

健康 6 月龄内儿童肺炎链球菌携带状况及耐药特征分析

关恒云, 刘岚铮, 姜慧钰, 白爱英, 刘辉, 阮师漫

济南市疾病预防控制中心, 山东 济南 250021

摘要: **目的** 了解济南地区健康 6 月龄内儿童鼻咽部肺炎链球菌携带血清型及耐药特征, 为肺炎球菌疫苗推广接种提供数据。 **方法** 2019 年 11 月—2020 年 4 月采集济南地区 216 例健康 6 月龄内儿童鼻咽拭子, 经分离培养获得疑似肺炎链球菌菌株; 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱和奥普托欣敏感试验鉴定后, 采用多重 PCR 方法明确肺炎链球菌血清型; 进一步采用微生物药敏分析仪进行药物敏感性检测。 **结果** 216 例健康 6 月龄内儿童肺炎链球菌携带率为 5.1% (11/216), 共携带 7 种血清型: 15B、23F、6B、8、18C、19F 和 13。13 价肺炎球菌多糖结合疫苗血清型覆盖率为 54.5%, 23 价肺炎球菌多糖疫苗覆盖率为 90.9%。19 种抗生素中红霉素和阿奇霉素耐药率为 100.0%; 耐药率 80.0% 以上的有四环素、克林霉素、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、头孢呋辛和青霉素 (口服) 的耐药率超过 50.0%。万古霉素、利奈唑胺、左氧氟沙星、氯霉素和莫西沙星未发现耐药菌株。11 例儿童鼻咽部肺炎链球菌分离株显示多重耐药, 耐药种类 3~6 种。 **结论** 济南地区健康 6 月龄内儿童鼻咽部定植的肺炎链球菌具有多种血清型, 且抗生素耐药现象较严重。

关键词: 健康儿童; 肺炎链球菌; 血清型; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 耐药; 多重耐药

中图分类号: R183.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2023)02-0169-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.02.010

Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and its drug resistance characteristics in healthy children under 6 months of age

GUAN Heng-yun, LIU Lan-zheng, JIANG Hui-yu, BAI Ai-ying, LIU Hui, RUAN Shi-man

Jinan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jinan, Shandong 250021, China

Corresponding authors: RUAN Shi-man, E-mail: jncdcrsm@jn.shandong.cn; LIU Lan-zheng, E-mail: jncdcllz@jn.shandong.cn

Abstract: **Objective** To analyze nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and characteristics of drug resistance in healthy children under 6 months of age in Jinan, and to provide reliable data for pneumococcal vaccination.

Methods Two hundred and sixteen nasopharyngeal swabs were collected from healthy infants younger than 6 months in Jinan from November 2019 to April 2020. *Streptococcus pneumoniae* was cultured and isolated. Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and optochin susceptibility were performed. Multiplex PCR was used to determine *Streptococcus pneumoniae* serotypes. Antibiotic susceptibility was evaluated by antimicrobial susceptibility analyzer. **Results** The carriage rate of *Streptococcus pneumoniae* in the 216 healthy children under 6 months of age was 5.1% (11/216), including seven pneumococcal serotypes, 15B, 23F, 6B, 8, 18C, 19F and 13. The vaccine coverage of the 13-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine was 54.5%, and that of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine was 90.9%. Among 19 antibiotics, the drug resistance rates of erythromycin and azithromycin were 100.0%, those of tetracycline, clindamycin and trimethoprim/sulfamethoxazole were over 80.0%, and those of cefuroxime and penicillin (oral) were over 50.0%. No drug resistant strains were found for vancomycin, linezolid, levofloxacin, chloramphenicol and moxifloxacin. *Streptococcus pneumoniae* isolated from eleven children's nasopharynx showed multi-drug resistance with 3-6 kinds of drugs. **Conclusion** *Streptococcus pneumoniae* colonized in nasopharynx of the healthy children under 6 months of age in Jinan has multiple serotypes and serious antimicrobial resistance.

