

• 临床检验研究论著 •

# 解脲支原体生物群与耐药关系的研究

葛锁华, 唐国建<sup>△</sup>, 蒋海燕, 吴 军

(江苏省金坛市人民医院检验科, 江苏金坛 213200)

**摘要:**目的 了解该地区解脲支原体(UU)生物群分布及其耐药特征。方法 214 例女性患者宫颈拭子样本被检测。UU 鉴定采用培养法, 药敏试验采用折点微量稀释法, UU 生物群检测采用 PCR 法。结果 UU 阳性率为 48.1%(103/214), 其中生物 1 群占 54.4%, 生物 2 群占 45.6%。结合药敏检测结果分析显示: 生物 1 群对 9 种抗菌药均较为敏感, 而生物 2 群仅对强力霉素及美满霉素敏感, 对于其他抗菌药均存在不同程度耐药且其耐药性均高于生物 1 群。结论 在该地区, UU 2 生物群均较为常见, 但以生物 1 群为主。UU 生物群与耐药有关, UU 生物 2 群耐药较为严重。

**关键词:**解脲支原体; 生物群; 抗药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.21.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)21-2596-02

## The relationships between *Ureaplasma urealyticum* biovars and their drug resistances

Ge Suohua, Tang Guojian<sup>△</sup>, Jiang Haiyan, Wu Jun

(Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Jintan, Jintan, Jiangsu 213200, China)

**Abstract: Objective** To investigate the distribution of *Ureaplasma urealyticum*(UU) biovars in our region and the characteristics of their drug resistances. **Methods** 214 cervical swabs from female patients were tested. Identification for UU was did by culture method and antimicrobial susceptibility testing was used by breakpoint microdilution method. PCR was applied for distinguishing UU biovars. **Results** UU positive rate was 48.1%(103/214). Among them, biovar 1 accounted for 54.4% and biovar 2 accounted for 45.6%. The analyses in combination of susceptibility tests showed biovar 1 was more sensitive to 9 kinds of antimicrobial agents, while biovar 2 was sensitive only to doxycycline and minocycline and biovar 2 had a different degree of resistance to other antimicrobial agents. Moreover, the resistances in biovar 2 were higher than those in biovar 1. **Conclusion** Both UU biovars were common in our region, but biovar 1 predominated. UU biovar is associated with the drug resistance, and the resistances in biovar 2 are more severe.

**Key words:** *Ureaplasma urealyticum*; biovar; drug resistance

解脲支原体(UU)无细胞壁及前体, 细胞器极少。UU 以二分形式繁殖, 体形多样, 但基本为球形, 革兰染色为阴性。由于 UU 没有细胞壁, 因此对影响细胞壁合成的抗菌药如青霉素等天然耐药。研究证实: UU 与非淋病性尿道炎<sup>[1]</sup>、前列腺炎<sup>[2]</sup>、妇科疾病<sup>[3]</sup>、不育症<sup>[4]</sup>等多种疾病有关。由此, UU 对人体健康的危害不容忽视, 有必要对其进行深入研究。目前, UU 可分为生物 1 群和生物 2 群共 14 个血清型。其中生物 1 群包括 1、3、6 和 14 血清型, 生物 2 群包括其余 10 个血清型<sup>[5]</sup>。鉴于 UU 生物群在本地区分布及 UU 生物群与其耐药性的关系目前均不明确, 笔者进行了以下研究。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 214 例均为本院 2010 年 1~6 月妇产科门诊患者。病例纳入标准: 至少 1 周以上未使用任何抗菌药物。

**1.2 标本采集** 以无菌拭子在宫颈管内鳞柱状上皮交界处轻轻转动 15~20 s 后留取分泌物标本。

### 1.3 方法

**1.3.1 UU 培养及药敏试验** 支原体培养鉴定药敏采用商品化试剂盒(珠海丽珠试剂公司产品)。该试剂盒药敏试剂包括强力霉素、美满霉素、交沙霉素、克拉霉素、罗红霉素、阿奇霉素、氧氟沙星、左氧氟沙星、司帕沙星等共 9 种。具体操作: 将宫颈拭子标本接种于现配的培养基中, 挤压使拭子中标本渗入后弃拭子, 充分混匀液体培养基, 分别准确量取 50 μL 至微量孔中(除空白孔), 再加入无菌石蜡油封盖, 35~37 °C, 48 h 内观察结果。根据每孔生长情况分别判断 UU 或 MH 鉴定及药敏试验结果。敏感(S): 两孔均为不生长; 中介(I): 高浓度孔不

