

无乳链球菌和化脓性链球菌对氟喹诺酮类
抗生素的耐药性及耐药机制的研究



论文作者签名: 杨旭东

指导教师签名: 洪永

论文评阅人 1: 王贤军 教授 杭州市第一人民医院

评阅人 2: _____

评阅人 3: _____

评阅人 4: _____

评阅人 5: _____

答辩委员会主席: 陈卫良 副教授 浙江大学生物技术研究所

委员 1: 张 钧 教授 浙江大学医学院附属邵逸夫医院

委员 2: 杨 青 副教授 浙江大学医学院附属第一医院

委员 3: 陈学军 教授 浙江大学医学院附属儿童医院

委员 4: 吕火祥 教授 浙江省人民医院

委员 5: _____

答辩日期: 2013.12.2



浙江大学研究生学位论文独创性声明

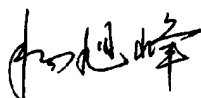
本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

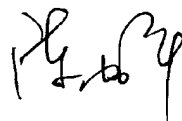
学位论文作者签名:  签字日期: 2013 年 12 月 3 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名: 

导师签名: 

签字日期: 2013 年 12 月 3 日

签字日期: 2013 年 12 月 3 日

致 谢

本论文是在我的导师陈功祥教授的亲切关怀和悉心指导下完成的。他严肃的科学态度，严谨的治学精神，精益求精的工作作风，深深地感染和激励着我。在这里特别感谢张嵘老师，从课题的选择到项目的最终完成，张嵘老师都始终给予我细心的指导和不懈的支持。

这里还要感谢周宏伟，蔡加昌，胡燕燕，池丹，张晓飞几位师兄妹，在此期间给予我无私的帮助。

在论文即将完成之际，我的心情无法平静，从开始进入课题到论文的顺利完成，有多少可敬的师长、同学、朋友给了我无言的帮助，在这里再次请接受我诚挚谢意！

第一部分 无乳链球菌对氟喹诺酮类 抗生素耐药性及耐药机制的研究

浙江大学医学院

临床检验诊断学

硕士研究生

杨旭峰

导

师

陈功祥 教授

中文摘要

目的:

研究分离自浙江和台湾地区无乳链球菌的耐药性的差异以及喹诺酮不敏感无乳链球菌的耐药机制,为临床上合理使用抗菌药物提供理论依据。

方法:

采用 Vitek2 Compact 全自动细菌鉴定和药敏系统对无乳链球菌进行鉴定,并用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) 进行确认。采用 Vitek2 Compact 全自动细菌鉴定和药敏系统对菌株 MIC 进行测定,统计细菌对 9 种抗生素的敏感率,并用卡方检验和 fisher 确切概率法对两地区的敏感率进行统计分析。用 PCR 分别扩增喹诺酮类耐药菌株的 *parC* 和 *gyrA* 基因,并进行测序和序列分析。

结果:

本研究共收集 60 株无乳链球菌,30 株来自于台湾地区,30 株来自于浙江地

区。其中 45 株来自待产产妇和正常体检妇女的阴道及阴道后穹隆分泌物标本, 7 株来自待产产妇的羊水, 2 株来自精液, 6 株来自尿液。台湾地区和浙江地区分离的无乳链球菌对青霉素敏感率分别为 96.7%和 100.0%, 对头孢吡肟敏感率分别为 86.7%和 93.3%, 对红霉素敏感率均为 13.3%, 对左氧氟沙星敏感率均为 70.0%, 两地区无乳链球菌对 9 种抗生素的敏感率均无统计学差异。18 株左氧氟沙星不敏感菌株中 14 株无乳链球菌的 *parC* 或 *gyrA* 基因存在突变, 突变类型以 *parC* 基因的 Ser79Tyr 和 *gyrA* 基因的 Ser81Leu 突变为主。

结论:

台湾和浙江地区分离的无乳链球菌对临床常用抗生素的敏感率相似。分离自台湾和浙江的左氧氟沙星不敏感菌株 *parC* 和 *gyrA* 基因的突变类型均以 Ser79Tyr 和 Ser81Leu 突变为主。

【关键词】 无乳链球菌; 耐药性; 喹诺酮类

Part I Antimicrobial susceptibility analysis and mechanisms for fluoroquinolones of *Streptococcus agalactiae*

Zhejiang University School of Medicine

Postgraduate: Xu FengYiang

Supervisor: Chen Gongxiang

Abstract

Objective:

To investigate the antimicrobial susceptibility and mechanisms for quinolones of *Streptococcus agalactiae* from Taiwan and Zhejiang Province, to provide theoretical basis for clinical rational use of antimicrobial agents.

Methods:

The clinical isolates were identified by Vitek2 Compact automated microbiology system, and then confirmed by Matrix-Assisted Laser Desorption/IonizationTime of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Antibiotic susceptibilities were determined by Vitek2 Compact automated microbiology system. Susceptibilities rates of 9 antibiotics for isolates from Taiwan and Zhejiang were analyzed by chi square test and fisher's exact test. Antimicrobial resistance genes of quinolones in *S. agalactiae* such as *parC* and *gyrA* were investigated by PCRs and DNA analysis.

Results:

Sixty *S. agalactiae* strains were collected, 30 strains were from Taiwan and 30

strains from Zhejiang. Of which 45 were from the normal examination of maternal and women's vagina and vaginal fornix secretion samples, 7 cases of amniotic fluid from maternal, 2 cases from the semen, 6 from urine. Susceptibilities rates for penicillin of Taiwan and Zhejiang were 96.7% and 100%, those for cefepime were 86.7% and 93.3%, those for erythromycin were 13.3%, and those for levofloxacin were 70.0%. There were no statistical significance between susceptibilities rates of Taiwan and Zhejiang. Amine acid substitutions were detected in *parC* and *gyrA* genes in 14 of 18 levofloxacin-non-susceptible isolates. The predominant mutation type was the combination of Ser79Tyr and Ser81Leu mutation in *parC* and *gyrA* genes.

Conclusions:

The susceptibilities rates for common antibiotics of *S. agalactiae* from Taiwan and Zhejiang were similar. Ser79Tyr and Ser81Leu mutation were the main types in *parC* and *gyrA* genes in both of Taiwan and Zhejiang.

【Key words】 *Streptococcus agalactiae* ; drug resistance; quinolones

第二部分 化脓性链球菌对氟喹诺酮类 抗生素耐药性及耐药机制的研究

中文摘要

目的:

研究环丙沙星不敏感化脓性链球菌的耐药性及其耐药机制,并对这些菌株的同源性进行分析,为院感控制提供依据。

方法:

用 API 20 Strep 链球菌鉴定系统对 2012 年 3 月北京地区分离自猩红热患者的 48 株链球菌进行鉴定,同时采用基质辅助激光解析电离解析飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 进行进一步鉴定。采用琼脂稀释法检测环丙沙星及临床常用 7 种抗生素的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。对环丙沙星 MIC ≥ 4 mg/L 的化脓性链球菌检测氟喹诺酮染色体介导的耐药基因 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 的突变,同时以环丙沙星 MIC ≤ 0.25 mg/L 的化脓性链球菌做比对。采用脉冲场凝胶电泳(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)对分离自北京不同地区的菌株进行同源性分析。

结果:

经 API 20 Strep 链球菌鉴定系统和 MALDI-TOF MS 的鉴定,48 株链球菌均为化脓性链球菌。其对左氧氟沙星、氨苄西林和青霉素的敏感率均为 100%。对四环

素、红霉素和克林霉素的耐药率分别为 91.7%、91.7%和 89.6%。环丙沙星、左氧氟沙星和莫西沙星的 MIC₅₀ 分别为 2 mg/L、1 mg/L 和 ≤ 0.25 mg/L; MIC₉₀ 分别为 4 mg/L、2 mg/L 和 0.5 mg/L。48 株化脓性链球菌中有 12 株对环丙沙星 MIC 为 4 mg/L, 1 株 MIC 为 8 mg/L, 菌株来自北京朝阳区。对这 13 株喹诺酮类耐药基因检测结果显示, 12 株在 *parC* 基因上出现 79 位丝氨酸突变为苯丙氨酸或酪氨酸 (Ser79Phe/Tyr), 10 株在 *parC* 基因的 121 位出现丙氨酸突变为缬氨酸 (Ala121Val)。发现 1 株在 *parC* 基因上 Ser79Phe 突变合并 *parE* 基因上 371 位丝氨酸突变为亮氨酸 (Ser371Leu) 的化脓性链球菌, 但该菌株对环丙沙星的 MIC 未显著增高 (MIC=4 mg/L)。17 株试验菌株的 PFGE 结果显示为 7 个克隆, 其中克隆 A 均为环丙沙星 MIC ≥ 4 mg/L 的菌株, 主要分布在朝阳区、大兴区、丰台区、顺义区和石景山区, 占 MIC ≥ 4 mg/L 菌株的 69.2%。克隆 C 菌株也为环丙沙星 MIC ≥ 4 mg/L 菌株, 均分布在怀柔地区。克隆 B、D、E、F 和 G 分别分散在不同地区。

结论:

parC 基因突变是北京地区分离的化脓性链球菌对环丙沙星 MIC 略有升高的主要原因, PFGE 分析显示化脓性链球菌感染在北京部分地区有小范围流行。

【关键词】 化脓性链球菌; 环丙沙星; 基因突变; 同源性分析

Part II Antimicrobial susceptibility analysis and mechanisms for fluoroquinolones of *Streptococcus pyogenes*

Abstract

Objective:

To investigate the antimicrobial susceptibility and mechanisms for quinolones of *Streptococcus pyogenes* and to analysis the homology of the strains.

Methods:

The clinical isolates were identified by API 20 Strep identification system, and then confirmed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Minimum inhibitory concentration (MIC) to ciprofloxacin and other 7 common antibiotics in clinic were detected by using blood M-H agar dilution method. Isolates of MICs ≥ 4 mg/L against ciprofloxacin were detected for mutations of Fluoroquinolone resistance genes such as *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*. At the same time, 4 isolates, with MIC ≤ 0.25 mg/L against ciprofloxacin, were used for comparison. Homology analysis of 17 isolates from different areas of Beijing was performed by using the method of pulsed field gel electrophoresis.

Results:

The identification results of API 20 Strep Identification System and MALDI-TOF MS indicated that all of the 48 strains were *S. pyogenes*. Sensitive rates of *S. pyogenes* to levofloxacin, ampicillin and penicillin were all 100%. The resistance rates to tetracycline, erythromycin and clindamycin were 91.7%, 91.7% and 89.6%, respectively.

