

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.09.016

社区肺炎链球菌感染药敏分析及分子生物学分型*

向 蓉, 黄雪珍, 莫和国, 徐 宁[△]

南方医科大学附属小榄医院检验科, 广东中山 528415

摘要:目的 调查该院肺炎链球菌药敏谱及耐药基因型, 为肺炎链球菌感染的预防与治疗提供参考。方法 收集该院 2014 年 1 月至 2016 年 12 月分离的肺炎链球菌共 184 株, 用 Vitek 2 鉴定菌株, 检测耐药模式, PCR 方法检测耐药基因 erm(B)、mef(A)。结果 肺炎链球菌对青霉素 G 的耐药率为 60.6%, 对红霉素、克林霉素的耐药率分别为 93.3%、100.0%。耐药表型为 MLSB 型的检出率为 93.5% (cMLSB: 89.7%, iMLSB: 3.8%), 未检出 M 耐药表型。耐药基因 erm(B) 的检出率为 91.3%, mef(A) 的检出率为 1.6%。结论 该院肺炎链球菌对红霉素与克林霉素的耐药率较高; 耐药表型以 erm(B) 编码的 cMLSB 耐药表型为主, 主要以靶位点的修饰为主, 也与泵外排机制有关。

关键词: 肺炎链球菌; 耐药基因; 药敏谱

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)09-1202-03

Antibiotic sensitivity spectrum and molecular epidemiology among
Streptococcus Pneumoniae from community hospital*XIANG Rong, HUANG Xuezheng, MO Heguo, XU Ning[△]Department of Clinical Laboratory, Xiaolan Hospital Affiliated to
Southern Medical University, Zhongshan, Guangdong 528415, China

Abstract: Objective To determine the antibiotic sensitivity spectrum and resistant phenotypes of Streptococcus Pneumoniae in Xiaolan Hospital Affiliated to Southern Medical University order to provide a reasonable guidance for prevention and treatment. **Methods** A total of 184 Streptococcus Pneumoniae strains were collected from January 2014 to December 2016. Vitek 2 was used to identify the isolates and the resistant phenotypes. PCR was used to detect the resistant genes erm(B) and mef(A) genes. **Results** Penicillin G resistance was found in 60.6% of Streptococcus Pneumoniae isolated. The resistant rates of erythromycin, clindamycin were 93.3%, 100.0% respectively. The detection rate of the phenotype MLSB was 93.5% (cMLSB: 89.7%, iMLSB: 3.8%). The phenotype M was not found. The detection rates of erm(B) gene and mef(A) gene were 91.3%, 1.6% respectively. **Conclusion** The resistant rates of Streptococcus Pneumoniae to erythromycin and clindamycin are still high. cMLSB mediated by erm(B) gene is the most predominant phenotype among macrolide-resistant Streptococcus Pneumoniae, and it is also mediated by efflux pumps.

Key words: Streptococcus Pneumoniae; resistant genes; resistant phenotypes

肺炎链球菌是革兰阳性菌、 α 溶血的兼性厌氧菌。可引起侵袭和非侵袭性疾病, 如社区获得性肺炎、中耳炎、脑膜炎和败血症等^[1]。在 20 世纪 80 年代以前, 青霉素是治疗肺炎链球菌感染的一线用药, 由于耐青霉素肺炎链球菌的产生, 到了 20 世纪 90 年代, 一线用药改为红霉素。然而, 随着抗菌药物的广泛使用, 大环内酯类耐药的菌株趋于流行。根据相关报道, 肺炎链球菌对 β 内酰胺类和大环内酯类药物的耐药率居高不下, 多重耐药菌约占 60%^[2-3]。为探讨肺炎链球菌的耐药表型、耐药机制, 本研究对 184 株肺炎链球菌临床分离株进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集、复苏本院 2014 年 1 月至 2016 年 12 月分离的 184 株肺炎链球菌菌株, 已经剔除重复菌株。菌株来源于痰液标本 120 株, 血液标本 31 株, 脓液标本 12 株, 分泌物标本 11 株, 其他标本 10 株。

1.2 菌株鉴定及耐药分析 所有菌株均经过 Vitek 2 鉴定, 用 GP68 卡做肺炎链球菌药敏分析。药敏结果判断参考美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 2016 年标准。检测的抗菌药物包括青霉素类 (青霉素 G、阿莫西林)、头孢菌素类 (头孢曲松)、氟喹诺酮类

* 基金项目: 广东省中山市科技计划项目 (2015B1077)。

作者简介: 向蓉, 女, 副主任技师, 主要从事细菌耐药监测及耐药机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: 67781904@qq.com。

