

• 科研论著 •

产时抗菌药物预防对 6 月龄内婴儿肠道菌群抗生素耐药基因的影响及变化研究

齐琪¹, 朱中海¹, 王良¹, 祝璞泽¹, 曾令霞^{1,2,3}

1. 西安交通大学医学部公共卫生学院流行病与卫生统计学系卫生统计学教研室, 陕西 西安 710061;

2. 西安交通大学全球健康研究院慢性病防控研究所; 3. 陕西省疾病防控与健康促进研究重点实验室

摘要: **目的** 探究产时抗菌药物预防(IAP)对 6 月龄内婴儿肠道菌群抗生素耐药基因(ARGs)的影响及纵向变化,为抗生素的规范性使用和耐药性控制提供理论依据。**方法** 基于母婴队列 2018 年 1 月—2019 年 6 月数据,采集新生儿 3 日龄内、2 月龄及 6 月龄粪便,使用 qPCR 技术检测 6 种常见 ARGs(*aac(6')*-*Ib*、*qnrS*、*blaTEM*、*ermB*、*mecA*、*tetM*),计算 ARGs 丰度及阳性检出例数。采用非参数检验及线性混合效应模型(LMM)分析 IAP 在 3 个时间点对 ARGs 绝对丰度的影响,以及 ARGs 丰度在 3 个时间点的纵向变化。**结果** 共 65 名单胎婴儿的 157 个样本纳入分析,其中 15 名母亲(23.1%)接受了 IAP。婴幼儿在出生后半年内 ARGs 检出率较高,丰度随时间呈增加趋势。IAP 可显著增加经阴道分娩婴儿肠道菌群 6 月龄时 *mecA* 基因丰度(VDIAP 组 6.1 ± 1.1 vs. VDno-IAP 组 3.8 ± 4.6 , $P=0.046$),剖宫产婴儿的 *aac(6')*-*Ib* 基因丰度则在 2 月龄($\beta=3.81$, $S_x=1.45$, $P<0.05$)、6 月龄($\beta=4.89$, $S_x=1.11$, $P<0.001$)较 3 日龄有显著升高。**结论** IAP 可增加 6 月龄婴儿 ARGs 丰度,调整分娩方式影响后,该效应依然显著,提示合理规范使用产时抗菌药物可能减少抗生素耐药的形成。

关键词: 产时抗菌药物预防; 肠道菌群; 婴儿; 耐药性

中图分类号:R72 文献标识码:A 文章编号:1008-6579(2024)02-0142-07 doi:10.11852/zgetbjzz2023-0526

Effects and changes of intrapartum antimicrobial prophylaxis on antibiotic resistance genes in gut microbiota of infants within 6 months of age

QI Qi¹, ZHU Zhonghai¹, WANG Liang¹, ZHU Yingze¹, ZENG Lingxia^{1,2,3}

1. Department of Epidemiology and Health Statistics, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 2. Center for Chronic Disease Control and Prevention, Global Health Institution, Xi'an Jiaotong University; 3. Key Laboratory for Disease Prevention and Control and Health Promotion of Shaanxi Province

Corresponding author: ZENG Lingxia, E-mail: tjzlx@mail.xjtu.edu.cn

Abstract: **Objective** To explore the impact of intrapartum antibiotic prophylaxis (IAP) on antibiotic resistance genes (ARGs) in the gut microbiota of infants up to 6 months of age and their longitudinal changes, in order to provide theoretical basis for the rational use of antibiotics and antibiotic resistance control. **Methods** Fecal samples were collected within 3 days, 2 months, and 6 months from a maternal and birth cohort conducted between January 2018 and June 2019. A panel of 6 common ARGs (*aac(6')*-*Ib*, *qnrS*, *blaTEM*, *ermB*, *mecA*, *tetM*) were tested, the absolute abundance and positive detection rate by qPCR were calculated. Nonparametric and linear mixed model (LMM) analysis were used to assess the influence of IAP on the absolute abundance of antibiotic resistance genes and the longitudinal changes in their abundance at the three time points. **Results** A total of 157 samples from 65 singleton infants were analyzed, including 15 mothers (23.1%) who received IAP. The detection rate of ARGs was high in infants up to six months of age, and the abundance of ARGs tended to increase over time. IAP significantly increased the abundance of the *mecA* gene in the gut microbiota of vaginally delivered infants at 6 months of age (6.1 ± 1.1 in the VDIAP group vs. 3.8 ± 4.6 in the VDno-IAP group, $P=0.046$). Additionally, in cesarean section infants, there was a significant increase in the abundance of *aac(6')*-*Ib* genes at 2 months ($\beta=3.81$, $S_x=1.45$, $P<0.05$), $P<0.05$] and 6 months of age ($\beta=4.89$, $S_x=1.11$, $P<0.001$), $P<0.001$) compared to 3 days of age. **Conclusions** The findings suggest that IAP can increase the abundance of ARGs in 6-month-old infants, and this effect is still significant after stratifying by delivery mode. Therefore, the rational and standardized use of intrapartum antibiotics may help reduce the development of antibiotic resistance.