MIC₅₀ of ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin was 2 mg/L, 1 mg/L and ≤ 0.25 mg/L, MIC₉₀ was 4 mg/L, 2 mg/L and 0.5 mg/L, respectively. Of the 48 isolates of *S. pyogenes*, 12 isolates showed the MIC at 4 mg/L, while one isolate has a MIC against ciprofloxacin at 8mg/L, which isolated from Chaoyang district. Analysis of sequence of chromosome mediated quinolones resistance genes in those 13 ciprofloxacin non-susceptible isolates exhibited that there were 12 isolates that harbored Ser79Phe/Tyr mutation and 10 isolates which harbored Ala121Val in *parC* gene. It is shown that an isolate contained Ser79Phe mutation in *parC* gene in the occurring of Ser371Leu mutation in *parE* gene for the first time, but there was no marked raise to ciprofloxacin MIC (MIC=4 mg/L). There were no mutations in *gyrA* and *gyrB* genes. The PFGE results demonstrated that the 17 tested isolates could be divided into 7 clones. The clone A isolates from Chaoyang, Daxing, Fengtai, Shunyi and Shijingshan district have a MIC ≥ 4 mg/L against ciprofloxacin, which covered 69.2% of all MIC ≥ 4 mg/L isolates. The clone C isolates from Huairou district were MIC ≥ 4 mg/L isolates. B, D, E, F and G clones isolates come from different districts.

Conclusion:

The mutation of *parC* gene was the main reason that contribute to the slightly increase of ciprofloxacin MIC in *S. pyogenes* isolated from Beijing districts. The PFGE analysis showed that there was a small scale prevalence caused by the infection of *S. pyogenes* in some districts.

【 Key words 】 *Streptococcus pyogenes*; Ciprofloxacin; Gene mutation; Homology analysis

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry	基质辅助激光解吸电离飞 行时间质谱
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核苷酸
<i>gyrA</i>	Subunit A of DNA gyrase	DNA 解旋酶 A 亚单位
<i>parC</i>	Subunit C of DNA topoisomerase	DNA 拓扑异构酶 C 亚单位
MIC	Minimum inhibitory concentration	最低抑菌浓度
<i>gyrB</i>	Subunit B of DNA gyrase	DNA 解旋酶 B 亚单位
<i>parE</i>	Subunit E of DNA topoisomerase	DNA 拓扑异构酶 E 亚单位
MIC ₅₀	50% Minimum inhibitory concentration	50%最低抑菌浓度
MIC ₉₀	90% Minimum inhibitory concentration	90%最低抑菌浓度
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis	脉冲场凝胶电泳

目 次

致 谢.....	I
第一部分 无乳链球菌对氟喹诺酮类抗生素耐药性及耐药机制的研究	II
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
第二部分 化脓性链球菌对氟喹诺酮类抗生素耐药性及耐药机制的研究	VI
中文摘要.....	VI
Abstract.....	VIII
缩略词表.....	X
第一部分无乳链球菌对氟喹诺酮类抗生素耐药性及耐药机制的研究	1
1. 前 言.....	1
2. 材料与方法.....	2
3. 结 果.....	7
4. 讨 论.....	10
5. 结 论.....	12
参考文献.....	13
第二部分 化脓性链球菌对氟喹诺酮类抗生素耐药性及耐药机制的研究	16
1. 前 言.....	16
2. 材料与方法.....	17
3. 结 果.....	23
4. 讨 论.....	27

5.结 论	29
参考文献	30
综 述	32
作者简历及在学期间所取得的科研成果	43

第一部分 无乳链球菌对氟喹诺酮类

抗生素耐药性及耐药机制的研究

浙江大学医学院

临床检验诊断学

硕士研究生

杨旭峰

导 师

陈功祥 教授

1. 前 言

无乳链球菌亦称B群链球菌(Group B Streptococcus, GBS)正常寄居于妇女阴道和人体肠道,是围产期妇女感染的主要致病菌。已证实新生儿无乳链球菌感染(尤其是早发型感染)与母亲孕期或分娩时生殖系统携带无乳链球菌有关,已引起国内外学者高度重视。同时也可引起免疫低下人群菌血症、心内膜炎、皮肤和软组织感染以及骨髓炎^[1-3]。目前治疗GBS感染多选用β内酰胺类抗生素,对有过敏体质或轻微感染患者,常用大环内酯类抗生素替代。然而,近几年无乳链球菌对大环内酯类抗生素耐药率逐年增加^[4-5]。2003年Yoshiaki等首次报道了对喹诺酮耐药的无乳链球菌^[6],随后在美国,西班牙,巴西等国也相继分离到对喹诺酮耐药的无乳链球菌^[7-9]。无乳链球菌对红霉素的最主要的耐药机制是erm基因调控的靶基因的甲基化和mef基因介导的外排泵机制^[2];处于喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region, QRDR)上的gyrA、parC基因突变,是引起无乳链球菌对喹诺酮类药物耐药的主要原因^[6]。然而,国内关于无乳链球菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究非常少见。本研究收集了60株浙江和台湾地区分离的无乳链球菌,比较分析其临床常用抗生素的耐药情况,并对喹诺酮类药物的耐药机制进行了研究。

2 材料与amp;方法

一、材料

1、菌株来源:

无乳链球菌 60 株, 标本来源于 2012 年 1 月-6 月采集于台湾地区 (30 株)、浙江地区 (30 株)。45 株来自待产产妇和正常体检妇女的阴道及阴道后穹隆分泌物标本, 7 株来自待产产妇的羊水, 2 株来自精液, 6 株来自尿液。

标准菌株: 大肠埃希菌 DH5 α , 作为基质辅助激光解析电离飞行时间质谱的标准菌株。

2、主要仪器:

(1) HFsafe1200 生物安全柜: HEAL FORCE 公司;

(2) 细菌恒温培养培养箱: 美国 Thermo 公司;

(3) MALDI-TOF MS 仪: 德国 Bruker Daltonics 公司;

(4) Legend Micro 17R 离心机: Thermo 公司;

(5) PCR 扩增仪: 德国 Biometra 公司;

(6) DYY-11 型电泳仪: 北京市六一仪器厂;

(7) DNAMAN 6.0: 美国 Lynnon Biosoft 公司;

(8) UVIpro 紫外成像仪: 德国 Whatman Biometra 公司;

(9) 微量移液枪: 德国 eppendorf 公司;

(10) Vitek2 Compact 全自动细菌鉴定和药敏系统: 法国生物梅里埃公司

3、培养基和试剂:

(1)培养基: 哥伦比亚血琼脂平板、中国蓝平板和巧克力平板购自杭州威晟生物科技有限公司

(2)MALDI-TOF MS 标准分子量蛋白 I 及多肽: 德国 Bruker Daltonics 公司;

(3)MALDI-TOF MS 所用试剂如三氟乙酸(TFA)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、色谱纯乙腈、甲酸、无水乙醇: 美国 Sigma 公司;

(4) 基因组提取试剂盒: 上海泽衡生物技术有限公司;

(5) Taq 酶及 PCR 反应相关试剂: 日本 Takara 公司;

(6) PCR 反应管: 美国 Axygen 公司;

(7) 5 $\times$ TBE 电泳缓冲液: 称取 54gTris 碱, 27.5g 硼酸溶于 500ml 蒸馏水中, 加入 20ml 的 0.5mol/L 的 EDTA (pH8.0) 混匀, 补加纯水至 1000ml,室温保存, 使用时量取 100ml, 用纯水稀释成 1000ml.

(8) 引物: 耐药基因测序引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列如下:

基因引物	序列	片段长度	退火温度
<i>gyrA</i>	5'-GGTTTAAACCTGTTTCATCGTCGT-3'	407 bp	48 $^{\circ}$ C
	5'- GCAATACCAGTTGCACCAT TGACT-3'		
<i>parC</i> ,	5'- CCGGATATTCGTGATGGCTT-3'	403 bp	48 $^{\circ}$ C
	5'-TGACTAAAAGATTGGGAAAGGC-3'		

(9)Vitek2 Compact 阳性球菌鉴定/药敏卡: 法国生物梅里埃公司

二、方法

1、菌株鉴定:

采用 Vitek2 Compact 全自动细菌鉴定和药敏系统对无乳链球菌进行鉴定。

2、MALDI-TOF MS 鉴定菌株:

(1) 细菌灭活: 挑取 2-3 个中等大小菌落于 1.5ml 离心管中, 加入 300 μ l 蒸馏水混匀, 然后加入 900 μ l 无水乙醇混匀, 12,000 g 离心 2 min;

(2) 提取蛋白: 离心后完全去除上层乙醇, 下层沉淀加入 50 μ l 70%甲酸混匀, 然后加入 50 μ l 乙腈混匀, 12,000 g 离心 2 min;

(3) 加样: 离心后取上清 1 μ l 点样于 96 孔加样板, 样品空气干燥后加入 1 μ l 基质 HCCA 覆盖加样的位置;

(4) 校准定标: 每次实验前需对仪器进行校准定标, 标准蛋白采用配制的混合蛋白 CPS (按标准蛋白 I 与多肽比例为 4: 1 配制);

(5) 质谱分析和鉴定比对: 质谱仪使用线性正性模式。使用 355 nm 波长以最大频率(60 Hz)采集 2000-20000 Da 范围内的样品蛋白图谱, 每个样品的激光轰击次数为 100 次; 仪器具体参数设置如下: 加速电压 20 kV, 提取电压 18.6 kV, 聚焦电压 6.5 kV, 延迟提取时间 150 ns。样品的质量图谱图通过 Bruker Biotyper 3.0 软件与数据库进行比较, 并用匹配分值来量化结果, 同时给出最终鉴定结果。

2、药物敏感性试验

采用 Vitek2 Compact 全自动细菌鉴定和药敏系统对菌株 MIC 进行测定, 判读标准参照美国临床实验室标准委员会 (CLSI, 2011) ^[10]。

3、耐药基因 PCR:

扩增 24 株无乳链球菌的 *gyrA* 和 *parC* 基因 (其中左氧氟沙星耐药 16 株、中介耐药 2 株、敏感 6 株)。

PCR 反应体系如下:

10×buffer	5μl
10μM dNTP	4μl
上游引物	1μl
下游引物	1μl
Taq 酶 (5u/μl)	0.25μl
模板 DNA	2μl
加双蒸水至	50μl

基因扩增条件如下:

1	94℃ 预变性	5min	
	94℃	45s	
2	48℃	50s	共循环 30 次反应
	72℃	45s	
3	72℃	5min	

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外成像系统观察结果, 目标条带大小为 500 bp 左右。

4、测序比对:

PCR 扩增产物送至上海生物工程股份有限公司进行测序, 测序结果导入 DNAMAN 软件对比分析。

5、数据统计分析:

数据采用卡方检验和 fisher 确切概率法, 用 SPSS11.5 进行分析。

3 结 果

1、菌种鉴定

无乳链球菌: Vitek2 Compact 全自动细菌鉴定和药敏系统鉴定来自台湾和浙江共 60 株无乳链球菌结果均为无乳链球菌。MALDI-TOF MS 鉴定结果全部显示为无乳链球菌,分值为 2.0~2.3,2.3~3.0,分别提示为: secure genus identification, probable species identification。两种方法的鉴定结果完全相符。

2、药物敏感性试验

左氧氟沙星、红霉素及临床常用 9 种抗生素的结果见表 1。从表 1 可见无乳链球菌对 β 内酰胺类抗生素的敏感率较高,台湾、浙江地区对青霉素敏感率分别为 96.7%和 100.0%,对头孢吡肟敏感率分别为 86.7%和 93.3%。对红霉素敏感率均为 13.3%,对左氧氟沙星敏感率均为 70.0%。数据采用卡方检验和 fisher 确切概率法,用 SPSS11.5 进行分析。九种抗生素的 P 值均大于 0.05,差异无统计学意义。

表 1 60 株无乳链球菌对临床常用抗生素的药敏情况和统计分析结果

抗生素	台湾地区 (n=30)		浙江地区 (n=30)		P	χ^2
	敏感率(%)	不敏感率(%)	敏感率(%)	不敏感率(%)		
左氧氟沙星	70.0(21/30)	30.0(9/30)	70.0(21/30)	30.0(9/30)	-	-
四环素	10.0(3/30)	90(27/30)	16.7(5/25)	83.3(25/30)	1.000	/
红霉素	13.3(4/30)	86.7(26/30)	13.3(4/30)	86.7(26/30)	1.000	/
克林霉素	36.7(11/30)	63.3(19/30)	26.7(8/30)	73.3(22/30)	0.405	0.693
美罗培南	93.3(28/30)	6.7(2/30)	96.7(29/30)	3.3(1/30)	1.000	/
氯霉素	70.0(21/30)	30.0(9/30)	80.0(24/30)	20.0(6/30)	0.371	0.800
头孢吡肟	86.7(26/30)	13.3(4/30)	93.3 (28/30)	6.7(2/30)	0.671	/
青霉素	96.7(29/30)	3.3/(1/30)	100(30/30)	0	-	-
万古霉素	100(30/30)	0	100(30/30)	0	-	-

注:“-”表示未进行统计学分析;“/”表示该数据采用 fisher 确切概率法进行统计分

析，只有 P 值没有 χ^2 值

3、喹诺酮类耐药基因检测

24 株无乳链球菌（包括左氧氟沙星耐药 16 株、中介耐药 2 株、敏感 6 株）的 *parC* 和 *gyrA* 基因序列与敏感株的比对结果见表 2: 18 株左氧氟沙星不敏感菌株(台湾和浙江各 9 株) 有 14 株无乳链球菌的 *parC* 或 *gyrA* 基因存在突变。大部分菌株（10/14）的 *parC* 和 *gyrA* 基因具有相同的突变模式: Ser79/Tyr 和 Ser81/Leu 突变，即 *parC* 基因的 79 位出现丝氨酸突变为酪氨酸（Ser79/Tyr）和 *gyrA* 基因的 81 位出现丝氨酸突变为亮氨酸(Ser81/Leu)，2 株无乳链球菌存在 Ser79/Phe 和 Ser81/Leu 突变，1 株无乳链球菌存在 *parC* 基因 Ser79/Tyr 突变，1 株无乳链球菌存在 *gyrA* 基因 Ser81/Leu 突变。左氧氟沙星敏感的 6 株无乳链球菌的 *parC* 和 *gyrA* 基因均无突变。

表 2 24 株无乳链球菌的来源、氟喹诺酮类药敏结果以及基因序列比对结果

来源	序号	编号	左氧氟沙星 药敏结果	<i>parC</i> 基因	<i>gyrA</i> 基因
台湾	1	737	S	-	-
台湾	2	788	S	-	-
台湾	3	934	S	-	-
台湾	4	1113	R	-	-
台湾	5	1192	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu
台湾	6	1319	R	-	-
台湾	7	1492	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu
台湾	8	1679	I	-	-
台湾	9	1749	R	Ser79/Phe	Ser81/Leu
台湾	10	1798	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu
台湾	11	2272	R	-	-
台湾	12	2280	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu

嘉兴	13	S1	S	-	-
嘉兴	14	S3	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu
嘉兴	15	S8	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu
嘉兴	16	S9	R	-	Ser81/Leu
嘉兴	17	S11	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu
嘉兴	18	S12	S	-	-
嘉兴	19	S13	S	-	-
嘉兴	20	S15	R	Ser79/Phe	Ser81/Leu
嘉兴	21	S17	I	Ser79/Tyr	Ser81/Leu
嘉兴	22	S22	R	Ser79/Tyr	-
杭州	23	1	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu
杭州	24	120411074	R	Ser79/Tyr	Ser81/Leu

注：“-”表示无突变，Ser 表示丝氨酸，Phe 表示苯丙氨酸，Tyr 表示酪氨酸，Leu 表示亮氨酸

4 讨论

无乳链球菌是围产期妇女和新生儿感染的主要病原菌,在美国和欧洲,新生儿感染无乳链球菌发生菌血症、肺炎和脑膜炎的死亡率达到 4~6%。无乳链球菌亦引起皮肤和软组织感染、尿路感染、菌血症、肺炎、心内膜炎、骨髓炎等疾病,尤其是糖尿病、肿瘤患者感染的重要病原^{[1][13]}。然而,在国内围产期妇女无乳链球菌的检测没有受到足够的重视。

无乳链球菌对红霉素、四环素、克林霉素一直保持较高耐药率^[2,4]。本研究中无乳链球菌对红霉素、四环素、克林霉素的耐药率为 60.0~86.7%,其中台湾地区和浙江地区红霉素耐药率分别为 86.7%和 80.0%,明显高于近两年文献报道的美国红霉素耐药率 50.7%^[4]、突尼斯红霉素耐药率 40.0%^[14]和国内深圳红霉素耐药率 60.1%^[14],提示大环内酯类抗生素耐药情况越来越严峻。青霉素和头孢吡肟对无乳链球菌的抗菌效果良好,与文献报道^[15]一致。青霉素类抗生素仍可以作为无乳链球菌感染治疗的首选药物。

本次研究台湾地区与浙江地区左氧氟沙星的耐药率分别为 30.0%和 33.3%,比国内赵明泽^[16]等报道北京 26.67%的耐药率和 Ueno 等^[17]报道的日本 18.4%的耐药率高。国内治疗无乳链球菌感染的孕妇和新生儿,并不使用喹诺酮类药物,然而喹诺酮类药物在临床和养殖业的应用非常广泛,细菌对这类药物的耐药性也在不断增加。有研究表明,环境中有的细菌携带一定比例的喹诺酮基因^[18],可能与无乳链球菌喹诺酮耐药率的增高有关。细菌对喹诺酮类药物耐药的机制,除了由含喹诺酮耐药基因的质粒介导引起以外,主要是由编码拓扑异构酶 A 亚基和 B 亚基的基因 (*gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE*) 突变引起。无乳链球菌对喹诺酮耐药的基因突变,文献报道主要为 *parC* 和 *gyrA* 基因的突变,主要突变类型为 *parC* 基因的 Ser79Phe 和 Ser79Tyr 突变以及 *gyrA* 基因的 Ser81Leu 突变^[3,6,7],然而国内缺少这方面数据。本研究中 18 株左氧氟沙星不敏感株中有 14 株存在 *parC* 和 *gyrA* 基因突变,以 Ser79Tyr 和 Ser81Leu 突变最为常见,其次为 Ser79Phe 和 Ser81Leu 突

变。

台湾地区和浙江地区分离的无乳链球菌对常用抗生素的敏感率相近，统计学分析也证实两者之间没有统计学差异。18株左氧氟沙星耐药菌株中，台湾和浙江各9株，*parC*和*gyrA*基因的突变类型虽然均以Ser79Tyr和Ser81Leu突变为主但略有不同。分离自浙江的菌株均存在突变，6株为Ser79Tyr和Ser81Leu突变，1株为Ser79Phe和Ser81Leu突变，1株为Ser79Phe突变，1株为Ser81Leu突变。分离自台湾的9株菌株有4株存在Ser79Tyr和Ser81Leu突变，1株为Ser79Phe和Ser81Leu突变。有3株耐药和1株中介耐药菌株未检测到*parC*和*gyrA*基因突变，可能存在*parE*和*gyrB*突变或者有其它的机制参与，有待进一步研究。

5 结 论

大部分左氧氟沙星耐药菌株的 *parC* 和 *gyrA* 基因具有相同的突变模式: Ser79/Tyr 和 Ser81/Leu 突变, 提示无乳链球菌对氟喹诺酮类药物耐药机制与 *parC* 和 *gyrA* 基因突变有关。

参考文献

- [1] Dogan B, Schukken YH, Santisteban C, et al. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(12): 5899-5906.
- [2] Marimon JM, Valiente A, Ercibengoa M, et al. Erythromycin resistance and genetic elements carrying macrolide efflux genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(12): 5069-5074.
- [3] Murayama SY, Seki C, Sakata H, et al. Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(6): 2650-2653.
- [4] Back EE, O'Grady EJ, Back JD. High rates of perinatal group B *Streptococcus* clindamycin and erythromycin resistance in an upstate New York hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(2): 739-742.
- [5] Chohan L, Hollier LM, Bishop K, et al. Patterns of antibiotic resistance among group B streptococcus isolates: 2001-2004. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2006, 2006: 57492.
- [6] Kawamura Y, Fujiwara H, Mishima N, et al. First *Streptococcus agalactiae* isolates highly resistant to quinolones, with point mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(11): 3605-3609.
- [7] Wehbeh W, Rojas-Diaz R, Li X, et al. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae*: epidemiology and mechanism of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(6): 2495-2497.

