

广州地区 GBS 阳性孕妇 GBS 致病菌株的 基因分型及分子流行病学调查*

容莉莉, 关小珊, 刘海英, 周珍文, 杨丽媛 (广州市妇女儿童医疗中心检验科, 广州 510120)

摘要:目的 研究探讨广州市 GBS 阳性孕妇 GBS 致病菌株的基因分型及其各种基因型的流行分布情况, 为 GBS 致病菌株的快速分子诊断及流行病学监测提供一定的理论依据和方法。方法 在广州市采用多阶段分层整体抽样的方法从 2015 年 01 月~12 月就诊的 GBS 阳性孕妇的生殖道中收集的标本, 药敏质控标准菌株: 肺炎链球菌(ATCC49619)及金黄色葡萄球菌(ATCC25923), 采取菌株培养、鉴定、DNA 提取、PCR 试验、基因检测等方法, 通过相关软件进行相关数据分析, 分析 GBS 致病菌株的基因分型及分子流行病学状况。结果 共收集分泌物标本 2 812 份, 经菌株鉴定分离出 178 株 GBS 致病菌株, 其检出率为 6.33%。GBS 致病菌株对利奈唑烷、万古霉素、青霉素、呋喃妥因等抗菌药物耐药率均为 0, 对氨苄青霉素、环丙沙星、莫西沙星及左旋氧氟沙星部分耐药, 其耐药率分别为 1.1%、16.9%、18.0% 及 22.5%, 而 GBS 致病菌株对红霉素、克林霉素等抗菌药物均出现了较高的耐药率, 其耐药率分别为 50.6%、47.8% (其中红霉素诱导克林霉素耐药有 20 例, 占 23.5%) 和 73.0%。65 株 GBS 检测出 *mreA* 基因, 56 株 GBS 检测出 *ermB* 基因, 36 株 GBS 检测出 *mefA* 基因, 28 株 GBS 检测出 *mefE* 基因, 5 株 GBS 检测出 *ermA* 基因, *ermC* 基因未被检测出。其中携带 5 种耐药基因的有 3 株 (1.69%), 携带 4 种耐药基因的有 15 株 (8.43%), 携带 3 种耐药基因的有 19 株 (10.67%), 携带 2 种耐药基因的有 25 株 (14.04%), 携带 1 种耐药基因的有 5 株 (2.81%), 不携带耐药基因的有 1 株 (0.56%)。五种耐药基因的核苷酸序列, 其同源性均为 100%, 无基因突变发生。结论 GBS 致病株耐药基因主要是 *mreA*, *ermA*, *ermB*, *mrfA*, *mefE*, 且其核苷酸序列同源性为 100%, 临床上需加强耐药基因分子水平检测, 指导临床更加合理科学的用药。

关键词: GBS 致病菌株; 基因分型; GBS 阳性孕妇; 分子流行病学调查

中图分类号: R378.12; R181.32 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)01-087-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.024

Genotyping and Molecular Epidemiology Investigation of GBS Pathogenic Strains of GBS Positive Pregnant Women in Guangzhou

RONG Li-li, GUAN Xiao-shan, LIU Hai-ying, ZHOU Zhen-wen, YANG Li-yuan
(Department of Laboratory Medicine, Women and Children's Medical Center
of Guangzhou City, Guangzhou 510120, China)