基金项目:国家自然科学基金(81872633);陕西省创新能力支撑计划(2023-CX-PT-47);国家留学基金委(CSC)资助项目(202006280219);中国博士后科学基金(2021M702578)

作者简介:齐琪(1993-),女,陕西人,博士研究生在读,主要研究方向为儿少卫生与妇幼保健。

通信作者:曾令霞, E-mail: tjzlx@mail.xjtu.edu.cn

Keywords: intrapartum antimicrobial prophylaxis; gut microbiota; infants; antibiotic resistance

产时抗菌药物预防 (intrapartum antimicrobial prophylaxis, IAP) 是最常见的新生儿抗生素暴露来源^[1], 常见种类包括青霉素、氨苄西林等^[2], 可降低早发型感染的风险^[3]。然而, 有研究报道, IAP 会影响婴儿肠道菌群定植、增加 β -内酰胺类抗生素编码基因丰度^[1]、干扰正常的母婴菌群垂直传递^[4]。由于欠发达地区 IAP 对婴儿肠道菌群耐药性的短期和长期影响仍不清楚, 因此, 本研究基于一项母婴队列, 探究 IAP 分别对 3 日龄内、2 月龄、6 月龄婴儿肠道菌群 6 种常见抗生素耐药基因 (ARGs) 的影响并分析其纵向变化, 为规范使用抗菌药物、控制抗生素耐药形成提供理论支持和依据。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2018 年 1 月—2019 年 6 月陕西母婴队列农村地区出生的 65 名单胎足月活产儿及其母亲纳入本次研究, 随访至婴儿 6 月龄。排除标准: 1) 母亲患有慢性基础疾病或妊娠期合并症; 2) 母亲产前 3 周内使用过抗生素 [剖宫产 (CS) 预防性使用抗生素除外]。

样本分析依据源于前期研究, 在此基础上计算各因素对婴儿肠道菌群 ARGs 影响的统计效能, 以本课题组前期对农村地区婴儿肠道菌群 ARGs 的检出情况为依据, 即以新生儿肠道菌群 ARGs *tetM* 检出率 30% 或 *qnrS* 检出率 18.7% 为例, 进行双侧 *t* 检验, α 值为 0.05, 显著性设定为 $P < 0.05$, 保守设定假设比率为 0.5, 得到统计功效均大于 0.9。本研究通过西安交通大学医学部生物医学伦理委员会审核 (2018-293), 所有研究对象均在纳入前签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 问卷资料收集 采用项目组设计并修订的

问卷进行调查。在项目合作医院纳入孕中/晚期的孕妇, 填写基线问卷 (基本信息、疾病及治疗情况等), 分娩后于医院系统提取分娩数据 (胎龄、性别、出生体重、分娩方式等), 并完成 3 日龄内问卷信息收集 [出生后婴儿喂养 (母乳/奶粉/混合)、疾病及治疗情况等], 于 2 月龄、6 月龄时进行随访, 由调查员在卫生院或妇女家中对其进行面对面问卷调查 (婴儿对应时间点的喂养、疾病及治疗情况等)。

考虑到生命早期肠道定植模式因分娩方式而异^[5], 经阴道分娩 (VD) 胎儿经过母亲生殖道因而与母亲阴道菌群组成结构类似, 而 CS 分娩胎儿更多与母亲皮肤或医院环境中的菌群接触, 导致新生儿菌群结构和组成的差异, 并可能影响 ARGs 的丰度^[6-8], 因此按分娩方式对样本进行分层^[9], 将与婴儿肠道菌群 ARGs 丰度相关的其他因素设定为混杂因素。

1.2.2 粪便样本采集 65 名调查对象均来自同一家医院, 由专业调查人员分别于 3 日龄内、2 月龄、6 月龄采集粪便样本。将粪便采集到无菌容器中, 分装、编号、整理后, 最终保存至 -80°C 冰箱, 等待进一步分析。

1.2.3 样本 DNA 提取、纯化、扩增及 ARGs 的检测 按照 QIAamp Fast DNA stool Mini Kit (天根生化科技有限公司, 中国) 试剂盒说明书进行操作。查阅文献并结合当地医院用药情况^[10-11], 确定 6 种 ARGs: β -内酰胺类 (*mecA*, *blaTEM*), 红霉素类 (*ermB*), 四环素类 (*tetM*), 氨基糖苷类 (*aac(6')-Ib*), 及氟喹诺酮类 (*qnrS*), 引物信息见表 1。根据已选择的 ARGs 制备标准品、制作标准曲线, 然后进行定量检测, 完成数据质控后进行分析。最终计算出每个粪便样本所含有的 ARGs 的拷贝数 (copies/ μL) 及相应的基因阳性检出例数。

表 1 6 种 ARGs 引物表
Tab. 1 Primers of 6 ARGs

目标耐药基因	引物设置	引物序列 (5'-3')	种类
<i>tetM</i>	tetM-F	GGAGCGATTACAGAATTAGGAAGC	四环素
	tetM-R	TCCATATGTCCTGGCGTGTC	
<i>mecA</i>	mecA-F	GGTTACGGACAAGGTGAAATACTGAT	β -内酰胺类
	mecA-R	TGTCTTTTAATAAGTGAGGTGCGTTAATA	
<i>blaTEM</i>	blaTEM-F	CGCCGCATACACTATTCTCAG	β -内酰胺类
	blaTEM-R	GCTTCATTGAGCTCCGGTTC	
<i>ermB</i>	ermB-F	GAACACTAGGGTTGTTCTTGCA	红霉素类
	ermB-R	CTGGAACATCTGTGGTATGGC	
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib-F	CGTCGCCGAGCAACTTG	氨基糖苷类
	aac(6')-Ib-R	CGGTACCTTGCCCTCTCAAACC	
<i>qnrS</i>	qnrS-F	CCACTTTGATGTCGCAGATCTTC	氟喹诺酮类
	qnrS-R	CCCTCTCCATATTGGCATAGGAAA	