(左氧氟沙星、莫西沙星)、糖肽类(万古霉素)、碳青霉烯类(厄他培南、美罗培南)、大环内酯类(红霉素)、氯霉素类(氯霉素)、恶唑烷酮类(利奈唑胺)、磺胺类(磺胺甲噁唑)、林可酰胺类(克林霉素)药物及四环素。质控菌株为肺炎链球菌 ATCC49619。用纸片扩散(K-B)法检测大环内酯类和林可酰胺类药物耐药菌株表型,所用药物为红霉素和克林霉素,由 OXOID(UK)公司提供。根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2016 判断标准:红霉素 K-B 法抑菌圈直径 > 20 mm 为敏感(S),16~20 mm 为中介(I),<16 mm 为耐药(R);克林霉素 K-B 法抑菌圈直径 > 18 mm 为 S,16~18 mm 为 I,<16 为 R。MLS_B 型(大环内酯类、林可酰胺类药物和链阳霉素 B 耐药)指对红霉素耐药,对克林霉素中介或耐药。M 型(大环内酯类药物耐药)指仅对红霉素耐药,对克林霉素敏感。

1.3 耐药基因检测 PCR 方法检测耐药基因 erm(B)、mef(A)。试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司合成,具体检测方法见李静等^[4]的报道。基因引物见表 1。

表 1 大环内酯类抗菌药物耐药基因检测引物

基因	引物序列(5'~3')
erm(B)	F:5'-CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATT-3'
	R:5'-GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA-3'
mef(A)	F:5'-AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3'
	R:5'-TTC TTC TGG TAC TAA AAG TTG-3'

注:F 为上游引物;R 为下游引物。

1.4 统计学处理 微生物鉴定及药敏数据使用 WHONET5.6 软件导出,计数资料以例数或率进行

描述统计。

2 结果

2.1 肺炎链球菌的药敏情况 耐药表型为 MLS_B 型的菌株有 172 株(93.5%),未检测到耐药表型为 M 型的菌株,见表 2。

表 2 184 株肺炎链球菌对常见抗菌药物敏感性结果(%)

抗菌药物	R	I	S
青霉素 G	60.6	18.2	21.2
阿莫西林	32.6	8.7	58.7
头孢曲松	24.7	8.4	66.9
厄他培南	0.0	2.3	97.7
美罗培南	23.2	39.5	37.3
左氧氟沙星	0.5	0.0	99.5
莫西沙星	0.0	0.6	99.4
磺胺甲噁唑	78.7	0.5	20.8
红霉素	93.3	1.1	5.6
利奈唑胺	0.0	0.0	100.0
万古霉素	0.0	0.0	100.0
氯霉素	4.4	0.0	95.6
四环素	87.4	5.5	7.1
克林霉素	100.0	0.0	0.0

2.2 肺炎链球菌的耐药基因检测 PCR 分析结果显示 168 株(91.3%)只含有 erm(B)基因,3 株(1.6%)只含有 mef(A)基因,1 株(0.5%)既含有 erm(B)又含有 mef(A)基因。所有耐药表型为 MLS_B 型的菌株均含有 erm(B)基因,见表 3。耐大环内酯类肺炎链球菌中,有 89 株(51.7%)对青霉素 G 耐药,有 23 株(13.4%)对青霉素 G 敏感。

表 3 184 株肺炎链球菌的耐药基因型

耐药表型	菌株总数 (n)	目标菌株占总菌株数的 百分比(%)	耐药菌株(n)		检测出耐药基因的菌株(n)		
			红霉素	克林霉素	erm(B)	mef(A)	erm(B)+mef(A)
cMLS _B	165	89.7	165	165	161	3	1
iMLS _B	7	3.8	7	0	7	0	0
M	0	0.0	0	0	0	0	0

注:cMLS_B 为固有耐药;iMLS_B 为诱导耐药。

3 讨论

细菌耐药是指细菌对药物的敏感性下降或者药物对细菌无作用,此时往往需要联合多种药物进行治疗。随着药物的联合应用,多重耐药菌也随之增多。本地区肺炎链球菌对红霉素耐药率为 93.3%,对克林霉素耐药率为 100.0%,高于文献^[5]报道的 74.9% 和 71.7%。对四环素耐药率为 87.4%,略微高于林倍州等^[6]报道的广东地区的 78.9%。四环素耐药基因与 erm 基因可能存在于同一转座子,因此,肺炎链球菌产生红霉素耐药性的同时可能产生四环素耐药性^[7]。本研究结果显示,肺炎链球菌对万古霉素、利

奈唑胺的敏感率为 100.0%,对左氧氟沙星与氯霉素的敏感率也在 95.00%以上。本研究结果显示,本地区大环内酯类药物对肺炎链球菌感染的治疗几乎无效。根据肺炎链球菌对红霉素与克林霉素的耐药性可分为不同的耐药表型^[8],即 MLS_B 型与 M 型。MLS_B 型又可分为 cMLS_B 型(固有耐药,即对红霉素与克林霉素均耐药)和 iMLS_B 型(可诱导耐药,即对红霉素耐药,对克林霉素抑菌圈减小,出现 D 环现象)。MLS_B 型是由 erm(B)和(或)mef(A)基因引起。M 型仅对红霉素耐药,对克林霉素敏感,只是由 mef(A)基因引起。本研究中耐药表型为 MLS_B 型的

