

β -内酰胺耐药粪肠球菌的低亲和力青霉素结合蛋白检测与多位点序列分型

姚杰,唐伟,程娟,汪林翠,任影丽,周强

摘要 目的 检测临床分离粪肠球菌的耐药性、低亲和力青霉素结合蛋白 pbp4 基因和多位点序列分型 (MLST) 情况。方法 收集临床分离的粪肠球菌 78 株,使用自动化仪器检测其耐药性;采用 PCR 扩增及基因测序的方法检测 TEM 基因和 pbp4 基因突变的突变情况;应用 MLST 对分离菌株进行多位点序列 (MLST) 分型。结果 78 株粪肠球菌对环丙沙星、左氧氟沙星、利福平、红霉素、四环素以及高浓度庆大霉素的耐药率较高,对青霉素和氨苄青霉素的耐药率为 10.3%,未发现对呋喃妥因、万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺耐药的菌株;78 株粪肠球菌中有 8 株扩增出 TEM 基因,全部对青霉素和氨苄青霉素耐药,阳性率为 10.3%;78 株粪肠球菌共分为 16 个序列型,其中 ST179 型和 ST16 型最多,分别有 21 株和 20 株,占 26.9% 和 25.6%,其余依次为 ST6 型 8 株 (10.3%),ST4 型 7 株 (9.0%),ST585 型 6 株 (7.7%),ST480 型 4 株 (5.1%),ST28 型 3 株 (3.8%),其余各 ST 型只检出 1 株;分析 ST 型别与耐药性的关系显示相同 ST 型别的粪肠球菌具有类似的耐药谱。结论 粪肠球菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药机制主要是由于产生由 TEM 基因介导的 β -内酰胺酶所致,与 pbp4 基因的突变没有必然联系;粪肠球菌分离菌株主要以 CC16 (包含 ST16 和 ST179) 克隆株为主且耐药情况严重,需要针对其特点指导临床用药并加强院内感染监控。

关键词 粪肠球菌;耐药性;青霉素结合蛋白;多位点序列分型

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1474-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.007

粪肠球菌是一种寄居于胃肠道的革兰阳性球菌,在环境中普遍存在,可作为机会性病原体引起菌血症、脑膜炎、心内膜炎或泌尿道和伤口感染,是全球医院感染的主要原因之一^[1-2]。由于粪肠球菌表达低亲和力青霉素结合蛋白 PBP4,导致粪肠球菌都

表现出对青霉素和氨苄青霉素的敏感性降低,以及对大多数头孢菌素和所有半合成青霉素的高水平耐药性^[3]。随着粪肠球菌越来越严峻的耐药趋势以及给临床治疗带来的巨大困难,本实验通过对临床分离的粪肠球菌 pbp4 基因的检测以及进行多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 技术,为了解临床分离的粪肠球菌中低亲和力青霉素结合蛋白 (penicillin-binding proteins, PBPs) 的突变状况和遗传信息,明确耐药表型与基因型之间的关系,探讨粪肠球菌的流行变化趋势、进化特点,为临床粪肠球菌感染的预防和治疗提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2019 年 1 月—2021 年 10 月医院临床标本分离的 78 株粪肠球菌,舍弃同一患者相同部位的重叠菌株。标准质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 及粪肠球菌 ATCC 29212。

1.2 主要仪器和试剂 MBT IVD 质谱仪 (Bruker), Vitek-2 全自动微生物分析系统 (Biomérieux), TOne 96G PCR 扩增仪 (Biometra), HE-120 水平电泳槽 (Tanon), PowerPac 电泳仪电源 (BioRad), Gel Doc XR 凝胶成像系统 (BioRad), PCR 混合体系 GoTaq MasterMix (Promega), DL2000DNA Marker (Promega), 蛋白酶 K (Calbiochem)。

1.3 方法

1.3.1 粪肠球菌的培养与鉴定 将标本接种哥伦比亚血琼脂培养基 37℃ 培养 24 h,挑选目的菌落经 MBT IVD 质谱仪和 Vitek-2 全自动微生物分析系统鉴定为粪肠球菌。

