

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.24.006

婴儿感染 B 族链球菌的喹诺酮耐药突变调查*

关小珊,唐倩,邓秋连,钟华敏,高坎坎,刘海英[△]

广东省广州市妇女儿童医疗中心儿童院区检验科,广东广州 510120

摘要:目的 调查 B 族链球菌(GBS)的喹诺酮耐药情况,探讨耐药株的突变位点与血清学分型之间的关系。方法 选取从 2014 年 1 月至 2019 年 12 月于该中心确诊为 GBS 感染的婴儿临床标本中分离出的非重复菌株共 120 株作为研究对象。对纳入研究的 GBS 进行药敏试验。PCR 扩增喹诺酮耐药菌株的喹诺酮耐药决定区(QRDR)靶基因 GyrA 和 ParC,乳胶凝集法检测上述菌株的血清学分型,分析不同位点突变与血清学分型之间的关系。结果 2014—2019 年共收集来自婴儿的 GBS 临床分离株 120 株,其中喹诺酮耐药株 14 株,喹诺酮耐药率为 11.7%。将喹诺酮耐药株中的 11 株用于后续实验,这些耐药株 100% 存在 GyrA 的碱基突变,表现为 81 位丝氨酸变为亮氨酸,219 位丙氨酸变为脯氨酸或缬氨酸。仅 1 株同时出现 ParC 和 GyrA 的有义突变。共检测出 2 种血清学分型,分别为 III 型(90.9%)和 I b 型(9.1%)。结论 2014—2019 年,该中心喹诺酮耐药 GBS 临床分离株以 GyrA 基因耐药突变为主,表现为 81 位和(或)219 位的氨基酸改变,血清学分型以 III 型为主。

关键词: B 族链球菌; 喹诺酮耐药; 基因突变; 婴儿

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)24-3525-04

Investigation of quinolone resistance mutations in group B Streptococcus which infected the infants*

GUAN Xiaoshan, TANG Qian, DENG Qiulian, ZHONG Huamin, GAO Kankan, LIU Haiying[△]

Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510120, China

Abstract: Objective To investigate the quinolone resistance of group B Streptococcus (GBS), and the relationship between the mutation site of the resistant strains and the serological types. **Methods** A total of 120 non-repetitive strains isolated from clinical specimens of infants diagnosed with GBS infection in the center from January 2014 to December 2019 were selected as the research objects. A drug sensitivity test was conducted on the GBS included in the study. The quinolone resistance-determining regions (QRDRs)' target genes GyrA and ParC of quinolone-resistant strains were amplified by PCR, and the serological type of the above-mentioned strains was detected by latex agglutination, and the relationship between mutations at different sites and serological type was analyzed. **Results** From 2014 to 2019, a total of 120 GBS clinical isolates from infants were collected, of which 14 were quinolone-resistant strains, and the quinolone-resistant rate was 11.7%. Among them, 100% of the 11 quinolone-resistant strains used in the follow-up experiment had GyrA mutations, which made the 81-position serine change to leucine, and the 219-position alanine change to proline or valine. Only one strain showed both ParC and GyrA sense mutations. A total of 2 serotypes were detected, type III (90.9%) and type I b (9.1%). **Conclusion** From 2014 to 2019, quinolone-resistant GBS clinical isolates from the center were dominated by GyrA resistance mutations, which made changes in amino acids at positions 81 and (or) 219, and the major serological type was type III.

Key words: group B Streptococcus; quinolone resistance gene; mutation; infant

B 族链球菌(GBS)正常定植于妇女下生殖道,为围生期新生儿败血症、肺炎和脑膜炎的主要致病菌^[1-2]。基于孕晚期 GBS 筛查或临床高危因素评估的

产时抗菌药物干预是当前预防新生儿 GBS 感染唯一有效的措施,而及时的抗菌治疗直接决定患儿的临床预后^[3]。尽管喹诺酮类抗菌药物不用于孕妇和儿童

* 基金项目:广东省广州市科创委项目(201804010447)。

作者简介:关小珊,女,副主任技师,本科,主要从事临床微生物检验研究。△ 通信作者,E-mail:xiangliuhaiying@aliyun.com。

本文引用格式:关小珊,唐倩,邓秋连,等.婴儿感染 B 族链球菌的喹诺酮耐药突变调查[J].检验医学与临床,2021,18(24):3525-3527.

