

深圳地区人群 B 群链球菌 血清学分布和毒力基因及耐药性分析*

江 凡, 王飞玲, 路瑞静, 周喜友, 邹建话 (深圳市宝安区妇幼保健院检验科, 广东深圳 518101)

摘要:目的 了解深圳地区 B 群链球菌(GBS)血清型分布、毒力基因和耐药性。方法 来自深圳 4 家医院 515 例 B 群链球菌(Group B *Streptococcus*, GBS)分离株(其中 108 例侵袭性, 112 例非侵袭性和 295 例定植株)。所有 GBS 分离株采用常规血清方法和分子方法进行血清分型;PCR 方法检测 GBS 分离株的 *scpB*, *lmb*, *hylB*, *cylE*, *bac*, *bca* 和 *rib* 毒力基因;纸片扩散法检测 GBS 对青霉素、红霉素和四环素的敏感度;青霉素的最低抑菌浓度(MICs)用 E 实验检测。结果 分子分型(8 个血清型 I a, I b, II ~ VI, IX)与血清分型相符。结合分子分型与血清学分型,血清型 III 是最常见的荚膜型(56.5%),然后依次为 I b(17.5%), I a(12.6%), V(7.4%), II(2.7%), VI(1.4%), IV(1.0%)和 IX(1.0%)。在不同的人群中 III 型为主要血清型。除 III 型外,在侵袭性和非侵袭性感染人群中,血清型 I a 也较为常见(11.1%和 29.5%), I b 在定植人群中较为常见(19.3%)。PCR 检测毒力基因表明在几乎所有分离株中含 *cylE*, *lmb*, *scpB* 和 *hylB* 基因,在 515 例分离株中发现 *rib*, *bca* 和 *bac* 基因分别为 29.1%, 14.6% 和 9.7%。此外,一些毒力基因显著与特定的血清型相关,如 *rib* 与血清型 III, I a 和 I b 主要相关;*bca* 和 *bac* 与血清型 III 和 I b 主要相关。药敏结果显示,GBS 对 β -内酰胺酶 100% 敏感,对红霉素、克林霉素和四环素的耐药性分别为 67.0%, 61.9% 和 86.0%。结论 GBS 血清型分布、毒力基因和耐药性的相关性为临床治疗、流行病学研究和疫苗设计方面提供重要依据。

关键词: B 群链球菌;分子分型;毒力基因;耐药性

中图分类号:R378.12;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)02-051-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.02.015

Analysis of Serological Distribution, Virulence Gene and Drug Resistance among Group B *Streptococcus* from Shenzhen Patients

JIANG Fan, WANG Fei-ling, LU Rui-jing, ZHOU Xi-you, ZOU Jian-hua

(Department of Laboratory Medicine,

Maternity and Child Health Care Institute of Baoan District, Guangdong Shenzhen 518101, China)

Abstract: Objective To understand the antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence genes. **Methods** A total of 515 group B *Streptococcus* (GBS) including 108 virulence, 112 non-virulence, and 295 colonizing isolates were collected in four Shenzhen hospitals. Isolates were characterized by conventional and molecular serotyping. The virulence genes of *scpB*, *lmb*, *hylB*, *cylE*, *bac*, *bca* and *rib* of GBS isolates were detected by PCR. Antimicrobial susceptibility to penicillins, macrolides, lincosamides, quinolones and tetracyclines was tested using disk diffusion and the MICs for penicillin were determined by E-test. **Results** Molecular serotyping for all eight serotypes (I a, I b, II ~ VI, IX) was in full accordance with conventional serotyping. Taking MS and CS together, serotype III was the most common capsular type (56.5%), followed by I b (17.5%), I a (12.6%), V (7.4%), II (2.7%), VI (1.4%), IV (1.0%) and IX (1.0%). Serotype III was the main serotype in different groups, serotype I a was significantly more common among patients with invasive infections (11.1%) and non-invasive infections (29.5%), serotype I b isolates were significantly more common among clone (19.3%). Virulence gene screening using PCR method showed the presence of *cylE*, *lmb*, *scpB* and *hylB* in almost all the isolates, while *rib*, *bca* and *bac* genes were found in 29.1%, 14.6% and 9.7% of the isolates. Certain genes were significantly associated with specific serotypes, for example, *rib* with serotypes III, I a and I b, *bca* and *bac* with serotypes III and I b. Drug susceptibility results showed that GBS susceptibility to β -lactam antimicrobials was prevalent (100%). Resistance rates for erythromycin, clindamycin and tetracycline were 67.0%, 61.9% and 86.0%, respectively. **Conclusion** Serotype distribution, virulence genes and antimicrobial susceptibility profiles of GBS contributes to the clinical therapy, epidemiological studies and design of Vaccines.

