

• 论 著 •

某地区部分医院肺炎链球菌对红霉素的耐药性与基因分析

牟晓峰, 赵自云

(青岛大学医学院第二附属医院检验科/山东省青岛市中心医院检验科 266042)

摘要:目的 了解某地区临床分离的肺炎链球菌(SPN)对红霉素的耐药基因流行情况及与耐药表型的关系。方法 采用微量琼脂稀释法,对 2008 年 1 月至 2009 年 12 月某地区部分医院临床分离到的 98 株 SPN 对红霉素的耐药状况进行分析,并用 PCR 法检测与红霉素耐药基因的关系。**结果** 98 株 SPN 对红霉素的药敏结果显示,耐药 87 株,中敏 2 株,敏感 9 株;在红霉素耐药菌株中,含有 ermB 基因 70 株,含有 Mef 基因 18 株,含有 ermA 基因 9 株。9 株红霉素敏感 SPN 均未检出 ermB 基因。**结论** ermB 基因表达是 SPN 对红霉素耐药的主要原因,并同时使克林霉素耐药。红霉素已不是治疗 SPN 的有效药物。

关键词:链球菌,肺炎; 红霉素; 抗药性; 耐药基因
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.016 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)02-0168-02

Erythromycin resistance and related gene analysis of Streptococcus pneumoniae in some hospitals in certain area

Mu Xiaofeng, Zhao Ziyun

(Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Qingdao Medical College/The Center Hospital of Qingdao, Shandong 266042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of erythromycin resistance gene and the relationship between drug resistance gene and resistance phenotype of Streptococcus pneumoniae(S. pneumoniae) in certain area. **Methods** 98 strains of S. pneumoniae were collected from clinical samples in some hospitals in certain area from Jan. 2008 to Dec. 2009. Erythromycin phenotypes were analyzed with minimum inhibitory concentration test. The ermA, ermB and Mef genes were detected with polymerase chain reaction (PCR). **Results** In all 98 strains, 87 strains were erythromycin resistant, 10 strains were erythromycin sensitive and 2 strains were moderately sensitive. The total detection rate of erythromycin resistance gene ermB, ermA and mefA were 70%, 9% and 18% respectively in 87 erythromycin resistant S. pneumoniae. There were neither gene ermB/A nor gene Mef in 9 erythromycin sensitive S. pneumoniae. **Conclusion** ermB gene expression could be the main mechanism of erythromycin and clindamycin resistance in S. pneumoniae. Erythromycin might not be effective drug for the treatment of S. pneumoniae.

Key words: streptococcus pneumoniae; erythromycin; drug resistance; resistance genes

肺炎链球菌(SPN)是人类呼吸道感染的重要病原菌之一,可以引起肺炎、菌血症或脑膜炎等。随着大量的不恰当使用抗菌剂,对β-内酰胺类和非β-内酰胺类抗菌剂的耐药率也不断增高^[1-3]。为了解某地区 SPN 对红霉素等大环内酯类的耐药状况,对 2008 年 1 月至 2009 年 12 月某地区部分医院临床分离 100 株 SPN 进行红霉素药敏实验和与红霉素耐药相关基因检测,并分析红霉素耐药表型和耐药基因的关系,现将相关情况报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2008 年 1 月至 2009 年 12 月青岛中心医院、青岛肿瘤医院、青岛职业病医院、中国人民解放军第四〇一医院,以及李沧区、四方区等社区医院门诊和病房标本中分离的 SPN 98 株(已排除同一患者的分离菌株)。

1.1.2 试剂 哥伦比亚琼脂、M-H 琼脂为 OXOID 公司产品,用 5% 去纤维羊血自制 MHA 平板和羊血琼脂平板(SBA)。Pneumo-Kit 乳胶凝集法 SPN 试剂、ATB STREP5 药敏试条为法国生物梅里埃公司产品。去氧胆酸钠购于杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SPN 鉴定^[4] 按常规操作,将采集标本接种于血平板,置 5%CO₂, 35℃ 条件下过夜孵育 18~24 h,选可疑菌落进行革兰染色、Optochin 实验、胆汁溶解实验,并对有争议的菌做 SPN 乳胶凝集实验。SPN 菌株保存于-20℃ 脱纤维新鲜羊

血中。检测前,将其溶解后接种哥伦比亚血琼脂平板,37℃ 5%CO₂ 条件下孵育 18~24 h,细菌生长后单个菌落传代,用于药敏实验。

1.2.2 药敏实验 按 NCCLS 规定进行,采用琼脂稀释法,使用梅里埃公司的链球菌药敏板,按操作指南进行,分别测定青霉素、阿莫西林、头孢噻肟、左氧氟沙星、四环素、红霉素、氯霉素、万古霉素等 11 种药物的 MIC,SPN(ATCC49619)标准菌进行质控。药敏结果判断按照 2009 年 CLSI M100-S19 标准,红霉素 MIC: <0.25 为敏感; ≥0.25 ~ ≤1 为中敏; >1 为耐药。

