

论著·临床研究

儿童呼吸道感染肺炎链球菌耐药性及 pbp2B 与 TEM 基因的研究

黄勇¹, 万根平¹, 周珍文¹, 邓秋连¹, 黄旭强², 邓力², 赵长安³

(广州市儿童医院 1. 检验科; 2. 呼吸科, 广东 广州 510120; 3. 广东省妇幼保健院儿科, 广东 广州 510010)

[摘要] 目的 了解广州地区儿童呼吸道感染肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)的耐药情况以及 SP 中青霉素耐药相关基因 TEM 与 pbp2B 的流行分布及突变情况。方法 采用 E-test 和 K-B 纸片法对 44 株 SP 分离株进行药敏试验; PCR 扩增 SP 中的 TEM 基因及 pbp2B, 并对 pbp2B 基因进行测序, 结果与 SP 青霉素敏感株 R6 进行序列比对分析。结果 ①44 株 SP 对青霉素的敏感率仅为 11.4%, 不敏感率高达 88.6%。对红霉素耐药率已达 100%, 对克林霉素、复方新诺明的耐药性也在 90% 以上。但对头孢曲松、阿莫西林、亚胺培南仍敏感, 耐药率分别为 0, 2.6% 和 3.9%。未发现对氧氟沙星、万古霉素耐药菌株。②44 株 SP 的 pbp2B 基因扩增序列与 R6 敏感株相比较, 5 株青霉素敏感株 99% 以上的核苷酸序列相同, 未发生氨基酸的替换。39 株青霉素不敏感株均发生核苷酸序列的改变, 核苷酸序列突变率为 13.2% ~ 23.1%, 约 6.5% ~ 10.9% 的氨基酸发生了替换。根据氨基酸在 Ser391-Thr492 片段之间的突变情况, 可将 39 株青霉素不敏感株分为四型, 其中 I 型突变 30 株, II 型突变 7 株, III 型和 IV 型各 1 株。44 株 SP 均未检出 TEM 型 β -内酰胺酶耐药基因。结论 广州地区儿童呼吸道感染 SP 多重耐药情况较严重, 青霉素、红霉素已不适宜作为 SP 感染的临床一线用药, 阿莫西林及第三代头孢菌素可作为 SP 感染的经验用药。pbp2B 基因突变是广州地区儿童 SP 对青霉素耐药的主要机制之一。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(8): 623-626]

[关键词] 肺炎链球菌; 耐药性; 耐药基因; 儿童

[中图分类号] R378.1⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)08-0623-04

Antimicrobial resistance and penicillin resistance-associated genes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with respiratory tract infection

HUANG Yong, WAN Gen-Ping, ZHOU Zhen-Wen, DENG Qiu-Lian, HUANG Xu-Qiang, DENG Li, ZHAO Chang-An. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou 510120, China (Email: hypz@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate the antimicrobial resistance and penicillin resistance-associated genes (TEM and pbp2B) of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) isolated from sputum specimens of Guangzhou children with respiratory tract infection. **Methods** E-test and Kirby-Bauer methods were applied to detect the antibiotic susceptibility of 44 strains of *S. pneumoniae*. PCR was used to detect resistance genes pbp2B and TEM, followed by DNA sequence analysis of pbp2B gene. The sequence results were compared to those of penicillin-susceptible *S. pneumoniae* R6. **Results** Of the 44 isolates of *S. pneumoniae*, only 5 (11.4%) were susceptible to penicillin. All strains were resistant to erythromycin but susceptible to ofloxacin and vancomycin. The resistance rate of the isolates to clindamycin and trimoxazole was more than 90%. The *S. pneumoniae* isolates showed a high susceptibility to amoxicillin, imipenem and ceftriaxone, with a resistance rate of 0, 2.6% and 3.9%, respectively. The sequence analysis showed that more than 99% nucleotide sequence of pbp2B gene of five penicillin-susceptible isolates was the same as penicillin-susceptible *S. pneumoniae* R6, without any amino acid replacement. Site mutation was found in the remaining 39 penicillin-nonsusceptible isolates with a nucleotide mutation rate ranging from 13.2% to 23.1% and amino acid replacement rate from 6.5% to 10.9%. The 39 penicillin-nonsusceptible isolates were classified into 4 types according to the mutation site between Ser391 and Thr492 of pbp2B: type I ($n=30$), type II ($n=7$), type III ($n=1$) and type IV ($n=1$). No TEM gene was detected in all the 44 *S. pneumoniae* isolates. **Conclusions** The *S. pneumoniae* isolates from Guangzhou children with respiratory tract infection are resistant to penicillin and erythromycin. Amoxicillin and the third generation cephalosporin may be recommended for treating *S. pneumoniae* infection. The mutation of pbp2B gene plays an important role in the development of *S. pneumoniae* resistance to penicillin.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(8): 623-626]

