

• 调查报告 •

肺炎链球菌耐药性及分子流行病学调查*

吴佳学¹, 朱德全^{2△}

(1. 山东医学高等专科学校临床实验中心, 山东临沂 276000;

2. 山东省临沂市人民医院临床检验中心 276003)

摘要:目的 研究临沂地区肺炎链球菌呼吸道感染分离株的耐药性及其传播情况。方法 对肺炎链球菌分离株进行药物敏感试验和血清学分型,并结合 BOX-PCR、青霉素结合蛋白基因指纹等分子生物学方法分析菌株间亲缘关系。结果 124 株肺炎链球菌中红霉素不敏感菌株 33 株,占 26.6%,其中 *ermB* 基因介导的红霉素耐药菌株 21 株,占 63.6%,*mefE* 基因介导的红霉素耐药菌株 12 株,占 36.4%。青霉素敏感株(PSSP)111 株,敏感率 89.5%,青霉素低度耐药株(PISP)10 株,发现青霉素耐药株(PRSP)3 株,PSSP 组中除对红霉素、克林霉素、复方磺胺甲噁唑敏感度较低外,对阿莫西林/克拉维酸,第二、三代头孢菌素,氧氟沙星,万古霉素亦敏感;而 PISP 组出现了对第二代头孢菌素耐药菌株,3 株 PRSP 除对万古霉素敏感外,对其他抗菌药物均耐药。124 株肺炎链球菌血清型主要为 23F、3、19F、14、9V、6A、6B 等;BOX-PCR 谱型共 35 种,其中青霉素不敏感株(PNSP)有 6 种谱型。结论 上述肺炎链球菌呼吸道感染分离株对红霉素耐药的肺炎链球菌,其耐药机制以 *ermB* 基因介导为主,*ermB* 基因介导的耐药水平高于 *mefE* 基因介导的耐药水平;对青霉素耐药率较低,耐二代头孢菌素肺炎链球菌对万古霉素敏感。存在青霉素耐药菌株克隆传播和耐药基因水平传播。

关键词:呼吸道感染; 肺炎链球菌; 抗药性,细菌; 耐药基因; 流行病学,分子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0345-03

本文自儿科呼吸道感染患者痰液标本中分离出肺炎链球菌 124 株,检测细菌的耐药性结合 BOX-PCR 谱型、细菌耐药谱、血清型和青霉素结合蛋白(PBP)指纹等,提供肺炎链球菌耐药株流行的遗传学证据,为儿科临床合理使用抗菌药物及控制肺炎链球菌的感染提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 1 月至 2010 年 9 月间临沂市人民医院儿科下呼吸道感染患儿共 124 例,其中儿内科呼吸组 62 例,年龄 10 个月至 6 岁;儿科神经组 28 例,年龄 1~6 岁;儿科血液组 20 例,年龄 1~6 岁;儿科肾病组 14 例,年龄 2~6 岁。

1.2 标本采集和处理 采用一次性无菌吸痰器收集痰标本,样本在接种前先行涂片细胞学筛选,以白细胞与上皮细胞之比大于 2.5 为合格痰^[1],将筛选合格的痰样本经 1% 痰标本消化液(SPUTASOL,英国 Oxoid 公司)消化 1 h 后,接种于 2 块血平皿(其中一块血平皿贴庆大霉素纸片置于 CO₂ 培养箱,以提高肺炎链球菌的检出率)、1 块麦康凯平皿和 1 块巧克力平皿。巧克力平皿贴万古霉素、林可霉素、杆菌肽 3 种药敏纸片成倒三角形,置于 CO₂ 培养箱以提高流感嗜血杆菌的检出率,37℃ 孵育 18~24 h。

1.3 试剂

1.3.1 细菌鉴定和药敏试剂及培养基 细菌鉴定卡、药敏卡及 VITEK-32 和 ATB 系统手工药敏条、Etest 条等均购自法国生物梅里埃公司,SPUTASOL、X、V 因子、药敏纸片及 Optochin 为英国 Oxoid 公司产品,血平皿和巧克力平皿系本室自制。

1.3.2 分子生物学试剂 Taq 酶和 BOX-PCR 引物为英国 Advanced Biotechnologies 公司产品。RNA 酶、DNA 标记物、dNTP、限制性内切酶 Ddel、Styl、Hinfl、Msel 和 SmaI 为德国 Boehringer Mannheim GmbH 公司产品。

