

重庆地区肺炎链球菌耐药性和分子流行病学调查

姚成 余泽波 肖永红

【摘要】 目的 调查重庆地区肺炎链球菌在社区获得性感染患者中的分离率及对抗生素的敏感性。方法 采集社区获得性感染患者的痰、鼻咽拭子标本,培养、分离和鉴定肺炎链球菌。琼脂二倍稀释法测定肺炎链球菌对 11 种抗生素的耐药性。通过聚合酶链反应(PCR)扩增肺炎链球菌 BOX 重复元件对其进行分子流行病学分型。结果 680 份临床标本中,分离出 39 株肺炎链球菌,阳性率为 5.7%。34 株(有 5 株在保存过程中死亡)肺炎链球菌中有 2 株对青霉素低度耐药(MIC 为 0.125 mg/L),1 株青霉素敏感株对左氧氟沙星耐药(MIC 为 8 mg/L)。肺炎链球菌对大环内酯类抗生素和克林霉素表现出较高的耐药率,且均为高度耐药(MIC \geq 64 mg/L),对所测其他 β -内酰胺类和万古霉素均呈敏感。盒式 PCR 显示了较高的分辨率,能快速、可靠地检测菌株间的亲缘关系。35 株肺炎链球菌共分为 25 个型,29 个亚型,最多见的为 A 型图谱(3 株),2 株青霉素低度耐药株分属不同的型。结论 重庆地区分离的临床肺炎链球菌对青霉素耐药率较低,但对大环内酯类抗生素和克林霉素耐药却非常普遍。盒式 PCR 能快速、可靠地对肺炎链球菌进行分子流行病学分型,重庆地区耐药克隆没有明显的优势株。

【关键词】 肺炎链球菌;耐药性;流行病学;分子

Study on drug resistance and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Chongqing
YAO Cheng*, YU Ze-bo, XIAO Yong-hong. *Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China
Corresponding author: YAO Cheng, Email: yaocheng1228@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the prevalence and drug resistance of *Streptococcus* (*S.*) *pneumoniae* in patients infected in communities and molecular epidemiology with BOX-polymerase chain reaction(PCR) in Chongqing areas. **Methods** A total of 680 clinical specimens from sputum and throat/nasal swabs were collected from patients seen from September 2000 to March 2001. Antibiotic susceptibility was determined by agar dilution test. BOX-PCR was used for molecular typing of *S. pneumoniae*. **Results** A total of 39 isolates of *S. pneumoniae* were collected with the isolation rate of 5.7%. Of the 34 *S. pneumoniae* strains, two showed low-level resistance to penicillin (MIC 0.125 mg/L), one to levofloxacin, but many to macrolide and clindamycin (nearly 70%). All the strains were susceptible to β -lactams and vancomycin. BOX-PCR typing demonstrated a high discriminatory potential and easy to be accurately analysed. 35 *S. pneumoniae* strains(include ATCC49619) were divided into 25 distinct types, representing 29 subtypes with A ($n=3$) as the predominant type. 2 penicillin-resistant strains were shown to be different types. **Conclusion** Penicillin resistant rate of *S. pneumoniae* was low in Chongqing, but macrolide and clindamycin resistant strains were common while BOX-PCR typing was a suitable technique to type *S. pneumoniae*. No dominant antibiotic resistant strains were found in Chongqing.

【Key words】 *Streptococcus pneumoniae*; Antibiotic resistance; Molecular, epidemiology

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)是社区获得性感染的主要致病菌,长期以来对青霉素高度敏感,自 1967 年澳大利亚首次报道耐青霉素

SP 以来,世界各地相继发现了单一和多重耐药性 SP,20 世纪 80 年代后,耐药 SP 在世界范围内广泛流行且耐药率逐年增高,尤其是对青霉素高度耐药株和耐第三代头孢菌素的菌株相继在许多国家出现。为此,我们于 2000 年 9 月至 2001 年 3 月对分离自重庆地区的 SP 进行了分子流行病学研究。

作者单位:400016 重庆医科大学附属第一医院感染科(姚成、余泽波);北京大学临床药理研究所(肖永红)

第一作者现工作单位:400041 重庆前沿生物技术公司,Email: yaocheng1228@yahoo.com.cn

材料与方 法

1. 材料:

(1)标本采集:2000 年 9 月至 2001 年 3 月采集重庆医科大学附属第一医院门诊及住院呼吸道感染患者痰、鼻咽拭子标本 680 份。SP ATCC49619 购自中国抗生素微生物菌种保藏中心。

(2)培养基:分离用 MH 琼脂(法国 bioMérieux 公司产品)加 5% 脱纤维兔血;药敏试验用 MH 琼脂加 5% 脱纤维羊血;染色体提取用 TH + Y 培养基;菌种保存用 40% 甘油加营养肉汤, -70℃ 保存。

(3)Optochin 纸片和抗生素:Optochin 纸片为法国 bioMérieux 公司产品;青霉素 G(批号 0413-200031)、头孢呋辛(批号 0368-9607)、头孢噻肟钠(批号 0483-9801)、红霉素(批号 1307-9713)、阿奇霉素(批号 0322-200001)、克林霉素(批号 0422-9502)、左氧氟沙星(批号 0492-200003)、万古霉素(批号 0437-9812),均为中国药品生物制品检定所产品;克拉霉素(批号 951211)和美欧卡霉素(批号 961101)为西安京西制药厂产品;阿莫西林/克拉维酸(批号 20000822)为珠海联邦制药有限公司产品。

(4) BOX-聚合酶链反应(PCR):引物 5' ATACTCTTCGAAAATCTCTTCAAAC 3' 由上海生工生物工程有限公司合成。

2. 方法:

(1)SP 的分离与鉴定:用无菌棉拭子采集患者鼻、咽部分泌物标本,无菌玻璃瓶收集患者痰液标本立即接种于 MH 血平板,35℃ 3%~5% CO₂ 条件下过夜孵育,根据菌落形态、革兰染色、菊糖发酵试验、Optochin 试验、胆汁溶解试验进行鉴定。

(2)最低抑菌浓度(MIC)测定:MIC 测定用美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的琼脂二倍稀释法^[1]。取血平板上过夜培养菌落制成 0.5 麦氏标准浊度单位细菌悬液,用 MH 肉汤按 1:10 比例稀释至菌悬液至 10⁷ CFU/ml。用多点接种仪(日本 Sakuma 株式会社)在抗生素平板上接种菌液,每点接种菌液量为 1~2 μl,约 10⁴ CFU/ml。35℃ 3%~5% CO₂ 条件下孵育 18~24 h 后观察结果。用质控株 SP ATCC49619 作全程质量控制,按 2000 年版 NCCLS 标准判断结果^[1]。

(3)分子生物学分型:将 SP 在 5% 兔血平板上培养 18 h 后转入 TH + Y 培养基继续培养 6 h(35℃ 3%~5% CO₂ 条件)。收集培养物,用十六烷基三甲

基溴化铵(CTAB)法提取基因组 DNA。每 50 μl BOX-PCR 反应体系含:5.0 μl buffer、4.0 mmol/L MgCl₂、200 μmol/L dNTP、100 pmol/L BOX-引物、1 U Taq 酶、20 ng DNA 模板。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 4 min,然后 94℃ 变性 1 min、60℃ 退火 2 min、74℃ 延伸 2 min,共 40 个循环,最后 74℃ 再延伸 5 min^[2,4]。制备 1.5% 琼脂糖凝胶,每孔加入 PCR 产物 7 μl,在 0.5×TBE 电泳缓冲液中 100 V 电泳 2 h,溴化乙锭染色成像。

结 果

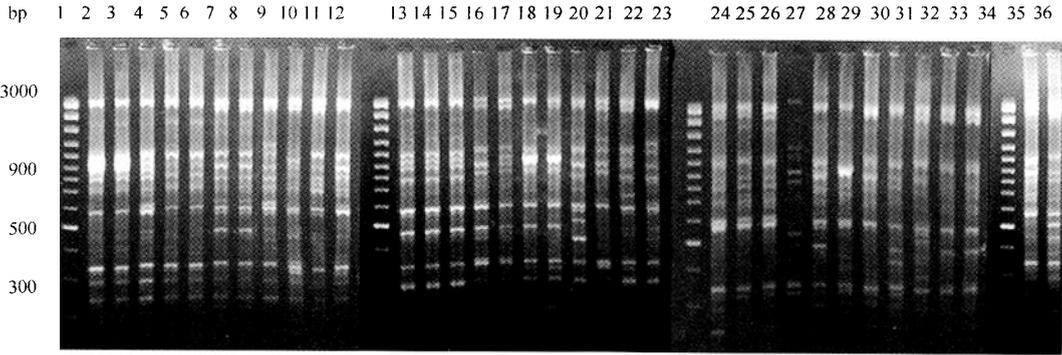
1.呼吸道感染患者 SP 分离率:从 680 份标本中分离获得 SP 39 株,阳性率 5.7%。