- [8] Miro E, Rebollo M, Rivera A, et al. [Streptococcus agalactiae highly resistant to fluoroquinolones]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2006, 24(9): 562-563.
- [9] Barros RR, Kegele FC, Paula GR, et al. Molecular characterization of the first fluoroquinolone resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Brazil. *Braz J Infect Dis*, 2012, 16(5): 476-478.
- [10] institute cals. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21th informational supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2011.
- [11] Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(11): 2562-2566.
- [12] Kataja J, Seppala H, Skurnik M, et al. Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(6): 1493-1494.
- [13] Corvec S, Illiaquer M, Touchais S, et al. Clinical features of group B *Streptococcus* prosthetic joint infections and molecular characterization of isolates. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(1): 380-382.
- [14] 艾辉, 宁克勤, 林宝虹等. 无乳链球菌的药敏结果分析及其感染的临床特征. *中外医学研究*, 2011, 9(35): 4-5.
- [15] Hraoui M, Boutiba-Ben Boubaker I, Rachdi M, et al. Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Tunisia. *J Med Microbiol*, 2012, 61(Pt 8): 1109-1113.
- [16] Betriu C, Culebras E, Rodriguez-Avial I, et al. In vitro activities of tigecycline against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*: mechanisms of macrolide and tetracycline resistance. *Antimicrob Agents*

- Chemother, 2004, 48(1): 323-325.
- [17] Ueno H, Yamamoto Y, Yamamichi A, et al. Characterization of group B streptococcus isolated from women in Saitama city, Japan. *Jpn J Infect Dis*, 2012, 65(6): 516-521.
- [18] Zhang R, Ichijo T, Huang YL, et al. High prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China. *Microbes Environ*, 2012, 27(2): 158-163.

第二部分 化脓性链球菌对氟喹诺酮类 抗生素耐药性及耐药机制的研究

1 前言

化脓性链球菌能产多种链球菌溶血素、M 蛋白和链激酶等多种致病因子。可引起急性咽炎、呼吸道感染、软组织感染等。还可引起猩红热、休克综合征、坏死性筋膜炎等疾病^[1]。2000 年 Yan 等^[2]首次报道了对氟喹诺酮耐药的化脓性链球菌,随后在美国,欧洲,日本等国也相继分离到对氟喹诺酮耐药的化脓性链球菌^[3-5]。至今,国内对氟喹诺酮类耐药的化脓性链球菌仍未见报道。处于喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region, QRDR)上的 *gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 基因突变,是引起化脓性链球菌对氟喹诺酮耐药的主要原因^[2,5]。由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码的 DNA 解旋酶(DNA gyrase)的两个亚基,以及由 *parC* 和 *parE* 基因编码的拓扑异构酶IV(Topoisomerase IV)的两个亚基的氨基酸序列发生变化,可使氟喹诺酮类药物的作用靶点发生改变,从而产生耐药。本研究收集北京地区 1 个月内分离的 48 株化脓性链球菌,检测其对 3 种氟喹诺酮类和 5 种其他临床常用抗生素的 MIC,检测 17 株(包括对环丙沙星 MIC $\leq$ 0.25 mg/L 的 4 株和 MIC $\geq$ 4 mg/L 的 13 株)化脓性链球菌的 *gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE* 基因的突变情况;同时采用脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)对这 17 株菌株进行同源性分析。

2 材料与方法

一、材料

1、菌株来源:

化脓性链球菌 48 株, 标本来源为 2011 年 3 月份北京医院门诊患者咽拭子, 患者均诊断为猩红热。

质控菌株为: 肺炎链球菌 ATCC49619

标准菌株: 大肠埃希菌 DH5 α , 作为基质辅助激光解析电离飞行时间质谱的标准菌株。

沙门菌 H9812: 作为脉冲场凝胶电泳分子量标记菌株。

2、主要仪器:

(1) HFsafe1200 生物安全柜: HEAL FORCE 公司;

(2) 细菌恒温培养培养箱: 美国 Thermo 公司;

(3) MALDI-TOF MS 仪: 德国 Bruker Daltonics 公司;

(4) Legend Micro 17R 离心机: Thermo 公司;

(5) PCR 扩增仪: 德国 Biometra 公司;

(6) DYY-11 型电泳仪: 北京市六一仪器厂;

(7) DNAMAN 6.0: 美国 Lynnon Biosoft 公司;

(8) UVIpro 紫外成像仪: 德国 Whatman Biometra 公司;

(9) 微量移液枪: 德国 eppendorf 公司;

(10) 脉冲场凝胶电泳仪: 德国 Biometra 公司;

(11) 细菌多点接种仪: 日本 Oriental motor 公司;

3、培养基和试剂:

(1) 培养基: 哥伦比亚血琼脂平板、中国蓝平板和巧克力平板购自杭州威晟生物科技有限公司

(2) MALDI-TOF MS 标准分子量蛋白 I 及多肽: 德国 Bruker Daltonics 公司;

(3) MALDI-TOF MS 所用试剂如三氟乙酸(TFA)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、色谱纯乙腈、甲酸、无水乙醇: 美国 Sigma 公司;

(4) 基因组提取试剂盒: 上海泽衡生物技术有限公司;

(5) Taq 酶及 PCR 反应相关试剂: 日本 Takara 公司;

(6) PCR 反应管: 美国 Axygen 公司;

(7) 5×TBE 电泳缓冲液: 称取 54g Tris 碱, 27.5g 硼酸溶于 500ml 蒸馏水中, 加入 20ml 的 0.5mol/L 的 EDTA (pH8.0) 混匀, 补加纯水至 1000ml, 室温保存, 使用时量取 100ml, 用纯水稀释成 1000ml。

(8) 引物: 耐药基因测序引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列如下:

基因引物	序列	退火温度
<i>gyrA</i>	5'-TATGCCATGAGTGTCATTGT-3'	48°C
	5'-ATTATGAGCCGGAATGTTAG-3'	
<i>gyrB</i>	5'-GCAACTCAGAAGTGGTTAAG-3'	46°C
	5'-AGCTTCTAGAACAGGTCTCA-3'	
<i>parC</i> ,	5'-GGCCGTTATTCCAAGTATAT-3'	48°C
	5'-CACAACAGCATCAATCACTT-3'	
<i>parE</i>	5'-GCTCAGATTATCGAGAAGGA-3'	48°C
	5'-CAGCATCGGTCATGATAATA-3'	

(9) API 20 Strep 链球菌鉴定系统: 法国生物生物梅里埃;

- (10) 蛋白酶 K、溶菌酶: 美国 Sigma 公司;
- (11) 限制性内切酶 SmaI: 立陶宛 Fermentas 公司;
- (12) 青霉素: 华北制药股份有限公司;
- (13) 氨苄西林: 齐鲁制药;
- (14) 克林霉素: 北京四环科宝制药有限公司;
- (15) 红霉素: 湖南中南科伦药业有限公司;
- (16) 四环素: sigma 公司;
- (17) 左氧氟沙星: 山西普德药业有限公司;
- (18) 莫西沙星: 拜耳先灵医药保健股份有限公司;
- (19) 环丙沙星: 广州南新制药有限公司。

二、方法

1. 菌株初步鉴定:

采用 API 20 Strep 链球菌鉴定系统对 48 株链球菌进行鉴定。

2. MALDI-TOF MS 鉴定菌株:

(1) 细菌灭活: 挑取 2-3 个中等大小菌落于 1.5ml 离心管中, 加入 300 μ l 蒸馏水混匀, 然后加入 900 μ l 无水乙醇混匀, 12,000 g 离心 2 min;

(2) 提取蛋白: 离心后完全去除上层乙醇, 下层沉淀加入 50 μ l 70%甲酸混匀, 然后加入 50 μ l 乙腈混匀, 12,000 g 离心 2 min;

(3) 加样: 离心后取上清 1 μ l 点样于 96 孔加样板, 样品空气干燥后加入 1 μ l 基质 HCCA 覆盖加样的位置;

(4) 校准定标: 每次实验前需对仪器进行校准定标, 标准蛋白采用配制的混合蛋白 CPS (按标准蛋白 I 与多肽比例为 4: 1 配制);

(5) 质谱分析和鉴定比对: 质谱仪使用线性正性模式。使用355 nm波长以最大频率(60 Hz)采集2000-20000 Da范围内的样品蛋白图谱, 每个样品的激光轰击次数为100次; 仪器具体参数设置如下: 加速电压20 kV, 提取电压18.6 kV, 聚焦电压6.5 kV, 延迟提取时间150 ns。样品的质量图谱图通过Bruker Biotyper 3.0软件与数据库进行比较, 并用匹配分值来量化结果, 同时给出最终鉴定结果。

2、药敏实验

采用琼脂稀释法测定左氧氟沙星、莫西沙星、环丙沙星、四环素、红霉素、克林霉素、氨苄西林、青霉素的 MIC 值。具体实验操作参照 CLSI 操作规程。

3、耐药基因PCR:

扩增对环丙沙星MIC≤0.25 mg/L的4株和MIC≥4 mg/L的13株化脓性链球菌的 *gyrA*、*gyrB*、*parC*和*parE*基因。

PCR 反应体系如下:

10xbuffer	5μl
10μM dNTP	4μl
上游引物	1μl
下游引物	1μl
Taq 酶 (5u/μl)	0.25μl
模板 DNA	2μl
加双蒸水至	50μl

基因扩增条件如下:

1	94℃预变性	5min	
	94℃	45s	
2	48℃	50s	共循环30次反应
	72℃	45s	
3	72℃	5min	

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外成像系统观察结果。

4、测序比对:

PCR 扩增产物送至上海生物工程股份有限公司进行测序, 测序结果导入 DNAMAN 软件对比分析。

5、PFGE 分析:

对 17 株 (包括对环丙沙星 $MIC \leq 0.25$ mg/L 的 4 株和 $MIC \geq 4$ mg/L 的 13 株) 化脓性链球菌及沙门菌 H9812 用限制性内切酶 XbaI 酶切。

PFGE 简要步骤:

(1) 胶块制备: 用 TE 缓冲液将待测菌株配制成 4-5 麦氏浊度的细菌悬液后待用; 称取 0.1g 金胶琼脂粉放入 50ml 三角烧瓶中, 加入 10ml TE 缓冲液封口后微波加热融解, 将其放入 55 度水浴待用; 将制胶模子在 75% 酒精中浸泡后用蒸馏水冲洗干净, 用透明胶条封住模子的一侧待用; 从 4-5 麦氏浊度的细菌悬液中吸取 200 μ l 加入到灭菌的 1.5ml 离心管中, 向其中加入 10 μ l 50mg/ml 的溶菌酶, 37 度水浴 10min。

10min 后取出, 向其中加入 10 μ l 20mg/ml 蛋白酶 K 混匀, 吸取 200 μ l 1% 金胶溶液与以上溶液混匀加入胶块模子中 (尽量快的加入)。将模子放入 4 度冰箱中 15min。

(2) 裂解细菌: 在50ml离心管中加入5ml细菌裂解液并加入25 μ l 20mg/ml 蛋白酶K。将凝固好的胶块取出放入配置好的裂解液中(确保胶块在液面以下), 放入54度恒温摇床中摇3小时。

