

200 株肠球菌系统鉴定及药敏试验的研究

韩香云 祖玉丽 金慧心* 张 慥

周玉珍 黄学林 杨暑伏* 郑秀英

(黑龙江省农场总局总医院, 哈尔滨 150088)

摘要 本文报告 200 株肠球菌系统生理生化、血清学及药敏试验研究。其结果为: 粪肠球菌 165 株, 屎肠球菌 21 株, 鸟肠球菌和孤立肠球菌各 3 株, 希拉肠球菌 2 株, 假鸟肠球菌、鸡肠球菌、芒地肠球菌、坚韧肠球菌各 1 株, 2 株未定种。148 株含 D 抗原, 占 74%。对其进行青霉素、氨苄青霉素、氟哌酸和呋喃妥因药敏试验, 敏感率较高, 并发现屎肠球菌比粪肠球菌更耐药。对严重的肠球菌感染, 在测定肠球菌高浓度 ($\geq 2\text{g/L}$) 氨基糖苷类耐药性指导下, 以联合用药为佳。

关键词 肠球菌; 鉴定; 药敏试验

肠球菌是人、动物和禽类的肠道正常菌群, 异位寄生时可引起尿路感染、心内膜炎、败血症、创口感染及食物中毒等。近年来由于广谱抗生素的大量使用, 使肠球菌感染及耐药菌株日益增多, 已成为医院内感染的重要病原菌之一。国内曾有马俊春等人对肠球菌进行生理生化鉴定^[1], 以后未再见详细报道。为此我们从 1990 年开始从临床分离到 200 株肠球菌, 并对其进行了系统的生理生化、血清学鉴定和药敏试验, 现将结果报告如下:

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 供试菌株: 从临床分离到的肠球菌 200 株, 其中 178 株来自尿液、1 株来自血液、17 株来自脓汁、4 株来自痰液。

2. 参考菌株: 链球菌血清型 A(32132)、B(32133)、C(32134)、D(32135) 群各 1 株, 粪肠球菌 (32118) 1 株均由中国药品生物制品检定所提供。

3. 链球菌分群诊断血清: 由哈尔滨市卫生防疫站提供。部份菌株用英国 Wellcome Diagnostics 生产的 Streptex 诊断血清核对。

4. 培养基: 分离培养基为 5% 羊血琼脂平板和 SF 培养基; 生理生化鉴定培养基及 T-H

培养基按文献 [2] 修正后配制。药敏试验用 M-H 培养基购于浙江军区检验所。

5. 药敏纸片: 杆菌肽、奥普多欣诊断纸片及氟哌酸、呋喃妥因药敏纸片, 均购自浙江军区检验所。

(二) 方法

1. 分离培养: 将临床标本接种 5% 羊血琼脂平板和 SF 平板, 37℃ 培养 24—48h 后挑取可疑菌落进行初筛试验。

2. 初筛试验: 血平板上出现灰白色、湿润、边缘整齐的小菌落呈 α 、 β 、 γ 溶血, 革兰氏阳性, 触酶、杆菌肽、奥普多欣和 CAMP 试验均阴性, 胆汁七叶灵和 6.5% NaCl 耐受性试验均阳性, 凡具上述情况的菌株进行系统生理生化鉴定。

3. 生理生化试验: 将初筛菌种经纯化后接种在各种生理生化培养基, 37℃ 培养连续观察 7 天判定结果。动力试验 30℃ 培养观察结果。

4. 血清学分群鉴定: 取 24h 血平板培养物, 挑菌落 2—3 个, 接种于 5ml T-H 培养基, 37℃ 18h 培养。离心, 取沉淀物 0.5ml, 加酚红

* 哈尔滨市卫生防疫站

本文承蒙哈尔滨市卫生防疫站徐迪诚主任医师指导, 中国科学院微生物研究所蒙妙英研究员协助菌种 G+C 值测定并指导, 特此一并致谢。

指示剂 1 滴, 胰酶消化液 4 滴, 修正保持 pH8.0—8.5, 置 37 °C 水浴 2h, 然后以该消化物为凝集原, 与分群血清做玻片凝集试验。

5. 采用美国 NCCLS 方法和判定标准^[3]。氟哌酸、呋喃妥因采用纸片扩散法(K-B法); 青霉素、氨苄青霉素和 4 种高浓度(=2g/L)氨基糖苷类采用琼脂平板稀释法。

