

327 例患儿肺炎链球菌感染分布及耐药性分析*

韦柳华, 李梦薇, 罗国兰

(广西医科大学第四附属医院检验科, 广西柳州 545005)

摘要:目的 分析该院 0~14 岁儿童患者肺炎链球菌感染分布及耐药性特征。**方法** 使用基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)鉴定细菌,使用 ATB STREP 5 进行药敏试验,青霉素 G 最低抑菌浓度(MIC)采用 E 试验法检测。**结果** 共分离肺炎链球菌 327 株,其中 287 株(87.8%)来自痰液,25 株(7.6%)来自耳分泌物,10 株(2.9%)来自鼻窦穿刺液,3 株(0.9%)来自血液。菌株分离的季节以春季最多(28.4%),冬季最少(22.0%),但四季分离率差异无统计学意义($P<0.05$)。肺炎链球菌非脑膜炎株对青霉素 G 的敏感、中介和耐药率分别 97.9%、0.6%、1.5%。该菌对红霉素、克林霉素、复方磺胺甲噁唑、四环素耐药率较高,已出现少量左氧氟沙星耐药株,未检出万古霉素和奎奴普丁/达福普汀耐药株。青霉素 G 耐药、青霉素肺炎链球菌(PRSP)、青霉素中介肺炎链球菌(PISP)对阿莫西林、头孢噻肟的耐药率显著高于青霉素 G 敏感的肺炎链球菌(PSSP),差异有统计学意义($P<0.01$)。共分离出多重耐药肺炎链球菌 227 株(69.4%),以红霉素、四环素、复方磺胺甲噁唑和克林霉素耐药为主(46.2%)。**结论** 儿童患者感染肺炎链球菌的耐药性监测不容忽视,该菌对青霉素 G 的耐药性较低,青霉素 G 仍是治疗肺炎链球菌感染价廉而有效的药物。

关键词:肺炎链球菌; 药敏试验; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.10.022

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2018)10-1238-04

文献标识码:A

Distribution and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* infection in 327 children*

WEI Liuhua, LI Mengwei, LUO Guolan

(Department of Clinical Laboratory, The Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi 545005, China)

Abstract: Objective To analyze the distribution and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in 0-14 year old children of 0 to 4 year-old in the our hospital. **Methods** *S. pneumoniae* were identified by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Drug susceptibility test was performed by using ATB STREP 5 for each isolate. Penicillin G minimum inhibitory concentration (MIC) was performed by using E-test. **Results** A total of 327 strains of *S. pneumoniae* were isolated, among which 287 (87.8%) were from sputum, 25 (7.6%) from the ear secretions, 10 (2.9%) from the nasal sinuses puncture fluid, and 3 (0.9%) from the blood. The most strains were isolated in spring (28.4%), and the least in winter (22%), and there was no significant difference in the separation rate among the four seasons ($P<0.05$). The sensitivity rate, intermediate rate and drug resistant rate of non meningitis *S. pneumoniae* strains to penicillin G were 97.9%, 0.6%, 1.5%, respectively. The resistance rates of the bacteria to erythromycin, clindamycin, compound trimethoprim sulfamethoxazole and tetracycline were relatively high, a small number of levofloxacin resistant strains were found, and vancomycin and quinopin / Dafoe-P resistant strains were not detected. The resistance rates of penicillin G, penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) and penicillin inter mediated *Streptococcus pneumoniae* (PISP) to amoxicillin and cefotaximeto were markedly higher than that of penicillin G sensitive *Streptococcus pneumoniae* (PSSP), and the difference was statistically significant ($P<0.01$). A total of 227 strains of multidrug resistance *Streptococcus pneumoniae* (69.4%) were isolated, which were resistant to erythromycin, tetracycline, trimethopri compound m-sulfamethoxazol and clindamycin (46.2%). **Conclusion** The drug resistance monitoring of *Streptococcus pneumoniae* in children can not be ignored. The drug resistance of the bacteria to penicillin G is low. Penicillin G is still a cheap and effec-