1.3 统计学方法 所有统计学分析采用 Stata 15.0(Stata Corp., College Station, TX)软件进行。正态分布资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布的资料采用中位数(M)和上下四分位数(P_{25}, P_{75})表示,计数资料描述其频数(n)和百分比(%),组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。使用 Mann-Whitney U 检验比较各时间点使用 IAP 或未使用 IAP 对特定 ARGs 的绝对丰度是否存在显著性差异,以及按分娩方式分层后的差异。使用混合效应模型(Linear Mixed Model, LMM)比较 IAP 与 no-IAP 组在 3 个时间点 ARGs 的纵向丰度变化,模型纳入变量时,将时间因素设置为随机效应,以“3 日龄内”为参照,分

别计算“2 月龄”和“6 月龄”的统计量,固定效应为纳入模型的其他与结局相关的变量,再进一步按分娩方式分层分析。分析中的检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本信息 共有 65 名足月单胎新生儿纳入研究,其中 15 名母亲(23.1%)接受了 IAP,剖宫产较经阴道分娩的 IAP 暴露频率明显更高($P = 0.019$)。见表 2。分别于出生后 3 日龄内、2 月龄、6 月龄采集到样本 65、45、47 个,即共有 157 个粪便样本纳入分析。

表 2 65 对母婴的基线特征(例,%)
Tab. 2 Baseline characteristics of 65 mother-infant dyads of the cohort (n, %)

变量	合计	使用 IAP	未使用 IAP	$\chi^2/t/Z$ 值	P 值
母亲特征					
母亲年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	27.4 $\pm$ 3.6				
	<25	16(24.6)	3(18.8)	13(81.3)	0.569 ^b
	25~35	48(73.9)	12(25.0)	36(75.0)	0.802
	>35	1(1.5)	0(0.0)	1(100.0)	
教育年限(年, $\bar{x} \pm s$)	10.8 $\pm$ 2.9				
	<9	35(53.9)	5(14.3)	30(85.7)	3.949 ^b
	9~12	1(1.5)	0(0.0)	1(100.0)	0.112
	>12	29(44.6)	10(34.5)	50(76.9)	
职业					
	农民	51(78.5)	10(19.6)	41(80.4)	1.605 ^b
	非农民	14(21.5)	5(35.7)	9(64.3)	0.205
母亲入组身高(m, $\bar{x} \pm s$)	1.60 $\pm$ 0.05	1.61 $\pm$ 0.06	1.60 $\pm$ 0.05	0.363 ^c	0.359
母亲入组体重(kg, $\bar{x} \pm s$)	55.7 $\pm$ 8.1	54.5 $\pm$ 3.2	56.1 $\pm$ 9.1	-0.693 ^c	0.755
孕前 BMI(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	21.7 $\pm$ 3.3	21.1 $\pm$ 1.9	21.85 $\pm$ 3.7	-0.754 ^c	0.773
分娩方式					
	经阴道分娩	46(70.8)	7(15.2)	39(84.8)	5.476 ^b
	剖宫产	19(29.2)	8(42.1)	11(57.9)	0.019
婴儿特征					
性别					
	男	35(53.8)	5(14.3)	30(85.7)	3.302 ^b
	女	30(46.1)	10(33.3)	20(66.7)	0.069
胎龄[周, $M(P_{25}, P_{75})$]	39.7(39.0, 40.4)	39.4(38.4, 40.0)	40.0(39.3, 40.4)	-1.396 ^d	0.163
出生体重(g, $\bar{x} \pm s$)	3 262.0 $\pm$ 328.3	3 272.0 $\pm$ 314.6	3 259.0 $\pm$ 335.3	0.134 ^c	0.447
出生身长 ^a (cm, $\bar{x} \pm s$)	51.7 $\pm$ 1.7	51.4 $\pm$ 1.8	51.8 $\pm$ 1.7	-0.694 ^c	0.755

注:^a“出生身长”数据缺失($n=1$);^b χ^2 值; ^c t 值; ^d Mann-Whitney U 检验 Z 值。

2.2 IAP 对 6 月龄内婴儿肠道菌群耐药性的影响

本研究中观察到 IAP 的主要种类为 β -内酰胺类抗生素,在大多数情况下,使用的初始剂量为每天每 12h 使用 320 万单位青霉素,或每天每 6h 使用头孢唑林/头孢替安。

2.2.1 IAP 对 ARGs 的影响 非参数检验分析比较了 3 个时间点在未分层、按分娩方式分层两种情况下,使用或未使用 IAP 对 6 种 ARGs 绝对丰度的影响。见表 3。结果可知,所有样本中均检出了 *aac* (6′)-*Ib* 基因,在 2 月龄、6 月龄时均检出了 *ermB*、*tetM* 基因,整体 ARGs 检出率较高。未分层情况下, *mecA* 基因的绝对丰度在 IAP 组显著更高($P =$