1.3 菌株 DNA 检测模板制备 挑 3~5 个菌落,置于内含 100 μL 无菌蒸馏水的 0.5 mL 离心管内,置 100℃ 金属浴灭活 10 min,以 12 000 r/min,离心 5 min。上清液即为基因扩增检测的模板液。

1.4 红霉素耐药基因检测 反应体系 25 μL: 含 10×Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.8 μL, 25 mmol/L 氯化镁 2.0 μL, 5 个单位 Taq DNA 多聚酶 0.2 μL, 上、下游特异引物各 0.5 μL, 去离子水 13.3 μL, 模板为 5 μL; PCR 循环参数为: 94℃ 4 min 预变性, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 35 个循环后,延伸 72℃ 10 min; 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察扩增条带。3 对引物分别为, ermA 上游引物: TCT AAA AAG CAT GTA AAG GAA, 下游引物: CAG AAT CTA CAT TAG GCT TAG GG; ermB 上游引物: GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA, 下游引物: AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT

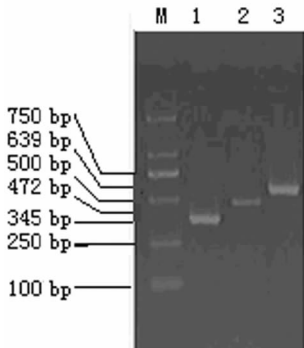
TAC; Mef 上游引物: AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC, 下游引物: TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG, 均由上海闪晶生物科技有限公司合成^[5], PCR 试剂购自上海闪晶生物科技有限公司。分析耐药率、耐药基因与患者年龄、青霉素、克林霉素耐药情况的关系。

2 结 果

2.1 经过 37℃ 温育 24 h, 在哥伦比亚血琼脂培养基上生长为小的、菌落周围有狭窄的溶血环、脐窝状菌落, 进行纯化及生化鉴定。涂片染色镜检为革兰阳性球菌, 矛头状。对该细菌采用法国生物梅里埃公司的 rapidSTERP 鉴定板条鉴定为 SPN。

2.2 98 株 SPN 对红霉素药敏结果显示, 敏感 9 株, 中敏 2 株, 耐药 87 株。

2.3 红霉素耐药基因检测情况, 见图 1。



M: DL2000 Marker; 1~3 分别为 ermA、ermB、Mef 基因片段。

图 1 红霉素耐药基因电泳图

2.4 耐药基因检测情况, 见表 1~3。

表 1 87 株红霉素耐药肺炎双球菌基因型与分布情况

ermA 型	ermB 型	Mef 型	n(%)
—	+	—	60(69.0)
—	—	+	11(12.6)
—	+	+	7(8.0)
+	+	—	3(3.4)
+	—	—	6(7.0)

表 2 红霉素耐药性和 ermB 基因与患者年龄的关系(%)

组别	红霉素耐药率	ermB 阳性率
儿童组	91.9	86.0
成人组	83.3	58.3

采用卡方检验结果显示, 儿童组和成人组之间红霉素的耐药率比较, $\chi^2=1.62, P>0.05$, 两者差异无统计学意义; 而 ermB 阳性率比较, $\chi^2=4.78, P<0.05$, 两者差异有统计学意义。

表 3 红霉素和青霉素的药敏关系(n)

组别	青霉素敏感	青霉素中敏	青霉素耐药
红霉素敏感	4	0	2
红霉素中敏	0	0	2
红霉素耐药	70	7	13

采用卡方检验结果显示, 青霉素与红霉素的耐药率无相关性, $\chi^2=3.63, P>0.05$, 两者差异无统计学意义。

3 讨 论

1952 年第一个大环内酯类抗菌剂红霉素应用于临床, 1967 年美国首先发现对红霉素耐药的 SPN。随后, 耐药成为一个全球性问题, 在近 10 年中尤为突出, 以亚洲地区的 SPN 对大环内酯类抗菌剂耐药最严重^[1], 红霉素耐药 SPN 为 71.4%~87.6%, 而在北美洲为 16.0%~30.9%^[6-7]。有报道, 中国温州地区儿童分离株对红霉素的耐药率为 93.0%^[8]; 上海达 100.0%^[9]; 而吴金英等^[10]研究发现, 烟台地区 SPN 大环内酯类耐药率也达 100.0%。

