



学龄前儿童肺炎链球菌耐药性及大环内酯类耐药基因分析

赖剑秀, 宋相泉, 徐菊芳, 戴玉柱, 段达荣

引用本文:

赖剑秀,宋相泉,徐菊芳,戴玉柱,段达荣. 学龄前儿童肺炎链球菌耐药性及大环内酯类耐药基因分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2023, 48(11): 1577–1580.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.11.022>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

肺炎克雷伯菌耐药与抗菌药物使用强度现况及其关联分析

Drug resistance to *Klebsiella pneumoniae* and use density of antibacterial agents, and their correlation analysis
蚌埠医学院学报. 2019, 44(8): 1091–1096 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.08.032>

450例重症社区获得性肺炎患儿痰液病原体分布及细菌耐药特点

Distribution of sputum pathogens and characteristics of bacterial resistance in 450 children with severe community-acquired pneumonia

蚌埠医学院学报. 2019, 44(11): 1477–1480,1483 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.11.011>

新生儿败血症76例血培养阳性结果及耐药性分析

Analysis of positive results and drug resistance in 76 cases of blood culture of neonatal septicemia

蚌埠医学院学报. 2017, 42(1): 64–66 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.01.017>

某院住院患者抗菌药物使用量与细菌耐药分析

Analysis on consumption of antibacterials and bacterial resistance in a certain hospital

蚌埠医学院学报. 2017, 42(4): 495–498 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.04.023>

学龄前儿童肺炎链球菌耐药性及大环内酯类耐药基因分析

赖剑秀¹, 宋相泉¹, 徐菊芳¹, 戴玉柱², 段达荣³

[摘要] 目的: 了解学龄前儿童肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, Sp)的耐药性及大环内酯类耐药基因分布。方法: 选取 60 株 Sp, 采用 E-test 法检测菌株对青霉素、阿莫西林、头孢噻肟、头孢曲松的最低抑菌浓度; 纸片扩散法检测 Sp 对红霉素、克林霉素、复方新诺明、四环素、氯霉素、左氧氟沙星、万古霉素、利奈唑胺的药物敏感性; PCR 检测大环内酯类耐药基因 *ermB*、*mefA* 和 *mefE* 的检出率。患儿按年龄分为 0~12 个月组、13~36 个月组和 37~60 个月组, 比较各组抗菌药物不敏感率和耐药基因检出率。结果: 药敏试验结果显示, 60 株 Sp 对红霉素、四环素和复方新诺明的耐药率较高, 分别为 95.00%、93.30%、61.07%; Sp 对万古霉素、厄他培南、利耐唑胺和泰来霉素均敏感, 敏感率为 100.00%。0~12 个月组儿童对头孢噻肟、头孢曲松、青霉素 G、阿莫西林、红霉素、美洛培南不敏感率均高于 13~36 个月组和 37~60 个月组, 其中 3 组头孢噻肟、头孢曲松不敏感率差异有统计学意义($P<0.05$), 36~60 个月组儿童对复方新诺明、氧氟沙星、四环素不敏感率最高。PCR 结果显示, 大环内酯类耐药基因 *ermB* 检出率最高(98.33%), *mefA* 和 *ermB* + *mefA* 测出率均为 78.33%, *mefE* 和 *ermB* + *mefE* 检出率均为 60.00%, *ermB* + *mefA* + *mefE* 检出率最低(46.67%)。*mefE* 和 *ermB* + *mefE* 在 0~12 个月组、13~36 个月组、37~60 个月组检出率逐渐降低($P<0.05$)。结论: 学龄前儿童 Sp 对大环内酯类耐药率较高, *ermB* 耐药基因为 Sp 对大环内酯类抗生素耐药的主要基因型。

[关键词] 肺炎链球菌; 耐药率; 耐药基因; 学龄前儿童

[中图分类号] R 378.1 [文献标志码] A DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.11.022

Analysis of drug-resistance and macrolide-resistant genes
of *Streptococcus pneumoniae* in preschool children