Keywords: healthy infant; *Streptococcus pneumoniae*; serotype; matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; antimicrobial resistance; multi-drug resistance

基金项目: 传染病预防控制国家重点实验室自主研究开放课题 (2019SKLID310; 2020SKLID307); 济南市卫生健康委员会科技计划 (2020-4-105)

作者简介: 关恒云 (1978-), 女, 山东济南人, 硕士研究生, 副主任技师, 主要从事传染病分子流行病学研究工作。

通信作者: 阮师漫, E-mail: jncdcrsm@jn.shandong.cn; 刘岚铮, E-mail: jncdcllz@jn.shandong.cn。

肺炎链球菌是人类鼻咽部常见共生菌,可引起非侵袭性(如急性中耳炎、鼻窦炎等)或侵袭性(如肺炎、脑膜炎、败血症等)感染。肺炎链球菌对抗生素的耐药和多重耐药现象在东亚和东南亚国家及地区是一个比较严重的问题^[1]。但肺炎链球菌性疾病是疫苗可预防性疾病,疫苗的推广使用可降低与疫苗血清型相关的肺炎链球菌性疾病的发病率^[2];济南市 2018 年开始推广接种 13 价肺炎球菌多糖结合疫苗(13-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine, PCV13)。本研究分析了 216 例健康 6 月龄内儿童鼻咽部定植肺炎链球菌的血清型及耐药特征,为肺炎球菌疫苗的使用和临床抗生素的选择提供客观依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2019 年 11 月—2020 年 4 月采集 216 例健康 6 月龄内儿童鼻咽拭子。本研究充分考虑地理位置、肺炎球菌疫苗推广接种情况、居民对肺炎球菌疫苗接受意愿等因素,在济南市市中区和天桥区各选一家社区卫生服务门诊作为监测点。研究对象入选条件:①为济南市常住人口;②尚未接种肺炎球菌疫苗;③采集鼻咽拭子时无发热、流涕、咽痛等上呼吸道感染症状;④征得父母或监护人的知情同意,签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 CO₂ 培养箱购自海尔生物医疗股份有限公司;LS4509 增菌培养基购自广州迪景生物科技有限公司;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)购自法国梅里埃公司;链球菌药敏板和微生物药敏分析仪购自英国 Trek 诊断系统有限公司;奥普托欣(Optochin)纸片购自英国赛默飞世尔科技(中国)有限公司;引物由北京六合华大基因科技有限公司合成;核酸提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;核酸多重 PCR 血清分型检测试剂盒购自北京卓诚惠生生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 肺炎链球菌培养分离 社区医生按照标准方法采集鼻咽拭子后^[3],立即接种迪景 LS4509 增菌培养基,2 h 内保温、放置二氧化碳包运输至济南市疾病预防控制中心实验室。35 ℃,5%CO₂ 条件下培养 18~24 h。次日观察菌落形态,挑取具有 α 溶血环的菌落:包括典型的肺炎链球菌菌落(中央呈脐窝状或者水滴状、湿润、黏液型肺炎链球菌),以及不典型的菌落。每个培养板至少挑取 3 个可疑肺炎链球菌的单菌落,继续纯培养。

1.3.2 MALDI-TOF MS 鉴定 挑取疑似肺炎链球菌纯菌落,采用扩展法进行 MALDI-TOF MS 鉴定,采纳 99.9%可信度的鉴定结果,达到细菌种水平。

1.3.3 Optochin 敏感试验 置 Optochin 纸片的培养板在 35 ℃,5%CO₂ 条件下培养,抑菌环直径>14 mm 者为阳性^[4]。肺炎链球菌分离株保存在-80 ℃中。

1.3.4 多重 PCR 鉴定肺炎链球菌血清型 MALDI-TOF MS 和 Optochin 敏感试验鉴定为肺炎链球菌者,提取 DNA 后采用八轮多重 PCR 反应进行血清分型,每轮反应均以种属特异性基因 cpsA 作为阳性内对照,引物序列参考文献报道^[5]。PCR 扩增产物采用 QIAxcel 毛细管电泳进行目的基因鉴定。鉴定为 6(6A/6B/6C)、18(A/B/C/F)等血清群者进一步采用核酸多重 PCR 血清分型检测试剂盒进行分型,见表 1。