(3) 洗胶块: 3小时后取出离心管, 将其中的裂解液尽量倒净, 胶块留在离心管中, 加入10ml 纯水, 将离心管放入50度恒温摇床上摇10min, 然后重复一次; 将纯水换成TE缓冲液洗涤四次。

(4) 胶块内染色的酶切: 从TE缓冲液取出裂解好的胶块放入无菌培养皿中, 用刀片将胶块切成2mm宽的胶条, 将其放入1.5ml离心管中, 向其中加入不含限制性内切酶的缓冲液200 μ l (10 $\times$ 内切酶缓冲液稀释10倍后使用)。37度水浴10-15min。从水浴取出后将内切酶缓冲液用微量加样器洗干净, 向其中加入含50Unit内切酶的200 μ l 缓冲液。37度水浴2小时。

(5) 加样: 将酶切好的胶块从缓冲液中取出, 把胶块平铺于加样梳的梳齿上, 并用1%的普通琼脂固定。

(6) 电泳: 称取3g PFGE专用琼脂粉放入300ml 0.5 $\times$ TBE缓冲液中, 微波融化后放入55度水浴中平衡。将梳子固定在制胶槽上, 倒入已融解好的1% 的PFGE琼脂, 待琼脂凝固后拔出梳子。

(7) 胶的处理: 在电泳槽中加入2.4升0.5 $\times$ TBE电泳缓冲液, 并打开冷却系统使缓冲液冷却到设置温度。打开电脑主机, 运行PFGE主程序, 设置脉冲场电泳条件, 主要采用1kb-400kb的电泳条件。将凝固的PFGE胶放入电泳槽中, 开始电泳。

(8) 获取图像: 在染色盘中加入400ml 0.5 $\times$ TBE缓冲液, 再向其中加入40 μ l 10mg/ml 的EB溶液。将电泳好的凝胶从电泳槽中取出放入染色液中, 在水平摇床上闭光摇30min。30min后将染色液倒出, 加入等量的蒸馏水, 闭光摇15min。将PFGE胶在成像系统下拍照。

(9) 图像数据分析: 通过UVband 软件对 PFGE 结果进行分析。

3 结果

1、菌种鉴定:

利用 API 20 Strep 链球菌鉴定系统和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定来自北京地区的 48 株菌, 鉴定结果全部显示为化脓性链球菌。

2、抗生素的抗菌活性:

3 种氟喹诺酮类抗生素及临床常用 5 种抗生素的 MIC 结果见表 1。从表 1 可见化脓性链球菌对四环素耐药率为 91.7%, 对红霉素耐药率也为 91.7%, 对克林霉素耐药率为 89.6%。左氧氟沙星、氨苄西林、青霉素的抗菌活性良好, 敏感率为 100.0%。环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星的 MIC₅₀ 分别为 2 mg/L, 1 mg/L, ≤0.25 mg/L, MIC₉₀ 分别为 4 mg/L, 2 mg/L, 0.5 mg/L。

表 1 48 株化脓性链球菌对临床常用抗生素的药敏情况 (%)

抗生素	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC 范围 (mg/L)	耐药	中介	敏感
环丙沙星 ^a	2	4	≤0.25 ~ 8	- ^a	-	-
左氧氟沙星 ^b	1	2	≤0.25 ~ 2	0	0	100
莫西沙星 ^a	≤0.25	0.5	≤0.25 ~ 0.5	-	-	-
四环素	32	≥32	≤0.25 ~ 32	91.7	0	8.3
红霉素	≥8	≥8	0.125 ~ ≥8	91.7	0	8.3
克林霉素	≥8	≥8	0.0625 ~ ≥8	89.6	0	10.4
氨苄西林	≤0.03	0.0625	≤0.03 ~ 0.125	0	0	100
青霉素	≤0.03	≤0.03	≤0.03 ~ 0.0625	0	0	100

注: ^a CLSI (2011) 缺少环丙沙星和莫西沙星的折点判定标准。^b 根据 CLSI (2011) 标准, ≤2 mg/L 为敏感, 4 mg/L 为中介, ≥8 mg/L 为耐药

3、氟喹诺酮耐药基因检测及比对:

17株化脓性链球菌（包括对环丙沙星 MIC≤0.25 mg/L 的 4 株和 MIC≥4 mg/L 的 13 株）*gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 基因与野生株化脓性链球菌的相应基因序列比对，分析碱基突变导致的氨基酸突变，比对结果见表 2: *gyrA*、*gyrB* 基因上未发现突变位点。*parC* 基因上，除第 1、11 株未发现突变外，其他菌株均检测到突变。79 位出现丝氨酸突变为苯丙氨酸（Ser79/Phe）的共 3 株，包括 5、9、13；出现丝氨酸突变为酪氨酸（Ser79/Tyr）的共 9 株，包括 6~8,10,12,14~17；121 位出现丙氨酸突变为缬氨酸（Ala121/Val）的共 13 株，包括 2~8,10,12,14~17。在 9 号菌株的 *parE* 基因上检测到 371 位丝氨酸突变为亮氨酸（Ser371/Leu）。

表 2 17 株化脓性链球菌的来源、氟喹诺酮类药敏以及基因比对结果

序号	患者来源	MIC(mg/L)			氨基酸突变位点			
		LEV ^a	MXF	CIP	<i>parC</i>	<i>gyrA</i>	<i>parE</i>	<i>gyrB</i>
1	顺义	0.5	≤0.25	≤0.25	—	—	—	—
2	石景山	≤0.25	≤0.25	≤0.25	Ala121/Val	—	—	—
3	海淀	≤0.25	≤0.25	≤0.25	Ala121/Val	—	—	—
4	海淀	≤0.25	≤0.25	≤0.25	Ala121/Val	—	—	—
5	石景山	2	≤0.25	4	Ser79/Phe、 Ala121/Val	—	—	—
6	丰台	2	≤0.25	4	Ser79/Tyr、 Ala121/Val	—	—	—
7	朝阳	2	≤0.25	4	Ser79/Tyr、 Ala121/Val	—	—	—
8	朝阳	2	≤0.25	4	Ser79/Tyr、 Ala121/Val	—	—	—

9	延庆	2	≤ 0.25	4	Ser79/Phe	—	Ser371/Leu	—
10	大兴	2	≤ 0.25	4	Ser79/Tyr 、 Ala121/Val	—	—	—
11	怀柔	1	≤ 0.25	4	—	—	—	—
12	大兴	1	≤ 0.25	4	Ser79/Tyr 、 Ala121/Val	—	—	—
13	怀柔	1	≤ 0.25	4	Ser79/Phe	—	—	—
14	石景山	2	0.5	4	Ser79/Tyr 、 Ala121/Val	—	—	—
15	顺义	2	≤ 0.25	4	Ser79/Tyr 、 Ala121/Val	—	—	—
16	朝阳	2	0.5	4	Ser79/Tyr 、 Ala121/Val	—	—	—
17	朝阳	2	≤ 0.25	8	Ser79/Tyr 、 Ala121/Val	—	—	—

注：LEV 示左氧氟沙星；MXF 示莫西沙星；CIP 示环丙沙星。“—”未发现突变。
Ala 示丙氨酸；Val 示缬氨酸；Ser 示丝氨酸；Phe 示苯丙氨酸；Tyr 示酪氨酸；Leu 示亮氨酸

4. PFGE 同源性分析：

使用 UVIBand 软件根据 PFGE 图像生成同源性树状图，见图 1。由图可见，17 株化脓性链球菌可以分为 7 个克隆：菌株 6，7，8，10，12，14，15，16，17 属于 A 克隆且均为环丙沙星 $MIC \geq 4$ mg/L 菌株，占 $MIC \geq 4$ mg/L 菌株的 69.2%，其中 4 株来自北京朝阳区、2 株来自大兴地区，其他株分别来自丰台地区，石景山区和顺义地区；菌株 3，4 属于 B 克隆，为环丙沙星 $MIC \leq 0.25$ mg/L 的菌株，均来自北京海淀区；菌株 11，13 属于 C 克隆，为环丙沙星 $MIC \leq 0.25$ mg/L 的菌株，均来

自北京怀柔地区；菌株 1、2、5、9 分属于 D、E、F、G 克隆，分别来自顺义、石景山和延庆地区。

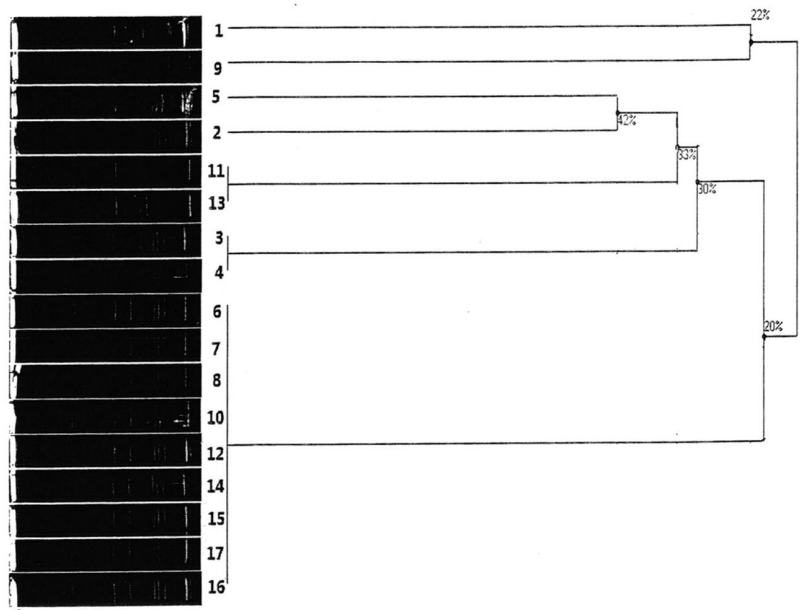


图 1 17 株化脓性链球菌的 PFGE 及树状图

注：树状图使用骰子相似系数及 UPGMA 算法计算，误差为 1%。编号代表菌株 1~17。百分数表示相似度

4 讨 论

国内化脓性链球菌对红霉素、克林霉素、氯霉素、四环素一直保持很高耐药率。本研究中,化脓性链球菌对四环素、红霉素、克林霉素的耐药率均在 90%左右,氨苄西林、青霉素对化脓性链球菌的抗菌效果良好,与文献报道^[2,9]一致。青霉素类药物仍可以作为化脓性链球菌感染治疗的首选药物。