Keywords: group B streptococci(GBS); molecular typing; virulence gene; antimicrobial susceptibility

B 族链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)是一种寄生于人类下消化道和泌尿生殖道的细菌,在

* 基金项目:深圳市知识创新计划项目(JCYJ20150403105513694)。

作者简介:江 凡(1969—),男,本科,副主任技师,研究方向:检验方法学,E-mail:jiangfan1224@163.com。

通讯作者:邹建话(1963—),本科,主任技师,研究方向:医学检验,E-mail:BAFYJY@163.com。

成年女性的阴道和直肠中带菌率可达 15%~40%,是围产期感染的首要病原菌之一。研究表明,孕妇 GBS 感染易发生胎膜早破、羊膜腔感染、晚期流产、早产及产褥感染等。新生儿 GBS 感染最常表现为肺炎和败血症,部分早发型(出生 6 天内)新生儿可表现为脑膜炎,病死率高达 10%,由宫内垂直感染所致;晚发型(生后 7~30 天)主要表现为脑膜炎和菌血症,发病率和病死率约 2%~6%,由出生后水平传播感染所致,约 50%的晚发型感染遗留不同程度的后遗症,包括癫痫、脑积水、听力丧失和语言发育迟缓等^[1,2]。

GBS 血清型与疾病的严重程度和疫苗的设计密切相关。目前已发现 10 种 GBS 荚膜多糖血清型: I a, I b, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 和 IX 型。分子分型技术对流行病学研究较血清学分型具有更强的鉴别能力^[2]。因为这些菌株一般含有需要的基因^[3]。GBS 有许多毒力因子和毒素,有助于 GBS 进入宿主细胞,其中包括表面蛋白、毒素和水解酶。C5a 肽酶(SCPB)、Laminin 结合蛋白(Lmb)、C 蛋白的 alpha 和 beta 亚单位(Bca 和 Bac)和 Rib 蛋白。目前对 GBS 的流行病学研究、药物敏感的评估和血清学分型在国内开展较少,GBS 的分子分型和毒力鉴定亦不多见。本研究旨在分析深圳地区 GBS 的血清型分布、药敏特点和毒力基因的鉴定;了解深圳地区 GBS 流行病学,为将来 GBS 疫苗的研制提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究对象 515 例 GBS 纯培养物来自深圳市四家医院门诊和住院患者(其中大部分来自深圳宝安区妇幼保健院),其中 54 例(10.5%)来自新生儿,所有患者出现早发疾病(EOD)(<7 天),已知一大半新生儿(64%)有 GBS 细菌血症;461 例分离株(89.5%)来自成人(年龄范围 20~87 岁)。在未怀孕的成人中($n=215$),GBS 分离株常分离于血液(37.3%)、阴道(35%)、伤口和化脓标本(26%),仅 5 例来自尿液标本(1.7%)。对于孕妇($n=246$)样本中,绝大多数 GBS 分离株来自阴道标本(90%),少量标本来自血液、尿液和胎盘(共占 10%)。根据临床结果和分离的部位把分离株分成三组:侵袭性($n=108$),来自正常人体的无菌部位;非侵袭性($n=112$)来自伤口、皮肤溃疡、气管和胃抽吸物;其它来自阴道拭子和无症状的尿液标本克隆的分离株($n=295$)。除了 115 例标本 GBS 和其它微生物共存(金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性的葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、克雷伯菌属和非特异性和特异性球菌),其余均为纯的 GBS 培养物。菌株的鉴定是基于培养鉴定、G 染色、触酶试

验和 CAMP 试验,所有操作参照《临床微生物鉴定手册》。分离株的种特性用玻片凝聚(Murex Diagnostics, UK)和用 PCR 鉴定 cfb 基因(编码 CAMP 因子)进一步证实。所有菌株保存在菌种保存管中, -80°C 长期保存, 4°C 短期保存在 5 ml/dl 血琼脂糖平板。