2.SP 对常用抗生素的耐药性:34 株(有 5 株在保存过程中死亡)临床分离的 SP 对 11 种抗生素的耐药性测定结果见表 1。其中 2 株为青霉素低度耐药株,MIC 为 0.125 mg/L,1 株青霉素敏感株对左氧氟沙星耐药,MIC 为 8 mg/L。SP 对大环内酯类和克林霉素表现出较高的耐药率,且均为高度耐药,MIC ≥ 64 mg/L,对所测其他 β-内酰胺类和万古霉素均呈敏感。

表 1 34 株 SP 临床分离株对抗生素的耐药性

抗菌药物	MIC(mg/L)			耐药率 (%)
	范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
青霉素	0.008~0.125	0.03	0.06	5.9
阿莫西林/克拉维酸	<0.03~0.06	<0.03	<0.03	0.0
头孢呋辛	<0.03~0.25	<0.03	0.125	0.0
头孢噻肟	<0.03~0.125	<0.03	0.06	0.0
红霉素	<0.03~>128	>128	>128	67.6
克拉霉素	<0.03~>128	>128	>128	67.6
阿奇霉素	0.125~>128	>128	>128	67.6
美欧卡霉素	0.25~>128	>128	>128	67.6
克林霉素	0.125~>128	>128	>128	67.6
左氧氟沙星	0.5~8.0	1.000	2.000	2.9
万古霉素	0.125~0.25	0.125	0.250	0.0

3.SP 分子流行病学分型特征:34 株临床分离 SP BOX 图谱分布很不均一(图 1),我们将相差 2 个条带以上的依次命名为 A、B、C、D 等型,仅相差一个条带或条带数量相同而信号强弱有差异的为同一型的不同亚型^[2,3]。由此,连同 ATCC49619 在内的 35 株 SP 共分为 25 个型(29 个亚型):最多的 A 型图谱有 3 株细菌,3 株 B 型图谱包括 2 个亚型,C 型图谱 3 株细菌分属不同的亚型,D、E、F 型图谱各有 2 株细菌,G 型图谱 2 株细菌为不同的亚型,其余 18 株 SP 分属不同的型,未发现与标准菌株



1: Marker, 2,3:D 型, 5,6:B1 型, 7,8:E 型, 12:B2 型, 13~15:A 型, 16:G1 型, 17:G2 型, 24:C1 型, 25:C2 型, 26:C3 型, 33,34:F 型, 其余泳道分别为不同的型

图1 SP BOX-PCR 图谱

ATCC49619 同型的菌株。A 型和 B 型图谱各 3 株细菌表现出一致的对青霉素敏感和大环内酯高度耐药,且在相近的时间分离到,应视为大环内酯高度耐药流行克隆。2 株青霉素低度耐药株具有不同的 BOX 图谱,不同于文献报道的波兰和荷兰克隆^[2,4]。

讨 论

20 世纪 80 年代后,耐药 SP 在世界范围内广泛流行,给 SP 感染的治疗造成极大困难^[5,6],本研究标本采集自门诊和住院上、下呼吸道感染患者,门诊来源占 70%,且咽拭子标本占 75%,SP 平均分离率为 6% 左右。对患者的询问调查中了解到,约 70% 出现发热或呼吸道症状的患者在就诊前往往已服用某种抗菌药物,致使我们的分离阳性率偏低。34 株 SP 药物敏感试验结果显示,青霉素低度耐药率为 5.9%,无高度耐药株,明显低于欧美国家的耐药率^[5,7],而我国周边国家和地区均为高耐药区,如韩国、日本、中国香港^[6];目前国内北京市、上海市、广东地区临床分离 SP 对青霉素耐药率达 10%~20%^[8,9],高于我们的研究结果。对大环内酯类抗生素(如红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、美欧卡霉素)和克林霉素耐药率高达 67.6%,高于欧美国家,而韩国、日本分别为 80.8% 和 75.6%,与北京、上海市的报道相似。34 株 SP 对阿莫西林/克拉维酸、头孢呋辛、头孢噻肟、万古霉素均敏感,仅 1 株对左氧氟沙星耐药。

