

新生儿侵袭性感染B族链球菌的耐药表型及耐药机制

李娟^{1,2} 高坎坎² 容莉莉² 关小珊² 邓秋连² 钟华敏² 龙燕² 高秀蓉²
张丽华³ 穆小平⁴ 袁春雷⁵ 计文婧⁶ 刘海英²

【摘要】目的 通过分析侵袭性感染新生儿的B族链球菌(GBS)临床分离株的耐药性和耐药基因型,为新生儿GBS感染的防治和抗菌药物的合理应用提供理论依据。**方法** 收集2013年1月至2016年6月就诊于广东省4家医院GBS侵袭性感染<90 d新生儿病例。使用VITEK-2 Compact全自动细菌鉴定及药敏分析系统对GBS分离株进行鉴定和抗菌药物最小抑菌浓度(MIC)测定;应用PCR方法进行红霉素和四环素耐药基因检测。**结果** 确诊新生儿GBS侵袭性感染93例,其中34例(36.6%)早发型,59例(63.4%)晚发型。93株GBS分离株药物敏感试验结果显示,GBS对青霉素类、头孢菌素类、利奈唑胺和万古霉素均100%敏感;对左氧氟沙星、氧氟沙星和阿奇霉素的耐药率较低,分别为8.6%、2.2%和1.1%。对红霉素、克林霉素和四环素的耐药率高,分别为60.2%、78.5%和93.5%;耐药表型以固有表型(cMLS_B)为主,占53.9%,其次为L表型(26.3%)、诱导表型(iMLS_B) (15.8%)和M表型(3.9%)。56株红霉素耐药菌株ermB基因的携带率为85.7%,2株(3.6%)耐药菌株同时携带ermB和mefA基因,均未检出ermA。87株四环素耐药菌株中,四环素耐药基因tetO和tetM携带率分别为74.7%和46%,其中25株同时携带tetO和tetM,均未检出tetL和tetK基因。**结论** 青霉素和氨苄西林仍是治疗新生儿侵袭性GBS感染及高危新生儿预防GBS感染的首选药物。广东地区GBS红霉素耐药机制以ermB基因介导的核糖体靶位改变为主,四环素耐药机制以tetO和tetM基因为主。

【关键词】 新生儿; B族链球菌; 微生物敏感性试验; 耐药基因

Resistance patterns and mechanism of group B *Streptococcus* isolated from infants with invasive disease Li Juan¹, Gao Kankan², Rong Lili², Guan Xiaoshan², Deng Qiulian², Zhong Huamin², Long Yan², Gao Xiurong², Zhang Lihua³, Mu Xiaoping⁴, Yuan Chunlei⁵, Ji Wenjing⁶, Liu Haiying². ¹Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Medical University Affiliated Tumor Hospital, Guangzhou 510070, China; ²Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, China; ³Department of Clinical Laboratory, Donghua Hospital of Dongguan, 523110 Dongguan, China; ⁴Maternal and Child Health Hospital of Guangdong Provincial, 511400 Guangzhou, China; ⁵Boai Hospital of Zhongshan, Affiliated to Southern Medical University, 528403 Zhongshan, China; ⁶Management and Clinical Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, 710061 Xi'an, China

Corresponding author: Liu Haiying, Email: xiangliuhaiying@aliyun.com

【Abstract】Objective To investigate the antibiotics resistance rates and the resistance mechanisms of erythromycin and tetracycline among group B *Streptococcus* (GBS)-positive isolates cultured from infants with invasive infection, and to provide a reliable evidence for the prevention and treatment of infants with invasive GBS infection. **Methods** From January 2013 to June 2016, the GBS strains isolated from infants with invasive diseases of < 90 days from four teaching hospitals were collected to investigate the current antimicrobial resistance status and resistance genes of these strains. The GBS isolates were identified and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics was determined by VITEK-2 Compact automatic bacterial identification system. Genes associated with resistance to erythromycin (ermA, ermB, mefA) and

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.01.005

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2015A030401007); 广州市卫生局西医类一般项目(No. 20151A010040, No. 20161A010026, No. 20151A010034)

作者单位: 510070 广州市, 广州医科大学附属肿瘤医院检验科¹; 510623 广州市, 广州市妇女儿童医疗中心检验科²; 523110 东莞市, 东莞东华医院检验科³; 511400 广州市, 广东省妇幼保健院⁴; 528403 中山市, 南方医科大学附属中山博爱医院⁵; 710061 西安市, 西安交通大学药学院药事管理与临床药理学系⁶

通信作者: 刘海英, Email: xiangliuhaiying@aliyun.com

tetracycline (tetK, tetL, tetM, tetO) were investigated using PCR amplification and DNA sequencing. **Results** Total of 93 non-duplicate colonizing GBS isolates were collected from infants with invasive GBS infection, among whom, 34 cases with early-onset infection and 59 cases with late-onset infection were diagnosed. All the isolates were susceptible to penicillins, cephalosporins, linezolid and vancomycin. The resistance of the isolates to levofloxacin, ofloxacin and azithromycin were 8.6 %, 2.2% and 1.1%, respectively. The resistance of isolates to erythromycin, clindamycin and tetracycline were significantly high, which were 60.2%, 78.5% and 93.5%, respectively. The most predominant phenotype was cMLSB (53.9%), followed by L phenotype (26.3%), iMLSB (15.8%) and M phenotype (3.9%). Among the resistance genes investigated, tetM (46%) and tetO (74.7%) were detected among tetracycline-resistant isolates and ermB (85.7%) and mefA (3.6%) were found among macrolide-resistant isolates. But ermA was not detected. **Conclusions** For neonates and young infants, empirical treatment with penicillins and ampicillin at birth for all high-risk neonates were recommended. Ribosomal modification by ermB gene play major role in erythromycin resistance of GBS, and the tetracycline resistance mediated by tetO and tetM genes were dominated.