感染的治疗,但多重耐药 GBS 菌株的耐药谱易产生协同效应,使常规使用的抗菌药物敏感性降低,而且细菌间耐药质粒的水平传播大大加快了喹诺酮耐药的传播。本研究旨在调查本中心 2014—2019 年的 GBS 喹诺酮耐药状况,并探讨耐药突变位点与菌株血清学分型之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取从 2014 年 1 月至 2019 年 12 月于本中心确诊为 GBS 感染的婴儿血液、脑脊液标本中分离出的非重复菌株共 120 株作为研究对象。纳入标准:(1)菌株来源患儿有 1 个或多个正常情况下无菌部位 GBS 培养阳性;(2)菌株来源患儿符合 GBS 感染诊断标准时,日龄不超过 90 d。本研究通过广州市妇女儿童医疗中心医学伦理委员会审批通过。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括法国生物梅里埃公司 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定和药敏分析仪和配套药敏试验卡、德国 Biometra 公司 PCR 仪。PCR 检测试剂购自 Takara 公司;血清学分型试剂盒购自丹麦 SSI 公司;质控菌株为肺炎链球菌 ATCC49619,购自国家卫生健康委员会临床检验中心。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 把 GBS 临床分离株从 -80 °C 冰箱取出,复苏并增菌;用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定药敏分析仪进行药敏检测,结果判读参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)^[4]及欧洲药敏试验联合委员会(EUCAST)^[5]标准。菌株对 2 种喹诺酮类抗菌药物(本研究为左氧氟沙星和莫西沙星)中的 1 种耐药即为喹诺酮耐药菌株。

1.3.2 血清学分型 使用 Oxoid 公司 Strep-B-Latex 快速乳胶凝集试剂盒对 GBS 进行血清学分型:准备 220 μL 浓菌悬液,每孔分别加入 20 μL 的细菌悬液及 5 μL 的胶乳试剂(兔抗血清 I a、I b 和 II~IX),充分混匀并轻摇 15~30 s,30 s 内出现凝集则判定为阳性。

1.3.3 PCR 根据文献[6]设计引物,GyrA 和 ParC 的引物序列见表 1。用煮沸法提取 GBS 临床分离株基因组 DNA 作为模板,PCR 反应总体积为 20 μL。GyrA 的 PCR 参数设置:94 °C 3 min,94 °C 60 s、45 °C 60 s、68 °C 60 s 共 30 个循环,68 °C 6 min;ParC 的 PCR 参数设置:94 °C 3 min,94 °C 60 s、48 °C 60 s、72 °C 60 s 共 30 个循环,72 °C 5 min。

1.3.4 电泳及测序 反应结束后,进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,使用紫外凝胶成像系统采集图像并保存。将以喹诺酮耐药菌株基因组 DNA 为模板的 GyrA 和 ParC PCR 阳性产物直接送华大基因公司测序,将测序结果与从 Gene Bank 数据库下载的参考菌株的喹

诺酮耐药决定区(QRDRs)序列用 CLC Genomics Workbench 12.0 和 ExPASy 软件进行比对,从而确定碱基突变引起的氨基酸改变。

表 1 GyrA 和 ParC 基因引物序列

检测基因	引物序列(5'-3')	温度(°C)	产物长度(bp)
GyrA	正向:CGAGTTTTATCGATTACGCC	60	521
	反向:TCACCAAGGCACCACTAGG		
ParC	正向:AAGGGATTTTCGCAAATCTGC	55	494
	反向:TCCTTGAATGATAGCGCCAG		