1.3.2 药敏试验 参照美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 2018 年标准,采用 Vitek-2 全自动微生物分析系统对研究菌株进行药敏实验。

1.3.3 模板 DNA 的制备 挑取纯培养菌落置入内含裂解液 (0.5% 非离子去污剂配制的浓度为 200 ng/ml 蛋白酶 K 溶液) 的 1.5 ml 离心管内,置 55℃ 水浴消化 1 h,改置 95℃ 水浴灭活 10 min,15 000 r/min,离心 30 s,上清液即为基因扩增的模板液 (保存

2023-08-11 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:82102460)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601

作者简介:姚杰,男,副主任技师;

周强,男,副教授,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-

mail:zhouqiang1973@163.com

于 -40 ℃ 备用)。

1.3.4 引物设计与合成 参照 Genbank 已公布的数据库资料在 NCBI 官网自行设计 TEM 和 pbp4 基因引物序列,均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

TEM 基因片段大小为 445 bp,其上、下游引物序列分别为 F: 5'-CGCCGCATACACTATTCT-CAGAATGA -3' 和 R: 5'- ACGCTCACCGGCTC-CAGATTTAT -3';pbp4 基因片段大小为 961 bp,其上、下游引物序列分别为 F:5'- GGGGGAAGCAGCT-GCGCAAT -3'和 R:5'- ATTCGCTGCGTTGGCGCTGA -3'。

表 1 粪肠球菌管家基因 PCR 检测引物序列(5'-3')

管家基因	核苷酸序列	产物长度 (bp)
gdh	F:GGCGCACTAAAAGATATGGT R:CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	530
gyd	F: CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC R:CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395
pstS	F:CGGAACAGGACTTTCGC R:ATTACATCACGTTCTACTTGC	583
gki	F:GATTTTGTTGGGAATTGGTATGG R:ACCATTAAGCAAAATGATCGC	438
aroE	F:TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC R:GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	459
xpt	F:AAAATGATGCGCGTGTATTAGG R:AACGTCACCGTTCCTTCACCTA	456
yqiL	F:CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG R:GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	436

1.3.5 PCR 反应体系及扩增条件 TEM 基因的反应条件为:93 ℃ 预变性 5 min,93 ℃ 解链 1 min,55 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃ 保温 5 min;pbp4 基因的反应条件为:95 ℃ 预变性 10 min,94 ℃ 解链 1 min、50 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 ℃ 保温 12 min。PCR 反应体系为 50 μl,包括 5 μl 的模板 DNA,上下游引物各 5 μl(10 μmol/L),Master Mix 25 μl,去离子水 10 μl。

1.3.6 多位点序列分型 参考 Ruiz-Garbajosa et al^[4] 的方法,扩增粪肠球菌的 7 对管家基因后并测序,引物序列见表 1。反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 解链 30 s,52 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 ℃ 保温 7 min。扩增产物纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向高通量测序。

1.3.7 生物信息学分析 引物设计:在 NCBI 官网

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 主页中选择“Gene”数据库并输入要查找的基因名称,将其基因序列输入至 Primer-BLAST([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi? LINK_LOC = BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)),设置参数后即可得到相应的引物。

扩增产物纯化测序后,在 NCBI 官方网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 BLAST 验证;将粪肠球菌的 7 个管家基因序列提交到 MLST 网站(<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecalis>),与数据库中粪肠球菌的相应基因的等位基因进行比较,获得每一管家基因的等位基因序号。gdh - gyd - pstS - gki - aroE - xpt - yqiL 这组 7 个位点的等位基因序号组成该菌株的等位基因谱,每个及基因谱对应一个粪肠球菌的序列型(ST 型)。

表 2 粪肠球菌对 12 种抗菌药物的耐药率[n(%)]

抗菌药物	粪肠球菌(n=78)	
	耐药株	耐药率(%)
青霉素	8	10.3
氨苄青霉素	8	10.3
环丙沙星	27	34.6
左氧氟沙星	22	28.2
利福平	38	48.7
红霉素	64	82.1
四环素	60	76.9
呋喃妥因	0	0
万古霉素	0	0
替考拉宁	0	0
利奈唑胺	0	0
高浓度庆大霉素	41	52.6

