

苏州地区肺炎链球菌 TEM 基因分子流行病学研究

丁云芳 张建华 糜祖煌 秦玲 陶云珍 元晓

【摘要】 目的 探讨肺炎链球菌(Sp)是否存在 TEM 基因及其流行状况。**方法** 对 2002 年 9 月至 2003 年 4 月苏州大学附属儿童医院就诊呼吸道感染患儿痰标本中分离到的 23 株 Sp 进行 β-内酰胺酶 TEM 全长基因聚合酶链反应检测及扩增产物序列与美国 GenBank 已登录的 TEM 基因序列比较分析。**结果** 23 株 Sp 中 21 株检出 TEM 基因(阳性率 91.3%)。有 1 株(株号 SR017,青霉素耐药)TEM 基因序列与已登录的均不相同,存在编码子第 182 位 ATG [M] →ATA [I] 有义突变,为 TEM 基因家族新成员,并成功以 TEM-129 型登录 GenBank(登录号:AY452662);其余 20 株 TEM 基因均为 TEM-1 亚型,1 号株(株号 SR001)TEM-1 型序列也以首次发现于 Sp 登录 GenBank(登录号:AY392531)。**结论** 从 Sp 中检出 β-内酰胺酶 TEM 基因,其携带率达 91.3%,其基因型有 TEM-129 和 TEM-1 型。这一发现丰富了对 Sp 青霉素耐药的认识。

【关键词】 链球菌,肺炎; TEM 基因; β-内酰胺酶

Study on the molecular epidemiology of β-lactamase TEM gene in isolated *Streptococcus pneumoniae*
 DING Yun-fang*, ZHANG Jian-hua, MI Zu-huang, QIN Ling, TAO Yun-zhen, QI Xiao.
 *Affiliated Children's Hospital of Suzhou University, Suzhou 215003, China

【Abstract】 Objective To investigate the β-lactamase TEM gene of isolated *Streptococcus pneumoniae*(Sp) in Suzhou area. **Methods** Twenty-three strains of Sp were collected from respiratory tract secretions of children with respiratory diseases in Nov 2002 to Apr 2003 at Children's Hospital of Suzhou University (reference strain ATCC49619) to build TEM polymerase chain reaction(PCR) system (reference strain *E. coli*. 9-j53R1 with TEM gene) TEM gene of 23 strains was detected to compare the sequences with published TEM gene sequences in GenBank for analyzing TEM gene model. **Results** Twenty-one strains had TEM gene with a positive rate of 91.3% (21/23). TEM-129 gene were confirmed from No. 17 (SR017, penicillin resistance) TEM sequence. New discovered TEM-129 sequence had a modification (ATG[M]→ATA [I]) at No. 182 code and published (GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide, AY452662). TEM-1 genes were confirmed from other TEM sequences. New discovered TEM-1 gene of isolated Sp had been published (GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide, AY392531) too. **Conclusion** Isolated Sp had TEM gene(TEM-129,EM-1 genotype) with a positive rate of 91.3%. The result enriched the understanding of isolated Sp with penicillin resistance.

【Key words】 *Streptococcus pneumoniae*; TEM gene; β-lactamase

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, Sp) 仍是社区获得性肺炎的常见病原菌。近年我国多中心研究发现,耐青霉素的 Sp (penicillin resistant, PRSP) 呈逐年上升趋势^[1,2]。Sp 青霉素耐药机制国内外学者均侧重于其青霉素结合蛋白突变的关系研究^[3-6], 尚无 Sp 是否因产 β-内酰胺酶而耐青霉素的报道。基于葡萄球菌、淋病奈瑟菌等球菌存在 TEM 型 β-内酰胺酶基因的遗传学背景^[7,8], 为探讨 Sp 是否存