LAI Jian-xiu¹, SONG Xiang-quan¹, XU Ju-fang¹, DAI Yu-zhu², DUAN Da-rong³

(1. Department of Clinical Laboratory, The Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital in Xihu District, Hangzhou Zhejiang 310000; 2. Department of Clinical Laboratory, The 903rd Hospital of PLA, Hangzhou Zhejiang 310013; 3. Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Taizhou, Taizhou Zhejiang 318020, China)

[Abstract] Objective: To understand the drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* (Sp) and the distribution of macrolide-resistant genes in preschool children. Methods: Sixty Sp strains were selected, and the minimum inhibitory concentrations of penicillin, amoxicillin, cefotaxime and ceftriaxone were detected by E-test method; the susceptibility of Sp to erythromycin, clindamycin, cotrimoxazole, tetracycline, chloramphenicol, levofloxacin, vancomycin and linezolid was detected by disk diffusion method; the detection rate of macrolide-resistant genes *ermB*, *mefA* and *mefE* was determined by PCR. The children were divided into 0 to 12-month group, 13 to 36 month group and 37 to 60-month group according to their age. The antimicrobial insensitivity rate and the detection rate of drug resistance genes in the three groups were compared. Results: The results of drug sensitivity test displayed that the 60 strains of Sp showed high drug resistance rate to erythromycin, tetracycline and cotrimoxazole, and the resistance rates were 95.0%, 93.3% and 61.7%, respectively; Sp was sensitive to vancomycin, ertapenem, linezolid and telithromycin, and the sensitivity rate was 100.0%. The insensitivity rates of children to cefotaxime, ceftriaxone, penicillin G, amoxicillin, erythromycin and meropenem in the 0 to 12-month group were higher than those in the 12 to 36-month group and 36 to 60-month group, the difference of insensitivity rates of cefotaxime, ceftriaxone among the three groups was statistically significant ($P<0.05$), and the insensitivity rates of children to cotrimoxazole, ofloxacin and tetracycline in the 36 to 60-month group were the highest. The PCR results showed that the detection rate of macrolide-resistant gene *ermB* was the highest (98.33%), which was 78.33% for *mefA* and *ermB* + *mefA*, 60.00% for *mefE* and *ermB* + *mefE*, and 46.67% for *ermB* + *mefA* + *mefE*. The detection rates of *mefE* and *ermB* + *mefE* gradually decreased in the 0 to 12-month group, 13 to 36-month group and 37 to 60-month group ($P<0.05$).

Conclusions: The resistance rate of Sp to macrolide in preschool children is high, and the resistance gene *ermB* is the main genotype of Sp to macrolide.

[Key words] *Streptococcus pneumoniae*; drug resistance rate; drug resistance gene; preschool children

[收稿日期] 2021-01-26 [修回日期] 2021-06-10
[作者单位] 1. 浙江省杭州市西湖区中西医结合医院 检验科, 310000; 2. 解放军第九〇三医院 检验科, 浙江 杭州 310013; 3. 浙江省台州市第一人民医院 检验科, 318020
[作者简介] 赖剑秀 (1981-), 女, 副主任技师。
[通信作者] 宋相泉, 主任技师. E-mail: 79219121@qq.com

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, Sp) 是儿童呼吸道感染常见致病菌之一, 同时也可引起中耳炎、化脓性脑膜炎及血流感染, 给病人的生命安全带来了巨大的威胁。据估计, 2015 年全球约 33.5 万名 <5 岁儿童死于 Sp 引起的细菌性肺炎^[1]。随抗菌药物的广泛使用, Sp 耐药性不断发生变化, Sp 耐药菌也被广泛报道, 且耐药菌株的产生速度不断增加, 导致部分抗菌药物治疗效果不佳, 给临床治疗带来很大的困难^[2]。本研究分析 Sp 的耐药性和大环内酯类耐药基因检出情况, 为临床 Sp 感染治疗提供参考。现作报道。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2018 年 1 月至 2019 年 6 月杭州市西湖区中西医结合医院儿科病人下呼吸道标本分离的 Sp。纳入标准: (1) 病人年龄 ≤5 岁, 剔除重复菌株; (2) 病人信息记录完善者。共收集符合条件患儿 60 例, 其中男 36 例, 年龄 1 ~ 57 个月; 女 24 例, 年龄 3 ~ 60 个月。患儿按年龄分为 0 ~ 12 个月组、>12 ~ 36 个月组和 37 ~ 60 个月组。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 PICO 17 型台式高速离心机和 NANO-DROP 型超微量分光光度计购自 Thermo 公司; PAC 3000 型电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; GIS-1600 型凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司; ABI 7500 型 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司; MCO-15CA 型二氧化碳培养箱购自日本三洋株式会社; GFP-9270 型普通培养箱购自上海一恒医疗器械有限公司。