【Key words】 Infant; Group B Streptococcus; Antimicrobial sensitivity test; Resistance gene

B族链球菌 (group B *Streptococcus*, GBS) 又称无乳链球菌 (*S. agalactiae*), 是孕产妇胃肠道和泌尿生殖道常见的定植菌群, 为引起孕产妇和新生儿围生期侵袭性感染的重要病原菌之一。孕产妇GBS感染可导致胎膜早破、脓毒性流产、绒毛膜羊膜炎、胎儿先天性肺炎和宫内死胎等^[1]。新生儿GBS感染可导致重症肺炎、败血症和化脓性脑膜炎等。新生儿免疫功能不完善, 血脑屏障功能差, 尤其是< 90 d的新生儿、早产儿和低体重患儿更易发生败血症和化脓性脑膜炎。GBS侵袭新生儿感染起病急, 首发症状非特异 (进食少、昏睡、易激惹、发热和呼吸异常等)、病情发展凶险, 尽管当前重症监护室技术先进, 儿科医生及时采取抗菌药物及其他治疗措施, 仍有较高的发病率、致残率和病死率, 仍是全球新生儿败血症和脑膜炎重要的病原菌之一, 且呈逐年增多的趋势^[1]。欧美等发达国家对GBS感染相关的疾病负担非常重视, 但中国等亚洲发展中国家研究资料较少, 疾病负担仍不确定。近几年, 新生儿GBS感染逐渐引起国内医学界的重视, 但国内尚未制定统一的筛查和防治指南。随着产时抗菌药物预防性治疗 (intrapartum antibiotic prophylaxis, IAP) 方案的实施以及抗菌药物的过度使用, 近年来出现GBS部分抗菌药物严重耐药的现象^[2], 引起国内外普遍关注。在孕妇感染或定植的GBS菌株耐药谱研究相对较多, 但新生儿GBS感染菌株的耐药谱研究较少^[3-15], 掌握新生儿GBS感染临床分离株的耐药情况, 对新生儿GBS感染的防治及疗效评估至关重要。本研究通过收集广东地区2013年至2016年侵袭性感染新生儿分离的GBS菌株的耐药谱和耐药基因数据, 以期指导临床合理选用

抗菌药物, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

回顾性分析2013年1月至2016年6月就诊于广州市妇女儿童医疗中心及其他三家华南地区医院 (广东省妇幼保健院、中山博爱医院和东莞东华医院) 的住院和门诊患者。

1. 纳入标准: ①发病年龄为0~89 d的新生儿; ②侵袭性GBS感染即无菌体液或组织 (如血液、脑脊液、浆膜腔液、骨髓和脏器等) 分离培养GBS阳性的病例; ③诊断为新生儿肺炎、败血症及化脓性脑膜炎, 诊断标准参照《实用新生儿学》(第4版)。若同一患者不同时间段或不同标本类型分离的GBS菌株的生物学特征和药敏试验结果一致, 则定义为同一株, 剔除重复菌株。

2. 临床感染分型: 根据发病时间, 分为早发型 (early-onset GBS disease, GBS-EOD) 即生后1周内 (0~6 d) 发病, 以及晚发型 (late-onset GBS disease, GBS-LOD) 即生后7~89 d发病^[1]。

二、方法

1. 一般资料收集: 医院信息系统收集患儿的一般资料 (年龄、性别、出生体重、胎龄和发病年龄等)、临床症状和体征、实验室和影像检查结果等。通过病案查询或电话问询随访3个月以上。

2. 仪器和材料: BACT/ALERT 3D全自动细菌培养仪及配套培养瓶 (BioMerieux, 法国), VITEK-2 COMPACT全自动细菌鉴定及药敏分析系统及配套GP鉴定卡和GP67药敏卡 (BioMerieux, 法

国), T100 PCR仪(Bio-Rad, 美国)。5%哥伦比亚羊血琼脂平板、MH平板购自广州市迪景公司;药敏纸片购自Oxiod公司。PCR试剂、DNA marker和DNA提取试剂盒(Takara, 日本)购自大连宝生物有限公司, 引物由大连宝生物有限公司合成。