在 TEM 基因及其流行状况,我们对分离到的 23 株 Sp 进行了 β-内酰胺酶 TEM 全长基因聚合酶链反应 (PCR) 检测与产物序列分析,结果报道如下。

材料与方法

1. Sp 分离鉴定药敏试验: 23 株 Sp 均为 2002 年 9 月至 2003 年 4 月分离自苏州大学附属儿童医院临床呼吸道感染患儿的 482 份痰标本。标本采集 1 h 内即接种于 MH + 酵母粉 + 绵羊红细胞平板,置 CO₂ 培养箱内,分离鉴定 Sp 菌株。标准菌株 ATCC49619 由上海华山医院抗生素研究所惠赠。

作者单位: 215003 苏州大学附属儿童医院(丁云芳、张建华、陶云珍); 无锡市克隆遗传技术研究所(糜祖煌、秦玲); 复旦大学公共卫生学院(元晓)

菌株经 du Plessis 等^[9]报道的 Sp 种特异 PCR 检测确认。用 E-test 法检测本组 Sp 的青霉素、二代、三代头孢药敏。结果 23 株 Sp 中青霉素:敏感(S)7 株 (MIC≤0.094 ng/ml), 低度耐药 6 株 (MIC 1.0~1.5 ng/ml), 无高度耐药 (MIC≥2 ng/ml), 不敏感率 69.6% [中介(I)+耐药(R), MIC>0.12 ng/ml]; 头孢呋辛 10 株 S、5 株 I、8 株 R、不敏感率 56.5%; 头孢曲松 19 株 S、4 株 I、无 R 株; 头孢噻肟 19 株 S、4 株 I、无 R 株。K-B 法苯唑青霉素 8 株 S、15 株 R、不敏感率 65.2%。

2. 菌株 DNA 检测模板制备: 挑取单个菌落置入内含 50 μl 裂解液 (0.5% 非离子去污剂 NP40 配制浓度为 200 ng/ml 蛋白酶 K 溶液) 的 0.5 ml 离心管中。置 55℃ 水浴消化 1 h, 改置 95℃ 水浴灭活 10 min。离心 15 000 r/min, 5 min。上清液即为模板液。

3. β-内酰胺酶 TEM 全长基因 PCR 与产物测序: 参照文献 [10] 进行。先用引物 TEM P₁-、TEM P₂ 作 TEM 全长基因扩增, 产物经纯水稀释后再分别以引物 TEM P₁-、TEM P₄ 和 TEM P₃-TEM P₂ 作 TEM 基因上、下游半套叠式扩增, 并以引物 TEM P₁-、TEM P₂-、对上、下游扩增产物作正、反向测序。测序在美国 ABI 公司 377 型测序仪上进行。测得正、反向序列由该仪软件拼接出 TEM 全长基因序列。引物序列见表 1。内含 TEM-1 基因的大肠埃希菌 (*E. coli*-j53R1) 由上海瑞金医院提供, 作为 TEM 基因 PCR 扩增的阳性对照。

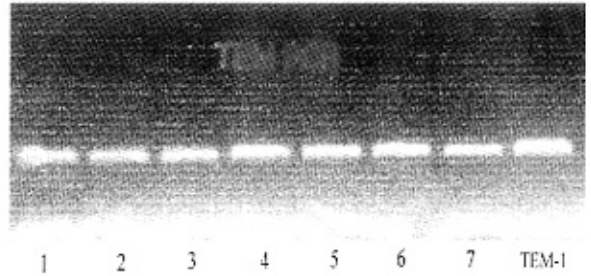
表1 TEM 引物序列

引物	序列 5'→3'	5' 首位位置
P ₁	5'-ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA-3'	-5
P ₂	5'-GAC AGT TAC CCA TGC TTA ATC A-3'	1074
P ₃	5'-AGG AAG AGT ATG AGT ATT CAA CA-3'	199
P ₄	5'-CTC GTC GTT TGG TAT GGC-3'	733

结 果

1. Sp 检测结果: 23 株 Sp 菌株中 21 株检出 TEM 基因 (阳性率 91.3%)。经 TEM 全长基因测序, 并与美国 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide) 已登录的 TEM 基因序列比较, 有 1 株 (SR017, 青霉素耐药) TEM 基因序列与已登录的均不相同, 存在编码子第 182 位 ATG [M]→ATA [I] 有义突变, 为 TEM 基因家族新成员, 并成功以 TEM-129 型登录 GenBank (登录号: AY452662); 其余 20 株 TEM 基因均为 TEM-1 亚型, 1 号株 (株号 SR001) TEM-1 型序列也以首次发现于 Sp 登录