左氧氟沙星与莫西沙星的抗菌活性良好,与文献^[10,11]报道一致。文献报道化脓性链球菌对环丙沙星以 $MIC \geq 2 \text{ mg/L}$ 作为判断不敏感的折点时,葡萄牙^[10]的不敏感率为 4.9%,西班牙^[12]为 13.0%,而本研究假定以 $MIC \geq 2 \text{ mg/L}$ 为判断菌株环丙沙星不敏感的折点时,环丙沙星不敏感率(29.2%, 13/48)远高于国外。虽然国内还未报告对氟喹诺酮耐药的化脓性链球菌,但不敏感率增高极有可能导致耐药株的出现,故应该引起注意。

细菌对喹诺酮类抗生素耐药的机制,除了由含喹诺酮耐药基因的质粒介导引起以外,主要是由编码拓扑异构酶 A 亚基和 B 亚基的基因(*gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE*)突变引^[13,14]。化脓性链球菌对氟喹诺酮耐药的基因突变,文献报道^[2-4,11-12,15]主要集中在 *parC*、*gyrA* 基因上,而在基因 *parE*、*gyrB* 上的突变报道较少^[11,15]。

本研究中,17 株测序菌株在 *gyrA* 和 *gyrB* 基因上均未发现突变。

文献^[4,11]中 *parC* 基因 Ala121Val 突变菌株对喹诺酮的耐药率均有所增高。本研究的 17 株化链,不论是对环丙沙星 $MIC \leq 0.25 \text{ mg/L}$ 的菌株还是 $MIC \geq 4 \text{ mg/L}$ 的菌株,在 *parC* 基因上都出现了 Ala121Val 突变,提示这一突变可能是无义突变。除来自怀柔地区的 11 号菌株外,13 株环丙沙星 $MIC \geq 4 \text{ mg/L}$ 的化脓性链球菌菌株中有 12 株 *parC* 基因上存在 Ser79Phe/Tyr 突变,提示可能是由于 79 位的碱基突变导致了化脓性链球菌对环丙沙星的耐药性提高。而 11 号菌株虽然对环丙沙星的 MIC 为 4 mg/L ,但未发现耐药基因的突变,是否是其他原因导致了该菌株环丙沙星 MIC 值升高有待进一步研究。

另外,延庆地区分离的9号菌株在 *parC* 基因 Ser79Tyr 突变的基础上合并 *parE* 基因 Ser371Leu 突变,但该菌株对氟喹诺酮类抗生素的耐药性并没有显著提高,因此对于 *parE* 上的这一突变,其意义还需进一步研究。

此外, Yan 等^[2,3,8]报道的 *parC* 基因上都出现了 Ser79Phe/Tyr 和(或)Ala121Val 突变,和本次研究检测到的突变一致,但在 *gyrA* 基因上这3篇报道中出现突变(Ser81Ala/Tyr, Met99Leu)的菌株对环丙沙星的 MIC 都为 32 mg/L; 对左氧氟沙星的 MIC 分别为 32 mg/L、16 mg/L、32 mg/L。而本次研究中环丙沙星、左氧氟沙星和莫西沙星的 MIC 分别为 $\leq 0.25 \sim 8$ mg/L、 $\leq 0.25 \sim 2$ mg/L 和 $\leq 0.25 \sim 0.5$ mg/L, 这提示如果只有 *parC* 基因突变,可能较难产生氟喹诺酮高耐药菌株。

本次试验中,编号为6~8, 10, 12, 14~17的菌株显示为同一克隆型A,并且这9株均为对环丙沙星不敏感菌株,占所收集菌株的18.75% (9/48),由于菌株的样本采集时间均在2012年3月,且患者地区分布(4株来自北京朝阳区、2株来自大兴地区)相距较近,病情均为猩红热,说明在此期间出现了由A型化脓性链球菌引起的小范围猩红热流行。故临床应加强化脓性链球菌病原菌的防控,防止传播。

5、结 论

1、化脓性链球菌对四环素、红霉素、克林霉素的耐药率均在 90%左右；氨苄西林、青霉素对化脓性链球菌的抗菌效果良好，青霉素类药物仍可以作为化脓性链球菌感染治疗的首选药物，左氧氟沙星与莫西沙星的抗菌活性依然良好。

2、*parC* 基因中 Ser79/Phe 、Ser79/Tyr 突变导致了化脓性链球菌对环丙沙星的耐药性提高。存在其他原因导致菌株环丙沙星 MIC 值升高，有待进一步研究。

3、A 群化脓性链球菌引起的小范围猩红热流行。

参考文献

- [1] Arai K, Hirakata Y, Yano H, et.al. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan by a point mutation leading to a new amino acid substitution. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66: 494–498.
- [2] Yan SS, Fox ML, Holland SM, et al. Resistance to multiple fluoroquinolones in a clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*: identification of *gyrA* and *parC* and specification of point mutations associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44: 3196–3198.
- [3] Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP, et al. Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Clin Infect Dis*, 2003, 36: 380–383.
- [4] Reinert RR, Lutticken R, Al-Lahham A. High-level fluoroquinolone resistance in a clinical *Streptococcus pyogenes* isolate in Germany. *Clin Microbiol and Infect*, 2004, 10: 659–662.
- [5] Arai K, Hirakata Y, Yano H, et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan by a point mutation leading to a new amino acid substitution. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66: 494–498.
- [6] 张明新, 朱敏, 王玫, 等. 应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定常见细菌和酵母菌. *中华检验医学杂志*, 2011, 34: 988-992.
- [7] Jones HE, Brenwald NP, Owen KA, et al. A multidrug efflux phenotype mutant of *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51: 707–710.
- [8] Rivera A, Rebollo M, Sanchez F, et al. Characterisation of fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* in Barcelona, Spain. *Clin Microbiol and Infect*, 2005, 9: 759-761.

- [9] Bahnan W, Hashwa F, Araj G, et al. emm typing, antibiotic resistance and PFGE analysis of *Streptococcus pyogenes* in Lebanon. *J Med Microbiol*, 2011, 60: 98-101.
- [10] Pires R, Ardanuy C, Rolo D, et al. Emergence of Ciprofloxacin-Nonsusceptible *Streptococcus pyogenes* Isolates from Healthy Children and Pediatric Patients in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 2677-2680.
- [11] Smeesters PR, Vergison A, Junior DC, et al. Emerging fluoroquinolone-non-susceptible group A streptococci in two different paediatric populations. *Int J Antimicrob Agents*. 2009, 34: 44-49.
- [12] Montes M, Tamayo E, Orden B, et al. Prevalence and Clonal Characterization of *Streptococcus pyogenes* Clinical Isolates with Reduced Fluoroquinolone Susceptibility in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 93-97.
- [13] Fabrega A, Madurga S, Giralt E, et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*, 2009, 2: 40-61.
- [14] Malhotra-Kuma S, Van Heirstraeten L, Lammens C, et al. Emergence of high-level fluoroquinolone resistance in emm6 *Streptococcus pyogenes* and in vitro resistance selection with ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother* 2009, 63: 886-89
- [15] 陈文标, 余菲菲. 细菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究进展. *检验医学与临床*, 2007, 4: 200-201.

综述

无乳链球菌和化脓性链球菌喹诺酮耐药及耐药机制的研究

杨旭峰 综述 陈功祥 审校

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 正常寄居于妇女阴道和人体肠道, 是围产期妇女感染的主要致病菌。已证实新生儿无乳链球菌感染 (尤其是早发型感染) 与母亲孕期或分娩时生殖系统携带无乳链球菌有关, 易导致流产、死胎, 甚至新生儿死亡, 现已引起国内外学者高度重视。同时也可引起免疫低下人群菌血症、心内膜炎、皮肤和软组织感染以及骨髓炎。^[1-3]

化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 是人类疾病和医院感染的主要病原菌之一, 其引起的疾病约占人类链球菌感染的90%。化脓性链球菌能产多种链球菌溶血素、M蛋白和链激酶等多种致病因子。可引起急性咽炎、呼吸道感染、软组织感染等, 特别。还可引起猩红热、休克综合征, 坏死性筋膜炎等疾病,^[4]化脓性链球菌是儿童和成人呼吸道感染的重要病原菌。

一、无乳链球菌和化脓性链球菌的流行情况

1991年张京海、杜桂香、刘桂英等^[5]报道从山东省658例孕妇阴道分泌物样本中分离出62株无乳链球菌, 分离率9.4%; 1997年梁梅英等^[6]报道从北京120例无症状产妇在产前阴道分泌物中分离出19株无乳链球菌, 分离率15.8%; 其新生儿带菌率3.3%; 郭素芳等^[7]在2006-2007年间从6702例尿液样本中分离出77株无乳链球菌, 分离率1.1%; 从1139例孕妇阴道分泌物样本中分离出31株无乳链球菌, 分离率2.7%; 从666例前列腺液样本中分离出36株无乳链球菌, 分离率5.4%。1998年Schuchat,A等^[8]报道了美国从1993年到1995年多地的无乳链球菌

流行情况,无症状的孕妇分离率约 15%-35%,新生儿带菌率约 0.2%-0.8%。2013 年 Tajbakhsh S 等^[9]报道了伊朗布什尔省的孕妇无乳链球菌分离率为 9.5%。国内外的无乳链球菌流行情况十分相似。

2007 年王晶等^[10]从大连市 286 例呼吸道感染患儿的咽拭子样本分离出 112 株病原菌,其中化脓性链球菌 18 株,占致病菌总数的 16.1%;2007 年王恒秋等^[11]从广东清远市 1405 例儿童及新生儿扁桃体炎和咽喉炎患儿的咽分泌物中分离出 155 株化脓性链球菌,分离率 11.0%;付盼等^[12]在 2010 年报道了对 2006 年 1 月至 2009 年 12 月在复旦大学附属儿科医院诊断为呼吸道感染的门诊及住院患儿上呼吸道取咽部分泌物、下呼吸道取痰标本进行培养鉴定,发现上呼吸道感染的病原菌主要为化脓性链球菌,2006-2009 年的分离率分别为:74.5%、78.8%、75.2%、77.0%。美国^[13]研究报道感染率约 15%~30%,在成人咽炎中占 5%~10%;Kim 等^[14]报道 2002 年韩国门诊咽炎儿童化脓性链球菌培养阳性率高达 50.8%。