0.009),其他 ARGs 未发现统计学差异($P > 0.05$)。

按分娩方式分层后,6 月龄样本中, *mecA* 基因的绝对丰度在 VDIAP 组显著更高(VDIAP 组 6.1 ± 1.1 vs. VDno-IAP 组 $3.8 \pm 4.6, P = 0.046$)。此外,2 月龄 VD 分层中, *aac* (6′)-*Ib* 基因在 no-IAP 组的绝对丰度较 IAP 组更高(VDIAP 组 9.20 ± 0.04 ; VDno-IAP 组 $11.1 \pm 2.8, P = 0.032$)。

2.2.2 6 种 ARGs 的绝对丰度在婴儿粪便样本中的纵向比较 采用 LMM 对 3 个时间点 ARGs 绝对丰度差异进行纵向比较,在分析之初纳入所有与结果可能相关的变量,然后使用逐步回归法进行变量筛选。考虑到实际研究样本量、与结局强相关变量

及模型简约性,最终将婴儿喂养、婴儿抗生素和益生菌暴露作为固定效应纳入模型,其中喂养以“纯母乳”喂养作为参照,计算“非母乳”的统计量,婴儿抗

生素暴露和益生菌暴露均以“否”作为参照,计算“是”的统计量,结果见表 4。

表 3 产时抗菌药物预防暴露(IAP)组与组非暴露组(no-IAP)3 日龄内、2 月龄、6 月龄婴儿样本中 6 种常见耐药基因的检出情况及绝对丰度差异的统计比较(log copies/ μ L)

Tab. 3 Distribution and statistical comparison of absolute abundance (log copies/ μ L) of six antibiotic resistance genes in IAP and no-IAP groups at 3 days, 2 and 6 months of age

<i>aac(6')-Ib</i>						<i>qnrS</i>				<i>blaTEM</i>			
基因		阳性检出 (n/N)	绝对丰度 ($\bar{x} \pm s$)	Z 值	P 值	阳性检出 (n/N)	绝对丰度 ($\bar{x} \pm s$)	Z 值	P 值	阳性检出 (n/N)	绝对丰度 ($\bar{x} \pm s$)	Z 值	P 值
3 日龄内 (<i>n</i> =65)													
未分层	IAP	16/16	7.2±2.1	−0.548	0.584	14/16	2.7±2.9	0.169	0.866	15/16	8.9±2.2	−1.110	0.267
	no-IAP	49/49	7.3±2.2			37/49	2.3±2.6			47/49	9.7±2.5		
VD	IAP	7/7	7.6±2.8	−0.138	0.891	5/7	4.8±3.6	1.508	0.131	7/7	10.3±2.3	0.783	0.434
	no-IAP	39/39	7.3±1.8			30/39	2.3±2.7			38/39	9.9±2.7		
CS	IAP	9/9	6.5±1.4	0.245	0.807	9/9	1.6±1.8	−0.794	0.427	8/9	7.6±1.0	−1.925	0.054
	no-IAP	10/10	7.1±3.5			7/10	2.2±2.0			9/10	9.0±1.4		
2 月龄 (<i>n</i> =45)													
未分层	IAP	9/9	9.9±1.7	−1.362	0.173	9/9	7.4±6.6	0.536	0.592	9/9	9±3.1	−1.088	0.277
	no-IAP	36/36	10.8±2.6			33/36	5.8±3.6			33/36	10.2±2.9		
VD	IAP	4/4	9.2±0.04	−2.151	0.032	4/4	6.4±1.6	0.671	0.502	4/4	9.6±3.1	−0.549	0.583
	no-IAP	29/29	11.1±2.8			26/29	5.9±3.4			26/29	10.4±3.0		
CS	IAP	5/5	10.5±2.2	0.731	0.465	5/5	8.1±9.1	0.244	0.808	5/5	8.6±3.4	−0.893	0.372
	no-IAP	7/7	9.5±1.5			7/7	5.4±4.5			7/7	9.6±2.9		
6 月龄 (<i>n</i> =47)													
未分层	IAP	9/9	11.6±2.4	0.973	0.330	9/9	6.3±3.1	1.000	0.317	9/9	10.7±2.5	0.276	0.782
	no-IAP	38/38	10.4±2.2			38/38	5.3±3.1			35/38	10.5±2.5		
VD	IAP	3/3	11.5±2.5	0.638	0.524	3/3	4.9±3.2	−0.030	0.976	3/3	9.8±1.0	−0.334	0.738
	no-IAP	31/31	10.6±2.3			31/31	4.7±2.6			28/31	10.2±2.5		
CS	IAP	6/6	11.6±2.6	1.429	0.153	6/6	7.1±3.1	−0.143	0.886	6/6	11.2±2.9	−0.143	0.886
	no-IAP	7/7	9.7±1.6			7/7	7.9±4.2			7/7	12.0±2.0		
<i>ermB</i>						<i>mecA</i>				<i>tetM</i>			
基因		阳性检出 (n/N)	绝对丰度 ($\bar{x} \pm s$)	Z 值	P 值	阳性检出 (n/N)	绝对丰度 ($\bar{x} \pm s$)	Z 值	P 值	阳性检出 (n/N)	绝对丰度 ($\bar{x} \pm s$)	Z 值	P 值
3 日龄内 (<i>n</i> =65)													
未分层	IAP	14/16	6.2±3.1	0.471	0.637	14/16	3.3±2.6	0.463	0.643	15/16	5.5±4.1	0.308	0.758
	no-IAP	48/49	5.9±3.4			43/49	3.5±4.1			42/49	4.9±3.5		
VD	IAP	5/7	8.0±3.7	1.128	0.259	6/7	2.6±1.3	−0.227	0.820	6/7	6.7±4.3	0.985	0.325
	no-IAP	39/39	6.1±3.4			34/39	3.6±4.4			34/39	5.0±3.4		
CS	IAP	9/9	5.2±2.4	0.751	0.453	8/9	3.9±3.3	1.058	0.290	9/9	4.7±3.9	0.289	0.773
	no-IAP	9/10	4.7±3.3			9/10	3.1±3.2			8/10	4.4±4.4		
2 月龄 (<i>n</i> =45)													
未分层	IAP	9/9	11.0±2.6	0.624	0.533	9/9	4.8±2.7	0.131	0.896	9/9	8.8±3.6	−0.539	0.590
	no-IAP	36/36	10.5±2.5			35/36	4.7±2.4			36/36	9.4±2.8		
VD	IAP	4/4	11.5±1.7	0.441	0.659	4/4	5.5±1.8	0.741	0.459	4/4	10.4±1.5	0.607	0.544
	no-IAP	29/29	10.6±2.7			28/29	4.5±2.4			29/29	9.4±2.6		
CS	IAP	5/5	10.7±3.3	0.731	0.465	5/5	4.3±3.4	−0.893	0.372	5/5	7.5±4.4	−1.380	0.168
	no-IAP	7/7	10.3±1.2			7/7	5.4±2.6			7/7	9.3±4.0		
6 月龄 (<i>n</i> =47)													
未分层	IAP	9/9	10.8±1.5	−1.757	0.079	8/9	5.6±2.2	2.622	0.009	9/9	9.5±2.7	−1.054	0.292
	no-IAP	38/38	11.7±2.1			35/38	3.7±4.2			38/38	10±3.3		
VD	IAP	3/3	11.8±2.3	−0.334	0.738	2/3	6.1±1.1	1.995	0.046	3/3	10.4±1.1	−0.455	0.649
	no-IAP	31/31	11.8±2.0			28/31	3.8±4.6			31/31	10.4±2.6		
CS	IAP	6/6	10.4±0.7	−0.286	0.775	6/6	5.5±2.6	1.429	0.153	6/6	9.1±3.2	−0.429	0.668
	no-IAP	7/7	10.8±2.2			7/7	3.1±2.1			7/7	8.3±5.3		