1.2 研究方法

1.2.1 血清分型:用型特异的抗血清乳胶凝聚方法试剂盒(Statens Serum Institute, SSI, Sweden)对上述 GBS 分离株血清分型(I a, I b, II~IX),操作严格按照试剂盒说明书。不与任何一种抗血清反应的菌株被归类为血清学不能分型(NT)菌株。

1.2.2 PCR 分型:所有 GBS 分离株 DNA 的提取采用细菌 DNA 提取试剂盒(天根生物有限公司),DNA 的浓度用微量核酸检测仪分析,提取后的 DNA 用 TE 缓冲液保存在 -80°C 冰箱。GBS 的基因分型采用常规的 PCR 反应,所有引物由上海捷瑞生物科技有限公司合成。GBS 参考株 A909 (type I a), H36B (type I b), 18RS21 (type II), M78 (type III), CNCTC 1/82 (type IV), BAA-611 (type V), NT6 (type VI), 7271 SSI (type VII) 由深圳市宝安区妇幼保健院吴丽娟博士提供。

1.2.3 药敏试验:药敏试验采用圆盘扩散(Kirby-Bauer)方法,操作参照 CLSI(2012)指南进行。抗生素包括青霉素(青霉素 G 和氨苄青霉素)、头孢呋辛(cefuroxime)、头孢曲松、左氧氟沙星、万古霉素、红霉素、克林霉素和四环素。用 E-test[®]试纸条(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)确定青霉素的最小抑菌浓度(MIC)。每次实验以肺炎链球菌 ATCC 49619 参考株作为质控。根据 CLSI 解释指南(2012)解释抑制区的直径和 MIC。红霉素耐受和克林霉素敏感株进一步采用双-圆盘扩散方法(D-zone test)试验。D 形克林霉素区(可诱导的克林霉素耐受株)被视为“克林霉素耐受”。

1.2.4 毒力基因:所有 GBS 分离株检测 7 个毒力基因,即 scpB, lmb, hylB, cylE, bac, bca 和编码 C5a 多肽酶的 rib 基因。引物和 PCR 反应条件参考文献[4~6]。具有上述基因的 GBS 参考菌株 ATCC 13813 (cfb), ATCC BAA-611 (rib), NCTC 11078 (bca 和 bac), ATCC12403 (cylE), ATCC12386 (lmb 和 scpB) 和无乳链球菌 4755 (hylB) 作为阳性对照。

1.3 统计学分析 结果采用 SPSS 21.0 进行统计分析; χ^2 检验独立用于变异之间的关联性。组别之间采取 t 检验;计数资料以率表示;所有统计检验均使用 $\alpha=0.05$ 的双侧检验,当 $P<0.05$ 时被

视为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清分型(CS)和分子分型(MS)的比较 见表1。在515例GBS样本中,能够用血清分型鉴定为I a, I b, II, III, IV, V, VI和IX血清型的共有470例,占80.6%,45例(8.7%)分离株不能被分型,占8.7%。515例GBS分离株全部能够被分子分型(MS)进行分型,MS可检测所有GBS衣壳血清型基因。在血清分型不能鉴定的45例分离株中,15例分离株为血清型III,而其余的30例分离株为血清型Ia。分子方法分型结果显示,血清型III是最常见的荚膜型(56.5%),然后依次为I b(17.5%),I a(12.6%),V(7.4%),II(2.7%),VI(1.4%),IV(1.0%)和IX(1.0%)。血清分型和分子分型的结果详见表1。在本研究中没有检测到血清型VII和VIII的分离株。

表1 GBS样本血清分型和分子分型

分型	I a	I b	II	III	IV	V	VI	IX	总计
血清分型	35	90	14	276	5	38	7	5	470
分子分型	65	90	14	291	5	38	7	5	515

针对不同人群特征,我们对I a, I b, II, III, IV, V, VI和IX血清型八种基因型进行了分类,分别为侵袭性、非侵袭性及定植株。不同血清型在侵袭性人群、非侵袭性人群及定植人群中表达不同,III型为主要血清型,分别为65.7%,42.0%和58.6%。除III型外,在侵袭性和非侵袭性感染人群中,血清型I a也较为常见(11.1%和29.5%),I b在定植人群中较为常见(19.3%)。详见表2。

表2 GBS人群的分子分型分布[n(%)]