二、无乳链球菌和化脓性链球菌的耐药情况

1996-1999 年杨明等^[15]报道北京孕妇阴道分泌物中分离出 69 株无乳链球菌的红霉素的耐药率为 49.4%,广州为 38.7%,圣彼得堡为 13%,国内情况耐药情况明显高于国外;2007 年吴健宁等^[16]报道厦门孕妇阴道分泌物中分离出 112 株,红霉素、克林霉素、左氧氟沙星的耐药率分别为 49.1%、41.1%、18.8%;2007 年郭素芳等^[17]报道了上海孕妇阴道分泌物中分离出 31 株,红霉素、克林霉素、左氧氟沙星的耐药率分别为 38.7%、22.6%、10.0%;2010 年饶洁等^[18]报道了江西省孕妇阴道分泌物中分离出的 165 株无乳链球菌对红霉素、克林霉素、左氧氟沙星的耐药率分别为 39.4%、35.2%、20.0%。

2006-2008 年 M.Ki.U 等^[19]对韩国南部地区 1075 株 GBS 的喹诺酮类药物耐药情况研究发现,诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星,莫西沙星耐药率分别为:94.0%、

8.8%、8.1%、0.7%；且发现9株对以上4种喹诺酮类抗生素均耐药，这9株耐药菌株的基因检测发现均有 *gyr* 和 *par* 基因突变。2007-2010 年 Hiroyuki Ueno 等^[20]报道了日本妇女阴道分泌物中分离 376 株无乳链球菌对红霉素、克林霉素、左氧氟沙星的耐药率分别为 12.8%、9.0%、18.4%。国外无乳链球菌对喹诺酮类抗生素耐药率有逐年升高趋势。

近几年国内报道的无乳链球菌对左氧氟沙星的耐药率在 10.0%-20.0%；国外报道的无乳链球菌对左氧氟沙星的耐药率在 8.1%-18.4%；国内的耐药情况略高于国外。

2003 年李伟忠等^[21]报道了浙江桐乡市 2002-2003 年 40 株化脓性链球菌对红霉素、氯霉素、环丙沙星和左氧氟沙星耐药率分别为：70.0%、17.5%、22.5%和 7.5%；2007 年毛剑虹等^[22]报道了浙江诸暨市从 2005-2007 年分离出 52 株化脓性链球菌，对青霉素 G、万古霉素、头孢噻肟均敏感，对红霉素、氯霉素、克林霉素和左氧氟沙星的耐药率分别为：70.0%、10.0%、52.0%、2.9%。

国外文献^[23-27]报道了化脓性链球菌对红霉素的耐药率在意大利为38.0%，加拿大为19.5%~36.3%，韩国报道咽炎患儿分离到化脓性链球菌对红霉素的耐药率为44.8%，对克林霉素的耐药率为7.5%~11.1%。2007年Milagrosa Montes等^[28]报道了西班牙吉普斯夸省从2005至2007年3年分离468株咽拭子来源的化脓性链球菌对喹诺酮类抗生素耐药率分别为：1.9%、6.4%、30.8%，该国化脓性链球菌对喹诺酮类抗生素耐药率有逐年升高趋势。

三、喹诺酮类抗生素耐药机制研究

自 1998 年起就陆续有报道喹诺酮类抗生素的耐药机制研究，主要是基因突变（DNA 解旋酶和 DNA 拓扑异构酶 IV）、生物被膜通透性下降（孔蛋白改变）、外排泵的过度表达降低药物的抑制作用和质粒介导喹诺酮耐药（plasmid-mediated

quinolone resistance , PMQR, *qnr* 耐药基因编码的蛋白对 DNA 解旋酶和 DNA 拓扑异构酶 IV 具有保护作用)。

1. 基因突变机制

喹诺酮类抗生素耐药机制主要是由于细菌拓扑异构酶 II (DNA 解旋酶和 DNA 拓扑异构酶 IV) 的喹诺酮类耐药决定区域上发生点突变。DNA 解旋酶和 DNA 拓扑异构酶 IV 是同系物, 是一个包含 2 各亚单位的四聚体, DNA 解旋酶由 2 个 *gyrA* 和 2 个 *gyrB* 分子组成, DNA 拓扑异构酶 IV 由 2 个 *parC* 和 2 个 *parE* 分子组成。4 种亚单位均可发生基因突变, 目前发现的环丙沙星耐药菌株均有 *parC* 亚单位的基因突变, 相对于其他亚单位的基因, *parC* 突变率高。*parC* 可发生 Ser79/Ala、Ser79/Phe 单位点突变或 Ser79/Phe+Asp91/Asn 双位点突变, 双位点突变可增高化脓性链球菌对环丙沙星的最小抑菌浓度 (MIC>32μg/mL), *gyrA* 主要发生 Ser81/Phe、Ser83/Tyr 突变^[28]。大肠埃希菌耐药菌株常发生突变的位点有 Ser83、Asp87, 肺炎链球菌耐药菌株常发生突变的位点有 Ser79, Ser 可被 Phe 或 Tyr 替换。化脓链球菌常发生突变的位点有 Ser81^[29]。

无乳链球菌喹诺酮类抗生素耐药基因的研究: 2012 年 M.Ki.U 等^[30]韩国学者在对氟喹诺酮类药物耐药基因的研究中发现: GBS 耐药菌株存在 *gyrA* 和 *parC* 基因突变, 而敏感菌株不存在 *gyrA* 和 *parC* 基因突变。有 3 株环丙沙星耐药株在 *gyrB* 基因的第 407 位丝氨酸突变为亮氨酸, *parE* 基因未发现突变, 有 20 株仅对诺氟沙星耐药的菌株也未发现突变, 所有环丙沙星耐药菌株也同时对诺氟沙星耐药, 但未发现 *parC* 或 *gyrA* 基因有突变, 约 90% 的左氧氟沙星耐药菌株在 *parC* 和 *gyrA* 基因都有突变。所有莫西沙星耐药菌株存在 *parC* 和 *gyrA* 基因突变, 而莫西沙星敏感菌株都不存在 *parC* 和 *gyrA* 基因突变。巴西学者 Barros RR 等^[31]也观察到喹诺酮耐药菌株中存在 *gyrA* 和 *parC* 基因的点突变, 中介菌株的 *parC* 点突变为: 第 80 位丝氨酸(Ser)突变为脯氨酸 (Pro), 耐药菌株的点突变为: 第 128 位的甘氨酸突变

为天冬氨酸 (Asp)。

化脓链球菌喹诺酮类抗生素耐药基因的研究：化脓链球菌耐喹诺酮类抗生素的耐药菌株也存在 *gyrA* 和 *parC* 基因突变。*gyrA* 基因含 2487 bp，编码的蛋白质有 829 个氨基酸残基，与肺炎链球菌的 *gyrA* 基因氨基酸序列有 79% 的一致性。*parC* 基因含 2460 bp，编码的蛋白质有 820 个氨基酸残基，与肺炎链球菌的 *parC* 基因氨基酸序列的前 620 个氨基酸残基有 82% 的一致性。*gyrA* 可发生双位点突变，如：Ser81/Phe, Met99/Leu，而 *parC* 常为点突变，如：Ser79/Tyr。多数的环丙沙星耐药菌株的存在 *parC* 基因突变，常见的是发生 Ser81 位点的突变。但有研究发现无论是 *gyrA* 或 *parC* 基因突变的化脓链球菌耐药菌株对克林沙星却保持敏感^[29]。

2. 外排泵机制

外排泵介导的药物主动外排系统是细菌耐药的一个重要原因。在铜绿假单胞菌生物被膜的耐药机制中，有研究证实其对阿奇霉素和对妥布霉素的耐药性分别是由 MexCD-OprJ 外排泵和 MexXY-OprM 外排泵高表达所致，pAl874-1877 编码的外排系统对于铜绿假单胞菌生物被膜多重耐药(耐受妥布霉素、庆大霉素、环丙沙星)具有重要作用。但外排泵系统高表达并不意味着耐药性必然升高，有研究发现尽管铜绿假单胞菌生物被膜中 MexAB-OprM 外排系统也存在过度表达，却并未对 β -内酰胺类抗生素表现出耐药性增强。细菌耐药对外排泵的依赖性并非始终如一，如铜绿假单胞菌生物被膜 MexAB-OprM 基因的表达，只能影响其对低剂量氧氟沙星的耐药性^[32]。

无乳链球菌外排泵介导的耐药机制的研究非常少。化脓链球菌外排泵介导的耐药机制的研究有用溴化乙锭、诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星筛选出化脓链球菌突变菌株，其原始菌株和突变菌株的 *gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 经测序未发现改变。使用溴化乙锭筛选的突变菌株的外排泵系统不受利血平、利血敏、维拉帕米、羰基氰氯苯腙 (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, CCCP)

等外排泵抑制剂的影响,而使用吉米沙星筛选的突变菌株对环丙沙星的MIC在增加利血平时下降了8倍,这推测可能是由于化脓链球菌的外排泵不是质子泵而是ATP依赖性外排泵,或是多种外排泵同时存在^[29]。

3.质粒介导机制

过去认为喹诺酮类抗生素耐药主要是染色体介导、靶位改变和主动外排所致,近年发现也可以由于质粒介导喹诺酮耐药基因表达导致耐药。研究报道最多是*qnrA*、*qnrB*和*qnrS*^[33]。2006年发现由质粒携带的氨基糖苷乙酰转移酶的变异基因*aac(6')-Ib-cr*可使细菌对环丙沙星及诺氟沙星的MIC上升4倍,有研究发现从耐喹诺酮类的大肠埃希菌90株中筛选出78株对利福平敏感并对左氧氟沙星耐药的菌株进行接合实验,有2株接合成功,接合率为2.6,接合实验的阳性供体菌的左氧氟沙星MIC为64 μ g/mL,其接合子检出*aac(6')-Ib-cr*基因,却未检出*qnrA*、*qnrS*、*qnrB*基因,其机制为此基因编码的灭活酶可使环丙沙星及诺氟沙星中的氨基“-NH”乙酰化,从而使其抗菌活性下降^[34-35]。另外,A组链球菌(GAS)质粒pA15携带*erm(B)*基因或*mef(A)*基因,*erm(B)*可介导红霉素高度耐药(MIC > 256 mg/L),质粒介导的耐药性可转染GBS和GCS,导致其他组群细菌耐药。GAS质粒pSM19035(28975 bp)在细菌内的拷贝数较低,一般每个细菌有2-5个,pSM19035的35个基因中有9个基因与pA15的基因相似,包括:*erm(B)*(功能: N-甲基转移酶),*cops*(功能: 调控质粒拷贝数),*repS*(功能: 初始化质粒复制),*beta*(功能: 特异性位点重组酶),*gamma*(功能: 拓扑异构酶),*delta*(功能: 类似ATP酶,参与质粒切割),*omega*(功能: 转录抑制蛋白),*epsilon*(功能: *epsilon-zeta* 解离后致死系统的解毒剂),*zeta*(功能: *epsilon-zeta* 解离后致死系统的毒素)。pSM19035的*epsilon*基因和*zeta*基因分别编码解毒剂与毒素,这是GAS特有的一个系统^[36]。