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; Drug resistance; Drug resistance gene; Child

[收稿日期] 2008-12-01; [修回日期] 2009-01-14

[基金项目] 广东省科技计划项目(63096), 广州市医药卫生科技项目(项目批准号: 2006-YB-075)。

[作者简介] 黄勇, 男, 硕士, 主管技师。主攻方向: 细菌耐药机制研究。

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)是儿童社区获得性呼吸道感染的常见病原菌,可引起儿童肺炎、中耳炎,严重者可引起化脓性脑膜炎、败血症等侵袭性感染。近年来的研究显示,SP临床分离株对常用抗生素的耐药性及耐药水平越来越高,青霉素耐药肺炎链球菌及多重耐药株分离率持续增加^[1-5]。SP对青霉素耐药主要由青霉素结合蛋白PBP2B的编码基因pbp2B突变所致^[6],此外还可能与TEM型β-内酰胺酶的产生有关^[7]。本研究对2006年我院呼吸科分离的44株SP进行青霉素等抗菌药物的敏感性药敏试验,并对青霉素耐药相关基因pbp2B、TEM进行研究,以了解广州地区呼吸道感染患儿SP临床分离株对常用抗菌药物的耐药状况及对青霉素耐药的机制。

1 资料与方法

1.1 菌株来源及患儿临床资料

实验菌株为2006年我院呼吸科诊断为肺炎、支气管炎的住院患儿痰液标本分离出的SP 44株。质量控制标准菌株ATCC49619。入选病例资料:患儿44例,年龄1个月至5岁;男女比例为32:12;44例患儿均可闻及肺部干、湿啰音并有咳嗽症状,咳嗽2~90 d不等;X线检查显示有支气管炎、肺炎;其中36例发热(占81.8%),12例气促(占27.3%);27例WBC计数 $>10 \times 10^9/L$;28例超敏CRP $>5 \text{ mg/L}$ 。

1.2 药敏试条、药敏纸片及其他试剂

E-test法浓度梯度试条使用瑞典AB Biodisk公司产品,K-B药敏纸片为英国OXOID公司产品。TaqDNA聚合酶、DNA Marker等购自广州威佳生物技术有限公司,Prime STRTM HS DNA Polymerase热启动酶由TaKaRa公司提供。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 SP的分离培养及鉴定

将痰标本接种于哥伦比亚血琼脂平板,置35℃、5% CO₂培养箱中培养18~24 h后,挑取疑似SP的菌落作革兰染色、Optochin敏感试验、胆汁溶菌试验、菊糖发酵试验。OP纸片抑菌环直径 $\geq 14 \text{ mm}$ 判定为阳性。

1.4 药敏试验

SP纯培养18~24 h后进行药敏试验。对青霉素、红霉素、阿莫西林、头孢曲松、亚胺培南、氧氟沙星、万古霉素7种抗菌药物采用E-test法进行,四环素、氯霉素、复方新诺明采用K-B纸片法,结果判断参照NCCLS/CLSI 2006年M100-S16标准。

1.5 青霉素耐药相关基因的PCR检测

细菌DNA模板的制备采用直接煮沸法。pbp2B和TEM基因均采用套式PCR进行扩增。pbp2B基因外套引物:P1:5'-CTGACCATTGATTTG-GCTTCCAA-3', P2:5'-TTTCGAATAGTTGCTA-CATACTG-3',产物长度682 bp;内套引物P3:5'-CCTGATTCCTTGGGAACGGT-3', P4:5'-CCCAAGC-CATATTCGCCAAA-3',产物352 bp。TEM基因外套引物P1:5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3', P2:5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3',产物长度1 079 bp;内套引物P3:5'-AGGAAGACTATGAT-TCAACA-3', P4:5'-CTCGTCGTTTGGTATGGC-3',产物535 bp。反应体系:各引物浓度均取0.2 μmol/L, dNTPs 200 μmol/L, TaqDNA聚合酶2 U (pbp2B基因采用Prime STRTM HS DNA聚合酶1 U), 1 × PCR缓冲液,模板加DNA提取液1 μL,加灭菌去离子水至50 μL。内套扩增时需将外套PCR扩增产物进行100倍稀释后取1 μL作为内套扩增模板。TEM基因热循环参数为:94℃预变性5 min;94℃变性60 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环;最后72℃延伸10 min。pbp2B基因热循环参数为:94℃预变性5 min;98℃变性10 s, 55℃退火15 s, 72℃延伸1 min, 30个循环;最后72℃延伸5 min。PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像系统观察分析结果。

