

世界肺炎日专题

## 上呼吸道感染儿童鼻咽部携带肺炎链球菌 状况及血清型和耐药性研究

俞桑洁 高薇 史伟 袁林 申阿东 姚开虎 杨永弘

(首都医科大学附属北京儿童医院, 北京市儿科研究所微生物研究室,  
儿科学国家重点学科, 教育部儿科重大疾病研究重点实验室, 北京 100045)

**[摘要]** **目的** 了解上呼吸道感染儿童鼻咽部携带肺炎链球菌状况, 以及分离株的耐药性和血清型分布。**方法** 2013年3月至2014年2月采集在北京儿童医院门诊就诊的上呼吸道感染儿童鼻咽拭子进行细菌培养和鉴定, 采用Etest方法检测抗生素敏感性, 荚膜肿胀试验检测血清型。**结果** 共采集到2941例1月龄至16岁患儿的鼻咽拭子, 分离出肺炎链球菌699株, 携带率为23.8%。随机选取100株菌检测了抗生素敏感性和血清型。分离株对静脉青霉素敏感率达98.0%, 口服青霉素敏感率仅为33.0%, 头孢克洛耐药率为54.0%, 头孢曲松和亚胺培南中介率也分别达到18.0%和38.0%。红霉素和阿奇霉素不敏感率均为97.0%。多重耐药率为86.0%。常见血清型为6A(12.0%)、19F(12.0%)、6B(10.0%)、23F(9.0%)和14型(8.0%), 7、10和13价结合疫苗覆盖率分别为41.0%、42.0%和59.0%。**结论** 门诊上呼吸道感染儿童中, 鼻咽部肺炎链球菌携带率约为25%, 抗生素耐药分离株常见, 13价结合疫苗覆盖率接近60.0%。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(10): 988-992]

**[关键词]** 肺炎链球菌; 携带率; 抗生素耐药; 血清分型; 儿童

### Nasopharyngeal carriage rate, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* among children with upper respiratory infection

YU Sang-Jie, GAO Wei, SHI Wei, YUAN Lin, SHEN A-Dong, YAO Kai-Hu, YANG Yong-Hong. Key Laboratory of Major Diseases in Children and National Key Discipline of Pediatrics, Ministry of Education, Microbiological Laboratory in Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China (Yao K-H, Email: jiuahu2655@sina.com)

**Abstract: Objective** To investigate nasopharyngeal carriage rate, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* among children with upper respiratory infection. **Methods** Nasopharyngeal swabs were collected from children with upper respiratory infection visiting the outpatient department of Beijing Children's Hospital between March 2013 and February 2014. The antibiotic susceptibility was tested by Etest method, and the serotype was determined by Quellung reaction. **Results** The nasopharyngeal carriage rate for *Streptococcus pneumoniae* was 23.8% (699/2941). One hundred isolates were randomly chosen for antimicrobial susceptibility test and serotyping. Up to 98.0% isolates were susceptible to parenteral penicillin. The susceptible rate against oral penicillin, however, was 33.0%. The non-susceptible rate to erythromycin and azithromycin was 97.0%. The multi-drug resistance rate was up to 86.0%. The common serotypes were 6A(12.0%), 19F(12.0%), 6B(10.0%), 23F(9.0%) and 14(8.0%). The coverage rates of 7-, 10- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine were 41.0%, 42.0% and 59.0% respectively. **Conclusions** About 25% of children with upper respiratory infection are nasopharyngeal colonized by *Streptococcus pneumoniae*. The isolates show a high antimicrobial resistance. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine covers about 60.0% of the isolates.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(10): 988-992]

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*; Carriage rate; Antimicrobial resistance; Serotype; Child

[收稿日期] 2014-07-16; [接受日期] 2014-08-18

[基金项目] 首都卫生发展科研专项项目重点攻关(项目编号首发2011-2009-05), 北京市科委行业定额经费自主项目(2014-bjsekyjs-3)。

[作者简介] 俞桑洁, 女, 硕士, 研究员。

[通信作者] 姚开虎, 男, 副研究员, 副教授。

肺炎链球菌是人类重要的致病菌,可引起呼吸道感染、菌血症、脑膜炎等,尤其肺炎仍然是5岁以下儿童因感染死亡的重要原因<sup>[1]</sup>。抗生素在细菌感染治疗中起到关键作用。但是近年来由于耐药菌株的出现及迅速传播,给儿童呼吸道感染的治疗造成了极大困扰。肺炎链球菌结合疫苗(pneumococcal conjugated vaccine, PCV)上市后,监测数据表明普遍接种PCV可降低肺炎链球菌感染的疾病负担<sup>[2]</sup>。本研究调查北京儿童医院门诊呼吸道感染儿童鼻咽拭子肺炎链球菌分离状况,并监测分离株血清型和抗生素耐药性,供临床用药和疫苗免疫决策时参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象及标本采集