3. 细菌的分离培养、鉴定和药物敏感试验: 患儿的无菌体液标本(静脉血、脑脊液和其他无菌体液)接种于小儿中和抗菌药物培养瓶后放置血培养仪进行培养, 培养瓶报阳后, 及时转种至5%羊血琼脂平板, 35℃、5% CO₂培养18~20 h, 通过细菌形态学观察、细菌涂片镜检、触酶试验和CAMP试验进行初筛, 使用VITEK-2 COMPACT全自动细菌鉴定及药敏分析系统进行鉴定和药物敏感试验。美国临床和实验室标准协会指南2016版CLSI M100S26作为药物敏感性试验判读标准。质控菌株为肺炎链球菌(ATCC49619), 所有质控在控。所有操作严格按照《全国临床检验操作规程》(第4版)进行。

4. 诱导型克林霉素耐药试验(D-抑菌圈试验): 选用纸片扩散法检测GBS分离株大环内酯类耐药表型, 按照2016版CLSI M100-S26指南对红霉素耐药和对克林霉素敏感或中介的GBS菌株进行D-抑菌圈试验, 若细菌对红霉素和克林霉素均耐药, 则为固有表型(constitutive macrolide-lincosamide Streptogramin B, cMLS_B); 若对红霉素耐药, 靠近红霉素纸片处克林霉素抑菌圈减少或截平, 报告D-抑菌圈试验阳性, 则为诱导表型(inducible MLS_B, iMLS_B); 若对红霉素耐药而克林霉素敏感, 靠近红霉素处克林霉素抑菌圈无减少, 则为主动外排所致耐药, 即M型。若克林霉素耐药, 红霉素敏感或中介为L型表型。

5. 细菌DNA的提取: GBS菌株接种于含5%羊血琼脂平板, 置35℃、5% CO₂培养箱培养过夜, 约18~24 h, 使用DNA提取试剂盒提取基因组DNA, 严格按试剂说明书进行操作。

6. 耐药基因检测: PCR方法检测红霉素(ermA、ermB和mefA)和四环素耐药基因(tetL、tetK、tetO和tetM), PCR引物序列详见表1。PCR反应体系共50 μl: 模板DNA 5 μl, Ex Taq酶0.5 μl, 正反向引物各10 pmol/L, dNTP 4 μl, 缓冲液5 μl, 用ddH₂O补至50 μl。PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 循环内95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸50 s, 共33个循环, 终末72℃延伸10 min。

取10 μl PCR扩增产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统检测到目的条带后, PCR扩增产物送至华大基因公司完成测序。测序结果与PubMed Genbank数据库序列进行BLAST比对分析。

三、统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。两组间的比较采用Fisher确切概率检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。药物敏感试验数据使用世界卫生组织(WHO)推荐的WHONET 5.6软件进行分析。

结 果

一、研究对象的一般资料

共纳入93例非重复新生儿(< 90 d)GBS侵袭性感染病例, 其中64例来自主办单位(广州市妇女儿童医疗中心), 29例来自3家广东省内合作单位(广东省妇幼保健院、东莞东华医院和中山博爱医院)。

其中GBS-EOD感染者34例(占36.6%); GBS-LOD感染者59例(占63.4%), 以LOD较常见, 标本来源分布详见表2。

二、入组患儿的临床特征

34例GBS早发型感染患儿中18例(53%)发生败血症, 16例(47%)发生脑膜炎; 24例(70.6%)GBS早发型患儿于出生后24 h内发病, 50%患儿以发热为首发症状。59例GBS晚发型感染患儿中26例(44.1%)发生败血症, 33例

表1 红霉素和克林霉素耐药基因引物序列及产物

引物	核酸序列(5'→3')	产物长度 (bp)
ermA-F	TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA	645
ermA-R	CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT	
ermB-F	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA	639
ermB-R	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	
mefA-F	CGTAGCATTGGAACAGC	316
mefA-R	TGCCGTAGTACAGCCAT	
tetL-F	TGAACGTCTCATTACCTG	993
tetL-R	ACGAAAGCCCCACCTAAAA	
tetO-F	AAC TT AGGCAT TC TGGC TCAC	515
tetO-R	TCCC AC TGT TCCA TAT CG TCA	
tetK-F	TCCTGGAACCATGAGTGT	189
tetK-R	AGATAATCCGCCCATAC	
tetM-F	TTATCAACGGTTTATCAGG	397
tetM-R	CGTATATATGCAAGACG	

(55.9%)发生脑膜炎,脑膜炎为晚发型GBS感染最常见的临床表现。37.5% (6/16)早发型和39.4% (13/33)晚发型脑膜炎存活患儿存在不同程度的神经系统后遗症,主要表现在视神经损害、听神经传导通路受损、颅内出血和脑积水、运动神经发育迟缓等,严重者有多部位脑梗塞和脑软化症。存活患儿脑膜炎复发率高,导致反复入院治疗。

三、药物敏感试验

93株GBS菌株对青霉素类(如青霉素、氨苄西林)、头孢菌素类(头孢曲松)、万古霉素和利奈唑胺100%敏感。对左氧氟沙星、氧氟沙星和阿奇霉素的耐药率较低,分别为8.6%、2.2%和1.1%。对红霉素耐药率为60.2% (56/93),中介率为18.3% (17/93),不敏感率高达78.5%,敏感20株。克林霉素耐药率高达78.5% (73/93株),敏感20株;其中12株为红霉素诱导克林霉素耐药。四环素耐药率高达93.5% (87/93株),敏感6株。药敏试验结果详见表3。4家医院分离株对四环素耐药率均> 90%。2013年至2016年本院分离的64例侵袭性GBS菌株,对红霉素和克林霉素的耐药率较高且呈逐年上升趋势(图1)。东莞东华医院红霉素和克林霉素的耐药率分别为41.7%和75%,广东省妇幼保健院分别为11.1%和55.6%,中山博爱医院分别为37.5%和37.5%。