6. G+Cmol% 测定: 选取 3 株菌, 由中国科学院微生物研究所采用熔解温度法测定^[4]。

结 果

(一) 生理生化及血清学鉴定

200 株肠球菌的生理生化及血清学鉴定(表 1)。发现: 200 株肠球菌中有 165 株为粪肠球菌, 占 82.5%, 21 株为屎肠球菌, 占 10.5%。还有孤立肠球菌、鸟肠球菌各 3 株, 希拉肠球菌 2 株, 假鸟肠球菌、鸡肠球菌、芒地肠球菌、坚韧肠球菌各 1 株, 2 株未定种。200 株肠球菌中有 148 株含 D 抗原, 占 74%。

表 1 200 株肠球菌的生理、生化及血清学鉴定结果

检测项目	粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>	屎肠球菌 <i>E. faecium</i>	孤立肠球菌 <i>E. solitarius</i>	鸡肠球菌 <i>E. gallinarum</i>	芒地肠球菌 <i>E. mundtii</i>	坚韧肠球菌 <i>E. durans</i>	希拉肠球菌 <i>E. hirae</i>	鸟肠球菌 <i>E. avium</i>	假鸟肠球菌 <i>E. pseud-avium</i>	未定种	标准株*
菌株数	165	21	3	1	1	1	2	3	1	2	1
溶血性	α, γ	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α
运动性	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
V-P 反应	164	21	3	1	1	1	2	0	0	2	1
精氨酸双水解酶	165	21	3	1	1	1	2	0	0	2	1
产酸:											
葡萄糖											
(产酸 / 产气)	165/0	21/0	3/0	1/0	1/0	1/0	2/0	3/0	1/0	2/0	1/0
阿拉伯糖	0	21	0	1	1	0	0	3	0	2	0
棉子糖	1	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0
山梨醇	164	4	3	1	0	0	0	3	1	2	1
乳糖	165	21	0	1	1	1	2	3	1	2	1
蔗糖	164	17	3	1	1	0	2	3	1	2	1
菊糖	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
蜜二糖	7	14	0	1	1	1	1	3	0	0	0
松三糖	163	3	3	0	0	0	0	3	0	2	1
山梨糖	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
甘露醇	164	21	3	1	1	0	0	3	1	2	1
侧金盏花醇	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0
0.04% 亚硫酸钾	150	3	3	0	0	0	0	0	0	2	1
D 抗原	117	17	3	1	1	1	2	3	1	2	1

注: 表中数字为阳性菌株数, “*”粪肠球菌标准株, “0”株数为零

(二) 药敏试验

菌对氨基糖苷类耐药性测定结果见表 2,3。

200 株肠球菌药敏试验及粪肠球菌、屎肠球

表 2 200 株肠球菌对抗菌素的敏感率

抗生素	青霉素	氨苄青霉素	氟哌酸	呋喃妥因
敏感率 (%)	89(178)*	95.0(190)	86.5(173)	92.5(185)

* 括号内为敏感菌株数

表 3 粪肠球菌、屎肠球菌对 PC, ABPC 和高浓度 AGS 的耐药率

菌名及株数	PC	ABPC	AGS(2g/L)			
			Ak	Km	Gm	Sm
粪肠球菌 165	2.4(4)	0(0)	7.3(12)	52.7(87)	40.6(67)	77.6(128)
屎肠球菌 21	81(17)	48(10)	9.5(2)	52.4(11)	19.0(4)	52.4(11)

PC: 青霉素, ABPC: 氨苄青霉素, AGS: 氨基糖苷类, Ak: 丁胺卡那霉素,

Km: 卡那霉素, Gm: 庆大霉素, Sm: 链霉素, 括号内为耐药菌株数

表 2 结果表明: 200 株肠球菌对青霉素、氨苄青霉素、氟哌酸、呋喃妥因四种抗菌素的敏感性较高, 敏感率分别为 89.0、95.0、86.5 和 92.5%。表 3 结果发现, 21 株屎肠球菌中有 17 株耐青霉素, 占 81%; 有 10 株耐氨苄青霉素, 占 48%。粪肠球菌中对高浓度丁胺卡那霉素耐药率较低的有 12 株占 7.3%。屎肠球菌对丁胺卡那霉素、庆大霉素耐药率较低的分别为 9.5%(2 株) 和 19.0%(4 株)。