注: *P* 值为 IAP 与 no-IAP 组耐药基因绝对丰度比较所得。

表 4 6 种耐药基因的绝对丰度在 3 日龄内、2 月龄、6 月龄的混合效应分析 $[\beta(S_x)]$ Tab. 4 Summary of LMM model statistics for abundance of antibiotic resistance genes within 3 days, 2 months and 6 months of age $[\beta(S_x)]$

变量	未分层		VD		CS	
	IAP	no-IAP	IAP	no-IAP	IAP	no-IAP
<i>aac(6')-Ib</i>						
时间点_2 月龄	3.58(1.17)**	3.67(0.55)***	4.85(1.37)	0.58(7.00)***	3.81(1.45)*	1.98(1.57)
时间点_6 月龄	4.83(0.88)***	3.27(0.53)***	4.17(1.00)*	0.55(6.30)***	4.89(1.11)***	2.17(1.48)
喂养_非母乳	-0.03(1.16)	0.01(0.57)	1.94(1.30)	0.61(-0.20)	-1.2(1.52)	-0.07(1.52)
婴儿抗生素暴露	-1.80(2.39)	-1.50(0.84)	-8.06(2.02)	0.82(-2.12)	—	—
婴儿益生菌暴露	-1.88(1.48)	0.05(0.70)	-2.02(1.33)	0.79(-0.32)	-1.19(2.42)	1.45(1.60)
<i>blaTEM</i>						
时间点_2 月龄	0.92(1.42)	0.72(0.63)	0.65(2.34)	0.70(0.71)	2.48(1.72)	0.77(1.33)
时间点_6 月龄	1.91(1.08)	1.14(0.61)	-0.75(1.78)	0.67(0.69)	3.78(1.31)*	3.07(1.26)*
喂养_非母乳	0.32(1.41)	-0.31(0.67)	0.71(2.19)	-0.41(0.77)	1.8(1.79)	-0.01(1.28)
婴儿抗生素暴露	-3.92(2.90)	-0.7(1.06)	0.33(2.34)	-0.42(1.11)	—	—
婴儿益生菌暴露	-0.94(1.79)	-1.36(0.81)	-5.01(3.37)	-1.89(0.99)	-3.75(2.86)	-0.42(1.34)
<i>qnrS</i>						
时间点_2 月龄	3.83(2.20)	3.63(0.77)***	1.51(1.57)	3.78(0.81)	3.73(3.00)	3.47(2.21)
时间点_6 月龄	4.29(1.59)*	3.24(0.70)***	-0.21(1.02)	2.73(0.73)***	5.30(2.17)*	5.73(2.13)*
喂养_非母乳	-3.09(2.23)	0.26(0.78)	1.24(1.38)	-0.07(0.82)	-5.59(3.29)	1.62(2.18)
婴儿抗生素暴露	-2.83(4.59)	-1.62(1.10)	-2.95(1.97)	-1.33(1.07)	—	—
婴儿益生菌暴露	-0.98(2.88)	0.42(0.94)	1.52(1.35)	-0.38(1.06)	1.02(5.59)	1.59(2.18)
<i>ermB</i>						
时间点_2 月龄	4.54(1.25)***	4.98(0.66)***	0.84(0.007)***	4.79(0.74)***	6.04(1.44)**	5.60(1.29)**
时间点_6 月龄	5.22(0.88)***	6.05(0.63)***	3.42(0.004)***	6.05(0.70)***	6.15(1.03)***	5.78(1.21)***
喂养_非母乳	0.32(1.28)	-0.05(0.67)	-1.30(0.006)***	-0.12(0.74)	2.05(1.59)	0.50(1.46)
婴儿抗生素暴露	-2.66(2.65)	0.25(0.99)	-1.46(0.008)***	0.39(1.02)	—	—