2 结果

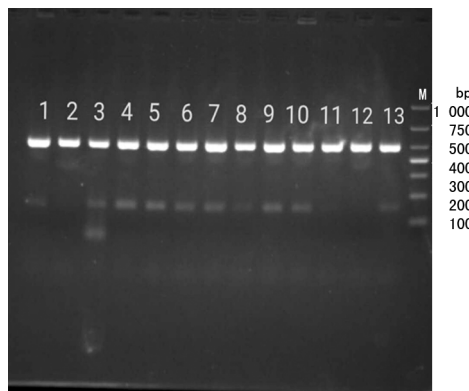
2.1 药敏试验 120 株 GBS 对青霉素、万古霉素和利奈唑烷 100.0% 敏感,其中 14 株为喹诺酮耐药菌株。本研究中,GBS 的喹诺酮耐药率为 11.7% (14/120),近 4 年(2016—2019 年)的耐药率分别为 9.7% (3/31)、15.4% (2/13)、21.4% (6/28)、17.6% (3/17)。

2.2 GyrA 和 ParC PCR 产物的电泳检测 凝胶电泳显示,扩增产物与预期目的片段大小一致,见图 1、2。



注:1~11 为喹诺酮耐药菌株;12 为喹诺酮敏感株;13 为标准株;M 为分子标准带。

图 1 GyrA PCR 产物电泳图



注:1~11 为喹诺酮耐药菌株;12 为喹诺酮敏感株;13 为标准株;M 为分子标准带。

图 2 ParC PCR 产物电泳图

2.3 靶基因测序及比对 11 株喹诺酮耐药菌株

100%存在 GyrA 的碱基突变,且均为错义突变,导致的氨基酸改变包括 81 位丝氨酸(Ser)→亮氨酸(Leu),219 位丙氨酸(Ala)→脯氨酸(Pro)或缬氨酸(Val)。仅存在 GyrA(Ser81Leu)单位点突变的占 36.36%(4/11),同时存在 GyrA(Ser81Leu 和 Ala219Pro)或 GyrA(Ser81Leu 和 Ala219Val)双突变的分别占 45.45%(5/11)和 9.10%(1/11)。仅 1 株耐药株有 ParC 的有义突变,且与 GyrA 突变同时出现;血清学分型显示,Ⅲ型占 90.9%(10/11),I b 型占 9.1%(1/11),见表 2。

表 2 喹诺酮耐药菌株 GyrA 与 ParC 基因突变导致的氨基酸改变及血清学分型

菌株编号	突变导致的氨基酸改变		血清学分型
	GyrA	ParC	
34	Ser81Leu,Ala219Val	—	I b
36	Ser81Leu,Ala219Pro	—	Ⅲ
45	Ser81Leu	—	Ⅲ
84	Ser81Leu	—	Ⅲ
88	Ser81Leu	—	Ⅲ
GZ26	Ser81Leu	—	Ⅲ
GZ34	Ser81Leu,Ala219Pro	—	Ⅲ
GZ35	Ser81Leu,Ala219Pro	—	Ⅲ
GZ37	Ser81Leu,Ala219Pro	—	Ⅲ
GZ42	Ser81Leu	Ile218Thr,Ile219Phe	Ⅲ
GZ51	Ser81Leu,Ala219Pro	—	Ⅲ

注:—表示无突变;Ile 为异亮氨酸;Thr 为苏氨酸;Phe 为苯丙氨酸。

3 讨 论

本研究显示,120 株 GBS 中的喹诺酮耐药率为 11.7%(14/120),与法国报道的 1.5%(新生儿标本 1 例)^[7]、意大利报道的 3.0%^[8],以及中国台湾地区报道的 6.2%^[9]相比,本中心分离的 GBS 对左氧氟沙星的耐药率较高。这种差异可能与标本来源有关,也可能与婴儿感染的特定流行病学特征有关。

喹诺酮类抗菌药物属于临床常用抗菌药物,具有广泛的抗菌谱,当前应用的喹诺酮类抗菌药物主要以第 4 代为主^[10]。目前,革兰阳性菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药机制主要是拓扑异构酶靶位点改变,即 QRDRs 特异位点发生突变介导的耐药,这些突变位点主要位于 GyrA、GyrB、ParC、ParE 的活性区域,尤其以 GyrA 和 ParC 上的突变最为常见。最常见的位点突变有 ParC(Ser79Phe)和 GyrA(Ser81Leu)双突变,此外还有 ParC(Ser80Pro)的报道^[7-8]。本研究显示,所有喹诺酮耐药 GBS 菌株均存在 GyrA(Ser81Leu)突变,其中仅存在 GyrA(Ser81Leu)单位