四、红霉素和克林霉素的耐药表型以及基因型

56株红霉素耐药菌株ermB基因的携带率为85.7% (48/56), 3.6% (2/56)耐药菌株同时携带ermB和mefA基因; 14.3% (8/56)红霉素耐药株未检测出耐药基因。17株红霉素中介菌株ermB和mefA的携带率分别为100% (17/17)和5.9%

(1/17),均未检出ermA基因。同时,在20株红霉素敏感株中,有9株GBS株检出ermB基因,未检出ermA和mefA基因。经Fisher确切概率检验,红霉素耐药基因检出率在红霉素不敏感菌株与敏感菌株中的检出率差异具有统计学意义($P < 0.001$)。

耐药表型分析结果显示,固有表型(cMLS_B)为主,占53.9% (41/76),其次是L表型占26.3% (20/76)、诱导表型(iMLS_B)占15.8% (12/76)和M表型占3.9% (3/76)。红霉素耐药表型与基因型的关系详见表4。PCR扩增产物基因测序结果与Genebank数据库进行Blast同源性比对,基因序列一致率为99%以上。

五、四环素的耐药基因型

87株四环素耐药菌株中,四环素耐药基因tetO和tetM携带率分别为74.7% (65/87)和46% (40/87),其中25株同时携带tetO和tetM,均未检出tetL和tetK基因。7株四环素耐药菌株未检出耐药基因,3株四环素敏感株中也检出tetO和tetM耐药基因,未检出tetL和tetK基因。经Fisher确切概率检验,四环素耐药基因检出率在四环素耐药菌株与敏感菌株中的检出率差异具有统计学意义($P = 0.015$)。部分PCR扩增产物电泳结果见图2,部分

表3 93株GBS对11种抗菌药物的耐药情况[例(%)]

抗菌药物	耐药		中介		敏感	
	株数	耐药率	株数	中介率	株数	敏感率
青霉素G	0	0.0	0	0.0	93	100.0
氨苄西林	0	0.0	0	0.0	93	100.0
头孢曲松	0	0.0	0	0.0	93	100.0
万古霉素	0	0.0	0	0.0	93	100.0
利奈唑胺	0	0.0	0	0.0	93	100.0
四环素	87	93.5	0	0.0	6	6.5
克林霉素	73	78.5	0	0.0	20	22.6
红霉素	56	60.2	17	18.3	20	21.5
左氧氟沙星	8	8.6	1	1.1	84	90.3
氧氟沙星	2	2.2	0	0.0	91	97.8
阿奇霉素	1	1.1	0	0.0	92	98.9

表2 93例GBS感染的标本分布构成比[例(%)]

疾病类型	血液	脑脊液	血液+脑脊液	关节腔积液
GBS-EOD	28 (30.1)	1 (1.1)	5 (5.4)	0 (0.0)
GBS-LOD	34 (36.6)	16 (17.2)	8 (8.6)	1 (1.1)
合计	62 (66.7)	17 (18.3)	13 (14.0)	1 (1.1)

表4 红霉素和克林霉素耐药表型与基因型的相关性

耐药表型	菌株[株(%)]	耐药基因(株)	耐药特征
cMLS _B	41 (53.9)	ermB (33) ermB + mefA (2)	红霉素和克林霉素同时耐药
iMLS _B	12 (15.8)	ermB (11)	红霉素耐药、克林霉素诱导耐药
M表型	3 (3.9)	ermB (2)	红霉素耐药、克林霉素敏感
L表型	20 (26.3)	ermB (18) ermB + mefA (1)	克林霉素耐药、红霉素敏感或中介
合计	76	ermB (64) ermB + mefA (3)	

基因序列结果见图3。

讨 论

尽管美国等西方国家从1996年开始逐渐采用产前筛查和产时抗菌药物预防性治疗(IAP)来预防新生儿GBS感染,使GBS-EOD的发病率下降80%,然而对GBS-LOD效果不明显,目前新生儿GBS感染的致病机理尚未完全阐明,全球尚无完善的防治策略能够完全消除GBS感染,GBS感染仍是全球新生儿主要致残及致死病原菌之一,给患儿家庭和社会造成一定的经济和社会负担,且近年来全球发病率有上升趋势,特别是晚发型,具体原因尚不明确^[1, 3, 16]。

本研究共收集93株新生儿GBS侵袭性感染病例,其中47%为早发型和55.9%为晚发型发展为脑膜炎,38.8%脑膜炎存活患儿存在不同程度的神经系统后遗症。GBS不仅侵袭胎儿或新生儿的肺部,