1.3.3 质控菌株 ATCC49619 肺炎链球菌标准菌株购自卫生部临床检验中心。

1.4 方法

1.4.1 药敏检测 药敏试验用 Etest 条测最低抑菌浓度(MIC),判断标准按 CLSI M100-S20 标准^[2]。

1.4.2 血清学分型 以 90 种肺炎链球菌抗血清(丹麦 Statens Serum Institute 公司)采用 Quellung 试验进行血清学分型。

表 1 pbp1A、pbp2B、pbp2X 基因的扩增引物

引物名称	序列(5'→3')
扩增 pbp1A	F1:TGTCTAATGGGAACATATGGAATG R1:TCCATTCTGTAGAGCCCCCTCTGG
扩增 pbp2B	F2:GATCCTCTAAATGATTCCTCAGGTGGC R2:CAATCAACTTGGCAATAGGTGTTGG
扩增 pbp2X	F3:GAACAGTATCTTTCGACGGACAGAC R3:GTCTCAGCAGTCTCCTTTGTCCAAC
pbp1A 正向测序引物	P1:TGTCTAATGGGAACATATGGAATG
pbp1A 反向测序引物	P2:CAGCGTAAGCAGCAGCCATC P3:TCCATTCTGTAGAGCCCCCTCTTGG
pbp2B 反向测序引物	P4:ACCGTTCCCAAGGAATCA P5:ACTGCATCGGCGTATAGTTATC P6:CAATCAACTTGGCAATAGGTGTTGG
pbp2X 正向测序引物	P7:GTATTCCTGCAGGGACAGACG
pbp2X 反向测序引物	P8:CAGACTTGAGGGCTACATTTTG P9:GCAGTCTCCTTTGTCCAACC

1.4.3 BOX-PCR DNA 提取与 PCR 方法同王辉等^[3]所用方法,以 Gel Compare 软件(比利时)分析图像,绘制树状图,分析肺炎链球菌菌株 BOX-PCR 指纹相似性。DNA 扩增仪采用

* 基金项目:山东省高等学校科技计划项目(J08LH06)。 △ 通信作者,E-mail:zhudequan886@126.com。

Thermal Cycler(美国 PEKIN-ELMER 公司)。

1.4.4 青霉素耐药菌株 pbp 基因 PCR 每 50 μ L 反应体系包括 200 μ mol/L dNTP、1 U Taq 酶、20 ng DNA 以及相应的 pbp1A、pbp2B、pbp2X 上下游引物(表 1)。PTC-200 DNA 扩增仪(美国 Mr. Research INC 公司)上, 93 $^{\circ}$ C 完全变性 5 min, 随后进行 30 轮循环扩增: 93 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。末轮循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 对 pbp PCR 产物分别以 Hinf1、Mse1/Dde1 或 Sty1 切割, 电泳比较细菌相应的 pbp 基因指纹。

1.4.5 肺炎链球菌红霉素耐药基因的判断^[4] 用克林霉素纸片法检测, 克林霉素、红霉素耐药肺炎链球菌为 *ermB* 基因介导, 克林霉素敏感而对红霉素耐药的肺炎链球菌为 *meFE* 基因介导。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件, 青霉素敏感株(PSSP)和青霉素低度耐药株(PISP)比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 肺炎链球菌药敏检测结果 124 株分离菌株中红霉素不敏感菌株 33 株, 占 26.6%(33/124), 青霉素不敏感菌株(PNSP)共 13 株占 10.5%(13/124), 其中 10 株为 PISP, 3 株为青霉素耐药株(PRSP), PSSP 111 株, 敏感率 89.5%, 见表 2。

2.2 血清型分布 124 株存活细菌分属 25 种血清型, 主要血清型依次为: 23F(24.2%)、3(13.7%)、19F(8.9%)、14(7.3%)、9V(5.7%)、6A(4.8%)、6B(4.8%)、8(4.0%)、18c(3.2%)、其他(23.4%)。

2.3 BOX-PCR 指纹 根据与细菌来源、表型和 pbp 基因指纹比较的结果, 以相似性大于 80% 为同一谱型, 124 株细菌共发现 35 种 BOX-PCR 谱型, 其中 22 种谱型分别有 2~12 株细菌。一些 BOX-PCR 谱型相同的菌株来自不同儿科病区, 对青霉素等药物敏感性以及血清型亦有所不同。13 株 PNSP 分属 6 种谱型。