点突变的占 36.36%,同时存在 GyrA(Ser81Leu 和 Ala219Pro)或 GyrA(Ser81Leu 和 Ala219Val)双突变的分别占 45.45%和 9.10%,经检索万方数据库、中国知网和 Medline 数据库发现,GyrA219 号位的点突变国内外未见报道。此外,本研究中的 GBS 菌株不存在 ParC(Ser79Phe)这种常见突变,尽管 11 株喹诺酮类耐药 GBS 均存在 ParC 基因序列的碱基突变(多数为 4 个不同碱基的单位点突变),但仅有 1 株 ParC(Ile218Thr 和 Ile219Phe)为有义突变,推测上述两种新的氨基酸位点突变可能与药物作用后酶的构型变化以及结合位点的改变有关。

本研究发现在有 GyrA 和 ParC 基因突变的喹诺酮耐药 GBS 菌株血清学分型多为Ⅲ型,与国内报道一致^[11],与法国 GBS 分离株 ST-19/CPS V 型在喹诺酮耐药菌株中的占比较高的报道^[7]存在差异。这可能与标本来源有关,也可能与不同国家和地区的地理位置、气候条件、种族差异等造成 GBS 感染菌株血清学型别谱的差异有关。

需要说明的是,鉴于美国 CLSI 与 EUCAST 均无环丙沙星的药敏试验的判定标准,因此本研究仅以左氧氟沙星和莫西沙星耐药作为喹诺酮耐药的判定标准。

综上所述,本中心 2014 年 1 月至 2019 年 12 月从婴儿临床标本分离的喹诺酮耐药 GBS 菌株血清学分型以Ⅲ型为主,并且检测出了新的 GyrA 和 ParC 基因突变位点。持续调查 GBS 对喹诺酮类抗菌药物的耐药趋势及耐药基因突变,对于预防耐药菌的产生,控制多重耐药菌的形成,以及新药的开发具有重要的参考价值。

参考文献

- [1] COLLIN S M, LAMB P, JAUNEIKAIT E, et al. Hospital clusters of invasive group B Streptococcal disease: a systematic review[J]. J Infection, 2019, 79(6): 521-527.
- [2] 新生儿细菌性脑膜炎多中心研究协作组. 华南部分地区新生儿细菌性脑膜炎多中心流行病学研究[J]. 中华儿科杂志, 2018, 56(6): 421-428.
- [3] JAY V, KRISTINA M A W, LAKSHMI R. Prevention of perinatal group B Streptococcal infection: management strategies[J]. Trends Microbiol, 2017, 25(11): 919-931.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S30[S]. Wayne, PA: CLSI, 2020.
- [5] 刘玉庆, 李璐璐, 骆延波, 等. 欧盟药敏试验标准[M]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 68-72.
- [6] KI M, SRINIVASAN U, OH K Y, et al. Emerging fluoroquinolone resistance in Streptococcus (下转第 3532 页)