1.2.2 试剂 哥伦比亚血琼脂平板 (批号: 070811-2)、药敏培养基为 5% 绵羊血、MHA 培养皿 (批号: 1002022190) 购自广州迪景生物技术有限公司, 青霉素 E-test 试条购自温州康泰生物科技有限公司。PCR 试剂盒 KAPA2G Fast Multiplex Mix 购自上海益启生物科技有限公司, PCR 引物见表 1。

表 1 耐药基因引物		
基因	引物序列	产物长度/ bp
ermB	F: 5'-GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA-3'	639
	R: 5'-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3'	
mefE	F: 5'-GGG AGA TGA AAA GAA GGA GT-3'	363
	R: 5'-TAA AAT GGC ACC GAA AG-3'	
mefA	F: 5'-TGG TTC GGT GCT TAC TAT TGT-3'	553
	R: 5'-CCC CTA TCA ACA TTC CAG A-3'	

1.3 方法

1.3.1 标本采集 晨起漱口, 清除口腔和鼻腔内的分泌物, 深呼吸将痰液用力咳出, 置于无菌痰杯中; 如果是婴幼儿晨起喂奶前由专人用低压吸引器连接一次性无菌吸痰管, 经鼻咽部负压吸取痰标本, 置消毒试管内。采集到的标本均在 1 h 内送至微生物实验室进行痰涂片镜检, 白细胞 > 25 个/低倍镜视野, 鳞状上皮细胞 < 10 个/低倍镜视野为合格标本。

1.3.2 Sp 培养和鉴定 将痰标本接种于哥伦比亚血琼脂平板, 置于 35 ℃ 含 5% CO₂ 孵箱中孵育 18 ~ 24 h, 然后挑选周围有草绿色溶血环、边缘整齐, 呈脐窝状的菌落, 进行革兰染色, 奥普托欣试验进行初筛, 结果阳性再用法国生物梅里埃自动细菌鉴定仪 VITEK 2 Compact GP 卡进行鉴定。

1.3.3 药敏试验 采用 E-test 法检测 Sp 对青霉素、头孢曲松及头孢噻肟的最低抑菌浓度; 采用纸片扩散法检测 Sp 对红霉素、克林霉素、复方新诺明、四环素、氯霉素、左氧氟沙星、万古霉素、利奈唑胺的药物敏感性。质控菌株为 SpATCC49619, 来源于南京便诊生物科技有限公司。抗菌药物敏感性判定依据美国临床和实验室标准委员会 2020 版判定标准实施和执行。

1.3.4 PCR 扩增 (1) DNA 提取: Sp 在哥伦比亚血琼脂平板上培养 24 h, 传代后收集整个血平板上菌落, 用十六烷基三甲基溴化铵法提取基因组 DNA。(2) PCR 反应体系: 10 × PCR 缓冲液 5.0 μL, MgCl₂ 2 mmol/L, dNTP 200 pmol/L, 上、下游引物各 50 pmol/L, Taq 酶 2 U/μL, 模板 DNA 50 ng/μL。(3) 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃、30 s, 60 ℃、30 s, 72 ℃、1 min, 35 次循环; 72 ℃ 延伸 5 min^[3]。(4) 电泳: 将扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 45 min, 紫外灯下观察结果, 凝胶成像系统扫描成像, 选用 ATCC49619 标准菌株作为阴性对照。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验和 Fisher's 确切概率法。