同时会通过血流感染侵袭全身脏器和组织,尤其GBS具有脑膜趋向性,通过黏附、转位等侵袭血脑屏障,引发脑膜炎^[1]。GBS脑膜炎较非GBS脑膜炎患儿病情更重,治疗周期和住院时间更长,后遗症严重和病死率更高。GBS-EOD多发生在出生前或出生时;首要高危因素是孕产妇胃肠道和生殖道的GBS定植(尤其是GBS高密度定植),GBS菌尿症是高密度定植的重要标志。EOD的传播方式主要是母婴垂直传播,有1%~2%定植阳性孕妇分娩的新生儿发生侵袭性感染,大多数患儿在出生24 h内出现临床症状^[1]。EOD以败血症和暴发性肺炎为主,部分患儿出现脑膜炎;首发临床表现为呼吸急促,低氧、发绀、肺高压等呼吸道系统症状。GBS-LOD多发生在出生时或出生后。LOD高危因素是早产,且出生越早危险系数越高^[1]。LOD传播方式主要是母婴垂直传播和出生后水平传播,主要表现为化脓性脑膜炎;高浓度的GBS菌血症是触发中枢神经系统炎症的先决条件。研究报道高毒力高

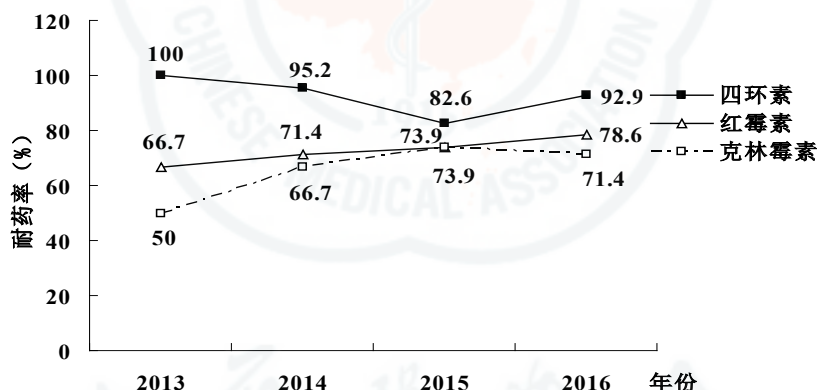
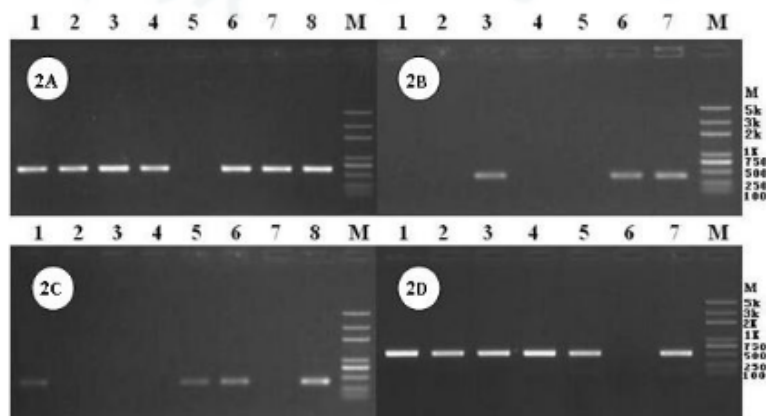
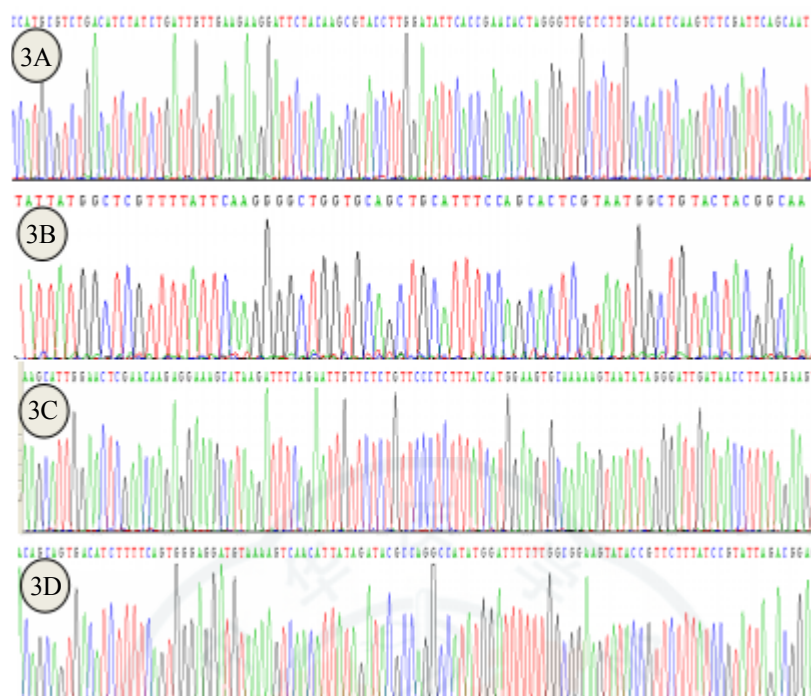