1.6 PCR扩增产物DNA测序及分析

以内套PCR反向引物5'-CCTGATTCCTTGG-GAACGGT-3'作为测序引物对44株SP pbp2B基因内套扩增产物进行测序,由上海英骏生物技术有限公司进行测定。运用DNAMAN序列分析软件对测序结果与SP青霉素敏感株R6株(GenBank登录号:NC-003098)进行比对,分析44株SP pbp2B基因的基因突变情况和突变类型。

2 结果

2.1 SP对抗生素的耐药状况

药敏试验结果显示,SP对青霉素耐药情况较严重,44株中仅5株敏感,敏感率为11.4%,不敏感率达88.6%,其中耐药率为11.4%。SP对红霉素的耐药率高达100%,其中43株MIC值为256 μg/mL高水平耐药,另1株为4 μg/mL。SP对克林霉素、复方新诺明的耐药性也在90.0%以上。对阿莫西林、头孢曲松、亚胺培南仍较敏感或高度敏感,未发现对氧氟沙星、万古霉素耐药的菌株(表1)。

表1 44株SP对抗菌药物的耐药情况 (%)

抗生素	敏感	中介	耐药
青霉素	11.4	77.2	11.4
阿莫西林	94.8	5.2	0
头孢曲松	76.6	19.5	3.9
头孢呋辛	18.2	9.1	72.7
万古霉素	100	0	0
红霉素	0	0	100
克林霉素	6.5	0	93.5
亚胺培南	92.2	5.2	2.6
氧氟沙星	100	0	0
氯霉素	28.3	1.0	70.7
四环素	11.4	31.8	56.8
复方新诺明	7.1	1.0	91.9

2.2 SP pbp2B 和 TEM 基因检测分析

44株SP分离株pbp2B基因测序结果与SP R6株的pbp2B基因核苷酸序列比对分析,结果显示,5株青霉素敏感株有99%以上的核苷酸序列相同,未发生氨基酸的替换。39株青霉素不敏感株的pbp2B基因序列都发生了核苷酸序列的改变,均为点突变,核苷酸改变最多者达23.1%(72/312),氨基酸改变最多达10.9%。氨基酸改变主要分布于

以下12个位点: Ser417→Pro、Asn427→Tyr、Thr431→Lys、Ile432→Leu、Gln443→Glu、Thr451→Ala、Leu460→Ile、Ser478→Thr、Glu481→Gly、Ser485→Ala、Tyr490→Ile、Leu492→Ala。根据氨基酸在Ser391-Thr492片段之间的突变情况,可将39株青霉素不敏感株分为4种突变类型。其中I型30株,有70多个核苷酸序列发生突变,有上述除Tyr490→Ile外的另11个氨基酸发生了替换。II型突变7株,有上述除了Tyr490→Ile、Leu492→Ala之外的10个氨基酸发生替换。III型1株,主要有Ser417→Pro、Thr431→Lys、Gln443→Glu、Thr451→Ala、Leu460→Ile和Glu481→Gly发生的6个氨基酸的替换。IV型1株,发生除Leu492→Ala之外的11个氨基酸的替换。pbp2B基因编码的氨基酸SVVK(391位-394位)、SSN(448-450)两个保守区内均未发生氨基酸替换。pbp2B基因不同突变型中,青霉素结合域核苷酸序列与R6株比较见图1。pbp2B基因内套PCR产物电泳结果见图2。