(三) G+C mol% 测定结果

测定 3 株肠球菌 G+C mol% 值分别为: 粪肠球菌 38.3, 屎肠球菌 40.0, 鸟肠球菌 42.0。

讨 论

1984 年以来, 随着分子生物学的发展, 肠球菌分类系统有较大的变化, 在《Bergey 氏系统细菌学手册》^[5] 中肠球菌为链球菌属中的肠球菌群, 由粪链球菌、屎链球菌、鸡链球菌和鸟链球菌组成。根据核酸研究数据, Schleifer^[6] 将肠球菌从链球菌属中分出, 新设肠球菌属, 到目前为止, 属中已发现了 13 个种和 1 个变异株即: 粪肠球菌、屎肠球菌、鸡肠球菌、鸟肠球菌、希拉肠球菌、芒地肠球菌、棉糖肠球菌、假鸟肠球菌、孤立肠球菌、酪黄肠球菌、恶臭肠球菌、坚韧肠球菌、粪肠球菌变异株^[7]、盲肠肠球菌^[8]。肠球菌鉴定比较复杂, 尤其是一些酶类检测在国内临床实验室不具备条件, 根据我们的经验, 血清学试验结合胆汁七叶灵和 6.5%NaCl 耐受试验结果适用肠球菌属鉴定。

我们对 200 株肠球菌进行系统生理生化特性鉴定, 根据分解山梨醇、乳糖、蔗糖、0.04% 亚碲酸钾生长等特性, 其中 165 株鉴定为粪肠球菌; 根据分解乳糖、阿拉伯糖、蜜二糖特性, 其

中 21 株鉴定为屎肠球菌; 根据不分解乳糖这一特性将孤立肠球菌与其它肠球菌区别开; 2 株希拉肠球菌和 1 株坚韧肠球菌对多数糖醇不发酵, 但前者分解棉子糖和蔗糖; 鸟肠球菌和假鸟肠球菌对精氨酸酶阴性, 但鸟肠球菌对阿拉伯糖和侧金盏花醇阳性; 鸡肠球菌有动力, 芒地肠球菌无动力, 二者均分解菊糖。本次试验有 2 株肠球菌含 D 抗原, 其生化特性符合肠球菌属, 但基中侧金盏花醇阳性, 故未能定种, 待进一步研究。

血清学反应中共检出 148 株肠球菌含 D 抗原, 占 74%, 与 Faclam 等报告的 76% 基本相符^[7]。从生理生化反应看符合肠球菌, D 抗原阴性不能否定肠球菌^[7], 这项工作有待进一步研究。

从 200 株肠球菌药敏试验观察到: 治疗肠球菌感染, 首选药物为氨苄青霉素。尿路感染可首选呋喃妥因。对于严重的肠球菌感染应用青霉素或氨苄青霉素联合氨基糖苷类治疗效果较好, 因后者可加强前者的杀菌力。据文献报道, 对于高浓度氨基糖苷类耐药的肠球菌联合用药无效^[3], 但从我们的高浓度耐药试验结果看, 粪肠球菌对丁胺卡那霉素耐药率仅为 7.3%; 屎肠球菌对丁胺卡那霉素和庆大霉素耐药率也较低, 分别为 9.5 和 19.0%。因此实验室常规测定高浓度丁胺卡那霉素和庆大霉素的耐药试验, 可指导临床联合用药。

在药敏试验中还发现屎肠球菌耐药率较高, 分别占 200 株肠球菌对青霉素和氨苄青霉素总耐药率的 70 和 100%。可见屎肠球菌比其它肠球菌耐药性更高, 所以肠球菌种间鉴定是

(下转第 136 页)

(上接第 155 页)

非常重要的,对于肠球菌的鉴定及治疗应引起临床医务人员的重视,以避免因无效用药而导致耐药菌株的流行。

参 考 文 献

1. 马俊春:中华医学检验杂志, 15(1):33, 1992.
2. 坂崎利一:临床细菌检查, 130 页, 东京文光堂, 1987.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antimicrobial Susceptibility Testing. SC3 Vol.

10 No. 7 M2—A4 & Vol. 10 No.8 M7—A2. 1991.

4. Marmur J and P Doty: *J. Mol. Biol.* 5:109, 1962.
5. Sneath P H A et al.: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, Vol.2, P. 1054—1068, Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
6. Schleifer K H and R Kilpper-Bälz: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:31—34. 1984.
7. Facklam R R et al.: *J. Clin. Microbiol.* 27:731. 1989.
8. Williams, Farrow and Colline: *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 185—189, 1989.

(1992-7-30 收稿)