研究表明,SP 对青霉素敏感性与多种因素有关,如标本的来源、患者年龄、抗生素的使用情况、SP 感染的流行情况等。本组 SP 多数来自未经筛选的门诊呼吸道感染患者,且多为咽拭子标本,故青霉

素耐药率低于北京、上海市的报道。此外,由于时间所限,样本偏少是本研究的一个缺陷。尽管目前我国 SP 青霉素耐药率较周边国家显著为低,但近年来有迅速上升的趋势,且北京、上海市均分离出对第三代头孢菌素耐药株,因此,在全国范围内开展对 SP 耐药性监测,为抗生素的合理使用提供依据显得尤为重要和紧迫。

我们选择 BOX-PCR 方法对 SP 整个染色体进行分析。SP 基因组中散布着高度保守的重复的 DNA 序列,称为 BOX 元件 (BOX elements)^[10,11]。此元件包含 3 个亚基 boxA、boxB、boxC 的各种组合。尽管 BOX 元件的确切功能尚不清楚,但证实只有 SP 含有高拷贝的完整 BOX 元件,故利用 BOX 元件区域附近的 DNA 序列的多态性,使用重复的 BOX-A 序列为引物,可以扩增 BOX 元件及其邻近的 DNA 序列,产生大小不同、数量不等的 DNA 扩增产物,从而得到 BOX-PCR 图谱^[10]。

Overweg 等^[2]和 van Belkum 等^[4]在不同种属细菌和不同反应条件下进行了 BOX-PCR 试验,证实 BOX-PCR 技术对 SP 分辨率高,能够快速、可靠地检测菌株之间的亲缘关系。本研究得到的 BOX-PCR 图谱条带清晰,且条带数量多于国外同类报道^[2,4],分辨率高,重复性好,能够可靠地检测菌株间的亲缘关系。A 型和 B 型图谱各 3 株细菌表现出一致的对青霉素敏感和大环内酯类高度耐药,且在相近的时间分离到,应视为大环内酯高度耐药流行克隆。仅有的 2 株青霉素低度耐药株不同于波兰和荷兰报道的克隆株^[2,4],说明可能是独立进化的结果,这与重庆地区较低的青霉素耐药率相符合。但韩国青霉素高度耐药率是有于 23F 西班牙耐药克

隆的传播,随着国际交流的频繁,耐药克隆的传播是非常迅速的。因此,应当加强我国不同地区 SP 耐药性监测,应用分子生物学技术调查耐药克隆的起源,从而有效地控制爆发。

参 考 文 献

1 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approval standards. NCCLS, Wayne PA, 2000.

2 Overweg K, Hermans PWM, Trzcinski K, et al. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: identification on emerging clones. J Clin Microbiol, 1999, 37: 1739-1745.

3 王辉, 陈民钧, Huebener R, et al. 北京地区肺炎链球菌的耐药性及其分子流行病学调查. 中华医学杂志, 1999, 79: 253-255.

4 van Belkum A, Sluijter M, de Groot R, et al. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. J Clin Microbiol, 1996, 34: 1176-1179.

5 Felmingham D, Grüneberg RN. The alexander project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract

infections. J Antimicrob Chemother, 2000, 45: 191-203.

6 Song JH, Lee NY, Ichijama S, et al. Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP) study. Clin Infect Dis, 1999, 28: 1206-1211.

7 Thornsberry C, Jones ME, Hickey ML, et al. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, haemophilus influenzae and moraxella catarrhalis isolated in the United States, 1997-1998. J Antimicrob Chemother, 1999, 44: 749-759.