2 结果

2.1 粪肠球菌的标本来源与科室分布 临床分离的 78 株粪肠球菌中有 48 株来源于尿液标本(61.5%),其余依次是分泌物标本 9 株(11.5%),血液和脓液标本各 6 株(7.7%),胆汁标本 5 株(6.4%),胸腹水和痰液标本各 2 株(2.6%)。标本科室分布粪肠球以泌泌尿外科、肾脏内科和普外科为主,分别占 18.1%、10.7%和 9.3%。

2.2 粪肠球菌的药敏试验结果 78 株粪肠球菌对环丙沙星、左氧氟沙星、利福平、红霉素、四环素、奎奴普丁/达福普汀以及高浓度庆大霉素的耐药率较高,对青霉素和氨苄青霉素的耐药率为 10.3%,未发现对呋喃妥因、万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺耐药的菌株,见表 2。

2.3 TEM 基因的扩增和测序比对 78 株粪肠球菌中有 8 株扩增出 TEM 基因,全部对青霉素和氨苄青霉素耐药,阳性率为 10.3%。见图 1。

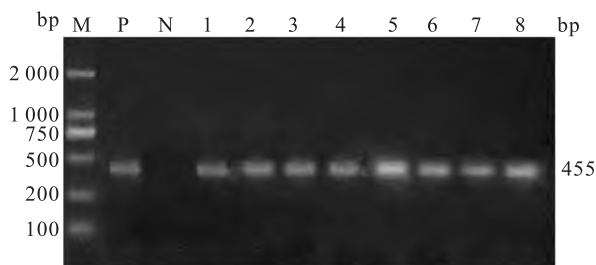


图 1 TEM 基因 PCR 产物电泳图

M: DL 2000 DNA Marker; P: 阳性对照; N: 阴性对照 (ATCC 29223); 1~8: 粪肠球菌

将 8 株 TEM 基因阳性的粪肠球菌 PCR 扩增产物进行 DNA 测序,经 BLAST 比对发现,8 株 TEM 基因均为 TEM-1 亚型。

2.4 pbp4 基因的扩增和测序比对 对 78 株粪肠球菌 pbp4 基因进行扩增,均获得 961 bp 的 pbp4 基因产物。见图 2。

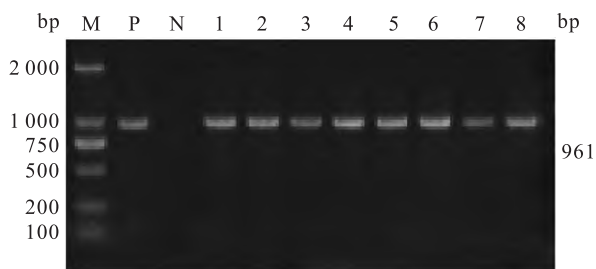


图 2 pbp4 基因 PCR 产物电泳图

M: DL 2 000 DNA Marker; P: 阳性对照; N: 阴性对照 (ATCC 29212); 1~8: 粪肠球菌

选取 16 株粪肠球菌 (青霉素耐药和敏感各 8 株) 和 ATCC 29212 的 pbp4 基因扩增产物进行测序分析,经 BLAST 比对发现,ATCC 29212 的 pbp4 基因核苷酸序列与 GenBank 注册号为 AY571368 的菌株的相应序列 100% 同源,所有粪肠球菌的 pbp4 基因核苷酸序列与 ATCC 29212 的同源性均在 98% 以上,其中第 369 位氨基酸有突变:GCC→GTC (丙氨酸→缬氨酸),见图 3。

2.5 粪肠球菌的 MLST 分型 78 株粪肠球菌的等位基因谱和序列型见表 3,共分为 16 个序列型,其中 ST179 型和 ST16 型最多,分别有 21 株和 20 株,占 26.9% 和 25.6%;其余依次为 ST6 型 8 株

(10.3%), ST4 型 7 株 (9.0%), ST585 型 6 株 (7.7%), ST480 型 4 株 (5.1%), ST28 型 3 株 (3.8%),其余各 ST 型只检出 1 株。