表 1 肺炎链球菌多重 PCR 扩增引物分组

反应	血清型	引物对数
1	cpsA, 6(6A/6B/6C), 3, 19A, 22F/22A, 16F	6
2	cpsA, 8, 33F/33A/37, 7F/7A, 23A	5
3	cpsA, 19F, 12F/12A/44/46, 11A/11D, 38/25F, 35B	6
4	cpsA, 24(A/B/F), 7C/7B/40, 4, 18(A/B/C/F)	5
5	cpsA, 14, 1, 23F, 15B/C, 10A	6
6	cpsA, 39, 10F/C/33C, 5, 35F/47F, 17F	6
7	cpsA, 23B, 35A/C/42, 34, 9N/9L, 31	6
8	cpsA, 21, 2, 20, 13	5

1.3.5 药物敏感性分析 采用链球菌药敏板进行药物敏感性测定,结果解释遵循临床和实验室标准协会 2018 年制定的指南和标准。同时进行肺炎链球菌(ATCC 49619)标准株测定用于阳性对照。

1.4 统计学分析 采用 SWIN 3.3 软件分析抗生素敏感性,血清型构成采用频数及相对数描述。

2 结果

2.1 研究对象基本情况 2019 年 11 月—2020 年 4 月共采集 216 例健康儿童鼻咽拭子,年龄最小者 27 d,最大者 5 个月零 7 d。男女比例为 1.2 : 1。1~4 月龄儿童占 91.7%。86.1%的儿童鼻咽拭子采集于 2019 年 11 月—2020 年 1 月,见表 2。

表 2 216 例健康儿童基本情况及鼻咽拭子采集时间(n,%)

特征	检测人数	阳性检出数
性别		
男	119(55.1)	4(3.4)
女	97(44.9)	7(7.2)
年龄		
~1 月	1(0.5)	0(0.0)
~2 月	74(34.2)	2(2.7)
~3 月	75(34.7)	3(4.0)
~4 月	49(22.7)	3(6.1)
~5 月	17(7.9)	3(17.6)
采集时间		
11 月	56(25.9)	5(8.9)

续表 2

特征	检测人数	阳性检出数
12 月	81(37.5)	6(7.4)
1 月	49(22.7)	0(0.0)
3 月	17(7.9)	0(0.0)
4 月	13(6.0)	0(0.0)
合计	216(100.0)	11(5.1)

2.2 肺炎链球菌鉴定及血清型分型 共有 11 例健康儿童鼻咽部检出肺炎链球菌,携带率为 5.1%(11/216)。共有 7 种血清型:15B、23F、6B、8、18C、19F 和 13,构成比分别为 27.3%(3/11)、18.2%(2/11)、18.2%(2/11)、9.1%(1/11)、9.1%(1/11)、9.1%(1/11)、9.1%(1/11)。PCV13 覆盖血清型有:23F、6B、18C 和 19F,覆盖率为 54.5%,15B、8 和 13 血清型未被覆盖;23 价肺炎球菌多糖疫苗(23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine23, PPV23)覆盖血清型有 15B、23F、6B、8、18C 和 19F 型,覆盖率为 90.9%,13 血清型未被 PPV23 所覆盖,见表 3。

表 3 济南地区健康 6 月龄内儿童鼻咽部定植肺炎链球菌血清型及 PCV13/PPV23 覆盖情况

肺炎链球菌血清型	检出人数(n,%)	PCV13 是否覆盖	PPV23 是否覆盖
15B	3(27.3)	否	是
23F	2(18.2)	是	是
6B	2(18.2)	是	是
8	1(9.1)	否	是
18C	1(9.1)	是	是
19F	1(9.1)	是	是
13	1(9.1)	否	否

2.3 肺炎链球菌药物敏感性测定 11 例健康儿童鼻咽部定植肺炎链球菌分离株进行 19 种抗生素链球菌药敏测定,结果显示:红霉素和阿奇霉素耐药率为 100.0%;耐药率 80.0%以上的有四环素、克林霉素、甲氧苄胺嘧啶/磺胺甲噁唑;头孢呋辛和青霉素(口服)的耐药率超过 50.0%;头孢曲松、美罗培南、青霉素(非脑膜炎)、头孢噻肟、阿莫西林/克拉维酸的耐药率在 20.0%以下;万古霉素、利奈唑胺、左氧氟沙星、氯霉素和莫西沙星未发现耐药菌株,见图 1。

