠球菌间进行传递,传递过程中如此巨大的质粒可获得了一些潜在的毒力因子(如 *hylEfm* 等)以及耐药基因,可使得屎肠球菌在医院环境中具有更强的适应性。通过接合实验,本研究发现在接合传递过程中可出现 *pilA* 基因重组现象,使得基因进行复制和(或)缺失,如供体菌 B 的接合实验中所示,接合子细菌中出现了 2 种大小的质粒(分别与供体菌、受体菌所含质粒大小一致),且受体菌大小的质粒上获得了 *pilA* 基因(图 3A 中),这些可能是由于携带 *pilA* 基因的转座子移动所致,这一现象与 Arias<sup>[9]</sup>得出的结果相似;有趣的是,供体菌 A 与受体菌 B 在进行接合过程中,菌 B 自身的质粒出现丢失现象(图 3A 左 Lane 7),这可能与两质粒之间不相容有关。

本研究初步发现了我院临床分离的屎肠球菌感染株携带菌毛样结构蛋白 *pilA* 基因阳性率近 4 年间居高不下且明显高于非临床感染株,与近年来屎肠球菌感染率上升呈正相关。*pilA* 和 *hylEfm* 基因可定位于同一个可移动大质粒上,此质粒在传递过程中伴随耐药基因的同时传递,这可促使屎肠球菌在住院患者肠道中定植,成为医院感染的优势致病菌。*pilA* 和 *hylEfm* 基因的具体作用机制还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. NHCN annual update; antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections; annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, 29(11): 996–1011.
- [2] 朱德妹, 汪复, 胡付品, 等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国抗感染与化疗杂志*, 2011, 11(5): 321.
- [3] 郑波, 吕媛, 王珊. 2010 年度卫生部全国细菌耐药监测报告: 革兰阳性菌耐药监测[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(24): 5128–5132.
- [4] Mandlik A, Swierczynski A, Das A, et al. Pili in Gram-positive bacteria; assembly, involvement in colonization and biofilm development[J]. *Trends Microbiol*, 2008, 16(1): 33–40.
- [5] Hendrickx AP, Bonten MJ, van Luit-Asbroek M, et al. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 10): 3212–3223.
- [6] Hendrickx AP, Schapendonk CM, van Luit-Asbroek M, et al. Differential *pilA* pilus assembly by a hospital-acquired and a community-derived *Enterococcus faecium* isolate[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 9): 2649–2659.
- [7] Kim DS, Singh KV, Nallapareddy SR, et al. The *fms21*(*pilA*)-*fms20* locus encoding one of four distinct pili of *Enterococcus faecium* is harboured on a large transferable plasmid associated with gut colonization and virulence[J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59(Pt 4): 505–507.
- [8] Rice LB, Lakticova V, Carias LL, et al. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model[J]. *J Infect Dis*, 2009, 199(3): 342–349.
- [9] Arias CA, Panesso D, Singh KV, et al. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hylEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(10): 4240–4246.
- [10] Al-Ahdal MN, Abozaid SM, Al-Shammery HF, et al. Characterization of *Enterococcus faecium* isolates and first report of vanB phenotype-vanA genotype incongruence in the Middle East[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(11): 3223–3229.
- [11] Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, et al. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections[J]. *Adv Pharm Bull*, 2013, 3(1): 197–201.
- [12] Fraenkel CJ, Melhus A. *Enterococcus faecium* coisolated with *Lactobacillus* species can mimic vancomycin-resistant enterococci[J]. *Infect Ecol Epidemiol*, 2011, 1(Special section p1). Doi:10.3402/iee.v1i0.7335.
- [13] Tomita H, Pierson C, Lim SK, et al. Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(9): 3326–3333.
- [14] Eisner A, Gorkiewicz G, Feierl G, et al. Identification of glycopeptide-resistant enterococci by VITEK 2 system and conventional and real-time polymerase chain reaction[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005, 53(1): 17–21.
- [15] Behnood A, Farajnia S, Moaddab SR, et al. Prevalence of *aac*(6')-Ie-*aph*(2'')-Ia resistance gene and its linkage to resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26041.
- [16] Zhang T, Zhang XX, Ye L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26041.
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22th informational supplement [S]. CLSI document M100-S22. Wayne, Pa: CLSI, 2012.
- [18] Gilmore MS. The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance[M]. Washington DC: ASM press, 2002.
- [19] Top J, Willems R, van der Velden S, et al. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(1): 214–219.
- [20] Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(22): 8233–8240.
- [21] Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis[J]. *Infect Immun*, 2008, 76(9): 4120–4128.
- [22] 吴利先, 黄文祥, 罗涛, 等. 屎肠球菌类透明质酸酶基因突变株的构建及功能研究[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(40): 2852–2855.

(责任编辑: 关蕴良)