血清型	n	侵袭性人群 (n=108)	非侵袭性人群 (n=112)	定植的人群 (n=295)
I a	65	12(11.1)	33(29.5)	20(6.8)
I b	90	10(9.3)	23(20.5)	57(19.3)
II	14	4(3.7)	1(0.9)	9(3.1)
III	291	71(65.7)	47(42.0)	173(58.6)
IV	5	1(0.9)	0(0.0)	4(1.4)
V	38	5(4.6)	8(7.0)	25(8.5)
VI	7	4(3.7)	0(0.0)	3(1.0)
IX	5	1(0.9)	0(0.0)	4(1.4)

2.2 药敏试验 515例GBS样本药敏试验结果显示:所有GBS分离株对青霉素、氨苄青霉素、头孢呋辛、头孢曲松和万古霉素敏感。E试验证实了GBS对青霉素100%敏感,MIC范围为0.023~0.064 μg/ml。多数分离株(n=443,86.0%)对四

环素耐药;345例分离株(67.0%)对红霉素耐药;319例(61.9%)对克林霉素耐药,其中319例克林霉素耐药的分离株中有15例显示为可诱导性克林霉素耐药分离株。

2.3 毒力基因 四种主要的毒力基因编码β-溶血素/细胞裂解素(β-H/C)、层黏结合蛋白、C5a多肽酶和透明质酸裂解酶(cylE, lmb, scpB和hylB)。几乎所有的GBS分离株中可以检测到cylE, lmb, scpB和hylB基因,检出率分别为97.1%,97.1%,96.1%和94.2%。另外三个毒力基因型(bac, bca, rib)的分布和各种血清型关系见表3。

表3 275例GBS分离株衣壳血清与毒力基因rib, bca, bac相关性[n(%)]

血清型	rib	bca	bac
I a	15(10.0%)	4(5.3%)	3(6.0%)
I b	25(16.7%)	18(24.0%)	18(36.0%)
II	6(4.0%)	2(2.7%)	0(0.0%)
III	83(55.3%)	51(68.0%)	25(50%)
V	14(9.3%)	0(0.0%)	4(8.0%)
VI	4(2.7%)	0(0.0%)	0(0.0%)
IX	3(2.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
总数	150(54.5%)	75(27.3%)	50(18.2%)

3 讨论 本研究是针对深圳地区人群B群链球菌血清型分布、毒力基因和耐药性分析的前瞻性研究,国内同类研究报道较少。在本研究中,515例GBS分离株用血清分型和分子分型方法进行分型,并且对其进行药敏分析。血清分型可以对470例标本进行分型,分子分型可以对所有GBS样本进行分型。相当比例分离株不能用常规的血清分型鉴定,我们的实验结果与有关文献报道^[7]相一致(8.7%)。血清分型相对经济实惠,操作简单,但存在一定的局限性,不能对所有分离株进行分型;分子分型能准确对所有分离株进行分型,效率高,但经济耗费相对昂贵。

本研究中,515例深圳地区GBS分离菌株中,共发现8种血清型,其中血清型III在GBS分离株中最为多见(56.5%),其次是血清型I b(17.5%)和I a(12.6%)。对分离菌株进行人群分布,发现在不同的人群中,III型为主要血清型。除III型外,在侵袭性和非侵袭性感染人群中,血清型I a也较为常见(11.1%和29.5%),I b在定植人群中较为常见(19.3%)。本研究中,血清型IV, VI和IX检出数较少,且未发现血清型VII, VIII,与相关文献^[8,11]报道一致。

本研究药敏结果表明,所有GBS分离株对β-内酰胺敏感,没有检测到青霉素耐药或中度耐药的

菌株。但有研究者已鉴定到对青霉素敏感性减弱的 GBS 菌株^[7,9]。因此,青霉素是否可作为分娩期预防和治疗 GBS 的一线药物仍有待于进一步研究。我们的药敏实验结果表明 GBS 对红霉素和克林霉素的耐药率较高,与相关报道一致^[10,15]。因此,对于那些对 β -内酰胺酶类抗生素过敏的孕妇,在选用红霉素和克林霉素时,一定要参考相关药敏结果。