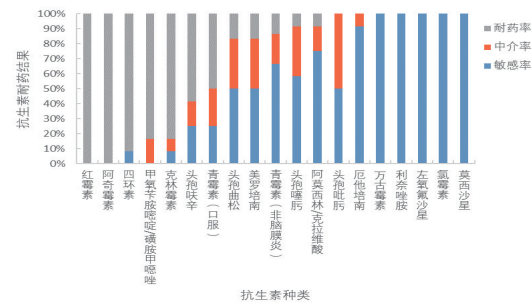


图 1 济南地区 11 例健康儿童鼻咽部定植肺炎链球菌分离株药物敏感性测定

19 种抗生素共归为 10 类,分别是 β 内酰胺类(包

括青霉素、头孢噻肟、阿莫西林/克拉维酸、头孢呋辛、头孢曲松、头孢吡肟)、糖肽类(万古霉素)、林可霉素类(克林霉素)、唑烷酮类(利奈唑胺)、四环素类(四环素)、喹诺酮类(包括左氧氟沙星、莫西沙星)、氯霉素类(氯霉素)、磺胺类(甲氧苄胺嘧啶/磺胺甲噁唑)、碳青霉烯类(包括厄他培南、美罗培南)、大环内酯类(包括红霉素、阿奇霉素)。11 例健康儿童鼻咽部定植肺炎链球菌分离株显示多重耐药,耐药种类 3~6 种,耐药模式(人数)如下:大环内酯类+林可霉素类+磺胺类(1)、大环内酯类+林可霉素类+四环素类(1)、大环内酯类+四环素类+磺胺类(2)、大环内酯类+林可霉素类+四环素类+磺胺类(1)、大环内酯类+ β 内酰胺类+林可霉素类+四环素类(1)、大环内酯类+ β 内酰胺类+林可霉素类+四环素类+磺胺类(3)、大环内酯类+ β 内酰胺类+林可霉素类+四环素类+磺胺类+碳青霉烯类(2)。

3 讨论

肺炎链球菌性疾病是全世界关注的公共卫生问题之一。婴幼儿是肺炎链球菌的主要储存宿主,研究显示 8.7%~52.4%的肺炎病例发生于 6 月龄内婴儿^[6]。肺炎链球菌在鼻咽部呈携带状态,当微生态失衡而迁移到机体其他部位时则会引起感染。疫苗接种与抗生素的合理使用是肺炎链球菌性疾病两大重要的防控措施。

研究显示鼻咽部肺炎链球菌很少在小于 3 个月患儿中检出^[7],而随着接触外界环境的增多、从母亲获得的 IgG 抗体消失,可在 80%以上的 6 月龄~2 岁的健康婴幼儿中定植^[8]。本研究中 6 月龄内健康儿童肺炎链球菌携带率(5.1%)较大龄儿童、住院/门诊儿童低。例如中山市 6~13 岁学龄儿童鼻咽部携带率为 7.4%~15.9%^[9];厦门市住院和门诊儿童为 8.4%^[10]。肺炎链球菌的血清型分布随地理、时间、年龄和疾病而变化。研究显示我国 2006—2016 年主要血清型为 19F、19A、23F、14 和 6B 型^[11]。本研究中除了 19F、23F、6B 外,还检出 15B、8、18C 和 13 血清型,其中 54.5%可被 PCV13 覆盖。上海地区 7 价、10 价和 13 价肺炎球菌结合疫苗的覆盖率分别为 64.4%、64.4%和 91.8%^[12]。PCV13 适用于 6 周龄~15 月龄婴幼儿,PPV23 适用接种年龄为 2 岁以上(含 2 岁)个体。根据儿童年龄,选择适合人群推广接种的肺炎球菌疫苗,对于保护儿童远离肺炎链球菌潜在感染具有重要意义。长期监测鼻咽部定植肺炎链球菌血清型,有助于肺炎球菌疫苗的改进与完善。

肺炎链球菌的抗生素耐药是一个世界性的严重问

题。黎巴嫩、伊朗、沙特阿拉伯和土耳其等中东国家抗生素耐药的强度和流行程度增长态势明显^[13];2010—2011 年我国临床分离的肺炎链球菌对红霉素、克林霉素、四环素、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶耐药率大于 62.8%^[14]。本研究中鼻咽部定植肺炎链球菌耐药和多重耐药情况也不容乐观。大环内酯类全部耐药,四环素、甲氧苄胺嘧啶/磺胺甲噁唑和克林霉素耐药率超过 80.0%。头孢菌素类是临床广泛使用的抗生素,本研究中四代头孢菌素未检出耐药株,二代头孢菌素耐药率高于三代头孢菌素,因此四代和三代头孢菌素可作为肺炎链球菌感染治疗的选择。某医院 2013—2017 年呼吸道送检标本检出肺炎链球菌青霉素耐药率为 1.9%^[15],值得注意的是本研究中健康 6 月龄内儿童鼻咽部出现青霉素耐药菌株和美罗培南不敏感株。建议加强抗生素的研发和耐药机制的研究,为临床提供有效的治疗方案。