图1 2013至2016年侵袭性B族链球菌对四环素、红霉素和克林霉素的耐药率变迁



注: A: *ermB* 基因, B: *mefA* 基因, C: *tetM* 基因, D: *tetO* 基因; A 图1~8泳道、B 图1~7泳道、C 图1~8泳道和D 图第6孔: GBS 菌株, D 图第6孔: 阴性对照; D 图第7孔: 阳性对照

图2 红霉素和四环素耐药基因PCR产物电泳图



注: A: *ermB* 基因, B: *mefA* 基因, C: *tetM* 基因, D: *tetO* 基因

图3 红霉素和四环素耐药基因部分基因序列图

侵袭力菌株(如基因序列分型ST-17)和早产是新生儿GBS感染的独立高危因素。

本研究GBS感染临床分离株对青霉素类、头孢菌素类、万古霉素和利奈唑胺均敏感,国外有关于GBS菌株对青霉素、 β -内酰胺类、头孢菌素和头孢噻肟敏感性降低的研究报道^[13, 17-19],国内申阿东等^[20]报道1994年至1999年北京地区GBS分离株对青霉素类的中介率高达17%,本研究期间尚未发现青霉素不敏感菌株;左氧氟沙星、氧氟沙星和阿奇霉素的耐药率较低,与国内外报道一致。本研究红霉素和克林霉素耐药率较高,红霉素不敏感率为78.5%(耐药率为60.2%+中介耐药率为18.3%),克林霉素耐药率为78.5%。国内外新生儿GBS感染红霉素耐药率报道:意大利为12%^[3],法国为16.7%^[4],西班牙为8.3%^[5],日本为35%^[6],韩国为42.9%^[7],北京为92.5%^[8]。新生儿GBS感染克林霉素耐药率报道:西班牙为4.1%^[5],日本为15%^[6],北京为87.5%^[8]。国内外孕妇GBS定植红霉素和克林霉素耐药率报道:巴西为4.1%和3.1%^[9],西班牙为16.5%和10.1%^[5],美国为50.7%和38.4%^[10],瑞士为14.6%和14%^[11],加拿大为36%和33%^[12],韩国为25.6%和54%^[13],北京为78.6%和64.3%^[14]。综上报道,我国新生儿感染和围产期妇女定植GBS

分离株的红霉素和克林霉素耐药率较国外明显偏高,广州地区较北京略低,本院较其他三家参与医院耐药率略高。本课题组现阶段在收集孕妇GBS耐药谱的数据以行进一步研究。GBS对红霉素和克林霉素的主要耐药表型和机制^[1, 15]: ①MLS_B型:*erm*基因编码的甲基化酶导致的核糖体构型改变,使GBS与大环内酯类抗菌药物结合受阻,即大环内酯类-林可霉素类-链阳霉素B三类抗菌药物交叉耐药。MLS_B耐药表型又分为固有表型(cMLS_B)和诱导表型(iMLS_B)。②M表型:*mefA*基因编码外排蛋白使细菌主动将大环内酯类药物泵出菌体外而产生耐药。主要表现为红霉素耐药,对林可霉素和链阳性菌素B敏感。本研究GBS耐药表型以cMLS_B为主,与国内外近年研究数据一致^[12, 15]。通过耐药基因检测,*ermB*是介导广东地区红霉素耐药的主要机制,几乎全部cMLS_B、全部iMLS_B和M型耐药表型均携带*ermB*基因,85.7%红霉素耐药菌株携带*ermB*耐药基因。耐药基因流行情况存在时空和地域差异,近年国内新生儿侵袭和孕产妇定植GBS菌株红霉素耐药均以*ermB*基因为主^[8, 15],法国新生儿以*ermB*为主^[4],日本新生儿以*ermA*为主^[6],韩国新生儿以*ermB*为主^[7]。8株红霉素耐药株未检测出*ermA*、*ermB*和*mefA*基因,提示可能存在其

他耐药机制。本研究发现95.9% (70/73株) 红霉素不敏感株与克林霉素发生交叉耐药 (cMLSB或iMLSB), 因此, GBS红霉素不敏感株高度怀疑克林霉素耐药。

国内外新生儿感染和围产期妇女定植/感染的GBS分离株对四环素的耐药率均较高: 本研究为93.5%, 北京为83.9%^[14], 意大利为93.3%^[3], 法国为90%^[4], 加拿大为89%^[12], 巴西为97%^[9]。究其原因因为四环素广泛应用于农业和畜牧业的抗感染治疗, 使GBS在内的许多细菌对四环素产生普遍耐药性, 耐药基因通过质粒、转座子、接合转座子和整合子在不同菌群间传播, 导致四环素高耐药率现状。四环素耐药主要是获得耐药基因, tetK和tetL编码外排蛋白, 介导四环素耐药; tetM和tetO编码核糖体保护蛋白, 使四环素无法与细菌核糖体结合而耐药^[15]。本研究四环素耐药主要由tetO和tetM介导, 携带率分别为74.7%和46%, 与陈惠玲等^[15]报道一致。然而, 欧美国家主要由tetM介导, 如意大利为97.1%^[3], 法国为99%^[4], 巴西为99.3%^[9]。另外, 本研究同时发现在少数红霉素和四环素敏感菌株检出耐药基因, 可能是敏感菌株通过质粒、转座子等从GBS菌株或其他菌群获得耐药基因, 尚未表现出耐药表型, 具体机制有待进一步研究。