在本研究中,275 例 GBS 样本中可以检测到 rib 基因,bac 基因和 bca 基因,其血清分型分别为 I a, I b, II, III, V, VI 和 IX。其中 rib 基因检出率最高,占总数的 54.5%,同欧美类似,但高于在波兰和科威特孕妇中的报道^[10]。来自东南亚和欧洲的报道指出 rib 基因与血清型 I a, II 和 III 密切相关^[12~14],但在我们的研究中,rib 在血清型 III 中表达最高,其次是 I b 和 I a,较为相似。此次研究中 bca 和 bac 基因主要分布在血清型 III 和 I b 中,比例分别为 68%,24% 和 50%,36%。在 Meehan 等^[14]的一个研究中,约 50%的血清型 III 分离株含 bac 基因或 bca 基因或两种基因同时存在,这与我们的研究结果一致。有研究发现,30~55%血清型 I a 的 GBS 分离株含 bca 基因^[5],但在我们的研究中 I a 血清型分离株含 bca 基因比例略低(5.3%)。以上这些结果表明毒力基因和 GBS 的血清分型之间存在相关性,但也存在地理差异与环境影响。

综上所述,分子分型和常规血清分型各有优缺点,但分子分型更有推广价值,GBS 分离株对青霉素和头孢类药物敏感,较多分离株对四环素、红霉素和克林霉素耐药。毒力基因与 GBS 的分型存在一定的相关性,但 GBS 的毒力和基因之间相互作用有待于进一步研究。另外,本研究不能证明毒力基因和 GBS 感染患者临床状态之间的相关性。

参考文献:

- [1] Vornhagen J, Adams Waldorf KM, Rajagopal L. Perinatal group B *Streptococcal* infections: virulence factors, immunity, and prevention strategies[J]. Trends Microbiol, 2017, 25(11): 919-931.
- [2] Jiang H, Chen M, Li T, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* causing community- and hospital-acquired infections in Shanghai, China[J]. Front Microbiol, 2016(7): 1308.
- [3] Eskandarian N, Ismail Z, Neela V, et al. Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) from Malaysian patients[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(3): 579-584.
- [4] Goudarzi G, Ghafarzadeh M, Shakib P, et al. Culture and real-time PCR based maternal screening and antibiotic susceptibility for group B *Streptococcus*: an Iranian experience[J]. Glob J Health Sci, 2015, 7(6): 233-239.
- [5] Dutra VG, Alves VM, Olendzki AN, et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1): 323.
- [6] Lyhs U, Kulkas L, Katholm J, et al. *Streptococcus agalactiae* serotype IV in humans and cattle, northern Europe 1[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(12): 2097-2103.
- [7] Morozumi M, Wajima T, Takata M, et al. Molecular characteristics of group B *Streptococci* isolated from adults with invasive infections in Japan[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(11): 2695-2700.
- [8] Teatero S, Ferrieri P, Martin I, et al. Serotype distribution, population structure, and antimicrobial resistance of group B *Streptococcus* strains recovered from colonized pregnant women[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(2): 412-422.
- [9] Nagano N, Nagano Y, Toyama M, et al. Penicillin-susceptible group B *Streptococcal* clinical isolates with reduced cephalosporin susceptibility[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(9): 3406-3410.
- [10] Li S, Huang J, Chen Z, et al. Antibiotic prevention for maternal group B *Streptococcal* colonization on neonatal GBS-related adverse outcomes: a meta-analysis[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 374.
- [11] van Wijk XM, Döhrmann S, Hallström BM, et al. Whole-genome sequencing of invasion-resistant cells identifies laminin $\alpha 2$ as a host factor for bacterial invasion[J]. MBio, 2017, 8(1): pii: e02128-16.
- [12] Teatero S, McGeer A, Low DE, et al. Characterization of invasive group B *Streptococcus* strains from the greater Toronto area, Canada[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(5): 1441-1447.
- [13] Sadeh M, Firouzi R, Derakhshandeh A, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates from pregnant and non-pregnant women at Yazd University Hospital, Iran[J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 9(2): e30412.
- [14] Meehan M, Cunney R, Cafferkey M. Molecular epidemiology of group B *Streptococci* in Ireland reveals a diverse population with evidence of capsular switching[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(7): 1155-1162.
- [15] 张迎华, 郭素芳, 孙景勇, 等. D 试验检测红霉素耐药葡萄球菌和 B 群链球菌[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(1): 76-78.

Zhang YH, Guo SF, Sun JY, et al. D test erythromycin resistant staphylococcus and group B *Streptococcus*[J]. J Mod Lab Med, 2008, 23(1): 76-78.

收稿日期: 2017-12-10

修回日期: 2018-01-21