本研究存在一定的局限性:首先,样本量仅收集到 216 例,一方面 6 月龄内儿童因年龄较小,征得家属及其监护人的同意采集鼻咽拭子具有一定难度;其次,受 2020 年新冠肺炎疫情影响,采样工作严格按照疫情防控要求开展,样本收集受到了一定的影响;第三,目前受试者信息收集比较有限,如是否被动吸烟,是否有兄弟姐妹等信息,无法进行肺炎链球菌携带危险因素的分析;最后,由于本研究未进行 2 岁以上人群的监测,因此 PPV23 血清型覆盖状况存在缺憾。以上不足在未来研究工作中将持续关注。

综上所述,济南地区健康 6 月龄内儿童鼻咽部定植多种血清型的肺炎链球菌,且其抗生素耐药和多重耐药较严重。肺炎球菌疫苗可在一定程度上覆盖定植肺炎链球菌血清型,因此积极接种疫苗并完善疫苗血清型覆盖范围是保护儿童远离肺炎链球菌危害最好的预防措施。

致谢 感谢中国疾病预防控制中心传染病预防控制国家重点实验室秦天和任红宇两位研究员提供的科研指导;感谢济南市疾病预防控制中心赵小冬和高尚两位医师提供的流行病学调查指导

参考文献

[1] Song JH, Jung SI, Ko KS, et al. High prevalence of antimicrobial

resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(6):2101-2107.

- [2] Grabenstein JD, Klugman KP. A century of pneumococcal vaccination research in humans[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, Suppl 5:15-24.
- [3] Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, et al. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group[J]. *Vaccine*, 2013, 32(1):165-179.
- [4] Ing J, Mason EO, Kaplan SL, et al. Characterization of nontypeable and atypical *Streptococcus pneumoniae* pediatric isolates from 1994 to 2010[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(4):1326-1330.
- [5] 任红宇,王艳晴,李一楠,等. 102 株侵袭性肺炎链球菌血清型分布特征及耐药谱分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2021, 37(9):801-807.
- [6] World Health Organization. Pneumococcal vaccines WHO position paper-2012[J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2012, 87(14):129-144.
- [7] 王立波,张明智,冯海燕,等. 社区获得性肺炎患儿鼻咽部病原年龄分布特点[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2005, 5(4):218-221.
- [8] 郑跃杰. 肺炎链球菌疾病与微生态平衡[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2020, 35(7):543-546.
- [9] 陈燕辉,陈晓娟,杨晓华,等. 2016 年中山市 6~13 岁学龄儿童鼻咽部肺炎链球菌携带情况及药物敏感性分析[J]. *实用预防医学*, 2018, 25(5):554-556.
- [10] 刘勇,骆健,魏娟,等. 厦门市海沧城郊区 2 个月~5 岁儿童肺炎链球菌携带状况[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(10):798-800.
- [11] Lyu S, Hu HL, Yang YH, et al. A systematic review about *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution in children in mainland of China before the PCV13 was licensed[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2017, 16(10):997-1006.
- [12] Wang X, Cong Z, Huang W, et al. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolated from pediatric patients in Shanghai, China[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55(8):2135-2141.
- [13] El Moujabber G, Osman M, Rafei R, et al. Molecular mechanisms and epidemiology of resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the Middle East region[J]. *J Med Microbiol*, 2017, 66(7):847-858.
- [14] 王启,张菲菲,赵春江,等. 2010—2011 年中国肺炎链球菌耐药性和血清型研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(2):106-112.
- [15] 王娟,谢良伊,张景,等. 2013—2017 年某院呼吸道分离病原菌分布及耐药性分析[J]. *实用预防医学*, 2020, 27(5):584-587.

收稿日期:2022-03-15