文章编号: 1001-0580(2009)12-1516-02 中图分类号: R 378.1+2; R 978.1 文献标志码: A

【调查研究与分析】

肺炎链球菌耐药表型及红霉素耐药基因分析

贾建民

关键词: 肺炎链球菌; ermB基因; mefA基因;红霉素;耐药基因

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是引起人类肺炎、脑膜炎及败血症的最常见病原菌。近年来,肺炎链球菌对青霉素、红霉素等常用抗生素的耐药率逐年增高,导致经验用药失败,给抗感染治疗带来困难[1]。为了解肺炎链球菌的耐药表型及红霉素耐药相关基因,本研究对 2006-2007年分离自郑州大学第五附属医院就诊患者的 87株肺炎链球菌株进行了药物敏感试验,并进行红霉素耐药相关基因核糖体甲基化酶基因(ermB)及主动外排转运基因(mefA)检测。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)菌株:收集 2006年 1月-2007年 12月郑州大学第五附属医院就诊患者的痰液、咽拭子、血液、脑脊液等标本中肺炎链球菌分离株 87株;质控菌株:肺炎链球菌 ATCC 49619。(2)试剂:奥普托欣(Optochin, OP)、四环素、氯霉素、左氧氟沙星、万古霉素、复方新诺明及红霉素等药物纸片(英国 OXOID公司);DNA ladder、dNTP、Taq酶(美国 Promage公司);TriPure DNA提取试剂盒(瑞士 Roche公司)。(3)仪器:VITEK-32全自动微生物分析仪、革兰阳性菌(GPI)卡(法国生物梅里埃公司)。

1.2 方法

1.2.1 肺炎链球菌鉴定与药敏 采集患者标本,1 h内接种于 5%绵羊血平板,置 5% CO_2 培养箱内孵育 18～24 h,根据菌落特点、镜下形态,奥普托欣敏感试验初筛,采用全自动微生物分析仪和 GPI卡鉴定肺炎链球菌。药敏试剂采用 K-B法。结果判断参照文献[2]。

1.2.2 红霉素耐药相关基因检测 (1)DNA模板制备:挑取平皿上过夜孵育的细菌,利用 TriPure总 RNA提取试剂提取分离菌株 DNA,按产品说明书进行操作。(2) ermB、mefA基因引物序列[3]: ermB-f: 5′-GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA-3′, ermB-r: 5′-AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC-3′,产物长度为 639 bp; mefA-f: 5′-AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3′, mefA-r: 5′-TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG-3′,产物长度为 348 bp。(3) PCR扩增:反应体系 50 μL,包括 5 μL模板 DNA、5 mmol/L $MgCl_2$、0.2 mmol/L dNTP、0.4 μmol/L引物和 1.5 U Taq酶。循环条件为 95 ℃ 4 min热变性后,94 ℃ 1 min, 56 ℃ 2 min, 72 ℃ 2 min, 30个循环,再延伸 72 ℃ 10 min。取 5 μL PCR反应产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳,在凝胶成像系统中观察结果。

2 结 果

2.1 肺炎链球菌对常用抗生素耐药率比较(表 1) 表 1可见,肺炎链球菌临床分离株对红霉素、复方新诺明、四环素、克林霉素、青霉素等抗生素均有较高的耐药率(中介率+耐药率);万古霉素、左氧氟沙星对肺炎链球菌仍有较好抗菌活性。

2.2 红霉素耐药基因型分布(表 2) 在 87株肺炎链球菌中,检出红霉素耐药株 76株(耐药+中介)。总检出率为 94.7%;对红霉素敏感的 11株肺炎链球菌均未检出 ermB、mefA基因。

表 1 87株肺炎链球菌对常用抗生素敏感试验结果

抗生素	耐药率(%)	中介率(%)	敏感率(%)
青霉素	49.4	4.6	46.0
左氧氟沙星	5.7	2.3	92.0
红霉素	83.9	3.5	12.6
四环素	70.1	2.3	27.6
复方新诺明	69.0	4.6	26.4
克林霉素	63.2	1.1	36.7
万古霉素	0	0	100.0
氯霉素	25.3	0	74.7

表 2 76株红霉素耐药肺炎链球菌耐药基因型分布

基因型	株数	检出率(%)
ermB+ mefA-	54	71.0
ermB+ mefA+	13	17.1
ermB- mefA+	5	6.6
ermB- mefA-	4	5.3
ermB+	67	88.2
mefA+	18	23.7

3 讨 论

在过去 10年中,对大环内酯类抗生素耐药的肺炎链球菌已蔓延全球,其基因型与表型具有明显的地区差异[4-5]。亚洲病原微生物耐药监测网(ANSORP)监测数据显示[6],中国大陆地区的红霉素不敏感率高达 74.8%,中国香港地区的红霉素不敏感率高达 76.8%。本研究结果显示,本院肺炎链球菌临床分离株的红霉素不敏感率为 87.4%,对其他几种常用抗生素的耐药率也较高,应予以重视。

肺炎链球菌对红霉素的耐药机制主要有 2种,1种是耐药基因 ermB编码的 23 S rRNA甲基化酶导致的核糖体靶位甲基化,另 1种是 mefA编码的主动外排系统[7]。近年来,一些新的耐药机制不断被发现,如细菌 L22和 L4核糖体蛋白的突变、23 S rRNA V区和 II区的基因突变[8];研究表明,不同地区流行的大环内酯类耐药肺炎链球菌的耐药机制有明显差异[6,9-10]。本研究对肺炎链球菌检测结果显示,所有红霉素耐药株中,94.7%耐药株检出 ermB和/或 mefA,其中以单独检出 ermB阳性株为主(71.0%),其次是 ermB和 mefA同时

作者单位: 郑州大学第五附属医院检验科,郑州 450057
作者简介: 贾建民(1966-),男,河南郑州人,主管技师,大专,主要从事临床微生物研究。

阳性株(17.1%),单独检出 mefA阳性株(6.6%),与上述报道基本一致,提示本地区肺炎链球菌对红霉素的耐药机制是 ermB基因和/或 mefA基因同时或单独介导耐药,其中以 ermB基因为主。此外,有 4株红霉素耐药的肺炎链球菌未检出 ermB和 mefA基因,提示可能存在其他耐药机制,有待进一步研究。

参考文献

〔1〕 Felmingham D, Canton R, Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001 - 2004[J]. J Infect, 2007, 55(2): 111 - 118.