目前, 全球普遍使用美国CDC制订的预防围产期GBS感染指南, 该指南建议35~37周的孕妇均应行直肠和阴道的GBS筛查, 阳性者予以预防性治疗; 对有绒毛膜羊膜炎、长期胎膜早破、早产的高危孕妇均应接受GBS预防性治疗^[16]。CDC指南认为青霉素是预防新生儿GBS感染的首选药物, 青霉素过敏者除外; 青霉素低危过敏孕妇推荐使用头孢唑啉等一、二代头孢类药物, 羊水内可达到较高的药物浓度, 而且青霉素和头孢菌素类抗菌药物的交叉过敏反应发生率较低, 约为4%~6%^[21]; 青霉素高危过敏反应孕妇, 若红霉素和克林霉素均敏感可以使用克林霉素。若孕妇对克林霉素耐药或药敏试验结果未知时, 万古霉素可用于青霉素高危过敏^[21]。尽管美国CDC推荐克林霉素作为青霉素高危过敏反应孕妇的预防手段, 但与国外相比, 我国GBS分离株对于红霉素和克林霉素处于高耐药率现状, 克林霉素作为我国GBS感染的预防和治疗手段需结合药敏试验, 应慎重考虑。有研究数据表明, 当青霉素高危过敏反应孕妇的GBS定植菌对克林霉素耐药, 若使用克林霉素来预防围产期GBS感染会导致

防治失败, 严重威胁着胎儿和新生儿的健康^[21]。

本研究新生儿感染GBS株对青霉素和氨苄西林100%敏感, 青霉素和氨苄西林可作为治疗新生儿GBS感染首选药物, 青霉素过敏患儿除外。氟喹诺酮类药物对新生儿关节软骨有损伤, 不常规用于孕妇和新生儿。四环素影响儿童牙齿和骨骼发育, 肝肾毒性严重, 不应用于儿童。尽管利奈唑胺100%敏感, 但其主要用于治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素肠球菌和耐青霉素肺炎链球菌引起的危重症感染, 其胎盘穿透能力尚未明确, 因此不予推荐应用于GBS感染治疗^[21]。万古霉素有肾毒性和耳毒性, 新生儿要慎用。由于头孢菌素类较青霉素类较易穿透血脑屏障, 对于脑膜炎患儿临床推荐使用头孢曲松进行治疗。当怀疑脑膜炎时, 推荐使用头孢噻肟; 与万古霉素相比, 头孢噻肟在脑脊液的血药浓度较高, 且最小杀菌浓度较低。与头孢唑林相比, 克林霉素、红霉素和万古霉素到达胎儿循环和羊水水中的杀菌水平非常有限^[3]。当临床怀疑新生儿败血症时, 临床医生应进行全面的临床评估, 包括外周血培养、血常规(白细胞计数、中性粒细胞比例和血小板计数), 胸片(有呼吸道感染症状和体征时), 必要时行腰椎穿刺。当血培养结果尚未回报临床, 临床医生应及早开始充分的经验抗感染治疗, 国外专家^[1]建议初始治疗方案为联合使用氨苄西林和氨基糖苷类(庆大霉素), 覆盖引起新生儿败血症的常见致病菌, 如阳性球菌(尤其是GBS和其他链球菌)、单核李斯特菌和阴性杆菌(如肠杆菌)。若怀疑合并化脓性脑膜炎, 需联合穿透血脑屏障的药物, 如头孢噻肟等头孢菌素类。当产妇诊断为绒(毛)膜羊膜炎, 尽管新生儿出生时“无症状”, 其患EOD的风险较高, 应进行血常规和血培养, 在等待血培养结果的同时, 也应尽早开始抗感染经验治疗。若“无症状”新生儿的血培养结果报告为阴性, 此时仍不可掉以轻心, 有可能是抽血量偏少或在抗菌药物使用后抽血导致的血培养假阴性, 应严密观察病情的进展^[2]。若实验室回报致病菌和药敏试验结果, 临床医生根据患儿病情、细菌特征、药动学和药敏结果制定安全有效的治疗方案, 尤其极低体重儿, 使血液或脑脊液的药物浓度足以抑制细菌生长。新生儿是一个特殊的群体, 应用于新生儿的抗菌药物的药理学(包括吸收、排泄和毒性)是独特的, 不可以照搬成人的防治指南。目前尚无统一的治疗新生儿

侵袭性感染的指南, 临床医生根据初期感染征兆开始抗感染经验治疗, 根据感染症状的持续时间决定抗感染疗程。尽管多数GBS对氨基糖苷类耐药, 但国外研究^[1]报道临床应用青霉素或氨苄西林联合庆大霉素疗效较好。