8 李家泰, 张焯, 吕媛, 等. 肺炎链球菌对青霉素耐药率的调查. 中华医学杂志, 1999, 79: 38-40.

9 汪复, 朱德妹, 吴卫红, 等. 呼吸道感染患者及健康儿童中耐青霉素肺炎链球菌的调查. 中华医学杂志, 2000, 80: 749-752.

10 Hermans PWM, Sluijter M, Hoogenboezem T, et al. Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. J Clin Microbiol, 1995, 33: 1606-1612.

11 Marein B, Humbert O, Camara M, et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Research, 1992, 20: 3479-3483.

(收稿日期: 2004-07-19)
(本文编辑: 尹廉)

· 疾病控制 ·

血液附红细胞体检查方法的探讨

杨学祥 张成友 张新德 郭冬黎 肖富浩 张世杰 金芳

附红细胞体(附红体)在普通显微镜下涂片染色检查有时很难辨认,所以各地检测结果差异较大^[1-3],为此我们对检测方法进行改进。用 EDTA-K₂ 真空管采集青海省格尔木市第二十二医院(海拔 2800 m)患者和健康查体者的血液标本 825 份、甘肃省敦煌市(海拔 800 m)入伍战士血液标本 315 份,上述人员分别来自于西安、兰州、西宁、贵州、吉林、江苏和格尔木等地。白细胞内附红体的检查方法与结果判断见文献[4]。红细胞附红体的观察,取 EDTA-K₂ 抗凝血 1 份用生理盐水 50 倍稀释后制作压片,10 min 后油镜下计数感染红细胞,以百分率报告。血浆内附红体的检查方法与结果判断见文献[5]。实验中我们对文献中的方法进行了改进,把原来的涂片染色检查不活动的附红体改为血浆与鲜血压片观察活动的附红体,排除了染色过程及染色沉淀等造成的假阴性或假阳性的干扰,增加放大倍数(×1000)使附红体的识别、辨认更加准确,提高了检出率,并建立了观察白细胞内感染附红体的方法,观察发现上述 1140 份血样的白细胞内都能找到运动活泼的附红体,红细胞表面以及血浆内均观察到不同程度的附红体感染,这说明我们目前调查的不同区域人群中附红体感染率为 100%,只是感染密度不同而已。对于白细胞压片的检查,制片时取白细胞层一定要注意尽可能不要吸取太多的红细胞,否则易造成视野不清晰,检查时要不

断调节显微镜的细螺旋观察不同液层中的白细胞,以便准确计数。在观察红细胞压片时发现,在同一压片的不同部位计数结果差异较大,不管怎样充分混匀血液和改变制片手法,在压片的四周感染附红体的红细胞密度大,压片中间则感染细胞较少,这是造成文献中计数误差的主要原因之一,说明用感染红细胞作为流行病学调查有一定的缺陷。血浆压片的观察,经煌焦油蓝染色后,红细胞被染成淡蓝色,而游离的附红体不着色,所以在浅蓝色背景下观察活动的附红体比较容易识别,通过大量的观察发现,还没有出现现象红细胞压片存在分布不均的问题。所以,我们推荐用血浆压片法观察附红体感染作为流病调查的方法,而白细胞与红细胞压片检查适用于附红体病的诊断及预后观察。

参 考 文 献

1 尚德秋, 李兰玉, 陆宙光, 等. 附红细胞体感染人畜的流行病学调查(Ⅲ). 中华流行病学杂志, 1997, 18: 150-152.

2 邵秀珍, 杨殿相, 秦林金, 等. 内蒙古地区人群附红细胞体感染的调查与分析. 中国人畜共患病杂志, 1998, 14: 90.

3 陶小润, 王显军, 孙桐, 等. 山东省附红细胞体病的流行病学调查. 中华流行病学杂志, 2001, 22: 359-361.

4 张成友, 张新德, 胡湘林, 等. 不同海拔随机病人微生物感染白细胞的实验研究. 中华医学研究杂志, 2005, 5: 104-106.

5 郭冬黎, 张成友, 杨学祥, 等. 高原地区人群感染附红细胞体的调查分析. 中华医学实践杂志, 2005, 4: 117-118.

(收稿日期: 2005-02-01)
(本文编辑: 张林东)