2 结果

2.1 60 株 Sp 耐药情况 药敏试验结果显示, 60 株 Sp 对红霉素、四环素和复方新诺明的耐药率较高, 分别为 95.0%、93.3%、61.7%; Sp 对万古霉素、厄他培南、利耐唑胺和泰利霉素均敏感, 敏感率为 100.0% (见表 2)。

表 2 60 株 Sp 耐药情况[<i>n</i> ;百分率(%)]			
抗菌药物	耐药	中介	敏感
复方新诺明	37(61.67)	8(13.33)	15(25.00)
左氧氟沙星	2(3.33)	0(0.00)	58(96.67)
氯霉素	7(11.67)	0(0.00)	53(88.33)
氧氟沙星	2(3.33)	3(5.00)	55(91.67)
万古霉素	0(0.00)	0(0.00)	60(100.00)
莫昔沙星	1(1.67)	0(0.00)	59(98.33)
厄他培南	0(0.00)	0(0.00)	60(100.00)
头孢噻肟	3(5.00)	0(0.00)	57(95.00)
头孢曲松	3(5.00)	0(0.00)	57(95.00)
青霉素 G	8(13.33)	6(10.00)	46(76.67)
阿莫西林	5(8.33)	0(0.00)	55(91.67)
红霉素	57(95.00)	1(1.67)	2(3.33)
四环素	56(93.33)	0(0.00)	4(6.67)
利奈唑胺	0(0.00)	0(0.00)	60(100.00)
美洛培南	4(6.67)	5(8.33)	51(85.00)
泰利霉素	0(0.00)	0(0.00)	60(100.00)

2.2 不同年龄组抗菌药物不敏感率比较 0 ~ 12

表 3 不同年龄组抗菌药物不敏感率比较[*n*;百分率(%)]

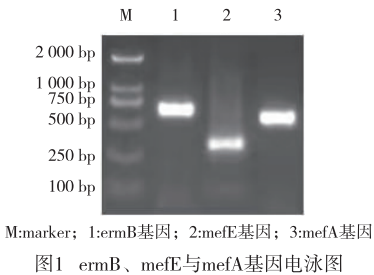
分组	<i>n</i>	复方新诺明	左氧氟沙星	氯霉素	氧氟沙星	头孢噻肟	头孢曲松	青霉素 G	阿莫西林	红霉素	四环素	美洛培南
0 ~ 12 个月组	19	15(78.95)	1(5.26)	1(5.26)	1(5.26)	3(15.79)	3(15.79)	5(26.32)	5(26.32)	19(100.00)	18(94.74)	5(26.32)
13 ~ 36 个月组	17	13(76.47)	1(5.88)	0(0.00)	1(5.88)	0(0.00)	0(0.00)	3(17.65)	0(0.00)	16(94.12)	15(88.23)	3(17.65)
37 ~ 60 个月组	24	19(79.17)	0(0.00)	1(4.17)	2(8.33)	0(0.00)	0(0.00)	6(25.00)	0(0.00)	22(91.67)	23(95.83)	1(4.17)
χ^2	—	0.06	—	—	—	—	—	0.44	11.77	—	0.93	4.21
<i>P</i>	—	>0.05	>0.05 Δ	>0.05 Δ	>0.05 Δ	<0.05 Δ	<0.05 Δ	>0.05	>0.05	>0.05 Δ	>0.05	>0.05

Δ 示 Fisher's 确切概率法

表 4 不同年龄组耐药基因检出率比较[*n*;百分率(%)]

分组	<i>n</i>	ermB	mefE	mefA	ermB + mefA	ermB + mefE	ermB + mefA + mefE
0 ~ 12 个月组	19	19(100.00)	15(78.94)	14(73.68)	14(73.68)	15(78.94)	9(47.37)
13 ~ 36 个月组	17	16(94.12)	11(64.71)	12(70.59)	12(70.59)	11(64.71)	9(52.94)
37 ~ 60 个月组	24	24(100.00)	10(41.67)	21(87.50)	21(87.50)	10(41.67)	10(41.67)
合计	60	59(98.33)	36(60.00)	47(78.33)	47(78.33)	36(60.00)	28(46.67)
χ^2	—	—	6.36	2.03	2.03	6.36	0.51
<i>P</i>	—	>0.05 Δ	<0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