Abstract: Objective To study genotyping and molecular epidemiology distribution of GBS pathogenic strains of GBS positive pregnant women in Guangzhou, for GBS pathogenic strains of rapid molecular diagnosis and epidemiological surveillance provide certain theoretical basis and method. **Methods** In the Guangzhou area, used multi stage stratified sampling method collecting GBS positive pregnant women's reproductive tract specimens from January to December 2015, drug sensitivity quality control standard strains: *Streptococcus pneumoniae* (ATCC49619) and *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), took culture of bacterial, strain, identification, DNA extraction, PCR, gene detection method, through the relevant software for data analysis, analyzed GBS strains of gene and molecular epidemiology. **Results** In the study, collected 2 812 samples of secretions, after identification of strains isolated from 178 strains of pathogenic GBS strains, the detection rate was 6.33%. GBS pathogenic strains to linezolid vancomycin, penicillin, nitrofurantoin and other antimicrobial drug resistance rate was 0, GBS pathogenic strains to ampicillin, ciprofloxacin moxifloxacin and levofloxacin resistant parts, the resistance rates were 1.1%, 16.9%, 18.0% and 22.5%, but GBS pathogenic strains to erythromycin, clindamycin tetracycline antibiotics showed a high resistance rate, the resistance rates were 50.6%, 47.8% (of which 20 cases of erythromycin induced clindamycin resistance accounted for 23.5%) and 73.0%. Among them, 65 strains of GBS detected the *mreA* gene, 56 strains of GBS detected the *ermB* gene, 36 strains of GBS detected the *mefA* gene, 28 strains of GBS detected the *mefE* gene, 5 strains of GBS detected the *ermA* gene, *ermC* gene was not detected in the gene. Among them, carried five multidrug resistance gene of 3 strains (1.69%) and 4 kinds of resistant gene carried with 15 strains (8.43%), carried three resistance genes of 19 strains (10.67%), 2 kinds of resistant gene carrying a 25 strains (14.04%), carried the resistance gene of 5 strains (2.81%), did not carry resistance gene of 1 strain (0.56%). The nucleotide sequences of the five drug resistance genes were 100%, and no gene mutation oc-

* 基金项目: 广东省广州市医药卫生科技项目(项目编号: 20161A010026)。

作者简介: 容莉莉(1982-), 女, 本科, 主管技师, 专业: 检验, E-mail: lilyrong@yeah.net。

curred. **Conclusion** The main GBS disease resistant gene was *mreA*, *ermA*, *ermB*, *mrfA*, *mefE* and its nucleotide sequence homology was 100%. The clinical need to strengthen the detection of resistant gene and molecular level and guide clinical more scientific and rational drug use.

Keywords: GBS pathogenic strain; genotyping; GBS positive pregnant women; molecular epidemiology investigation

B族链球菌(group B streptococcus, GBS)是女性生殖道常见的一种病原菌,同时也是孕妇围产期感染的主要病原菌^[1]。孕妇在产期分娩时,新生儿经过孕妇产道在娩出过程中可被GBS感染,容易诱发胎膜早破、早产、产褥感染及新生儿肺炎、新生儿败血症等感染性疾病,从而对孕妇及新生儿产生重要的影响,因此,对于GBS的研究已被引起高度关注和重视^[2]。目前对于GBS感染的治疗临床上多选用 β -内酰胺类抗生素或大环内酯类抗生素,但因近十年来抗生素的大量应用,导致GBS的耐药问题也逐渐显现^[3],而目前临床上对这方面的研究较少。为此,笔者为了解广州市妊娠期妇女GBS致病菌株的耐药情况、相关基因分型及其各种基因型的流行分布情况,为感染的预防、控制及GBS致病菌株的快速分子诊断与流行病学监测提供一定的理论依据和方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象 采用多阶段分层整体抽样的方法在广州市各行政区域内2015年1月~12月来我院就诊的2812例孕妇生殖道中分离收集的GBS致病菌株,按《全国临床检验操作规程(第2版)》进行病原菌分离培养。药敏质控标准菌株为肺炎链球菌(ATCC49619)及金黄色葡萄球菌(ATCC25923)。

1.2 试剂和仪器 VJTEK2 COMPACT全自动微生物分析仪,GP67鉴定及药敏(包括利奈唑烷、万古霉素、青霉素、呋喃妥因、氨苄青霉素、环丙沙星、莫西沙星、左旋氧氟沙星、红霉素、克林霉素、四环素等),培养皿(温州康泰生物医药有限公司),菌株保存液(OXOID Corporation),PCR扩增试剂盒(Promega Corporation),PCR扩增引物(上海生物工程技术有限公司),DNA提取试剂盒(Promega Corporation),DNA Ladder Marker(北京赛百盛基因工程有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集:在2015年1月~12月来我院就诊的围产期孕妇的生殖道中采集分泌物拭子标本,并备注标明相关信息。

1.3.2 细菌培养及鉴定^[4]:标本采集完成后送至微生物实验室进行菌落培养,同时将培养后的菌株经微生物全自动分析仪鉴定。

1.3.3 菌株药物敏感性试验:经全自动微生物仪鉴定并得出药敏结果。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)试验^[5]:对保存的菌株进行复苏并依据DNA提取试剂盒相关操作方法进行DNA提取。依据相关文献报道的GBS耐药基因进行PCR引物合成,并进行PCR扩增。扩增条件:37℃ 2 min, 94℃ 2 min, 94℃ 15 s, 55℃ 45 s, 40个循环。