研究对象为2013年3月至2014年2月在北京儿童医院门诊就诊的上呼吸道感染儿童,患儿均有发热等症状。每天采集标本数为10~20例,共采集了2941份鼻咽拭子标本。患儿年龄为1月龄至16岁,其中男1741例,女1200例。标本采集均经监护人同意。标本采集后立即放入脱脂奶粉-胰蛋白胨-葡萄糖-甘油(skim milk-tryptone-glucose-glycerol, STGG)转运培养基,2h内送至实验室培养。

### 1.2 细菌分离、培养和鉴定

将鼻咽拭子标本放入CO<sub>2</sub>孵育箱孵育,35℃,4h,然后震荡10~20s,取40μL液体转种于5%脱纤维羊血TSA琼脂(Oxoid,英国)平板上,35℃5%CO<sub>2</sub>过夜孵育。挑草绿色溶血可疑菌落,optochin纸片试验和全价血清凝集试验阳性鉴定为肺炎链球菌<sup>[3]</sup>。

### 1.3 血清分型

随机数字法选择100株进行血清分型和抗生素耐药性检测。使用相差显微镜观察荚膜肿胀反应进行血清分型。分型血清为肺炎链球菌棋盘式分型系统(Pneumotest kits)和因子分型血清(Statens Serum Institut, 丹麦)<sup>[4]</sup>。本研究能检测出的血清型为23价多糖疫苗包括的型别(1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F和33F型)和6A、6C和6D型,其他不能确定的型别暂归为不能分型。

### 1.4 抗生素敏感性试验

采用Etest(AB Biodisk, 瑞典)方法检测菌株对12种抗生素的敏感性,包括:青霉素、阿莫西林/棒酸、头孢克洛、头孢呋辛、头孢曲松、亚胺培南、红霉素、阿奇霉素、四环素、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、左氧氟沙星和氯霉素。判断标准采用CLSI 2012版<sup>[5]</sup>。为了与既往研究资料比较,对口服和胃肠外(非脑膜炎)青霉素两种界值的判定结果都做了描述。对3种或3种以上抗生素耐药定义为多重耐药。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析。采用软件WHONET 5.3进行抗菌药物敏感性分析。计数资料用百分率(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确概率法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 携带率

2941份鼻咽拭子标本中,分离出肺炎链球菌699株,携带率为23.8%(699/2941)。肺炎链球菌携带率高峰出现在4月,达36.6%;此后渐降低至8、9月,最低值15.7%;以后再逐渐升高,11、12月出现第二次分离率高峰,均在28%以上。各个月份的肺炎链球菌分离率见图1。

不同年龄段上呼吸道感染儿童鼻咽部携带肺炎链球菌状况见图2。5岁及5岁以下儿童携带率均超过20%,4岁组儿童携带率最高,为38.6%,以后随着年龄增长携带率降低。

### 2.2 抗生素敏感性

100株肺炎链球菌对青霉素等抗生素的敏感性试验结果见表1。所有菌株对阿莫西林/棒酸、左氧氟沙星敏感。菌株对静脉用青霉素敏感率为98.0%,对口服青霉素敏感率仅33.0%;青霉素对菌株的最小抑菌浓度(MIC)<sub>50</sub>和MIC<sub>90</sub>分别为0.5 mg/L、2 mg/L。菌株对头孢克洛耐药率达54.0%,没有菌株耐头孢曲松和亚胺培南,但中介率分别达到18.0%和38.0%。菌株耐红霉素和阿奇霉素比率很高,不敏感率均达97.0%;MIC<sub>50</sub>和MIC<sub>90</sub>均在256 mg/L以上。多重耐药率为86.0%,71.0%的菌株同时对大环内酯类、四环素和磺胺类耐药。