〔2〕 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement[S]. NCCLS, 2008.

〔3〕 Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(11): 2562 - 2566.

〔4〕 Schito GC. Resistance trends in *Streptococcus pneumoniae* (PROTEKT years 1 - 3 [1999 - 2002])[J]. J Chemother, 2004, 16(Suppl 6): 19 - 33.

〔5〕 范火炤,王素萍,赵启玉,等. 社区获得性肺炎流行特征及病原学分布[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(7): 825 - 827.

〔6〕 Song JH, Chang HH, Suh JY, et al. Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian Network for surveillance of resistant pathogens(ANSORP)[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 53(3): 457 - 463.

〔7〕 Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(9): 2727 - 2734.

〔8〕 Pérez-Trallero E, Garcia-de-la-Fuente C, Garcia-Rey C, et al. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain[J]. Antimicrob Agents and Chemother, 2005, 49(5): 1965 - 1972.

〔9〕 杨慧,饧永弘, Elisabet Nielsen,等. 肺炎链球菌耐药基因 ermB、mefA、tetM与转座子整合酶基因 intTn的检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(8): 677 - 682.

〔10〕 曾雪峰,雷秉钧,吕晓菊,等. 肺炎链球菌对抗生素的耐药性调查及对大环内酯类抗生素耐药机制研究[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2004, 4(3): 150 - 153.

收稿日期: 2009-09-07 (孔繁学编辑 解学魁校对)

文章编号: 1001-0580(2009)12-1517-02 中图分类号: R 994.6 文献标志码: A

【实验研究】

甲醛对小鼠源性巨噬细胞 DNA损伤作用*

贺庆芝,许雪梅,孙杰

摘 要:**目的** 探讨甲醛对小鼠源性巨噬细胞(RAW264.7细胞)DNA的损伤作用。**方法** 用 0, 20, 40, 80, 160, 320 μmol/L甲醛处理 RAW264.7细胞 1 h。采用单细胞凝胶电泳技术检测甲醛对 RAW264.7细胞 DNA的损伤作用。**结果** 甲醛剂量为 20, 40, 80, 160 μmol/L时,RAW264.7细胞 DNA的迁移率和尾长分别为 33.0%, 49.7%, 82.3%, 38.3%和 11.2, 22.6, 30.1, 18.9 μm,与空白对照组 4.3%和 9.7 μm比较,差异有统计学意义($P<0.05$);当甲醛浓度达 320 μmol/L时,细胞 DNA的迁移率和尾长分别为 6.3%和 9.3 μm,与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 低浓度甲醛可造成 RAW264.7细胞 DNA的损伤。

关键词: 甲醛; DNA损伤; RAW264.7细胞

Damage effect of formaldehyde on DNA of RAW264.7 cell HE Qing-zhi, XU Xue-mei, SUN Jie. Branch of Cell Biology, Department of Life Science, School of Pharmacy and Life Science, Nanhua University(Hengyang 421001, China)

Abstract: **Objective** To explore damage effect of formaldehyde on DNA of RAW264.7 cell. **Methods** Single cell gel electrophoresis was used for detecting the damage effect of formaldehyde on DNA of RAW264.7 cell. The RAW264.7 cell were exposed to 0, 20, 40, 80, 160, and 320 μmol/L of formaldehyde for 1 hr, respectively. **Results** It was shown that comet incidence and migration length of DNA of RAW 264.7 cells were increased remarkably in 20, 40, 80, 160 μmol/L group. But the comet incidence and migration length of DNA in 40 μmol/L group (49.7%, 22.6 ±18.5 μm) were more serious than 160 μmol/L group (38.3%, 18.9 ±17.5 μm). There was no difference in comet incidence and migration length between 320 μmol/L group and control group. **Conclusion** The formaldehyde has damage effect on DNA of RAW264.7 cell.

Key words: formaldehyde; DNA damage; RAW264.7 cell

甲醛是室内装修污染物的主要来源,也是一种生物内源性有机化合物。因其来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点,已成为当前环境监测的主要指标。动物实验表明,甲醛具有很强的免疫毒性和致癌作用,国际癌症研究所已将其列为人类致癌物质[1]。巨噬细胞是体内的一种主要免疫细胞,具有吞噬和清除外来异物、病毒、细菌、突变细胞等作用,从而保护机体健康。RAW264.7细胞是一种鼠源单核细胞源性巨噬细胞,本实验将此细胞用不同浓度的甲醛进行染毒处理,检测其 DNA的损伤情况,评价甲醛的遗传毒性。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 RAW264.7细胞(武汉大学中国典型培养物保藏中心);PRMI 1640培养基(美国 GIBCO公司);胎牛血清(杭州四季清公司);胰蛋白酶(美国 Hyclone公司);10%甲

*基金项目: 湖南省卫生厅基金(B2006105)

作者单位: 南华大学药学与生命科学学院生物科学系细胞生物学教研室,湖南 衡阳 421001

作者简介: 贺庆芝(1976 -),女,湖南安仁人,讲师,硕士,主要从事遗传毒理学研究。