1.3.5 菌株耐药基因测序:随机选取6株 *mreA*, *ermA*, *ermB*, *mrfA*, *mefE* 及 *ermC* 型基因进行PCR扩增及核苷酸系列测定,并应用BLAST程序比对,确定其基因亚型核苷酸序列变化。

1.4 统计学分析 研究中应用GeneBank软件及WHONET5软件进行数据处理分析。

2 结果

2.1 GBS的检出率 研究中共收集分泌物标本2812份,经过菌株鉴定分离出178株GBS致病菌株,其检出率为6.33%。

2.2 GBS药敏试验结果 对分离出的178株GBS致病菌株进行药敏试验,其结果显示对利奈唑烷、万古霉素、青霉素、呋喃妥因等抗菌药物耐药率为0,对氨苄青霉素、环丙沙星、莫西沙星及左旋氧氟沙星部分耐药,其耐药率分别为1.1%, 16.9%, 18%及22.5%。而GBS致病菌株对红霉素、克林霉素、四环素等抗菌药物均出现了较高的耐药率,其耐药率分别为50.66%, 47.8%(其中红霉素诱导克林霉素耐药有20例,占23.5%)和73.0%。

2.3 GBS耐药基因检测结果 对耐药的GBS致病菌株进行基因检测,其中65株GBS检测出*mreA*基因,56株GBS检测出*ermB*基因,36株GBS检测出*mefA*基因,28株GBS检测出*mefE*基因,5株GBS检测出*ermA*基因,*ermC*基因未被检测出。其中携带5种耐药基因的有3株(4.41%),携带4种耐药基因的有15株(22.06%),携带3种耐药基因的有19株(27.94%),携带2种耐药基因的有25株(36.76%),携带1种耐药基因的有5株(7.35%),不携带耐药基因的有1株(1.47%)。

2.4 基因测序分析结果 随机选取研究中能检测出的五种耐药基因的核苷酸序列,与GeneBank软件序列对比分析,发现其同源性均为100%,无基因突变发生。

3 讨论 当前,对于GBS感染的治疗临床上多选用 β -内酰胺类抗生素或大环内酯类抗生素,但因近

十年来抗生素的大量应用,导致GBS的耐药问题也逐渐显现。有研究认为^[6,7],GBS等革兰阳性菌对抗菌药物的耐药机制,主要包括两个方面,其一一是通过对细菌的RNA靶基因位点进行甲基化修饰,使其减少药物与细菌核糖体的结合,这一机制主要是由erm基因进行调控表达的。其二是通过一定的途径将已进入细菌体内的抗菌药物泵出菌体外,使其失去发挥作用的载体,这一机制主要是由mef基因进行调控表达的。

相关研究表明^[8,9],GBS的耐药率及其耐药基因分型的分布存在时间与地域上的差异,因此为研究广州地区GBS阳性孕妇GBS致病菌株的基因分型及其各种基因型的流行分布情况,故开展此研究。结果显示,GBS致病菌株对头孢曲松、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/舒巴坦、哌拉西林等头孢类抗菌药物均敏感;GBS致病菌株对阿莫西林/克拉维酸、头孢唑林、青霉素等抗菌药物部分耐药;GBS致病菌株对红霉素、阿奇霉素、克林霉素等抗菌药物均出现了较高的耐药率,这一结果与目前GBS耐药率的升高具有一定的相符性,同时其发生机制与上述耐药机制也可能存在一定的相关性。

从GBS致病菌株分子结构的差异来看,GBS的耐药基因可分为mreA,ermA,ermB,mrfA,mefE及ermC,ermTR等多种基因分型,但因不同国家或地区在抗菌治疗用药与抗菌管理上的差异,使得GBS在不同地区的耐药基因类型与分子结构也存在不同的差异。有流行病学调查分析指出^[10],在我国北京地区,GBS主要以mreA,ermA,ermB,mrfA等基因型为主,而在欧美国家,GBS主要以ermB,mrfA,ermTR等基因型为主。而本研究表明,在我国广州地区,分离出的GBS主要以mreA,ermB,mefA,mefE耐药基因为主,且存在多基因耐药现象。