* 基金项目:广西卫计委科研基金(Z2014379);柳州市科技局科技攻关与新产品试制课题(2014J030422)。

作者简介:韦柳华,女,副主任技师,主要从事病原微生物学研究。

本文引用格式:韦柳华,李梦薇,罗国兰. 327 例患儿肺炎链球菌感染分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(10):1238-1240.

tive drug for the treatment of *Streptococcus pneumoniae* infection.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; children; drug sensitivity susceptibility testing

肺炎链球菌是引起儿童黏膜感染和侵入性感染的重要病原菌之一,患者可能会出现严重的和潜在的危及生命的后遗症。在过去几十年中由于普遍出现的肺炎链球菌耐药性问题,特别是对大环内酯类耐药率极高以及多重耐药性问题,给儿童患者的治疗带来困难^[1]。因此,对儿童患者中肺炎链球菌的来源和耐药性进行分析,对预防、诊断和治疗肺炎链球菌感染十分重要。本研究对 327 例儿童患者肺炎链球菌感染的分布和耐药性进行分析,以期为临床诊疗提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集该院 2015 年 1 月 1 日至 2016 年 12 月 31 日,0~14 岁患儿送检标本中分离的肺炎链球菌,剔除同一患儿分离的重复菌株。327 例肺炎链球菌感染患儿中,男 203 例(62.1%),女 124 例(37.9%)。患儿年龄 1 d 至 14 岁,平均(2.11±2.31)岁,其中 1 岁者 84 例(25.7%),1~3 岁者 121 例(37.0%),>3~6 岁者 68 例(20.8%),>6~14 岁者 54 例(16.5%)。

1.2 仪器与试剂 MALDI-TOF MS 及配套试剂(如靶板、基质液)、VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪、BacT/ALERT 3D 血培养仪、ATB STREP 5 肺炎链球菌药敏试验条(法国生物梅里埃公司);GP 革兰阳性菌鉴定卡、哥伦比亚血平板、中和抗生素儿童瓶(上海生物梅里埃公司),青霉素 E 试验条、5%脱纤维羊血 MH 琼脂(温州康泰生物有限公司)。质控菌株肺炎链球菌 ATCC49619。由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供,大肠埃希菌 ATCC8739 由法国生物梅里埃公司提供。

1.3 菌株培养 按照《全国临床检验操作规程》(第 4 版)进行^[2],将痰液、耳分泌物、鼻窦穿刺液等临床标本接种于哥伦比亚血平板,37℃、5% CO₂ 孵育 18~24 h。血液注入中和抗生素儿童瓶,放入 BacT/ALERT 3D 血培养仪培养,如阳性再转种哥伦比亚血平板,37℃、5% CO₂ 孵育 18~24 h。根据典型菌落形态和 α 溶血特点进行初步筛选。

1.4 菌株鉴定 MALDI-TOF MS 鉴定:用 1 μL 定量接种环将大肠埃希菌 ATCC8739 涂在靶板的校准点位,然后取待测菌涂在 1~2 个靶板点位上,每点位加 1 μL 基质液,室温干燥后放入 MALDI-TOF MS,获取细菌全细胞蛋白质谱。然后将待测菌质谱图 and 数据库已知菌质谱图进行比较,获得鉴定结果。MALDI-TOF MS 鉴定结果可信度低时,使用 GP 革兰阳性菌鉴定卡进行鉴定,具体操作按仪器说明书要求进行。

1.5 药敏试验 327 例肺炎链球菌均来自非脑膜炎

患儿,采用 ATB STREP 5 进行药敏试验,具体操作按说明书要求进行。肺炎链球菌的青霉素 G 结果经 ATB STREP 5 测定中介、耐药时,采用 E 试纸条复核青霉素 G 的最低抑菌浓度(MIC)。肺炎链球菌的药敏试验结果参照 2015 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准进行判断^[3]。

1.6 统计学处理 使用 WHONET5.6 软件对药敏结果进行统计分析;使用 SPSS13.5 统计软件对计数资料进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株的标本分布 327 株肺炎链球菌中,分离自痰液 287 株(87.8%),耳分泌物 25 株(7.6%),鼻窦穿刺液 10 株(3.1%),血液 3 株(0.9%),其他标本 2 株(0.6%)。