婴儿益生菌暴露	1.35(1.68)	-1.75(0.82)*	5.43(0.005)***	-2.62(0.98)**	-1.09(2.79)	1.21(1.38)
<i>mecA</i>						
时间点_2 月龄	1.53(1.46)	1.26(0.91)	3.35(1.40)	0.99(1.07)	0.61(2.07)	2.72(1.34)
时间点_6 月龄	2.51(1.15)*	0.27(0.90)	3.82(1.32)	0.30(1.07)	1.87(1.52)	0.38(1.31)
喂养_非母乳	-0.03(1.46)	-1.11(0.90)	-0.42(1.32)	-1.29(1.07)	0.36(2.24)	0.08(1.51)
婴儿抗生素暴露	-0.29(2.99)	-0.61(1.39)	-1.91(2.03)	-0.56(1.52)	—	—
婴儿益生菌暴露	-0.74(1.87)	-1.60(1.17)	0.3(1.44)	-1.85(1.52)	-3.18(3.76)	-0.67(1.43)
<i>tetM</i>						
时间点_2 月龄	1.23(1.60)	4.88(0.79)***	3.20(3.52)	4.52(0.79)***	1.52(1.78)	6.46(2.47)*
时间点_6 月龄	4.67(1.13)*	5.37(0.75)***	2.90(2.72)	5.52(0.76)***	5.77(1.23)**	4.94(2.40)
喂养_非母乳	-1.70(1.64)	0.99(0.81)	0.06(3.33)	0.37(0.79)	0.17(2.00)	3.05(2.69)
婴儿抗生素暴露	0.60(3.42)	1.26(1.16)	-0.71(5.11)	1.34(1.06)	—	—
婴儿益生菌暴露	2.97(2.18)	-1.07(0.96)	2.36(3.52)	-1.67(1.01)	2.28(4.41)	0.94(2.59)

注:混合效应模型同时调整了喂养、婴儿抗生素和益生菌暴露情况等混杂因素; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

未经分娩方式分层时, *aac(6')-Ib*、*ermB* 基因绝对丰度在 IAP 和 no-IAP 分组中, 2 月龄和 6 月龄较 3 日龄内均有显著增高($P<0.01$)。在经分娩方式分层并调整混杂因素后发现, 以 3 日龄内为参照, VD 分层中, *aac(6')-Ib* 基因的绝对丰度在 no-IAP 组 2 月龄、6 月龄均有显著增高($P<0.001$)。 *ermB* 基因在 IAP 和 no-IAP 组中, 2 月龄和 6 月龄较 3 日龄均有显著性升高($P<0.001$)。 *tetM* 基因在 no-IAP 组中, 2 月龄、6 月龄较 3 日龄均有显著增高($P<0.001$); 在 CS 分层下, *aac(6')-Ib* 基因在 IAP 组 2 月龄、6 月龄较 3 日龄均有显著性升高($P<0.05$ 或 <0.001)。 *ermB* 基因在 IAP 和 no-IAP 组中, 2 月龄和 6 月龄较 3 日龄均有显著性升高

($P<0.001$)。

3 讨 论

3.1 产时抗菌药物预防可影响婴儿 6 月龄内肠道菌群 ARGs 丰度 本研究选取的 6 种婴儿肠道常见 ARGs 在 3 日龄内、2 月龄、6 月龄的样本均有检出, 所有样本中都检出了 *aac(6')-Ib* 基因。已有研究报道了母亲抗生素暴露后早产儿特异性 ARGs 的富集^[12], 或婴儿生命早期自身体内携带 ARGs^[13-15]。此外, IAP 还可能导致一些 β -内酰胺编码的 ARGs 的丰度升高, 并在肠道中富集^[16]。因此, 来自母亲 IAP 暴露导致的 ARGs 丰度升高是婴儿肠道菌群耐药的重要因素。

在本研究中,根据分娩方式分层后发现 CS 孕妇 IAP 暴露的比例较高。在临床上,IAP 通常用于预防对新生儿垂直传播的 B 族链球菌感染(Group B Streptococcus, GBS)或切口感染及愈合不良^[17],针对 GBS 筛查阳性、有 GBS 定植史等高危因素的孕妇,推荐使用 IAP^[18],但还未有研究证实分娩方式与 IAP 的关联,因此本研究分层后再根据 IAP 使用情况分组,以减少混杂因素影响。