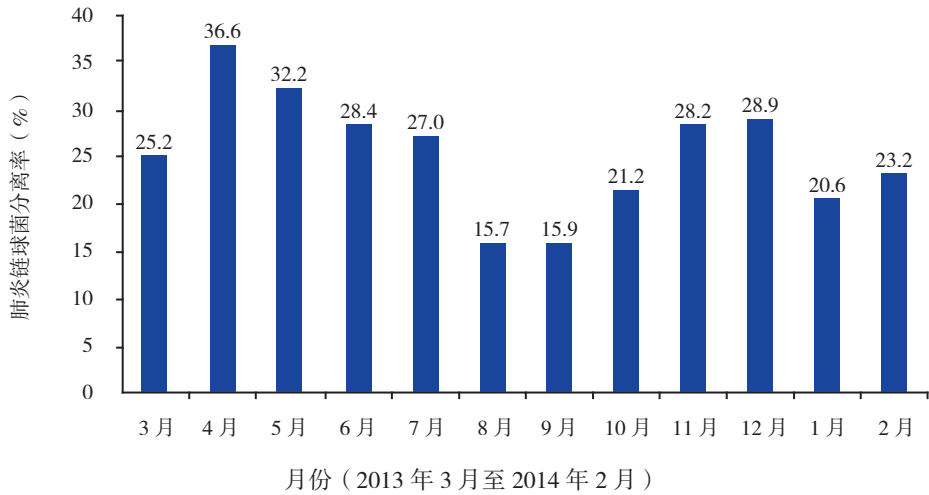


图 1 各月上呼吸道感染儿童鼻咽部肺炎链球菌分离率

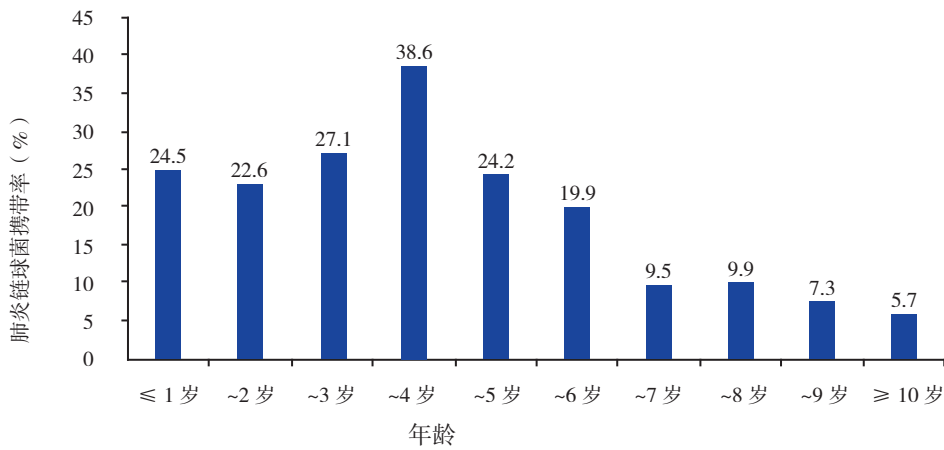


图 2 不同年龄段上呼吸道感染儿童鼻咽部携带肺炎链球菌状况

表 1 100 株肺炎链球菌对青霉素等抗生素的敏感性

| 抗生素          | 敏感性 (%) |      |      | MIC (mg/L) |      |            |
|--------------|---------|------|------|------------|------|------------|
|              | 敏感      | 中介   | 耐药   | 50%        | 90%  | 范围         |
| 青霉素（静脉）      | 98.0    | 2.0  | 0    | 0.5        | 2    | 0.008~6    |
| 青霉素（口服）      | 33.0    | 56.0 | 11.0 | 0.5        | 2    | 0.008~6    |
| 阿莫西林 / 棒酸    | 100     | 0    | 0    | 0.38       | 1    | 0.016~2    |
| 头孢克洛         | 42.0    | 4.0  | 54.0 | 6          | 32   | 0.125~256  |
| 头孢呋辛         | 51.0    | 41.0 | 8.0  | 0.75       | 3    | 0.016~8    |
| 头孢曲松         | 82.0    | 18.0 | 0    | 0.5        | 1.5  | 0.008~3    |
| 亚胺培南         | 62.0    | 38.0 | 0    | 0.125      | 0.25 | 0.012~0.38 |
| 红霉素          | 3.0     | 0    | 97.0 | >256       | >256 | 0.094~>256 |
| 阿奇霉素         | 0       | 3.0  | 97.0 | >256       | >256 | 1~>256     |
| 四环素          | 10.0    | 11.0 | 79.0 | 12         | 24   | 0.064~32   |
| 甲氧苄啶 - 磺胺甲噁唑 | 27.0    | 39.0 | 34.0 | 2          | 24   | 0.094~32   |
| 左氧氟沙星        | 100     | 0    | 0    | 0.5        | 0.75 | 0.38~1     |
| 氯霉素          | 87.0    | 3.0  | 10.0 | 3          | 6    | 1~24       |