综上所述,GBS已经呈现出较高水平的抗菌药物耐药性和高发耐药率,给临床上GBS阳性孕妇的治疗带来了极大的挑战与困难,因此,作为医务工作者就要严密监测本地区GBS致病菌的耐药最新发展趋势,加强其分子流行病学监测,加强相关教育宣传工作,指导临床更加合理的应用抗菌药物,以达到降低耐药病菌的感染发生率,防止相关感染及并发症出现。

参考文献:

[1] 王心,尚丽新.围生期B族链球菌感染诊治及预防新进展[J].医学综述,2016,22(3):530-532.
Wang X,Shang LX. Research progress of diagnosis, treatment and prevention of perinatal group B streptococcal[J]. Medical Review,2016,22(3):530-532.

[2] 郑海燕,温素珍,李文婷,等.韶关市2821名孕妇围产期B族链球菌感染率调查及防治研究[J].中国初级卫生保健,2015,29(1):73-74,77.
Zheng HY,Wen SZ,Li WT,et al. A investigation of 2812 perinatal group B streptococcus infection rates and prevention research in Shaoguan[J]. China Primary Health Care,2015,29(1):73-74,77.

[3] 陈惠玲,邓家德,叶慧芬,等.围产期生殖道感染B族溶血性链球菌的耐药性及耐药基因检测[J].中华妇产科杂志,2010,45(9):701-703.
Chen HL,Deng JD,Ye HF,et al. Drug resistance and drug resistance gene detection of *Streptococcus B* in the perinatal genital tract infection[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology,2010,45(9):701-703.

[4] 张育娟,黄日妹,张炜灵.浅析B族链球菌的耐药性及红霉素与四环素耐药基因检测[J].海峡药学,2015,27(9):152-153.
Zhang YJ,Huang RM,Zhang WL. Detection and drug resistance of erythromycin and tetracycline resistant gene of *Streptococcus B*[J]. Strait Pharmaceutical,2015,27(9):152-153.

[5] 时春艳,赵扬玉,范玲,等.实时聚合酶链反应技术检测妊娠晚期孕妇B族溶血性链球菌的多中心研究[J].中华围产医学杂志,2014,17(6):361-364.
Shi CY,Zhao YY,Fan L,et al. A multi-center study on realtime polymerase chain reaction assay for group B *Streptococcus* in pregnant women[J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine,2014,17(6):361-364.

[6] 王萍.B族链球菌耐药[J].中华实用儿科临床杂志,2016,31(4):247-252.
Wang P. Antibiotics resistance of group B *Streptococcus*[J]. Chinese Journal of Practical Pediatrics,2016,31(4):247-252.

[7] 李亚梅,张利侠,秦利,等.围产期孕妇B族链球菌的感染和耐药性检测及对妊娠结局的影响[J].现代检验医学杂志,2013,28(1):87-89.
Li YM,Zhang LX,Qin L,et al. Detection of group B *Streptococcus* and analysis of drug resistance in perinatal pregnant women and the influence of the pregnancy outcome [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2013,28(1):87-89.

[8] 王彦春,何三军.汉中地区孕妇生殖道B族链球菌定植和防御素水平的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2013,28(5):87-88,92.
Wang YC,He SJ. Correlation between the colonization of group B *Streptococcus* and the level of defensins in pregnant women in Hanzhong[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2013,28(5):87-88,92.

[9] 何红美.2014年石家庄地区围产期妇女B族链球菌的耐药性及其耐药基因的研究[D].石家庄:河北医

科大学, 2014.

He HM. Study on resistance and resistant genes of group B *Streptococcus* from perinatal women in Shijiazhuang during 2014[D]. Shijinzhuang: Hebei Medical University, 2014.

- [10] 鲁 曦, 金发光, 徐冬旻, 等. 3 种亚抑菌浓度抗生素对耐药基因水平传播的影响[J]. 中国抗生素杂志,

2014, 39(5), 379-384.

Lu X, Jin FG, Xu DY, et al. The effect of resistance genes horizontal transfer under stimulation of subinhibitory concentrations of antibiotics [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2014, 39(5): 379-384.

收稿日期: 2016-08-06

修回日期: 2016-10-27