Δ 示 Fisher's 确切概率法



个月组儿童对头孢噻肟、头孢曲松、青霉素 G、阿莫西林、红霉素、美洛培南不敏感率均高于 13 ~ 36 个月组和 37 ~ 60 个月组,其中 3 组头孢噻肟、头孢曲松不敏感率差异有统计学意义($P < 0.05$),37 ~ 60 个月组儿童对复方新诺明、氧氟沙星、四环素不敏感率最高(见表 3)。

2.3 Sp 耐药基因检测结果 检测的 Sp 大环内酯类三个基因分别为 ermB、mefE 与 mefA,结果表明,ermB 检出率最高(98.33%),mefA 和 ermB + mefA 测出率均为 78.33%,mefE 和 ermB + mefE 检出率均为 60.00%,ermB + mefA + mefE 检出率最低(46.67%)。mefE 和 ermB + mefE 在 0 ~ 12 个月组、13 ~ 36 个月组、37 ~ 60 个月组检出率逐渐降低($P < 0.05$)(见表 4)。

2.4 Sp 耐药基因电泳结果 本研究共检测 3 种耐药基因,ermB、mefE 与 mefA 基因产物长度分别为 639、363、553 bp,电泳结果见图 1。

3 讨论

近年来,我国抗菌药物滥用日趋严重,随着临床上抗菌药物的大量应用,儿童感染 Sp 多重耐药率逐渐升高,导致相关感染控制难度增大,已成为全球性问题^[4-5]。本研究分离的 60 株 Sp 药敏结果表明,红霉素耐药率为 95.00%,与 KIM 等^[6]在亚洲耐药病原体监测网络研究报道我国 Sp 的红霉素耐药率(96.4%)结果一致。除红霉素表现高度耐药外,四

环素耐药率也保持高位,本次检测四环素耐药率为93.33%,高于王扬帆等^[7]报道的86.54%。究其原因,一方面可能不同分离菌株间存在差异,另一方面可能不同地区医疗、养殖和环境抗生素的使用有关。由于Sp对红霉素高度耐药,在临床治疗中应避免使用,研究中未检测到耐万古霉素、厄他培南、利耐唑胺及泰利霉素菌株,这为临床治疗Sp感染相关疾病提供了更多的用药选择。

本研究中,不同年龄组抗菌药物不敏感率比较表明,0~12月儿童对头孢噻肟、头孢曲松、阿莫西林不敏感率高于12~36月和36~60月年龄组($P<0.05$),可能与当地生活节奏快,工作压力大,许多家庭6~12月儿童,用奶粉或辅食代替母乳喂养。另外,该时期免疫系统发育尚未完善,特别容易患呼吸道疾病(如咳嗽、打喷嚏、流涕、发热等感冒症状及肺炎等)和胃肠道疾病(如腹泻等),导致该时期的婴幼儿,经常使用抗生素,从而对许多抗菌药物产生耐药和中介现象,引起不敏感率增加。由于本研究的标本数量有限,不同年龄组的不敏感率比较需要再收集标本进一步分析。