通过分析 78 株粪肠球菌通过 MLST 分析结果发现有 4 种主要的克隆复合体 (clonal complexes, CCs),其中最为优势的克隆复合体是 CC16 (ST16 和 ST179),其余分别是 CC6 (ST6)、CC4 (ST4 和 ST585) 以及 CC21 (ST21 和 ST22)。

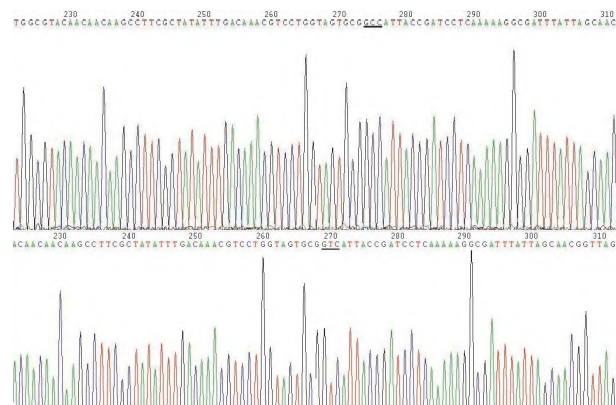


图 3 pbp4 基因测序图

上为 ATCC29212,下为部分粪肠球菌 pbp4 基因碱基序列发生突变,相应部位为 GCC→GTC

2.6 ST 型别与耐药性 分析 ST 型别与耐药性的关系显示相同 ST 型别的粪肠球菌具有类似的耐药谱。21 株 ST179 型粪肠球菌全部为多重耐药菌,红霉素的耐药率为 100%,19 株对四环素耐药,14 株对高浓度庆大霉素耐药,表现为“红霉素-四环素-高浓度庆大霉素”的耐药模式;与 ST179 相类似,20 株 ST16 型粪肠球菌也均为多重耐药菌,其中所有菌株都对红霉素和四环素耐药,18 株对高浓度庆大霉素耐药,15 株对利福平耐药,表现为“红霉素-四环素-高浓度庆大霉素-利福平”耐药模式。8 株 ST6 型粪肠球菌对红霉素、四环素和喹诺酮类全部耐药,1 株对高浓度庆大霉素敏感;7 株 ST4 型粪肠球菌均表现为对青霉素、氨苄青霉素、高浓度氨基糖苷类、氟喹诺酮类、四环素和红霉素耐药,另一株对青霉素耐药的菌株 ST 型别为 ST30。同属于克隆复合体 CC4 的 6 株 ST585,除对青霉素和氨苄青霉素敏感外,其耐药谱与 ST4 均一致。

3 讨论

头孢菌素属于 β -内酰胺类抗菌药物,肠球菌通过产生 β -内酰胺酶以及 PBP_s 的结合位点突变为其

表3 78株粪肠球菌的MLST分型

ST 型	菌株数	比例(%)	gdh	gyd	pstS	gki	aroE	xpt	yqiL
ST179	21	26.9	5	1	1	3	7	1	6
ST16	20	25.6	5	1	1	3	7	7	6
ST6	8	10.3	12	7	3	7	6	1	5
ST4	7	9.0	8	7	7	5	4	4	1
ST585	6	7.7	8	7	7	4	4	4	1
ST21	4	5.1	1	7	9	1	1	1	1
ST22	3	3.8	1	7	10	1	1	10	1
ST7	1	1.3	58	1	101	32	6	1	5
ST9	1	1.3	4	6	16	4	1	1	4
ST17	1	1.3	4	6	2	4	1	1	4
ST28	1	1.3	4	4	8	3	8	1	3
ST30	1	1.3	7	1	11	1	10	2	1
ST40	1	1.3	3	6	23	12	9	10	7
ST256	1	1.3	4	6	7	29	8	1	20
ST480	1	1.3	1	1	22	22	7	17	6
ST481	1	1.3	11	6	7	33	1	38	10