2.2 菌株的季节分布 春季感染最多,93 株(28.4%),其次是秋季 84 株(25.7%)。夏季 78 株(23.9%),冬季 72 株(22.0%),四季分离率的差异无统计学意义($P<0.05$)。

2.3 菌株的耐药情况 青霉素 G 敏感、中介、耐药肺炎链球菌(PSSP、PISP、PRSP)的检出率分别为 97.9%、0.6%、1.5%。肺炎链球菌对红霉素、克林霉素、复方磺胺甲噁唑、四环素耐药率较高(>77.0%),已出现少量左氧氟沙星耐药株,未检出万古霉素和奎奴普汀/达福普汀耐药株。PRSP、PISP 对阿莫西林、头孢噻肟的耐药率显著高于 PSSP,差异有统计学意义($P<0.01$)。按照 2015 年 CLSI 肺炎链球菌非脑膜炎株标准^[3],对 PSSP、PISP、PRSP 耐药率进行比较,见表 1。

表 1 儿童患者中肺炎链球菌非脑膜炎株对抗菌药物的耐药率(%)

抗菌药物	PSSP (n=320)	PISP (n=2)	PRSP (n=5)	合计 (n=327)
青霉素 G	0.0	0.0	100.0	1.5
阿莫西林	5.0	100.0	100.0	7.0
头孢噻肟	6.6	100.0	80.0	8.3
左氧氟沙星	0.6	0.0	0.0	0.6
万古霉素	0.0	0.0	0.0	0.0
奎奴普汀/达福普汀	0.0	0.0	0.0	0.0
氟霉素	5.6	0.0	40.0	6.1
复方磺胺甲噁唑	76.3	100.0	100.0	76.8
红霉素	94.7	100.0	100.0	94.8
克林霉素	90.9	100.0	100.0	91.1
四环素	86.9	100.0	100.0	87.2

2.4 菌株的多重耐药情况 共分离出多重耐药肺炎链球菌 227 株(69.4%),以红霉素、四环素、复方磺胺甲噁唑和克林霉素多重耐药为主(46.2%),其次是红霉素、四环素和复方磺胺甲噁唑多重耐药(11.0%),

所有多重耐药菌株均对红霉素耐药。

3 讨 论

本研究共分离到 327 株肺炎链球菌,从患儿年龄、性别分布看,肺炎链球菌主要感染 3 岁以下婴幼儿,且男性多于女性,与 OKADA 等^[4]报道的 3 岁以下婴幼儿占 66.6%,男性占 58.8%相近。分析原因主要为 3 岁以下婴幼儿免疫系统发育不完全,免疫力相对较低,容易出现感染,但随着年龄增大,自身抗体的产生,感染率会逐渐下降。从患儿标本来源看,该菌主要分离自痰液,表明该菌是引起儿童呼吸道感染特别是社区获得性肺炎的重要病原菌。其次从耳分泌物和鼻窦穿刺液分离,有文献报道高达 70%的急性中耳炎患者可从耳分泌物中分离出病原菌,50%感染由肺炎链球菌引起^[5]。有学者建议鼻咽部是一个重要的急性中耳炎细菌库,推荐取鼻咽拭子进行培养,以确定中耳炎感染的病原菌,并选择适当的抗菌药物进行治疗^[6-7]。从感染季节分布看,本院的肺炎链球菌感染未受到季节的影响,该菌全年散发,无季节优势,这与文献报道的肺炎链球菌感染主要集中在冬春季节不一致^[8],原因可能与本地区四季不太分明,温差变化不大有关。

值得关注的是多重耐药肺炎链球菌在本院较为普遍,PSSP、PISP、PRSP 对阿莫西林、头孢噻肟的耐药率存在差别,与文献报道的结果接近^[1,9-10]。多重耐药肺炎链球菌是指对 3 种或 3 种以上抗菌药物耐药。细菌的多重耐药性及 PSSP、PISP、PRSP 对部分抗菌药物的耐药性存在差别与其复杂的耐药机制有关。