四、结束语

无乳链球菌是围产期妇女和新生儿感染的主要致病菌，孕妇感染后易导致流产、死胎，甚至新生儿死亡。化脓性链球菌是医院感染的主要病原菌之一，也是儿童和成人呼吸道感染的重要病原菌。无乳链球菌的治疗首选 β 内酰胺类抗生素，对于青霉素过敏的患者常选用红霉素、克林霉素、左氧氟沙星等药物，化脓性链球菌虽然对多种常用抗菌药物仍比较敏感，但对一些抗菌药物的耐药率也逐渐升高，总体而言两种细菌的耐药菌株逐年增加，给临床治疗带来挑战。

喹诺酮耐药机制研究较多是对处于喹诺酮耐药决定区 (quinolone resistance-determining region, QRDR) 上的 *gyrA*、*parC* 基因突变的研究，其中 *parC* 基因突变较为常见。国外对基因突变引起喹诺酮耐药的研究较多，也许基因突变是引起无乳链球菌和化脓性链球菌对喹诺酮类药物耐药的主要原因，但外排泵系统和质粒介导也是不可忽视的耐药机制。国内关于无乳链球菌和化脓性链球菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究非常少见，也许与该两种细菌在孕妇和儿童感染时不推荐使用喹诺酮类药物有关，但近几年国内陆续报道了从罗非鱼^[37]、牛蛙^[38]、牛奶^[39]中分离出优势病原菌均为无乳链球菌；养殖场为保证产量不得不使用敏感抗生素，而由于抗生素的滥用，在畜牧业、家禽、水环境、施用有机肥的土壤^[40]，甚至化妆品^[41]中都可检测的喹诺酮类药物的残留；并且从家禽养殖场^[42]、水产中也分离出各种喹诺酮类耐药菌株，因此有必要了解各种细菌喹诺酮类耐药机制，观察其是否存在相互传染。另外，应在严格控制医院抗生素滥用的同时，也需要控制动物抗感染治疗中的抗生素滥用，减低耐药菌株的产生的几率，以避免耐药菌株的爆发流行。

参考文献

- [1] Dogan B, Schukken YH, Santisteban C, et al. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from

- bovine and human hosts. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(12): 5899-5906.
- [2] Marimon JM, Valiente A, Ercibengoa M, et al. Erythromycin resistance and genetic elements carrying macrolide efflux genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(12): 5069-5074.
- [3] Murayama SY, Seki C, Sakata H, et al. Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(6): 2650-2653.
- [4] Arai K, Hirakata Y, Yano H, et.al. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan by a point mutation leading to a new amino acid substitution. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66: 494-498.
- [5] 张京海、杜桂香、刘桂英等. 孕妇产道 B 群链球菌的分离鉴定及结果分析. *临床检验杂志*. 1992, 10(3): 163
- [6] 梁梅英, 王山米. 产前 B 族链球菌感染对母儿的影响. *中华围产医学杂志*. 1999, 2(1): 12-14
- [7] 郭素芳, 张迎华, 周敏. 泌尿生殖道分离无乳链球菌药物敏感性分析. *检验医学*. 2008, 23 (6): 612-614
- [8] Schuchat, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 497-513
- [9] Tajbakhsh S, Norouzi Esfahani M, Emaneini M, et al. Identification of *Streptococcus agalactiae* by fluorescent in situ hybridization compared to culturing and the determination of prevalence of *Streptococcus agalactiae* colonization among pregnant women in Bushehr, Iran. *BMC Infect Dis*, 2013, 13(1): 420
- [10] 王晶, 韩丽霞, 张凤华, 等. 儿童呼吸道感染病原菌分布与耐药分析. *中国感染控制杂志*, 2007, 6(3): 180-182
- [11] 王恒秋, 张广清. 小儿扁桃体炎和咽喉炎化脓性链球菌感染率及药物敏感试验. *实验与检验医学*, 2010, 28(1): 95

- [12] 付盼,何磊燕,王爱敏,等.2006 至 2009 年复旦大学附属儿科医院呼吸道感染患儿 5 种常见细菌构成比和耐药性分析.中国循证儿科杂志,2010,5(5):371-376
- [13] Bourbeau PP, Role of the microbiology laboratory in diagnosis and management of pharyngitis.Clin Micmbiol,2003,41:3467-3472
- [14] Kim S, Yong Lee N.Antibiotic resistance and genotypic characteristics of group A streptococci associated with acute pharyngitis in Korea.Microb Drug Resist,2004, 10:300-305
- [15] 杨明,杨永弘等.B 族链球菌的红霉素耐药基因研究.中华儿科杂志.2002,40(8):470-472
- [16] 吴健宁,林润华,林健.孕妇泌尿生殖道 112 例无乳链球菌感染的耐用性分析.医学研究杂志.2008,37(3):88-89
- [17] 郭素芳,张迎华,周敏.泌尿生殖道分离无乳链球菌药物敏感性分析.检验医学.2008,23(6):612-613
- [18] 饶洁,胡凯.女性生殖道无乳链球菌带菌状况及药敏结果分析.实验与检验医学.2011,29(2):194
- [19] M. Ki .U. Srinivasan .K. Y. Oh. M. Y. Kim. Emerging fluoroquinolone resistance in Streptococcus agalactiae in South Korea. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2012) 31:3199-3205
- [20] Hiroyuki Ueno, Yoshihiko Yamamoto, Characterization of Group B Streptococcus Isolated from Women in Saitama City, Japan. Jpn.J. Infect. Dis. 2012, 65; 516-521
- [21] 李伟忠,费楚寅.40 例化脓性链球菌分布情况及对抗菌药物的敏感性分析.现代中西医结合杂志,2004,13(22):3024-3025
- [22] 毛剑虹,吕火详.临床分离化脓性链球菌的耐药性分析.浙江医学,2008, 30 (5): 483-484
- [23] Borzani M, De Luca, Varotto F. A survey of susceptibility to erythromycin amongst Streptococcus pyogenes isolates in Italy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1997, 40: 457-458

- [24] Dicuonzo G, Fiscarelli E, Gherardi G et al. Erythromycin resistant pharyngeal isolates of *Streptococcus pyogenes* recovered in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46: 3987-3990
- [25] Katz K C, McGeer A J, Duncan C L, et al. Emergence of macrolide resistance in throat culture isolates of group A streptococci in Ontario Canada, in 2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 47: 2370-2372
- [26] De Azavedo J C, Yeung R H, Bast D J, et al. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of group A streptococci from Ontario Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 43: 21 44-21 47
- [27] Kim S, Lee N Y. Epidemiology and antibiotic resistance of group A streptococci isolated from healthy schoolchildren in Korea. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54: 447-450
- [28] Milagrosa Montes, Esther Tamayo, Beatriz Orden, et al. Prevalence and Clonal Characterization of *Streptococcus pyogenes* Clinical Isolates with Reduced Fluoroquinolone Susceptibility in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(1): 93-97
- [29] S. Steve Yan, Melissa L. Fox, Steven M. Holland, et al. Resistance to Multiple Fluoroquinolones in a Clinical Isolate of *Streptococcus pyogenes*: Identification of *gyrA* and *parC* and Specification of Point Mutations Associated with Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(11): 3196-3198
- [30] M. Ki. U. Srinivasan. K. Y. Oh. M. Y. Kim. Emerging fluoroquinolone resistance in *Streptococcus agalactiae* in South Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2012) 31: 3199-3205
- [31] Barros RR, Kegele FC, Paula GR. Molecular characterization of the first fluoroquinolone resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2012, 16(5): 476-478
- [32] 林飞燕, 陆春. 药物外排泵与生物被膜在微生物耐药机制中的相关性研究进展.

- 微生物学杂志,2011,31(4):85-89
- [33] 姜梅杰.肺炎克雷伯菌质粒介导喹诺酮类耐药基因 *qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS* 研究. 中华临床医师杂志,2011,5(23):7136-7139
- [34] Park CH,Robicsek A,George A,et al.Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*,2006,50(11):3953-3955
- [35] 蒋杰,胡大春,赵晓丽.大肠埃希菌对氟喹诺酮类的质粒介导耐药机制研究.国际检验医学杂志,2011,32(10):1073-1074
- [36] Yi-Fang Liu,Chih-Hung Wang,Rajendra Prasad Janapatla, et al. Presence of plasmid *pA15* correlates with prevalence of constitutive MLSB resistance in group A streptococcal isolates at a university hospital in southern Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,2007,59:1167-1170
- [37] 张新艳,樊海平,钟全福,等.罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究.水产学报,2008,32(5): 772-779
- [38] 杭小英,周冬仁,叶雪平,等.牛蛙无乳链球菌病原的分离鉴定.水生生物学报, 2012,36(2):361-364
- [39] 布日额,刘娣,华玉平,等.通辽地区牛奶乳房炎无乳链球菌的分离与鉴定.兽医科技,2009,3:76-77
- [40] 邵义萍,莫测辉,李彦文,等.长期施用粪肥土壤中喹诺酮类抗生素的含量与分布特征.中国环境科学,2010,30(6):816-821
- [41] 郑艳明,郭新东,冼燕萍,等.化妆品7种氟喹诺酮类药物的反相高效液相色谱法测定,分析测试学报,2009,28(2):235-238
- [42] 张悦,王杨,张美君,等.动物源肠杆菌分离株质粒介导的喹诺酮类耐药基因的检测.中国兽医杂志,2012,48(8):15-17

作者简历及在学期间所取得的科研成果

作者简历

1、基本情况

姓 名 杨旭峰 性别 男 民族 汉

政治面貌 中共党员 婚姻状况 已婚 籍贯 四川宜宾

家庭地址 杭州市严衙弄 6-5-502

工作单位 浙江大学医学院附属第二医院检验科

2、个人经历

1997.9-2002.7 重庆医科大学医学检验专业本科毕业

2002.8-至今 浙江大学医学院附属第二医院检验科

3、联系方式

E-mail: rubyease@126.com TEL: 15868490340

在学期间发表的文章

1、秦光明,金亚平,杨旭峰,蒋珍妮.ST 段抬高型心肌梗死患者内皮微粒与心肌损伤的关系.2012,21(7):701-705

2、Rong Zhang, Yan-yan Hu, Xu-feng Yang, Dan-xia Gu, Hong-wei Zhou, Qin-feng Hu, Kai Zhao, Su-fei Yu and Gong-Xiang Chen. Emergence of NDM-producing non-baumannii *Acinetobacter* spp. Isolated from China. *European journal of clinical microbiology & infection diseases*. 2013-11-01, accept.