主要耐药机制。肠球菌产生的 β -内酰胺酶通常是由质粒编码,与葡萄球菌的blaZ基因编码的A型 β -内酰胺酶相同。PBP_s是位于细菌细胞膜上的蛋白质,具有D,D-肽酶活性,参与细菌细胞壁肽聚糖的合成,同时也是 β -内酰胺类药物的作用靶位,细菌通过酰基化PBP_s的活性位点丝氨酸来抑制肽聚糖的生物合成,从而阻止PBP_s进行肽聚糖合成的交联反应,中断细胞壁的持续合成^[5]。

PBP_s按其酶活性可以分为A类(具有糖基转移酶和转肽酶活性的双功能)、B类(转肽酶)和C类(羧肽酶和内肽酶)三种,不同菌种之间PBP_s的数量、大小、含量以及对抗生素的亲合力都不相同,由于低亲合力PBP_s的表达,导致所有的肠球菌都表现出对青霉素和氨苄青霉素的敏感性降低,以及对大多数头孢菌素和所有半合成青霉素的高水平耐药性,引起粪肠球菌对 β -内酰胺类抗菌药物的敏感性降低是由于在粪肠球菌中表达称为PBP₄的低亲合力B类PBP_s^[6]。通过对粪肠球菌pbp4基因测序比对分析发现,无论表现为对青霉素敏感或耐药的菌株,均发现其pbp4基因第369位氨基酸有突变GCC→GTC(丙氨酸→缬氨酸),提示此突变与粪肠球菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药性没有必然联系。

粪肠球菌对高浓度庆大霉素耐药性的检测是一种筛查实验,如为阴性结果能够预测氨苄西林、青霉素或万古霉素与一种氨基糖苷类药物联合治疗粪肠球菌感染时具有协同作用,如为阳性结果,表示不具有协同作用。粪肠球菌对高浓度庆大霉素的耐药机

制体主要是细菌产生质粒介导的氨基糖苷类修饰酶所致,其aac(6')/aph(2'')基因编码可导致青霉素或糖肽类与氨基糖苷类的协同作用消失。本研究中高浓度庆大霉素耐药率高达52.6%,说明其与青霉素不具有协同作用,不是导致青霉素耐药的主要原因。

TEM基因能够编码TEM酶,可以水解青霉素导致耐药,是最常见的 β -内酰胺酶基因。本研究中共8株对青霉素和氨苄青霉素耐药的粪肠球菌全部扩增出TEM基因,同时对粪肠球菌pbp4基因进行PCR扩增,通过测序比对分析发现,粪肠球菌无论对青霉素敏感或耐药,均发现其pbp4基因第369位氨基酸有突变GCC→GTC(丙氨酸→缬氨酸),提示此突变与粪肠球菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药性没有必然联系,说明粪肠球菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药机制主要是由于产生由TEM基因介导的 β -内酰胺酶所致。有研究显示此类对青霉素敏感、氨苄青霉素耐药粪肠球菌对pbp4编码序列的分析显示包括V223I, A617T, D573E等26个位置的氨基酸变化^[7-8]。本研究中的菌株来源单一且样本数量有限,与国外研究具有不同的地理分布,国外研究显示粪肠球菌pbp4的突变可能与携带相关的信息素反应质粒相关。虽然未检出对青霉素敏感、氨苄青霉素耐药的菌株和有意义的突变位点,但随着世界范围内此类菌株的不断增多,研究和评价pbp4基因多态性和遗传多样性成为我们今后的研究方向之一,给临床治疗粪肠球菌感染的治疗提供一定的依据。

MLST 是一种基于核酸序列测定的细菌分型方法,通过分析 6 至 10 个管家基因内部核心片段的核苷酸序列用于病原菌的分子流行病学研究,包括流行克隆株的传播途径,大范围长时间内追踪病原菌的遗传谱的变化具有显著优势,具有结果客观,准确率和重复率高,分辨率好,国际通用等特点。