SPN 对红霉素的耐药是通过多种不同的耐药机制完成的。其中 erm 基因介导的核糖体甲基化修饰是 SPN 对红霉素耐药的最主要机制, 可以介导高水平的大环内酯类耐药; MefA 基因可以使细菌主动外排泵功能加强, 可将进入细菌内的大环内酯类抗菌剂泵出菌体外, 也是引起红霉素耐药的重要因素。但是不同地区流行的红霉素耐药 SPN 的耐药基因表达有所差异^[11], 多数欧洲和亚洲国家以 ermB 介导为主, 美国、中国香港等地以 MefA 为主。为调查某地区红霉素的耐药率和流行趋势, 作者收集了某地区部分医院 SPN 的临床分离株, 进行了药敏实验和常见耐药基因检测, 结果发现某地区 SPN 对红霉素的耐药率较高, 达 88.8%, 但低于吴金英等^[10]的报道。红霉素耐药菌株中有 70 株(80.4%)含有 ermB 基因, 低于李少君等^[12]的报道, 且基因型有所不同, 说明某地区和烟台地区 SPN 耐红霉素机制有所不同, 18 株(20.6%)含有 Mef 基因, 9 株(10.4%)含有 ermA 基因。根据耐药菌中含有的耐药基因的不同, 可以分为 5 种基因型, 分析可知, ermB 单独或与其他基因共同存在是引起红霉素耐药的主要原因。在成人和儿童间红霉素的耐药率不存在差异, 但是 ermB 阳性率在儿童高于成人, 存在明显差异, 说明成人红霉素的耐药机制比儿童复杂。比较 SPN 对青霉素和红霉素的耐药性可知, 94.6% 对青霉素敏感的菌株对红霉素耐药, 76.0% 对青霉素耐药的菌株对红霉素耐药, 青霉素敏感组和耐药组之间红霉素的耐药率两者比较, 差异无统计学意义, 与国内外报道一致^[13-15]。

参考文献

[1] Daneman N, McGeer A, Green K. Macrolide resistance in Bacteremic pneumococcal disease: implications for patient management [J]. Clin Infect Dis, 2006, 15(43): 432-438.

[2] Fuller JD, McGeer A, Low DE. Drug-resistant pneumococcal pneumonia: clinical relevance and approach to management [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24(12): 780-788.

[3] 王辉, 陈民钧. 肺炎链球菌对红霉素耐药机制的研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2002, 3: 137-140.

[4] 叶应妩, 王毓三. 全国检验操作规程 [M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 1.

[5] Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(11): 2562-2566.

[6] Adam D. Global antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50: S1-5.

[7] Felmingham D, Reinert RR, Hirakata Y, et al. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of Streptococcus pneumoniae from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50(1): 25-37.

[8] 杨锦红, 周义正, 刘立雪, 等. 肺炎链球菌红霉素相关耐药基因与耐药表型的关系 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, (下转第 171 页)

时,与健康对照组相比,Scr 有显著升高,Cystatin C 有非常显著升高,而血清 β_2 -M 仍未见明显改变。随着肾脏功能的进一步损伤,肾小球滤过功能下降加剧,Cystatin C、 β_2 -M、Scr 3 项均显著升高。

2.2 血清 Cystatin C、 β_2 -M、Scr 与 Ccr 直线相关分析结果显示,血清 Cystatin C 与 Ccr 相关系数 $r=-0.805, P<0.01$;血清 β_2 -M 与 Ccr 相关系数 $r=-0.726, P<0.01$;Scr 与 Ccr 相关系数 $r=-0.714, P<0.01$ 。3 项指标均呈高度负相关,血清 Cystatin C 与 Ccr 相关性的密切程度高于血清 β_2 -M、Scr 与 Ccr 相关性的密切程度。

3 讨 论

理想的内源性 GFR 标志物应该具备 3 个特性^[10]:体内产生的速率恒定,可以自由通过肾小球;不被肾小管重吸收和分泌;仅通过肾脏排出。

肌酐是肌肉组织中肌酸和磷酸肌酸的代谢产物,血清肌酐可以自由通过肾小球滤过,其浓度变化取决于 GFR。因为其测定方法简单快速,费用低廉,因此,一直作为临床最常用的一个肾功能指标。但由于血清肌酐个体差异大,易受性别、年龄、肌肉容积和饮食等因素影响,同时,肾小管有微量分泌,使其敏感性大打折扣。有报道称,当 GFR 降低至 50% 时,血肌酐浓度才开始升高^[11]。从本文实验结果也可看到,当患者病情较轻时,血清肌酐浓度与健康对照组基本无差异,随着 GFR 的逐渐降低,其变化才越来越明显,因此,其主要应该用在对明确诊断肾病的同一个体的病情监测上^[12]。

β_2 -M 是小分子蛋白质,可以自由滤过肾小球,几乎全部被近曲小管吸收和降解,肾小管也不分泌,与 GFR 呈高度负相关。本次实验中 β_2 -M 的变化趋势是 3 项标志物中最不明显的,其相关系数与血清肌酐相当,同时,由于在感染、肝脏疾病、肿瘤、自身免疫性疾病中 β_2 -M 浓度也升高,大大降低了其对于 GFR 的特异性,同样不能作为 GFR 的理想标志物。