Sp对大环内酯类的耐药是通过多种不同的耐药机制完成的。耐药机制主要包括核糖体靶位改变和主动外排系统。另外,IZE-IYAMU等^[8]报道转座子在Sp耐药进化中起重要作用,与质粒DNA无关的耐药性传递主要由转座因子完成。不同地区检测的红霉素Sp的耐药基因结果有所不同,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。本研究分离的60株Sp,采用PCR法检测大环内酯类耐药基因ermB、mefA和mefE,结果表明,耐药基因携带率以ermB最高(98.33%),与WANG等^[9]报道的100.0%及黄阿环等^[10]报道的98.1%一致,但高于宋彬容^[11]报道的87.5%与BAO等^[12]报道的70.2%,表明ermB基因为很多地区Sp耐红霉素的主要原因,另外在不同地区也存在着很大的差异。mefA和mefE携带率分别为78.33%与60.00%,高于赖玉华^[13]报道的mefA 6.1%和mefE 44.7%,可能与不同地区菌株差异有关。另外28株同时检测到耐药基因ermB、mefA和mefE,占比46.67%,表明该地区Sp对大环内酯类抗生素耐药现象严重,且耐药机制复杂;1株耐红霉素的Sp均未检测到ermB、mefA和mefE耐药基因,可能存在其他的耐药基因或耐药机制,有待于进一步研究。本研究中,不同年龄组的耐药基因比较发现,mefE与ermB+mefE在不同年龄组差异有统计学意

义,且0~12月组比13~36月与37~60月组高,与上述讨论的不同年龄组耐药率0~12月组高于其他2组较为一致,因此,0~12月患儿治疗Sp感染疾病尽量避免大环内酯类药物使用。

综上,学龄前儿童Sp对大环内酯类耐药率与耐药基因携带率均处于高位,对青霉素耐药率较低,对万古霉素、厄它培南、利耐唑胺及泰利霉素均未出现耐药菌,因此,临床在治疗Sp感染相关疾病时,必须加强耐药监测。

[参 考 文 献]

- [1] LZU A, SOLOMON F, NZENZE SA, *et al.* Pneumococcal conjugate vaccines and hospitalization of children for pneumonia: a time-series analysis, South Africa, 2006-2014 [J]. Bull World Health Organ, 2017, 95 (9): 618.
- [2] 肖海励, 易善永, 韩飞, 等. 晚期肺癌化疗患者医院感染的病原学与危险因素分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26 (5): 1025.
- [3] DALY MM, DOKTOR S, FLAMM R, *et al.* Characterization and prevalence of MefA, MefE, and the associated msr(D) gene in streptococcus pneumoniae clinical isolates [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42 (8): 3570.
- [4] 李正秋, 刘兰香, 刘云花, 等. 小儿感染肺炎链球菌的分布特点及耐药性分析 [J]. 中国医师杂志, 2016, 18 (3): 439.
- [5] 苏楠, 韩星, 杨恽墨, 等. 中国内地儿童侵袭型肺炎链球菌感染血清型的分布特征 [J]. 中华医学杂志, 2016, 96 (18): 1465.
- [6] KIM SH, SONG JH, CHUNG DR, *et al.* Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of Streptococcus pneumoniae isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012 (56): 1418.
- [7] 王扬帆, 蔡坤, 黄转, 等. 儿童呼吸道肺炎链球菌感染的耐药性及危险因素分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27 (7): 1623.
- [8] IZE-IYAMU IN, OGBOGU P. Nickel chromium brackets and its effect on the oral micro-flora [J]. Afr J Med Med Sci, 2011, 40 (4): 367.
- [9] WANG JR, LI FQ, P RA, *et al.* Detection of serotype distribution and drug resistance of Streptococcus pneumoniae isolated from pediatric patients [J]. Lab Med, 2017, 48 (1): 39.
- [10] 黄阿环, 陈文标, 朱焱, 等. 泉州地区19F型肺炎链球菌耐药性分析及多位点序列分型研究中国 [J]. 病原生物学杂志, 2018, 13 (2): 135.
- [11] 宋彬容. 儿童医院肺炎157例痰液病原菌分布及耐药性分析 [J]. 安徽医药, 2019, 23 (7): 1477.
- [12] BAO YM, WANG Q, YAO KH, *et al.* The changing phenotypes and genotypes of invasive pneumococcal isolates from children in Shenzhen during 2013-2017 [J]. Vaccine, 2019, 37 (49): 7248.
- [13] 赖玉华. 儿童感染肺炎链球菌耐药性及其耐药基因分型 [J]. 社区医学杂志, 2016, 14 (24): 38.

(本文编辑 赵素容)