肺炎链球菌对青霉素和头孢菌素等 β -内酰胺类抗生素的主要耐药机制细菌细胞壁上的青霉素结合蛋白(PBPs)发生结构改变,使其与抗菌药物的亲和力下降,导致其对抗菌药物不敏感或耐药^[9]。本院肺炎链球菌对青霉素 G 的耐药率为 1.5%,低于 2015 年中国 CHINET 细菌耐药性监测网报道的儿童患者青霉素 G 耐药率(7.2%)^[11]。青霉素 G 对肺炎链球菌具有优良的抗菌活性,是治疗该菌感染的一种价廉而有效的药物。值得关注的是,5 株 PRSP 分离自 1~2 岁患儿的痰液标本,其对青霉素 G 的耐药性处于较高水平(MIC 为 64~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。OKADA 等^[4]研究表明患儿年龄、有兄弟姐妹、经验使用过抗菌药物可能是 PRSP 感染的高危因素^[4]。

肺炎链球菌对红霉素的耐药与 erm 基因介导的核糖体甲基化修饰和 mef 基因介导的主动外排有关,核糖体甲基化修饰可降低细菌与红霉素的结合能力,并介导对所有大环内酯类、林可酰胺类和链阳菌素 B 高水平耐药即 MLSB^[1,12]。本研究中,肺炎链球菌对红霉素和克林霉素的耐药率大于 90%,与 2015 年中国 CHINET 细菌耐药性监测网报道接近^[11]。来自亚洲耐药监测网(ANSORP)报道显示,亚洲国家和地区

肺炎链球菌对大环内酯类的耐药率高于西方国家,中国、中国香港、日本、韩国、马来西亚、斯里兰卡、中国台湾、泰国、越南具有非常高的肺炎链球菌 MIC₉₀(64~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^[1]。研究表明,ermB 基因和 mefA 基因单独或同时表达均可导致红霉素耐药,红霉素已不是治疗肺炎链球菌感染的有效药物^[1,13]。

细菌携带二氢叶酸合成酶的编码基因,或同时携带二氢叶酸还原酶的编码基因,是复方磺胺甲噁唑耐药的主要机制^[14]。复方磺胺甲噁唑目前在临床并非常用药物,耐药性如此高的原因值得深究。由四环素耐药基因 tetM 和 tetO 介导的核糖体保护作用是肺炎链球菌对四环素的耐药机制^[15]。本研究中,肺炎链球菌对左氧氟沙星的耐药率仍然很低,与国内文献报道接近^[11]。氟喹诺酮类的耐药机制与 DNA 促旋酶和 DNA 拓扑异构酶 IV 的 1 个或多个基因突变,导致相应的氨基酸替代,使药物不能有效地与靶位结合导致耐药有关^[16]。本研究未检出万古霉素和奎奴普丁/达福普汀耐药的肺炎链球菌。

综上所述,由于治疗儿童肺炎链球菌感染的药物有限, β -内酰胺类和大环内酯类是主要选择,因此对儿童肺炎链球菌进行耐药性监测不容忽视。目前该菌对红霉素的耐药率极高,已不能用于儿童患者的经验性治疗;青霉素 G 的耐药性较低,仍是治疗肺炎链球菌感染价廉而有效的药物。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 654-658.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-five informational supplement [S]. Wayne PA, USA: CLSI, 2015.
- [4] OKADA T, SATO Y, TOYONAGA Y, et al. Nationwide survey of Streptococcus pneumoniae drug resistance in the pediatric field in Japan[J]. Padiatr Int, 2016, 58(3): 192-201.
- [5] Taylor S, Marchisio P, Vergison A, et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccination on otitis media: a systematic review[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(12): 1765-1773.
- [6] SLUIJTER M, FADEN H, DE GROOT R, et al. Molecular characterization of pneumococcal nasopharynx isolates collected from children during their first 2 years of life [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(8): 2248-2253.
- [7] FADEN H, DUFFY L, WASIELEWSKI R, et al. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children [J]. J Infect Dis, 1997, 175(6): 1440-1445.