在 IAP 对不同时间点 ARGs 丰度的影响分析中,发现婴儿 6 月龄时,*mecA* 基因在未分层及按分娩方式分层后的 VD 两种情况下,IAP 组的 ARGs 丰度均显著高于 no-IAP 组,提示 IAP 对婴儿肠道菌群耐药性的影响可能持续到出生后半年。而 *aac*(6′)-*Ib* 基因绝对丰度在 2 月龄 CS 分层下,no-IAP 组的绝对丰度明显高于 IAP 组,这一结果可能与样本量有限相关。从功能上来看,*mecA* 基因编码青霉素结合蛋白,使菌株对 β-内酰胺的亲合力下降从而耐药^[19],*aac*(6′)-*Ib* 基因与氨基糖苷类的氨基相结合从而使药物无法发挥作用,同时还使喹诺酮类药物失去活性^[20-21]。此外,一项对母乳、婴儿和母亲肠道样本进行测序的研究也证实了 IAP 与婴儿 6 月龄肠道菌群 ARGs 和可移动遗传元件的富集有关^[22]。动物实验还证实了对子代的长期健康风险^[23-25]。因此,婴儿期 ARGs 的增加可能会对长期健康造成深远影响。

3.2 婴儿肠道菌群抗生素耐药性随时间有增加趋势 本研究还观察到了婴儿 ARGs 随时间的变化趋势。按分娩方式分层来看,在 CSIAP 组中,*aac*(6′)-*Ib* 基因在 2 月龄、6 月龄较 3 日龄内的 ARGs 丰度有显著升高。有研究发现,婴儿肠道菌群中 ARGs 的丰度随年龄增长而增加,而 CS 婴儿增加的比例更大^[26]。考虑到研究地区处于我国西部农村地区,婴儿家长抗生素认知较为匮乏且滥用现象严重,因此可能导致了 ARGs 的绝对丰度在出生后随时间的增加趋势。此外,合作医院在产妇产时主要使用 β-内酰胺类抗生素,推断 *aac*(6′)-*Ib* 基因在 CSIAP 分组中呈增加趋势可能与使用该类抗生素以预防新生儿败血症有关^[4]。有报告指出,在母亲接受 IAP 的 1 月龄婴儿中,β-内酰胺类基因 *bla*-TEM 和 *acc6-aph2* 的丰度增加^[1],但在本研究中,属于 β-内酰胺类的 *mecA* 基因绝对丰度在分层后的 IAP 与 no-IAP 组中,随时间有增加趋势但无显著性差异。此外,还有研究报告婴儿肠道菌群 ARGs 库在生命早期可能已经建立^[27],动物实验也证明了携带 ARGs 的细菌可以在妊娠期从母体传播给胎

儿^[28]。因此,IAP 的使用很有可能在婴儿自身 ARGs 存在的基础上,进一步增加了 ARGs 的丰度。

抗生素滥用对全球公共卫生造成了重大威胁,而我国广大农村地区属于这一问题的重灾区。孕妇在妊娠期可能由于不规范的 IAP 暴露导致胎儿肠道 ARGs 的富集,不得不引起人们对耐药问题的关注。IAP 可有效降低 GBS 疾病及产妇发生感染的风险,但对抗生素耐药的影响也不容忽视。我国在 2015 年颁布的《抗菌药物临床应用指导原则》就已对各类抗生素的应用进行了规范管理^[29],此外,2021 年我国已针对“产时 GBS 预防性使用抗生素”这一课题发表了专家共识^[18]。这就需要加强基层地区医疗规范,更大程度上发挥临床手段的益处。本研究的局限性在于样本数量有限,观察时间限于出生后半年,仅对婴儿肠道菌群中常见的 6 种 ARGs 进行了分析,但现有样本已经能够支持对研究问题进行初步探索。未来研究可以着重于在大样本基础上,关注多种 ARGs,结合更精确的检测方式探究生命早期抗生素暴露对婴儿肠道菌群耐药性的长期影响。

本研究发现,婴儿在出生后半年内 ARGs 丰度随时间呈增加趋势,IAP 可增加经阴道分娩婴儿肠道菌群 6 月龄 *mecA* 基因的丰度,剖宫产且使用 IAP 可能显著增加婴儿在 2 月龄、6 月龄 *aac*(6′)-*Ib* 基因绝对丰度。因此,需要合理规范 IAP 在基层地区的使用,制定干预策略,以尽量降低早期抗生素暴露对肠道菌群发育过程的影响。

参考文献

- [1] Nogacka A, Salazar N, Suárez M, et al. Impact of intrapartum antimicrobial prophylaxis upon the intestinal microbiota and the prevalence of antibiotic resistance genes in vaginally delivered full-term neonates [J]. Microbiome, 2017, 5 (1):93.
- [2] Arboleya S, Sánchez B, Solís G, et al. Impact of prematurity and perinatal antibiotics on the developing intestinal microbiota: A functional inference study [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(5):649.
- [3] Aloisio I, Quagliarello A, De Fanti S, et al. Evaluation of the effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on newborn intestinal microbiota using a sequencing approach targeted to multi hypervariable 16s rDNA regions [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(12):5537-5546.
- [4] Li W, Tapiainen T, Brinkac L, et al. Vertical transmission of gut microbiome and antimicrobial resistance genes in infants exposed to antibiotics at birth [J]. J Infect Dis, 2021, 224(7):1236-1246.
- [5] Coker MO, Laue HE, Hoen AG, et al. Infant feeding alters the longitudinal impact of birth mode on the development of