GenBank (登录号: AY392531)。图 1 为 TEM 基因 PCR 凝胶电泳图



1~7: SR001、SR002、SR003、SR004、SR005、SR006、SR007 菌株; TEM-1: 阳性对照的 *E. coli*-j53R1 菌株

图1 Sp 菌株 TEM 基因 PCR 凝胶电泳图

2. Sp TEM-129 全长基因序列:

```

1 atacgctat ttttataggt taatgctatg ataataatgg tttcttagac gtcagggtgc
61 acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctc atttgtttat ttttctaata acattcaaat
121 atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taatgcttc aataatattg aaaaaggaag
181 agtatgagta ttaacattt ccggtgcgcc ettattccct tttttcgggc attttgcctt
241 cctgtttttg ctcaccaga aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt
301 gcacgagttg gttacatcga gctggatctc aacagcggta agatccttga gattttcgc
361 cccgaagaac gttttccaat gatgagcaat titaagatgc tgctatgtgg cgcggtatta
421 tcccgtgttg acgcccggca agagcaactc ggtcgcgcga tacactattc tcagaatgac
481 ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa
541 ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacctgcggc ccaacttact tctgacaacg
601 atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaaccgcc
661 cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg
721 atgectgcag caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact acttactcta
781 gttcccggcc aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttcagg accactctcg
841 cgctcggccc ttccgctggt ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgttga
901 tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatgtaagc cctcccgatc cgtatgtatc
961 tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaataa gacagatcgc tgagataggt
1021 gcctcactga ttaagcattg gtaa
    
```

3. SpTEM-1 全长基因序列:

```

1 atacgctat ttttataggt taatgctatg ataataatgg tttcttagac gtcagggtgc
61 acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctc atttgtttat ttttctaata acattcaaat
121 atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taatgcttc aataatattg aaaaaggaag
181 agtatgagta ttaacattt ccggtgcgcc ettattccct tttttcgggc attttgcctt
241 cctgtttttg ctcaccaga aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt
301 gcacgagttg gttacatcga gctggatctc aacagcggta agatccttga gattttcgc
361 cccgaagaac gttttccaat gatgagcaat titaagatgc tgctatgtgg tgcggtatta
421 tcccgtgttg acgcccggca agagcaactc ggtcgcgcga tacactattc tcagaatgac
481 ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa
541 ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacctgcggc ccaacttact tctgacaacg
601 atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaaccgcc
661 cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg
721 atgectgcag caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact acttactcta
781 gttcccggcc aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttcagg accactctcg
841 cgctcggccc ttccgctggt ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgttga
901 tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatgtaagc cctcccgatc cgtatgtatc
961 tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaataa gacagatcgc tgagataggt
1021 gcctcactga ttaagcattg gtaa
    
```

讨 论

人们对 Sp 青霉素耐药机制研究多数关注于 Sp 之青霉素结合蛋白基因突变与耐药关系。国内外学者发现,当 pbp1a、pbp2b、pbp2x 3 种基因发生突变,导致其所编码的 PBP1A、PBP2B、PBP2X 3 种蛋白与青霉素结合亲和力下降,即表现为对青霉素及其他 β -内酰胺类抗生素耐药^[4]。但有些细菌(包括球菌和杆菌)可通过获得 TEM 等基因从而表达 β -内酰胺酶,后者可使青霉素水解而致耐药。如淋病奈瑟菌、葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌等。我们对 23 株分离自苏州地区的 Sp 进行了 TEM 基因检测发现 21 株呈阳性,阳性率 91.3%。其中 20 株为 TEM-1 型(首次发现 Sp 并登录 GenBank),另 1 株为 TEM-129 型(基因序列与已登录的均不相同,以 TEM 基因家族新成员 TEM-129 型登录 GenBank)。本研究证明 Sp 也可携带 TEM 基因,本地区 Sp 携带的 TEM 基因型有 TEM-1 和 TEM-129,提示应关注 Sp 可产 β -内酰胺酶现象。