2.4 PNSP 菌株 pbp 基因指纹 见表 3。

表 2 124 株肺炎链球菌对所测抗菌药物的 MIC

抗菌药物	PSSP			PISP			PRSP	χ^2 值	P*
	MIC50	MIC90	敏感率(%)	MIC50	MIC90	敏感率(%)	敏感率(%)		
氨苄西林	≤ 0.016	0.030	—	0.25	1.00	—	0.0	—	—
阿莫西林/克拉维酸	≤ 0.016	≤ 0.016	100.0	0.25	0.5	100.0	0.0	—	—
头孢克洛	0.125	0.250	100.0	4.00	16.00	20.0	0.0	92.86	< 0.01
头孢呋辛	0.030	0.060	100.0	1.00	1.00	20.0	0.0	92.86	< 0.01
头孢噻肟	≤ 0.016	0.060	100.0	0.25	0.50	100.0	0.0	17.39	< 0.01
头孢曲松	≤ 0.016	0.030	100.0	0.25	0.50	100.0	0.0	17.39	< 0.01
红霉素	0.250	0.500	21.6	0.25	0.50	10.0	0.0	0.67	> 0.05
克林霉素	0.250	0.500	40.6	0.25	0.50	20.0	0.0	2.15	> 0.05
氧氟沙星	1.000	2.000	100.0	1.00	2.00	100.0	0.0	92.86	< 0.01
复方磺胺甲噁唑	1/19	1/19	23.1	1/19	2/38	20.0	0.0	0.09	> 0.05
万古霉素	0.250	0.500	100.0	0.25	0.50	100.0	100.0	—	—

* : PSSP 与 PISP 敏感率比较; — : 无数据。

表 3 PNSP 菌株表型和 DNA 指纹比较

菌株来源	BOX-PCR 谱型	血清型	耐药谱	MIC		pbp1A		pbp2B		pbp2X	
				青霉素	头孢曲松	Hinf	M/D	Hinf	Sty	Hinf	M/D
儿科内呼吸组	F	23F	P/E/DA/STX	2.5	1.5	*	*	G	J	Q	R
儿科内呼吸组	F	23F	P/E/DA/STX	4	2	D	C	B	J	P	N
儿科内呼吸组	F	23F	P/E/DA/STX	8	4	D	B	G	J	P	R
儿科内呼吸组	A	23F	P/E/DA/STX	4	3	A	C	B	J	Q	R
儿科血液组	A	23F	P/E/DA/STX	16	8	A	A	A	B	A	A
儿科肾病组	A	23F	P/E/DA	2.5	2	A	A	B	A	A	T
儿科内呼吸组	I	14	P/E/DA/STX	3	2	A	A	F	H	N	S
儿科内呼吸组	I	14	P/E/DA/STX	3	2.5	A	A	F	H	N	B
儿科神经组	J	19F	P/E/DA/STX	16	4	C	A	F	H	N	B
儿科神经组	J	19F	P/E/DA/STX	2.5	1.5	A	A	A	F	NB	*
儿科神经组	L	23F	P/E/DA/STX	3.5	2.5	D	C	G	J	Q	R
儿科肾病组	L	8	P	3	3	D	C	B	I	M	P
儿科血液组	B	6A	P/E/DA/STX	2.5	1.5	B	B	C	G	E	M

* : 不能检出。

2.5 肺炎链球菌红霉素耐药基因检测结果 33 株对红霉素耐药的肺炎链球菌中, *ermB* 基因介导的红霉素耐药菌株占 63.6%, *mefE* 基因介导的红霉素耐药菌株占 36.4%。

3 讨 论

肺炎链球菌耐红霉素的机制主要是 *ermB* 基因介导的靶位改变和 *mefE* 基因介导的药物外排。目前已知 *ermB* 基因介导的红霉素耐药, 是由于 23S rRNA 核糖体上红霉素结合靶位的改变, 使肺炎链球菌表现出对某些大环内酯类抗菌药物、克林霉素和链霉素耐药; *mefE* 基因介导的耐药, 使肺炎链球菌仅表现出对 14、15 环大环内酯类产生耐药, 而对林克霉素类等抗菌药物敏感^[5]。本组资料显示, 124 株儿科感染肺炎链球菌中, 红霉素耐药菌株为 33 株, 耐药率 22.7%, 其中 *ermB* 基因介导的红霉素耐药菌株占 63.6%; *mefE* 基因介导的红霉素耐药菌株占 36.4%。

本组呼吸道感染患者肺炎链球菌分离株中 PRSP 不多, 除对万古霉素 100.0% 敏感外, 对所测其他抗菌药物均耐药; PSSP 组中除对红霉素、克林霉素、复方磺胺甲噁唑敏感度较低外, 对阿莫西林/克拉维酸、第二、三代头孢菌素、氧氟沙星、万古霉素亦敏感; PISP 组对红霉素、克林霉素和复方磺胺甲噁唑敏感率更低, 并出现了对第二代头孢菌素耐药菌株, 对阿莫西林/克拉维酸、第三代头孢菌素、氧氟沙星、万古霉素敏感。PSSP 组与 PISP 组比较, 对红霉素、克林霉素和复方磺胺甲噁唑的耐药率虽无统计学差异 ($P > 0.05$), 但对三者的敏感性皆呈降低趋势; 对头孢呋辛、头孢克洛、头孢噻肟、头孢曲松、氧氟沙星的敏感率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