- Clin Hypertens (Greenwich), 2019, 21(1):127-135.
- [7] VAN LUMMEL M, PENNING S M T, DERKSEN R H, et al. The binding site in β 2-glycoprotein I for ApoER2' on platelets is located in domain V [J]. J Biol Chem, 2005, 280(44):36729-36736.
- [8] RADIN M, SCHREIBER K, CECCHI I, et al. The risk of ischaemic stroke in primary antiphospholipid syndrome patients: a prospective study [J]. Eur J Neurol, 2018, 25(2):320-325.
- [9] RAIMONDO M G, PERICLEOUS C, RADZISZEWSKA A, et al. Oxidation of β 2-glycoprotein I associates with IgG antibodies to domain I in patients with antiphospholipid syndrome [J]. PLoS One, 2017, 12(10):e0186513.
- [10] RADIN M, CECCHI I, ROCCATELLO D, et al. Prevalence and thrombotic risk assessment of anti- β 2 glycoprotein I Domain I antibodies: a systematic review [J]. Semin Thromb Hemost, 2018, 44(5):466-474.
- [11] PYO J Y, JUNG S M, LEE S W, et al. Subsequent thrombotic outcomes in patients with ischemic stroke with antiphospholipid antibody positivity [J]. Yonsei Med J, 2017, 58(6):1128-1134.
- [12] CARMEL-NEIDERMAN N N, TANNE D, GOREN I, et al. Classical and additional antiphospholipid antibodies in blood samples of ischemic stroke patients and healthy controls [J]. Immunol Res, 2017, 65(2):470-476.
- [13] DONG S, PEI B, XIE W, et al. Anticardiolipin antibody and anti- β 2 glycoprotein I antibody are potential risk markers of ischaemic stroke in Chinese adults [J]. Rheumatology (Oxford), 2020, 59(8):1834-1841.
- [14] 刘坦, 孟晓峰. β 2 糖蛋白 I 抗体在缺血性脑卒中的作用研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(4):448-450.
- [15] EL-ASSAAD F, KRILIS S A, GIANNAKOPOULOS B. Posttranslational forms of beta 2-glycoprotein I in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome [J]. Thromb J, 2016, 14(Suppl 1):S20.
- [16] DHARMA R, TAMBUNAN K L, ISBAGYO H, et al. Prothrombotic effect of anti-beta-2 glycoprotein-1 antibodies on the expression of tissue factor, thrombomodulin, and plasminogen activator inhibitor-1 in endothelial cells [J]. Acta Med Indones, 2015, 47(1):31-37.
- [17] HO Y C, AHUJA K D K, ADAMS M J. Further investigations of the effects of anti- β 2GP1 antibodies on collagen-induced platelet aggregation [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2018, 24(7):1128-1133.
- [18] PEREZ D, SERRANO A. New biomarker to predict thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: immune complexes of beta 2 glycoprotein 1 [J]. Isr Med Assoc J, 2017, 19(10):646-647.
- [19] 程娟, 陈礼文, 唐伟等. 抗心磷脂抗体及抗 β 2 糖蛋白 I 抗体检测血脂正常脑梗死患者的临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(9):1187-1190.
- [20] 孙继红, 张艳, 张洵岳, 等. 脑梗死患者与血清抗心磷脂抗体及 β 2 糖蛋白 I 抗体的关系研究 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(8):1100-1101.
- [21] 王飞, 李素彦. 老年血栓性疾病患者抗 β 2-GP1 抗体和抗心磷脂抗体的水平变化及临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2021, 18(6):821-823.
- [22] SCIASCIA S, SANNA G, KHAMASHTA M A, et al. The estimated frequency of antiphospholipid antibodies in young adults with cerebrovascular events: a systematic review [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(11):2028-2033.

(收稿日期:2021-02-16 修回日期:2021-08-22)

(上接第 3527 页)

- agalactiae in South Korea [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(11):3199-3205.
- [7] HAYS C, LOUIS M, PLAINVERT C, et al. Changing epidemiology of group B Streptococcus susceptibility to fluoroquinolones and aminoglycosides in France [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(12):7427-7430.
- [8] SIMONI S, VINCENZI C, BRENCIANI A, et al. Molecular characterization of Italian isolates of fluoroquinolone-resistant Streptococcus agalactiae and relationships with chloramphenicol resistance [J]. Microb Drug Resist, 2018, 24(3):225-231.
- [9] WU C J, LAI J F, HUANG I W, et al. Multiclonal emergence of levofloxacin-resistant group B Streptococcus, Taiwan [J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(12):3263-3271.
- [10] 夏昌霞. 喹诺酮类抗菌药物的药理作用与合理应用分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(11):183.
- [11] WANG H, ZHAO C, HE W, et al. High prevalence of fluoroquinolone-resistant group B streptococci among clinical isolates in China and predominance of sequence type 19 with serotype III [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(3):1538-1541.

(收稿日期:2021-02-16 修回日期:2021-07-09)