异,两者的核小体和 P-Prot 抗体滴度存在显著不同,对 SLE 诊断、治疗靶点选取具有重要意义。

参考文献

- [1] 彭赛蛟,陶锡东,王敏. 不同自身抗体联合检测在系统性红斑狼疮中的诊断价值[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(6):831-833.
- [2] KELLY-WORDEN M, HAMMER L, GEBHARD R, et al. Anti-nuclear antibodies positive serum from systemic lupus erythematosus patients promotes cardiovascular manifestations and the presence of human antibody in the brain[J]. J Pharm Bioallied Sci, 2014, 6(3):198-204.
- [3] 陈展泽,戴伟良,邱志琦,等. 系统性红斑狼疮患者活动期血清中的抗核抗体不同模式表达的探究[J]. 实用医技杂志, 2016, 23(7):703-705.
- [4] FRITZLER M J, STEBER W, LUPTON T, et al. Serological features of systemic lupus erythematosus diagnosed after referral through a rheumatology triage system because of positive antinuclear antibodies[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(S1):1-23.
- [5] LI T, PROKOPEC S D, MORRISON S, et al. Anti-nucleosome antibodies outperform traditional biomarkers as longitudinal indicators of disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology, 2015, 54(3):449-457.
- [6] CARMONA-FERNANDES D, SANTOS M J, CANHAO H, et al. Anti-ribosomal P protein IgG autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus: diagnostic performance and clinical profile[J]. BMC medicine, 2013, 11(1):98.
- [7] NOVAK G V, MARQUES M, BALBI V, et al. Anti-RO/SSA and anti-La/SSB antibodies: Association with mild lupus manifestations in 645 childhood-onset systemic lupus erythematosus[J]. Autoimm Rev, 2017, 16(2):132-135.
- [8] PRADHAN V D, BADA KERE S S, BICHILE L S, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical associations and correlation with other autoantibodies[J]. J Assoc Physic India, 2004, 52:533-537.
- [9] COZZANI E, DROSERA M, GASPARINI G, et al. Serology of lupus erythematosus: correlation between immunopathological features and clinical aspects[J]. Autoimmune Dis, 2014, 2014:321-359.
- [10] GUPTA N, DOSS J K, MOHAN H, et al. AB0149 Associations of Anti Nucleosome Antibody in Systemic Lupus Erythematosus in India[J]. Ann Rheumatic Dis, 2016, 75(Suppl 2):947-947.
- [11] FRITZLER M J, STEBER W, LUPTON T, et al. Serological features of systemic lupus erythematosus diagnosed after referral through a rheumatology triage system because of positive antinuclear antibodies[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(S1):1-23.
- [12] PIETERSE E, HOFSTRA J, BERDEN J, et al. Acetylated histones contribute to the immunostimulatory potential of neutrophil extracellular traps in systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exper Immunol, 2015, 179(1):68-74.

(收稿日期:2017-09-16 修回日期:2017-11-06)

(上接第 1240 页)

- [8] 吴乃胜,陈亚萍,刘坤鹏,等. 支气管肺炎患儿医院感染病原体分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(8):1884-1886.
- [9] 龚松迪,华春珍,李建平,等. 2006—2014 年本院 1 109 例肺炎链球菌感染及其耐药模式分析[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(11):859-864.
- [10] 董方,甄景慧,王艳,等. 住院患儿细菌培养标本分离肺炎链球菌特征分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2016, 31(3):201-205.
- [11] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2015 中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(6):685-694.
- [12] 王娟,甄冰红,罗晓琴,等. 多重耐药肺炎链球菌肺炎的危险因素及细菌耐药性分析[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(23):5030-5032.
- [13] 张璟,孙自镛. 肺炎链球菌对红霉素耐药机制的研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2007, 36(2):243-245.
- [14] 孙海平,李宁. 多重耐药大肠埃希菌复方新诺明耐药相关基因研究[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(5):42-43.
- [15] 杨锦红,周义正,刘立雪,等. 儿童肺炎链球菌红霉素、四环素相关耐药基因的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(5):866-868.
- [16] 徐敏,张建华,臧国庆. 肺炎链球菌对抗菌药物耐药机制研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(2):152-156.

(收稿日期:2017-09-28 修回日期:2017-11-08)