本组 124 株细菌共发现 35 种 BOX-PCR 谱型, 其中 22 种谱型分别有 2~12 株细菌; 13 株 PNSP 分属 6 种谱型。2 株 BOX-PCR 谱型为 I 的菌株, 其血清型、耐药谱亦相同, *pbp* 基因指纹相似, 且分离自同一病区, 提示可能存在耐药菌株克隆传播; BOX-PCR 谱型为 F(3 株)、A(3 株)、J(2 株) 和 L(2 株) 的菌株, BOX-PCR 谱型相同, 血清型和耐药谱不完全相同, 且 *pbp* 基因指纹表现出多样性, 提示耐药菌株在传播过程中可能

• 调查报告 •

存在着耐药基因水平传播。儿童免疫系统尚未发育完善, 易受到病原菌的侵袭, 耐药菌引起的感染更难控制, 使用抗菌药物时应避免盲目无指征的滥用^[6]。

菌株来源与其耐药性密切相关, 不同菌种间耐药性存在差异, 不同医院同一菌种对同一抗菌药物的耐药率也存在较大差异, 从同一患者分离的同一菌株在用药前后也可发生耐药性的改变^[7]。尽管青霉素耐药率尚较低, 但随着与周边地区的交流, 其流行的程度可能更广, 并可能流入新的耐药克隆, 应警惕其耐药性上升的可能性。

参考文献

- [1] Ken W, Crystal J, Barry G, et al. Use of clindamycin disks to detect macrolide resistance mediated by *ermB* and *mefE* in streptococcus pneumoniae isolates from adults and children[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1731-1734.
- [2] CLSI. M100-S20 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2010.
- [3] 王辉, 陈民钧, Huebener R, 等. 北京地区肺炎链球菌的耐药性及其分子流行病学调查[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(4): 253-256.
- [4] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 744.
- [5] Huban DJ, Wierzbowski AK, Nichol K, et al. Macrolide-resistant streptococcus pneumoniae in Canada during 1998-1999: prevalence of *mec(A)* and *erm(B)* and susceptibilities to ketolides[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7): 2147-2150.
- [6] 张晓丽, 周薇薇, 王晓红, 等. 儿科下呼吸道感染菌群分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1422-1423.
- [7] 李红梅, 单正清. 肺结核患者激发呼吸道感染主要病原菌分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 47-48.

(收稿日期: 2011-10-09)

生殖系统念珠菌感染的菌型及其体外药敏分析

黎小东, 宋卫忠, 李平, 高爱莉, 黄平, 颜景兰
(广东省广州市皮肤病防治所检验科 510095)

摘要:目的 了解性传播疾病患者中生殖系统念珠菌感染的菌型及其对临床常用抗真菌药物的敏感性。方法 采用法国梅里埃公司的 ATB ID32C 酵母菌鉴定反应板鉴定菌种和 Rosco 纸片扩散法进行体外药敏检测, 比较不同菌型念珠菌的药敏趋势。结果 临床 112 例生殖系统念珠菌感染者中白色念珠菌 82 例 (73.21%)、近平滑念珠菌 16 例 (14.29%)、光滑念珠菌 4 例 (3.57%)、无名念珠菌 4 例 (3.57%)、其他念珠菌 6 例 (5.36%), 药敏分析结果: 念珠菌属对制霉菌素 (98.21%)、酮康唑 (91.07%)、氟康唑 (67.86%) 敏感, 而对咪康唑 (35.71%)、噻康唑 (33.04%)、伊曲康唑 (42.86%) 和特比萘酚 (20.54%) 的中介度和耐药性较高。结论 生殖系统念珠菌感染以白色念珠菌为主, 感染的念珠菌除了对多烯类药物敏感率高外, 对唑类抗真菌药有不同程度的交叉耐药, 不同菌型其药敏谱存在差异。

关键词: 性传播疾病; 念珠菌属; 药敏试验; Rosco 纸片扩散法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)03-0347-03

近年来, 性传播疾病 (sexually transmitted disease, STD) 的发病率逐年上升, 生殖系统念珠菌感染发生率也日趋增高^[1], 由于抗真菌药物在临床上的大量应用, 真菌对抗真菌药物的耐药性也日趋严重。有研究认为生殖系统念珠菌感染的复发与其对唑类抗真菌药物耐药有关, 对 STD 患者定期了解生殖系统念珠菌感染的菌型及其体外药敏情况, 对指导临床选择用

药, 提高疗效, 具有一定参考意义^[2]。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 2010 年 1~12 月, 在本所性病门诊就诊的生殖系统念珠菌感染的患者, 共 112 例, 其中男 58 例, 女 54 例, 年龄 15~67 岁。

1.2 方法 将分泌物拭子接种于沙氏平板培养基或科马嘉显