44株SP采用套式PCR进行β-内酰胺酶TEM基因检测,均未检出TEM基因。

SPR6-578	GTACCCAAGC	CATATTCGCC	AAAGGTTGAA	CGCAGTTTCT	CCATAGCAGA	CTCTAGATTG
S-28-3	--T-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-20-3	...-A-GC-	-----	-----C-C-	--A----TC	-----T-T	T--C-A----
R-24-10-	-----	-----C-C-	--A----TC	-----T-T	-T-C-A----
R-33-3	...-A-GC-	-----	-----	--A----C	-----	-----
R-3-1-AT-	-----	-----C-C-	--A----TC	-----T-T	T--C-A----
SPR6-638	CTGGTGCCGA	CAAACATATT	GGGTTGATAG	GTTTGCCCA	TAAGACCTAA	GGCTGTTTGG
S-28-63	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-20-60	----T-A-	-----	T-----	--C-G---	-G-TT-A-G	A-G-----
R-24-61	----T-A-	-----	T-----	--C-G---	-G-TT-A-G	A-G-----A
R-33-60	-----	-----	T-----	-----	--TG---	--C-C---
R-3-51	----T-A-	-----	T-----	--C-G---	-G-TT-A-G	-A-G-----A
SPR6-698	ACCATATAGG	TATTTGATGA	ATACTCCAGA	GCTTGGACCG	CTGTGATAGG	GAATGAACCG
S-28-123	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-20-120	----G-A-	C--G----	-----AG	--T-CA-G	---A-T---	A--A-T--A
R-24-121	----G-A-	C--A----	-----AG	---CC-A-	---A----	A--A-T--A
R-33-120	-----	C--A-A--	-----AG	---CC-T-	---A-C-G	-----
R-3-111	----G-A-	C--A----	-----AG	---CC-A-	---A----	A--A-T--A
SPR6-758	TAAGCCTGAG	TATACCAAGA	ATTGATGGGA	GCTGAACCTT	GGAAGACAAT	GGACTGGTCT
S-28-183	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-20-183	--T--AATT	-----	--AA-T--	-----	---A----	A-G--A--
R-24-183	--T--AATT	-----	--AA-T--	-----	---A----	A-G--A--
R-33-183	-----TT	-----	--A-T--	-----	-----	C-GT-----
R-3-171	--T--AATT	-----	--AA-T--	-----	---A----	A-G--A--
SPR6-818	GTCAAGGTCT	GGTTTCCTGA	CAAGACTCCA	TTTTCCCAAC	CTGAGCTGAT	GGTCGCCGCC
S-28-243	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R-20-240	--T----T-	-----	T--A--A--	-----	-----	-----A--
R-24-241	--T----T-	-----	T--A--A--	-----	-----	---A-G---
R-33-240	-----	---C-----	-----G	-----
R-3-231	--T----T-	-----	T--A--A--	-----	-----	---A-G---

图1 肺炎链球菌pbp2B基因几种突变型中青霉素结合域核苷酸序列与R6株的比较 SPR6:青霉素敏感株; S-28:临床分离的青霉素敏感株; R-24:临床分离的青霉素耐药株, I型突变; R-20: II型突变; R-33: III型突变; R-3: IV型突变

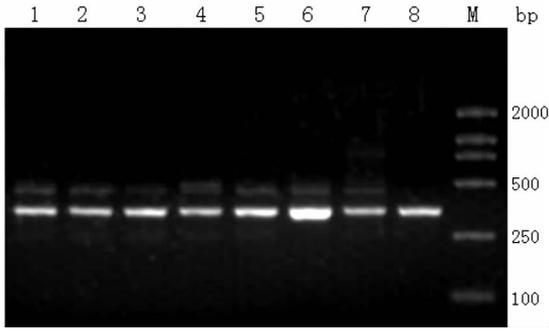


图2 pbp2B 基因内套 PCR 产物电泳示意图

1~8:SP 临床分离株; M:DNA Marker

3 讨论

近年来我国多中心研究发现,SP 临床分离株对β-内酰胺类、大环内酯类、氨基糖苷类和喹诺酮类药物的耐药率越来越高,呈逐年上升趋势^[1-3,5]。2000~2002年我们与北京、上海联合开展的儿童 SP 携带及抗菌药物耐药性监测显示,SP 对青霉素的敏感性为 39.9%,红霉素耐药率为 84.3%^[2];而至 2004 年则分别为 70.5%、89.7%^[3]。杨锦红等^[8]报道 2005~2006 年温州儿童检出的 SP 对青霉素的敏感性已高达 86.2%,红霉素耐药率为 96.6%。本研究结果显示,2006 年我院儿童下呼吸道检出 SP 对青霉素不敏感率已高达 88.6%,头孢呋辛耐药率达 72.7%,与 5 年前我院这两项监测结果报道的 53.5% 和 41.0% 相比明显升高,也高于陆权等^[9] 2002 年报道的青霉素不敏感率 61% 和头孢呋辛耐药率 27.0%。同时,SP 对红霉素、克林霉素及复方新诺明的耐药率也较高,在 90%~100% 之间,且多重耐药情况严重,耐药模式主要为红霉素+复方新诺明+氯霉素+四环素+头孢呋辛。但本研究所检 44 株菌株对阿莫西林、头孢曲松、亚胺培南仍较敏感或高度敏感,耐药率仅为 0~3.9%。本研究结果表明,青霉素、红霉素已不适宜作为广州地区儿童 SP 感染的临床一线用药,而阿莫西林及第三代头孢菌素可作为 SP 感染的经验用药。