- the gut microbiota in the first year of life[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:642197.
- [6] Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(5):690-703.
- [7] Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, et al. Sensitive quantitative analysis of the meconium bacterial microbiota in healthy term infants born vaginally or by cesarean section[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1997.
- [8] Li X, Stokholm J, Brejnrod A, et al. The infant gut resistome associates with *E. coli*, environmental exposures, gut microbiome maturity, and asthma-associated bacterial composition[J]. *Cell Host Microbe*, 2021;29(6):975-987. e4.
- [9] Mitchell CM, Mazzoni C, Hogstrom L, et al. Delivery mode affects stability of early infant gut microbiota[J]. *Cell Rep Med*, 2020, 1(9):100156.
- [10] Gosalbes MJ, Vallès Y, Jiménez-Hernández N, et al. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples[J]. *J Dev Orig Health Dis*, 2016, 7(1):35-44.
- [11] Liu H, Wang HH. Impact of microbiota transplant on resistome of gut microbiota in gnotobiotic piglets and human subjects[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:932.
- [12] Gibson MK, Crofts TS, Dantas G. Antibiotics and the developing infant gut microbiota and resistome[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2015, 27:51-56.
- [13] Lebeaux RM, Coker MO, Dade EF, et al. The infant gut resistome is associated with *e. coli* and early-life exposures[J]. *BMC Microbiol*, 2021, 21(1):201.
- [14] Raveh-Sadka T, Firek B, Sharon I, et al. Evidence for persistent and shared bacterial strains against a background of largely unique gut colonization in hospitalized premature infants[J]. *ISME J*, 2016, 10(12):2817-2830.
- [15] Esaïassen E, Hjerde E, Cavanagh JP, et al. Effects of probiotic supplementation on the gut microbiota and antibiotic resistome development in preterm infants[J]. *Front Pediatr*, 2018, 6:347.
- [16] Coker M, Hoen A, Dade E, et al. Specific class of intrapartum antibiotics relates to maturation of the infant gut microbiota: A prospective cohort study[J]. *BJOG*, 2020, 127(2):217-227.
- [17] Montoya-Williams D, Lemas DJ, Spiryda L, et al. The neonatal microbiome and its partial role in mediating the association between birth by cesarean section and adverse pediatric outcomes [J]. *Neonatology*, 2018, 114(2): 103-111.
- [18] 中华医学会围产医学分会, 中华医学会妇产科学分会产科学组. 预防围产期 B 族链球菌病(中国)专家共识[J]. *中华围产医学杂志*, 2021, 24(8):561-566.
- Chinese Society of Perinatal Medicine, Chinese Society of Obstetrics and Gynaecology. Chinese experts consensus on prevention of perinatal group b streptococcal disease[J]. *Chin J Perinat Med*, 2021, 24(08):561-566. (in Chinese)
- [19] 汤兰兰, 林洁如, 彭春红, 等. *MecA* 基因及非 *MecA* 基因在 MRSA 耐药机制中的研究进展[J]. *贵州医药*, 2019, 43(4):536-539.
- Tang LL, Lin JR, Peng CH, et al. Research progress of *MecA* gene and non-*MecA* gene in antibiotic resistance mechanism of MRSA[J]. *Guizhou Med J*, 2019, 43(4): 536-539. (in Chinese)
- [20] Lubriks D, Zogota R, Sarpe VA, et al. Synthesis and antibacterial activity of propylamycin derivatives functionalized at the 5'- and other positions with a view to overcoming resistance due to aminoglycoside modifying enzymes[J]. *ACS Infect Dis*. 2021;7(8):2413-2424.
- [21] Silva SMD, Ramos BA, Lima AVA, et al. First report of the *aac(6')-Ib-cr* gene in *Providencia stuartii* isolates in Brazil[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2020, 54:e20190524.
- [22] Pärnänen K, Karkman A, Hultman J, et al. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):3891.
- [23] Baron R, Taye M, Besseling-van der Vaart I, et al. The relationship of prenatal and infant antibiotic exposure with childhood overweight and obesity: A systematic review[J]. *J Dev Orig Health Dis*. 2020;11(4):335-349.
- [24] Livanos AE, Greiner TU, Vangay P, et al. Antibiotic-mediated gut microbiome perturbation accelerates development of type 1 diabetes in mice[J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(11): 16140.
- [25] Tochitani S, Ikeno T, Ito T, et al. Administration of non-absorbable antibiotics to pregnant mice to perturb the maternal gut microbiota is associated with alterations in offspring behavior[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0138293.
- [26] Vangay P, Ward T, Gerber JS, et al. Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(5):553-564.
- [27] Fouhy F, Ogilvie LA, Jones BV, et al. Identification of aminoglycoside and β -lactam resistance genes from within an infant gut functional metagenomic library [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e108016.
- [28] Bi Y, Tu Y, Zhang N, et al. Multiomics analysis reveals the presence of a microbiome in the gut of fetal lambs[J]. *Gut*, 2021.
- [29] 关于印发抗菌药物临床应用指导原则(2015 年版)的通知[J]. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会公报, 2015, 7:29.
- Notice on Issuance of Guidelines for Clinical Application of Antibiotics (2015 edition) [J]. *Bulletin of the National Health and Family Planning Commission*, 2015, 7:29. (in Chinese)