TEM 耐药基因既可为质粒传播,又可为染色体传播。有意义的是,本组 Sp 携带的 TEM-1 基因与本院 ESBLs 大肠埃希菌分离株携带的 TEM-1 基因序列高度同源,同源性达 99.7%~99.8%。后者对一、二、三代头孢均耐药。本组 Sp 主要有青霉素类(青霉素和苯唑青)和二代头孢耐药,三代头孢不明显。ESBLs 菌往往表现多重耐药,本组 Sp 也存在多重耐药。

迄今尚无针对 Sp 产 β -内酰胺酶的标准试验报道。我们曾采用 Nitrocofin 试验方法检测本组 Sp,结果全阴性。该方法用于流感嗜血杆菌和淋病奈瑟菌检测 β -内酰胺酶的结果是准确的,但对于产生少量而与菌细胞紧密结合的 β -内酰胺酶检测结果不可靠。故 Nitrocofin 试验阴性尚不能说明 Sp 不产 β -内酰胺酶。我们仍在寻找合适的方法。因此,我们认为本研究的意义在于证明从 Sp 中检出了 β -内酰胺酶 TEM 基因,了解本地区流行的基因型,丰富了人们对 Sp 青霉素耐药的认识,关键是提出问题以待进一步探讨。如球菌和杆菌的 TEM 基因表达有什

么不同? 菌株、菌种间 TEM 基因有传播? 又如本研究发现青霉素敏感株也携带 TEM 基因,目前既不能确认该 TEM 基因表达量不够或不完全表达,也不能确认该基因根本就是沉默。若是沉默,其机制何在? 该沉默机制对有 TEM 基因表达菌(包括所有该基因表达的菌种)及抗生素研发意义如何? 因此,我们认为现在断定 Sp 的 TEM 基因与青霉素耐药是否有关,还为时太早。

参 考 文 献

- 1 王辉,朱家馨,刘勇,等. 1999~2000 年中国 4 所医院肺炎链球菌、流感嗜血杆菌及卡他莫拉菌的耐药现状. 中国抗感染化疗杂志,2001,1:142-146.
- 2 杨永弘,陆权,邓力,等. 四地儿童肺炎链球菌、流感嗜血杆菌抗生素敏感性监测(2000~2001 年). 中华儿科杂志,2002,40:461-466.
- 3 杨帆,张婴元,Lesly M,等. 肺炎链球菌呼吸道感染分离株的耐药性. 中国抗感染化疗杂志,2001,1:13-16.
- 4 Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, et al. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate and -resistant pneumococci. Antimicrob Agents Chemother,2002,46:1273-1280.
- 5 du Plessis M, Bingen E, Klugman KP. Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of streptococcus pneumoniae with reduced susceptibility to amoxicillin. Antimicrob Agents Chemother,2002,46:2349-2357.
- 6 俞桑洁,胡翼云,高薇,等. 肺炎链球菌的耐药性和 pbp2b 基因扩增产物图谱的相关性. 中华微生物和免疫学杂志,2003,23:311-313.
- 7 巴特尔,段宝生,郭淑英,等. 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌药敏和耐药基因检测. 中华检验医学杂志,2003,26:389.
- 8 糜祖煌,秦玲. 无锡地区淋病奈瑟菌 TEM-1 基因分子流行病学研究. 中华流行病学杂志,2004,25:58-59.
- 9 du Plessis M, Smith AM, Klugman KP. Rapid detection of penicillin-resistant streptococcus pneumoniae in cerebrospinal fluid by a seminested-PCR strategy. J Clin Microbiol, 1998, 36: 453-457.
- 10 糜祖煌,秦玲,李崇高. 超广谱 β -内酰胺酶 TEM 和 SHV 型全长基因 PCR 直接测序. 中华微生物和免疫学杂志,2003,23:497.

(收稿日期:2004-01-30)

(本文编辑:尹廉)