## 2.3 血清型分布

对100株肺炎链球菌进行血清型检测显示,常见血清型为6A(12株,12.0%)、19F(12株,12.0%)、6B(10株,10.0%)、23F(9株,9.0%)和14型(8株,8.0%)。PCV7(19F、6B、23F、14、18C、9V和4型)、PCV10(PCV7+1、5和7F型)和PCV13(PCV10+6A、19A和3型)覆盖率分别为41.0%(41株)、42.0%(42株)和59.0%(59株)。非PCV13覆盖血清型包括15B(5株,5.0%)、

6C(4株,4.0%)、23A(4株,4.0%)和不能分型(9株,9.0%)。23价荚膜多糖疫苗(PPV23)覆盖率为71.0%(71株)。

## 2.4 PCV覆盖菌株与非PCV覆盖菌株抗生素不敏感率比较

PCV13覆盖菌株对口服青霉素、头孢菌素类和亚胺培南的不敏感率明显高于非PCV13覆盖菌株;PCV7覆盖菌株与非PCV7覆盖菌株比较也具有相似差异(表2)。

表2 PCV覆盖菌株与非PCV覆盖菌株抗生素不敏感率(中介+耐药)比较 [n(%)]

| 抗生素        | PCV7覆盖株<br>(n=41) | 非PCV7覆盖株<br>(n=59)  | PCV13覆盖株<br>(n=59) | 非PCV13覆盖株<br>(n=41) |
|------------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| 青霉素(静脉)    | 0(0)              | 2(3)                | 1(2)               | 1(2)                |
| 青霉素(口服)    | 34(83)            | 33(56) <sup>a</sup> | 48(81)             | 19(46) <sup>b</sup> |
| 头孢克洛       | 33(80)            | 25(42) <sup>a</sup> | 44(75)             | 14(34) <sup>b</sup> |
| 头孢呋辛       | 28(68)            | 21(36) <sup>a</sup> | 38(64)             | 11(27) <sup>b</sup> |
| 头孢曲松       | 12(29)            | 6(10) <sup>a</sup>  | 16(27)             | 2(5) <sup>b</sup>   |
| 亚胺培南       | 23(56)            | 15(25) <sup>a</sup> | 32(54)             | 6(15) <sup>b</sup>  |
| 红霉素        | 41(100)           | 56(95)              | 58(98)             | 39(95)              |
| 四环素        | 36(88)            | 54(92)              | 52(88)             | 38(93)              |
| 甲氧苄啶-磺胺甲噁唑 | 29(71)            | 44(75)              | 43(73)             | 30(73)              |
| 氯霉素        | 4(10)             | 8(14)               | 7(12)              | 6(15)               |

注: a示与PCV7覆盖株比较,  $P<0.05$ ; b示与PCV13覆盖株比较,  $P<0.01$ 。

## 3 讨论

肺炎链球菌常定植于儿童鼻咽部。本研究结果显示我院门诊上呼吸道感染就诊儿童鼻咽部肺炎链球菌携带率为23.8%,明显低于前期本课题组报告的数据(30%~40%)<sup>[6]</sup>,可能主要与以下因素有关:(1)本研究为1整年度的携带率调查研究,既往研究多是在11月至次年4月开展。本研究结果也显示了在不同月份儿童鼻咽部肺炎链球菌分离率不同。(2)本研究纳入了门诊就诊的18岁以下所有年龄段的儿童,既往研究仅采集5岁以下儿童的标本。此次数据也显示了不同年龄段儿童肺炎链球菌携带率的差异。4岁组儿童携带率最高,可能与该年龄段儿童处在进入托幼机构的初期有关。

100株肺炎链球菌中只有2株对静脉青霉素不敏感(MIC值分别为3 mg/L和6 mg/L),但口服青霉素不敏感率达67.0%,明显高于2000~2002年的18.0%~28.7%<sup>[7]</sup>,与2010年的55.0%比较也升高<sup>[8]</sup>。另外,青霉素对肺炎链球菌的MIC<sub>50</sub>和

MIC<sub>90</sub>分别达0.5 mg/L和2 mg/L,而2010年的研究结果显示两者分别为0.25 mg/L和0.75 mg/L<sup>[8]</sup>,说明肺炎链球菌对青霉素的耐药性一直处于增强的过程中。另外,值得注意的是多重耐药率高达86.0%,与既往研究<sup>[7-8]</sup>相符。有的国家肺炎链球菌多重耐药则较为少见,如俄罗斯只有22%<sup>[9]</sup>。