SP 对青霉素耐药主要与 pbp2B 基因突变相关, pbp2B 基因突变可导致其表达的 PBP2B 蛋白结构异常,与青霉素的亲和力下降,从而导致对青霉素耐药^[8]。文献报道 pbp2B 基因序列变异主要集中于第 331 个密码子到第 460 个密码子之间,不同菌株的氨基酸序列替换不尽相同,对青霉素抗性较强的菌株(MIC 增大),其 pbp2B 基因序列中核苷酸发生突变的数量亦有所增加,但并非所有突变都与青霉素抗性有关^[6]。本研究结果显示,44 株 SP 的 pbp2B 基因测序结果与 SP 敏感株 R6 的 pbp2B 基

因高突变区 1494800-1495092 位的核苷酸序列相比,5 株青霉素敏感株有 99% 的核苷酸相同,未发生氨基酸的替换,而 39 株青霉素不敏感株 pbp2B 基因序列均发生了点突变,核苷酸碱基改变最多的达 23.1% (72/312),氨基酸改变最多的达 10.9%。39 株 PNSP 在 Ser391-Thr492 之间共有 12 个氨基酸发生替换,SVVK (391-394)、SSN (448-450) 两个保守区内均未发生氨基酸替换。在 pbp2B 基因的耐药突变中, Thr451→Ala/Ser 的替换可产生低水平的青霉素耐药,但该变异是发展较高水平耐药性的先决条件。本研究的分析表明,39 株 PNSP 均出现了位于保守序列 SSN 之后的氨基酸 Thr451→Ala 的置换。通过 pbp2B 基因序列网上 NCBI Blast 分析,并未发现本地区特有的(新的)突变位点。

丁云芳等^[7]报道从苏州地区儿童呼吸道感染 SP 中检测出 TEM 型 β-内酰胺酶基因,检出率达 91.3% (21/23)。提示 SP 可以通过获得含 TEM 基因的质粒而产生 β-内酰胺酶,从而介导对青霉素耐药。但我们采用丁云芳等报道的方法对广州地区儿童呼吸道检出的 44 株 SP 进行 TEM 基因检测,结果未检出阳性菌株,可能与耐药基因的携带具有明显的地区差异有关。此外,我们所测菌株中有无其他类型的 β-内酰胺酶也有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 姚开虎,王立波,赵根明,郑跃杰,邓力,赵瑞珍,等. 四家儿童医院住院肺炎病例肺炎链球菌分离株的耐药性监测[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(3): 275-279.
- [2] 姚开虎,陆权,邓力,俞桑洁,张泓,邓秋莲,等. 2000-2002 年北京、上海和广州儿童肺炎链球菌携带及抗生素耐药性监测[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(28): 1957-1961.
- [3] 汪玲,陆权,王传清,邓秋莲,刘岚,黄勇,等. 2000-2004 年京沪穗渝 5 家儿童医院革兰阳性球菌耐药情况分析[J]. 中国循证儿科杂志, 2006, 1(2): 113-121.
- [4] Farrell DJ, Klugman KP, Pichichero M. Increased antimicrobial resistance among nonvaccine serotypes of Streptococcus pneumoniae in the pediatric population after the introduction of 7-valent pneumococcal vaccine in the United States[J]. Pediatr Infect Dis J, 2007, 26(2): 123-128.
- [5] Sadowy E, Izdebski R, Skoczynska A, Grzesiowski P, Gniadkowska M, Hryniewicz W. Phenotypic and molecular analysis of penicillin-nonsusceptible Streptococcus pneumoniae isolates in Poland[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(1): 40-47.
- [6] 林峰,曾爱平,郑敏巧,丁玟,王思远,王升启. 浙江地区青霉素耐药肺炎链球菌 PBPS 基因及氨基酸序列研究[J]. 遗传, 2005, 27(6): 965-971.
- [7] 丁云芳,张建华,糜祖煌,秦玲,陶云珍,亓晓. 苏州地区肺炎链球菌 TEM 基因分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(11): 970-972.
- [8] 杨锦红,杨海蔚,李向阳,王慧燕. 儿童感染肺炎链球菌对抗菌药物的耐药性调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(12): 1552-1554.
- [9] 陆权,张泓,杨永弘,陆敏,李万华,孔菁. 2000-2002 年上海地区儿童肺炎链球菌耐药性研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(9): 636-638.

(本文编辑:徐福兰)