Cystatin C 是一种小分子碱性分泌性非糖化蛋白质,相对分子质量约 13.343×10^3 ,含 120 个氨基酸残基,位于人类第 20 号染色体^[13]。其由机体所有有核细胞合成并以相对恒定的速率释放入血,几乎仅经肾小球过滤而被清除,在近端小管完全重吸收,不再被分泌,而且其血液水平不受昼夜节律的影响,干扰因素少,仅可能会受到一些能影响蛋白合成的因素影响,如甲状腺功能情况等,而不易受年龄、性别、肌肉容积、药物和感染等因素影响。因此理论上,其应该比前两者更适合作为 GFR 的理想标志物。本次实验也表明,在对早期肾损伤患者

的 GFR 评估中,Cystatin C 能检测出血清 β_2 -M、Scr 无法检测到的盲区,为临床早期诊断肾小球滤过率受损提供实验室依据,在对中、晚期肾损伤患者的评估中,Cystatin C 同样具有很高的敏感性和特异性。因此,Cystatin C 是 GFR 最理想的内源性标志物,有条件的医院应将其纳入肾功能常规检查中,以期在肾脏疾病的早期诊断中体现其临床应用价值。

参考文献

[1] 贾民宜. 诊断学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,1997:222.
[2] 侯振江,孟晨阳,李红岩,等. 肾小球滤过率标志物应用评价[J]. 医学与哲学,2007,28(10):31-32.
[3] 刘丽琴,王捷,袁仕善,等. 胱抑素 C 与早期肾功能损害的关系[J]. 广东医学,2010,31(24):3256-3258.
[4] 李萍,赵莹,黄亨健,等. 胱蛋白酶抑制剂 C 对肾小球滤过功能的评价[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(5):515-516.
[5] 蒋丽华,杨沿浪. 胱抑素 C 测定评价慢性肾脏病肾小球滤过率的临床应用[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(8):820-821.
[6] 袁平宗,鄢志丽. 血清胱抑素 C 测定对肾脏疾病的临床价值[J]. 检验医学与临床,2010,7(12):1184-1185.
[7] 胡芳,程中应,李培林,等. 非浓缩尿蛋白电泳和胱抑素 C 联合检测在早期糖尿病肾损伤中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):717-718.
[8] 刘传勇,古东海,周丽华,等. 胱抑素 C 水平的测定在 2 型糖尿病肾功能评价中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(8):814-815.
[9] 赵英,林成芳,杨劲,等. 胱抑素 C 及 α -1 微球蛋白检测对糖尿病肾病诊断价值的比较分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(9):935-936.
[10] Laterza OF,Price CP,Scott MG. Cystatin C:an improved estimating of glomerular filtration rate[J]. Clin Chem,2002,48(5):699-707.
[11] Le-Briond T,Thervet E,Benlakehal M,et al. Change in plasma cystatin C after renal transplantation and acute rejection in adults[J]. Clin Chem,1999,45(12):2243-2249.
[12] Brian GK,Eric SK,Simon PN,et al. Biological variation of Cystatin C:implication for the assessment of glomerular filtration rate[J]. Clin Chem,1998,44(7):1535-1539.
[13] 蔡钢强,垢敬. 胱抑素 C 的生物学特性及临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(5):457-460.

(收稿日期:2011-08-11)

(上接第 169 页)

17(6):643-646.
[9] 张泓,吴文娟,李万华,等. 肺炎链球菌对大环内酯类抗生素耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2008,8(1):15-19.
[10] 吴金英,李少君,徐新波,等. 烟台地区肺炎链球菌的耐药性检测[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(2):108-110.
[11] Song JH,Jung SI,Ko KS,et al. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical Streptococcus pneumoniae isolates in Asia[J]. Antimicrob Chemother,2004,48(6):2101-2107.
[12] 李少君,吴金英,徐新波,等. 肺炎链球菌大环内酯类耐药表型与相关基因的关系[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(10):1067-1069.
[13] Kiyoshi S,Norikazu Y,Tetsuo H. High prevalence of erythromy-

cin resistance and macrolide-resistance genes, mefA and ermB, in Streptococcus pneumoniae isolates from the upper respiratory tracts of children in the Sapporo district, Japan[J]. J Infect Chemother,2007,13(4):219-223.
[14] Li Y,Tomital H,Lv Y. Molecular characterization of erm(B)- and mef(E)-mediated erythromycin-resistant Streptococcus pneumoniae in China and complete DNA sequence of Tn2010[J]. J Appl Microbiol,2011,110(1):254-265.
[15] 杨锦红,周义正,刘立. 儿童肺炎链球菌红霉素、四环素相关耐药基因的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(5):866-869.

(收稿日期:2011-10-09)