本研究显示肺炎链球菌常见血清型为6A(12%)、19F(12%)、6B(10%)、23F(9%)和14型(8%),常见血清型基本符合本地区2000年以后的研究报告<sup>[10]</sup>,但具体比例有所不同。本研究中PCV7、PCV10和PCV133种结合疫苗覆盖率分别为41.0%、42.0%和59.0%,与2010年北京儿童医院140株鼻咽携带肺炎链球菌3种疫苗的覆盖率(分别为43.6%、43.6%和60.0%)<sup>[9]</sup>吻合。既往研究显示,我国北方地区(如北京、天津和沈阳)PCV7覆盖率明显低于东南部城市(如上海、广州和深圳)<sup>[10-11]</sup>。因此,全国多中心研究报告的疫苗覆盖率较本研究结果高。2006~2008年北京儿童医院与全国11家儿童医院合作,收集到171株侵袭性肺炎链球菌感染(IPD)的菌株,



其PCV7、PCV10和PCV13覆盖率分别为60.3%、66.7%和87.8%<sup>[11]</sup>。结合疫苗上市以后,美国在本土和非洲等地研究计划免疫PCV前后住院肺炎链球菌肺炎的发病率变化,发现疫苗接种后2岁以下儿童中发病减低了65%,2~4岁儿童中减低了73%<sup>[12-13]</sup>。我国目前PCV7接种率非常低,缺乏基础发病资料,也缺少疫苗接种后相关疾病发病情况的研究,无法评估疫苗使用效果。但从疫苗覆盖率来看,PCV13显然能获得更好的预防效果。

研究表明,接种PCV可使免疫人群鼻咽部疫苗血清型肺炎链球菌携带下降、耐青霉素肺炎链球菌携带下降和非疫苗型替换。疫苗接种可保护接种人群,并可阻止病原播散,同时可减少抗生素使用,减少细菌耐药的发生和扩散<sup>[14]</sup>。西班牙是抗生素消费和肺炎链球菌对抗生素耐药率很高的国家,1999年肺炎链球菌对青霉素不敏感率为33.9%,但其从2004年引进PCV7,2008年肺炎链球菌分离株对青霉素的不敏感率下降到22.3%<sup>[15]</sup>。本研究显示PCV13覆盖菌株对口服青霉素、头孢菌素和亚胺培南不敏感率明显高于非PCV13覆盖菌株,也提示推广计划免疫PCV对控制肺炎链球菌抗生素耐药有积极意义。

#### [参 考 文 献]

- [1] Scott JR, Millar EV, Lipsitch M, et al. Impact of more than a decade of pneumococcal conjugate vaccine use on carriage and invasive potential in Native American communities[J]. *J Infect Dis*, 2012, 205(2): 280-288.
- [2] Sharma D, Baughman W, Holst A, et al. Pneumococcal carriage and invasive disease in children before introduction of the 13-valent conjugate vaccine: comparison with the era before 7-valent conjugate vaccine[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2013, 32(2): e45-53.
- [3] 俞桑洁, 王辉, 沈叙庄, 等. 肺炎链球菌临床检验规程的共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(12): 1-7.
- [4] Sørensen UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(8): 2097-2100.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement[S]. CLSI, 2012.
- [6] 俞桑洁, 佟月娟, 袁林, 等. 肺炎链球菌耐药性的监测[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(8): 492-493.
- [7] 姚开虎, 陆权, 邓力, 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.
- [8] Zhou L, Yu SJ, Gao W, et al. Serotype distribution and antibiotic resistance of 140 pneumococcal isolates from pediatric patients with upper respiratory infections in Beijing, 2010[J]. *Vaccine*, 2011, 29(44): 7704-7710.
- [9] Mayanskiy N, Alyabieva N, Ponomarenko O, et al. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia[J]. *Int J Infect Dis*, 2014, 20: 58-62.
- [10] Yao KH, Yang YH. *Streptococcus pneumoniae* diseases in Chinese children: past, present and future[J]. *Vaccine*, 2008, 26(35): 4425-4433.
- [11] Xue L, Yao KH, Xie GL, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates that cause invasive disease among Chinese children[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(1): 741-744.
- [12] Grijalva CG, Nuorti JP, Arbogast PG, et al. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis[J]. *Lancet*, 2007, 369(9568): 1179-1186.
- [13] Cutts FT, Zaman SM, Enwere G, et al. Gambian Pneumococcal Vaccine Trial Group. Efficacy of nine-valent pneumococcal conjugate vaccine against pneumonia and invasive pneumococcal disease in the Gambia: randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2005, 365(9465): 1139-1146.
- [14] Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 3(15): 16-20.
- [15] Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, et al. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(5): 402-410.

(本文编辑: 邓芳明)