菌株有 172 株,其中 cMLSB 型有 165 株,iMLSB 型有 7 株,耐药表型为 M 型菌株有 0 株。

肺炎链球菌对大环内酯类耐药的主要耐药机制包括:核糖体作用位点的改变,主动外排机制增强,编码核糖体蛋白 L4、L22 和(或)rRNA235 的基因变异等^[9]。由 erm(B)编码 rRNA235 的甲基化,导致出现 MLSB 表型。根据甲基化基因的上游调节序列的不同^[10],MLSB 表型可分为 cMLSB 型和 iMLSB 型。MLSB 型对大环内酯类药物高水平耐药(MIC \geq 64 mg/L)。大环内酯类药物泵外排基因 mef 于 1996 年被发现,主要包括 mef(A)(最早发现于化脓链球菌)和 mef(E)(最早发现于肺炎链球菌)。mef(A)和 mef(E)在肺炎链球菌中非常常见。研究表明 mef(A)外排泵的特异性底物是十四元环和十五元环大环内酯类药物,mef 调节的大环内酯类药物耐药表型是 M 型^[11]。M 型通常对大环内酯类药物低水平耐药(MIC 为 1~32 mg/L)。

本研究中 erm(B)基因检出率为 91.3%,说明由 erm(B)编码的 cMLSB 耐药表型是中山地区的主要表型。mef(A)基因的检出率为 1.6%,但未能检测出 M 表型,这是因为由 mef(A)介导的低水平耐药被由 erm(B)介导的高水平耐药掩盖所致^[12]。

有报道称,mef(A)和 erm(B)基因的流行有明显的地域差异,也可随时间、年龄不同而变化^[13]。本研究结果与成都^[14]、温州^[15]等地区的报道不同,也可能是样本量太小或者入选人群不同而产生的偏倚所致。进一步研究应当加大样本量,增加入选人群,并动态监测耐药率与耐药基因的变化以更好地了解肺炎链球菌在本地区的流行情况。

综上所述,本地区肺炎链球菌对红霉素与克林霉素的耐药率较高;耐药表型以 erm(B)编码的 cMLSB 耐药表型为主,主要以靶位点的修饰为主,也与泵外排机制有关,耐药基因有地域差异。由于各地区医疗环境、抗菌药物使用习惯等的不同,导致肺炎链球菌对红霉素与克林霉素的耐药基因型和耐药表型检出率有地域差异,因此需要积累数据,动态监测当地耐药菌株流行情况,协助临床合理使用抗菌药物,控制耐药率。

参考文献

[1] WIERZBOWSKI A K, KARLOWSKY J A, ADAM H J, et al. Evolution and molecular characterization of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada between 1998 and 2008[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(1): 59-66.

[2] KIM S H, SONG J H, CHUNG D R, 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(3): 1418-1426.

[3] KANG C, SONG J H. Antimicrobial resistance in Asia: current epidemiology and clinical implications[J]. *Infect Chemother*, 2013, 45(1): 22-31.

[4] 李静, 马丽娟, 史伟, 等. 住院患儿肺炎链球菌血清型及耐药性分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(9): 622-626.

[5] LEE S, BAE S, LEE K J, et al. Changes in serotype prevalence and antimicrobial resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Korea, 1996-2008[J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt8): 1204-1210.

[6] 林倍州, 肖书念, 卓超. 广东 2012 年临床常见细菌耐药性监测分析[J]. *中国抗菌药物杂志*, 2014, 39(5): 321-326.

[7] 张育娟, 黄日妹, 张炜灵. 浅析 B 族链球菌的耐药性及红霉素与四环素耐药基因检测[J]. *海峡药学*, 2015, 27(9): 152-153.

[8] KORONA-GLOWNIAK I, SIWIEC R, MALM A. Resistance determinants and their association with different transposons in the Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 1-6.

[9] GUITOR A K, WRIGHT G D. Antimicrobial resistance and respiratory infections[J]. *Chest*, 2018, 154(5): 1202-1212.

[10] MARZOUK M, FERJANI A, AMAMOU S, et al. Phenotype, genotype, and serotype distribution of macrolide resistant invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* strains, in Sousse, Tunisia[J]. *Med Mal Infect*, 2014, 44(10): 478-482.

[11] IANNELLI F, SANTORO F, SANTAGATI M A, et al. Type M resistance to macrolides is due to a Two-Gene efflux transport system of the ATP-Binding cassette (ABC) superfamily[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1670.

[12] SAFARI D, KUO L C, HUANG Y T, et al. Increase in the rate of azithromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates carrying the erm(B) and mef(A) genes in Taiwan, 2006-2010[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 704.

[13] SCHROEDER M R, STEPHENS D S. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 98.

[14] 卢添林, 曹韵, 周玲旭, 等. 73 株婴幼儿呼吸道肺炎链球菌分离株耐药性研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2015, 46(3): 417-421.

[15] HU D K, SUN Z, LUO X H, et al. Drug resistance characteristics and Macrolide-Resistant mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* in Wenzhou city, China[J]. *Med Sci Monitor*, 2016, 22: 2731-2735.