粪肠球菌是与医院感染相关的最常见的肠球菌种类,占感染的 80%~90%^[9]。粪肠球菌的不同克隆株与医院感染和暴发有关,这些克隆株被称为高危粪肠球菌克隆复合体。本研究通过 MLST 分析表明临床分离的粪肠球菌中观察到明显的菌株多样性,并且从 78 个分离株的基因组序列中鉴定了 16 个不同的 ST 型别,其中最为优势的型别为 ST179 和 ST16,同属于克隆复合体 CC16,且此克隆复合体中所有菌株均为多重耐药株且耐药谱比较接近,与李岩等^[10]研究较一致。克隆复合体 CC16 通常被认为能够很好地适应医院环境,会引起人类感染,通过重组获得外源基因,并且能够携带 vanA 或 vanB 基因,接合质粒和转座子,参与医院分离株中耐药性和毒力的遗传转移^[11-12],虽然本研究中没有检测到耐万古霉素的菌株,但也需要引起足够的重视。克隆复合体 CC16 之所以成为优势克隆,主要是由于滥用抗生素导致的选择压力促进其耐药性的传播,使之成为在医院和社区都广泛分布的多重耐药菌。

本研究中 8 株 ST6 型粪肠球菌对红霉素、四环素和喹诺酮类全部耐药,1 株对高浓度庆大霉素敏感的结果与 Contreras et al^[13]得出的多重耐药的粪肠球菌 ST6 型是导致参与中心侵袭性疾病的主要遗传谱系,其中大多数携带对氨基糖苷类药物的耐药性决定因素,并影响使用庆大霉素治疗粪肠球菌引起的深部感染的结论相符。7 株 ST4 型粪肠球菌均表现为对青霉素、高浓度氨基糖苷类、氟喹诺酮类、四环素和红霉素耐药,对于青霉素耐药的粪肠球菌只存在于 ST4 型。有研究提示 ST4 型粪肠球菌的检出率在逐年增加,可能与克隆复合体 CC16 并列成为的另一个主要亚型的趋势,对免疫功能低下的患者具有高风险感染并显示对各种抗菌药物的耐药率较其他 ST 型别更加严重^[14]。ST585 检出 6 株,同属于克隆复合体 CC4,除对青霉素和氨苄青霉素敏感外,其耐药谱与 ST4 均一致,其特征是携带可转移的 *optrA* 和 *poxA* 基因,与利奈唑胺耐药相关^[15]。虽然本研究未检出利奈唑胺耐药的菌株,但也需要

加强对相关药物的耐药监控。

随着于临床抗菌药物的的大量使用,粪肠球菌的耐药性也逐渐增强,通过基因扩展和 MLST 技术发现其克隆组成多样,并且由与医院感染相关的谱系主导。研究粪肠球菌的多重耐药株是否获得了更多的毒力基因及不同模式的耐药基因是我们今后研究的主要方向。是否有新的 ST 型别粪肠球菌的检出可能是其在临床上重要的耐药细菌的出现和快速进化的警告,它表明有必要在该国其他医院和地区进行主动监测。

参考文献

- [1] Suryaetha K, Chandrika S K, Thomas S. Comprehensive genomics depict accessory genes encoding pathogenicity and biofilm determinants in *Enterococcus faecalis*[J]. *Future Microbiol*, 2021, 16(3): 175-84.
- [2] Nasr-Eldin M A, El-DougDoug N K, Elazab Y H, et al. Isolation and characterization of two virulent phages to combat *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* causing dental caries[J]. *J Pure Appl Microbiol*, 2021, 15(1): 320-34.
- [3] Gaget P, Bonofiglio L, García Gabarrot G, et al. Resistance to β -lactams in enterococci[J]. *Rev Argent Microbiol*, 2019, 51(2): 179-83.
- [4] Ruiz-Garbajosa P, Bonten M J, Robinson D A, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(6): 2220-8.
- [5] Djori D, Little J L, Kristich C J. Multiple low-reactivity class B penicillin-binding proteins are required for cephalosporin resistance in *Enterococci*[J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2020, 64(4): e02273-19.
- [6] Moon T M, ÉD D'Andréa, Lee C W, et al. The structures of penicillin binding protein 4 (PBP4) and PBP5 from *Enterococci* provide structural insights into β -lactam resistance[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(48): 18574-84.
- [7] Gawryszewska I, Abicka D, Hryniewicz W, et al. Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* in polish hospitals[J]. *Microb Drug Resist*, 2021, 27(3): 291-300.
- [8] Rice L B, Desbonnet C, Tait-Kamradt A, et al. Structural and regulatory changes in PBP4 trigger decreased β -lactam susceptibility in *Enterococcus faecalis*. *mBio*[J]. 2018, 9(2): e00361-18.
- [9] Lin Z, Pu Z, Xu G, et al. Omadacycline efficacy against *enterococcus faecalis* isolated in China: *in vitro* activity, heteroresistance, and resistance mechanisms[J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2020, 64(3): e02097-19.
- [10] 李岩,王晶,张桂,等. 2012—2014 年辽宁省大连市某医院分离粪肠球菌耐药性及多位点序列分析[J]. *疾病监测*, 2018, 33(5): 391-6.