流行病学资料显示全球范围新生儿GBS侵袭性感染发病率呈逐年增高趋势, GBS耐药菌株呈全球性分布, 且耐药率呈现不断增加的趋势。在中国, 尚未制定统一的国家或地方GBS防治指南来预防和治疗新生儿GBS感染, 不同地区或同一地区、不同医疗机构所实施GBS筛查和防治方案不完全相同, 许多大型三甲医院采用美国CDC的防治指南, 因此国内的GBS侵袭性感染新生儿的疾病负担(包括GBS侵袭性感染引起的新生儿肺炎、败血症、脑膜炎、死胎、流产等)仍不明确, 需要多中心大数据的资料来支持。产时使用青霉素类或头孢类药物对高危因素的孕妇进行围产期预防性治疗, 是防止新生儿发生早发型GBS感染较有效的预防措施。普遍筛查方案加IAP是目前最为有效的预防新生儿GBS感染的策略, 但仍有一定的局限性, 对于预防晚发型GBS感染仅能降低其严重程度, 并不能完全预防其发生。

综上, 鉴于不同地区或医院用药习惯不同, 及细菌耐药谱的不断变迁, 使GBS耐药谱存在时间和地域差异, 使耐药基因的分布和流行明显不同, 定期监测本地区GBS耐药谱和耐药基因监测, 了解耐药性变迁、耐药流行株的发生发展及传播规律, 对临床医生制订治疗和预防新生儿GBS感染方案具有重要的指导价值, 对预防和控制耐药株的产生和传播至关重要, 也可用于评估当前GBS防治措施对降低围产期侵袭性GBS感染发病率和病死率的成效。

参 考 文 献

- [1] Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, et al. Remington and Klein's infectious diseases of the fetus and newborn infant[M]. Eighth Edition. Saunders, Philadelphia. 2006:411-456.
- [2] Cotten CM. Antibiotic stewardship: reassessment of guidelines for management of neonatal sepsis[J]. Clin Perinatol, 2015, 42(1):195-206.
- [3] Imperi M, Gherardi G, Berardi A, et al. Invasive neonatal GBS infections from an area-based surveillance study in Italy[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(12):1834-1839.
- [4] Joubrel C, Tazi A, Six A, et al. Group B *Streptococcus* neonatal invasive infections, France 2007-2012[J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(10):910-916.
- [5] Liébana-Martos Mdel C, Cabrera-Alavargonzalez J, Rodríguez-Granger J, et al. Serotypes and antibiotic resistance patterns in beta-

hemolytic *Streptococcus agalactiae* isolates in colonized mothers and newborns with invasive disease[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2015, 33(2):84-88.

- [6] Chang B, Wada A, Hosoya M, et al. Characteristics of group B *Streptococcus* isolated from infants with invasive infections: a population-based study in Japan[J]. Jpn J Infect Dis, 2014, 67(5):356-360.
- [7] Kang HM, Lee HJ, Lee H, et al. Genotype characterization of group B *Streptococcus* isolated from infants with invasive diseases in South Korea[J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(10):e242-e247.
- [8] Wang P, Ma Z, Tong J, et al. Serotype distribution, antimicrobial resistance, and molecular characterization of invasive group B *Streptococcus* isolates recovered from Chinese neonates[J]. Int J Infect Dis. 2015 Aug; 37:115-118.
- [9] Dutra VG, Alves VM, Olendzki AN, et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14:323.
- [10] Back EE, O'Grady EJ, Back JD. High rates of perinatal group B *streptococcus* clindamycin and erythromycin resistance in an upstate New York hospital[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(2):739-742.
- [11] Fröhlicher S, Reichen-Fahrni G, Müller M, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B *streptococci* in pregnant women: results from a Swiss tertiary centre[J]. Swiss Med Wkly, 2014, 144:w13935.
- [12] 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.
- [13] Nagano N, Nagano Y, Toyama M, et al. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(4):849-856.
- [14] Wang P, Tong JJ, Ma XH, et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China[J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0120035.
- [15] 陈惠玲, 邓家德, 叶惠芬, 等. 侵入性感染B族链球菌对红霉素及四环素的耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(10):1354-1357.
- [16] Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC[J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(RR-10):1-36.
- [17] Chu YW, Tse C, Tsang GK, et al. Invasive group B *streptococcus* isolates showing reduced susceptibility to penicillin in Hong Kong[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(6):1407-1409.
- [18] Morikawa Y, Kitazato M, Katsukawa C, et al. Prevalence of cefotaxime resistance in group B *streptococcus* isolates from Osaka, Japan[J]. J Infect Chemother, 2003, 9(2):131-133.
- [19] Dahesh S, Hensler ME, Van Sorge NM, et al. Point mutation in the group B *streptococcal* pbp2x gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(8):2915-2918.
- [20] 申阿东, 张桂荣, 王咏红, 等. B组链球菌的耐药性及红霉素耐药基因检测研究[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(9):661-664.
- [21] Blaschke AJ, Pulver LS, Korgenski EK, et al. Clindamycin-resistant group B *streptococcus* and failure of intrapartum prophylaxis to prevent early-onset disease[J]. J Pediatr, 2010, 156(3):501-503.

(收稿日期: 2017-04-28)

(本文编辑: 孙荣华)

李娟, 高坎坎, 容莉莉, 等. 新生儿侵袭性感染B族链球菌的耐药表型及耐药机制[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(1):20-27.