- [11] Ben H Y, Chairat S, Hamdi N, et al. Antimicrobial resistance and genetic lineages of faecal enterococci of wild birds; emergence of vanA and vanB2 harbouring *Enterococcus faecalis*[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, 52(6): 936–41.
- [12] Oravcova V, Zurek L, Townsend A, et al. American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with vanA gene[J]. *Environ Microbiol*, 2014, 16(4): 939–49.
- [13] Contreras G A, Munita J M, Shelby S, et al. Contemporary clinical and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: a prospective multicenter cohort study (VENOUS I)[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2021, 9(3): ofab616.
- [14] Dai D, Wang H, Xu X, et al. The emergence of multi-resistant *Enterococcus faecalis* clonal complex, CC4, causing nosocomial infections[J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(8): 1069–77.
- [15] Moure Z, Lara N, Marín M, et al. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus spp.* isolates carrying the optrA and poxtA genes [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55(6): 105977.

Detection and multi-locus sequence typing of low-affinity penicillin-binding protein of β -lactam resistant *Enterococcus faecalis*

Yao Jie, Tang Wei, Cheng Juan, Wang Lincui, Ren Yingli, Zhou Qiang

(Dept of Medical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To detect the low-affinity penicillin-binding protein drug resistance, *pbp4* gene, and multi-locus sequence typing (MLST) of clinically isolated *E. faecalis*. **Methods** 78 clinical isolates of *E. faecalis* were collected, and their drug resistance was detected by automated instruments; the mutation of *pbp4* gene mutation was analyzed by PCR amplification and MLST. **Results** 78 strains of *E. faecalis* were highly resistant to ciprofloxacin, levofloxacin, rifampicin, erythromycin, tetracycline and high concentration of gentamicin, and were resistant to penicillin and gentamicin. The ampicillin resistance rate was 10.3%, and no strains were found to be resistant to nitrofurantoin, vancomycin, teicoplanin and linezolid; 8 strains of 78 *E. faecalis* had amplified TEM genes, and all of them were resistant to penicillin and ampicillin resistance, with a positive rate of 10.3%; the allelic profiles and sequence types of 78 strains of *E. faecalis* which were divided into 16 sequence types, of which ST179 and ST16 were the most, with 21 and 21 strains, respectively. 20 strains, accounting for 26.9% and 25.6%, the rest were ST6 type 8 strains (10.3%), ST4 type 7 strains (9.0%), ST585 type 6 strains (7.7%), ST480 type 4 strains (5.1%), ST28 strains 3 strains (3.8%) of the ST type were detected, and only 1 strain was detected for the other ST types. The analysis of the relationship between ST types and drug resistance showed that *E. faecalis* with the same ST type had similar drug resistance profiles. **Conclusion** The resistance mechanism of *E. faecalis* to β -lactam antibiotics is mainly caused by the production of β -lactamase mediated by TEM gene, which is not necessarily related to the mutation of *pbp4* gene. The isolates of *E. faecalis* are mainly CC16 (including ST16 and ST179) clones and drug resistance is serious. It is necessary to guide clinical medication and strengthen nosocomial infection monitoring according to its characteristics.

Key words *Enterococcus faecalis*; antimicrobial susceptibility; penicillin-binding protein; multilocus sequence typing