生长, 低浓度孔生长; 耐药(R): 两孔均为生长。

### 1.3.2 UU 生物群检测

**1.3.2.1 核酸提取及引物** 模板制备采用酚-氯仿提取。基因分群引物参照文献[6-7], 靶序列是 UU 多条带抗原基因(MBA)。其中生物 1 群引物序列为 F: 5'-CTG AGC TAT GAC ATT AGG TGT TAC C-3'; R: 5'-ACC TGG TTG TGT AGT TTC AAA GTT CAC-3'。生物 2 群引物序列为 F: 5'-GTA TTT GCA ATC TTA TAT GTT TTC G-3'; R: 5'-CAG CTG ATG TAA GTG CAG CAT TAA ATT C-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.3.2.2 扩增及电泳检测** 生物 1 群最适缓冲体系: 25 μL 反应体系中包含 2.5 U Taq 酶, Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol/L, 上、下游引物 0.2 pmol/L, 模板 DNA 1 μL。生物 2 群最适缓冲体系: 25 μL 反应体系中包含 3.0 U Taq 酶, Mg<sup>2+</sup> 2.0 mmol/L, 上、下游引物 0.1 pmol/L, 模板 DNA 2 μL。PCR 反应条件均为: 95 °C, 10 s; 55 °C, 20 s 共 35 个循环。扩增结束后, 取 10 μL 扩增产物在含 2% 的琼脂糖和 0.5 μg/mL 溴化乙锭的凝胶电泳 30 min(5 V/cm), 紫外灯下观察结果并以凝胶成像系统保存图像。

**1.4 统计学处理** 用 SPSS11.0 软件分析, 率之间的比较采用 χ<sup>2</sup> 检验进行, P<0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结 果

UU 阳性率为 48.1%(103/214)。琼脂糖凝胶电泳显示: PCR 试验成功扩增出生物 1 群及生物 2 群, 见图 1。UU 分群检测显示: 生物 1 群 56 例, 占 54.4%; 生物 2 群 47 例, 占

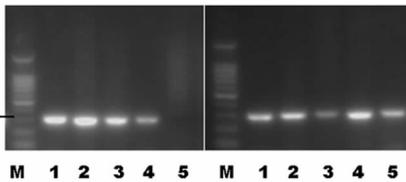
<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: tguojian1971@sina.com。

45.6%。本文药敏结果显示:除了强力霉素及美满霉素以外, UU 对其他抗菌药均产生一定的耐药性。UU 生物群分层的药敏检测结果分析显示:生物 1 群对 9 种抗菌药均高度敏感,

而生物 2 群仅对强力霉素及美满霉素高度敏感(90%以上),对于其他抗菌药均存在不同程度耐药且其耐药性均高于生物 1 群。UU 生物群的耐药结果见表 1。

表 1 解脲支原体两生物群的耐药结果比较分析[n(%)]

抗菌药物	生物 1 群(n=56)			生物 2 群(n=47)			$\chi^2$	P
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感		
强力霉素	0(0.0)	0(0)	56(100.0)	1(2.1)	0(0.0)	46(97.9)	1.203	0.273
美满霉素	0(0.0)	0(0)	56(100.0)	1(2.1)	0(0.0)	46(97.9)	1.203	0.273
交沙霉素	1(1.8)	0(0)	55(98.2)	4(8.5)	6(12.8)	37(78.7)	10.616	0.005
克拉霉素	1(1.8)	0(0)	55(98.2)	5(10.6)	6(12.8)	36(76.6)	11.938	0.003
罗红霉素	1(1.8)	2(3.6)	53(94.6)	17(36.2)	25(53.2)	5(10.6)	73.312	0.000
阿奇霉素	0(0.0)	1(1.8)	55(98.2)	2(4.3)	5(10.6)	40(85.1)	6.297	0.043
氧氟沙星	2(3.6)	5(8.9)	49(87.5)	10(21.3)	30(63.8)	7(14.9)	54.319	0.000
左氧氟沙星	0(0.0)	2(3.6)	53(94.6)	1(2.1)	26(55.3)	20(42.6)	36.084	0.000
司帕沙星	1(1.8)	1(1.8)	54(96.4)	1(2.1)	25(53.2)	21(44.7)	36.164	0.000



M:DNA 标准带(100~2 000 bp);左 1~4:生物 2 群扩增产物;右 1~5:生物 1 群扩增产物。

图 1 解脲支原体生物群凝胶电泳检测结果

### 3 讨论

UU 属原核微生物中的柔膜体纲支原体目支原体科脲原体属,其生物学特征为缺乏细胞壁,可以通过滤菌器,基因组较小。在含尿素液体培养基中, UU 可分解产生氨使培养基 PH 上升,从而使其变色。目前,尽管 UU 的致病地位仍然没有最终定论<sup>[8]</sup>,但从国内外大量研究结果来看, UU 和许多疾病尤其是感染性疾病密切相关,故而 UU 越来越受到国内外学者的重视。本文检测结果显示,在我们地区女性人群中有着相当高的 UU 阳性率 48.1%(103/214),明显高于姜世辉等<sup>[9]</sup>报道的 34.0%(405/1 193)。

目前,用于临床治疗 UU 感染的药物主要有喹诺酮类(氧氟沙星、左氧氟沙星、司帕沙星)、四环素类(美满霉素、强力霉素)、大环内酯类(阿奇霉素、交沙霉素、克拉霉素、罗红霉素)三大类。本研究表明,除了强力霉素及美满霉素以外, UU 对其他抗菌药均产生一定的耐药性。UU 耐药的主要机制:对大环内酯类耐药主要是 UU 核糖体 50S 大亚基甲基化引起<sup>[10]</sup>;对喹诺酮类耐药主要原因是喹诺酮耐药区(QRDR)碱基突变<sup>[11]</sup>;而对四环素类耐药主要涉及 UU 携带 tet(M)基因<sup>[12]</sup>。

UU 生物基因分群方法主要是利用脲酶基因、MBA、16S rRNA 及 16S~23S rRNA 基因间隔区的序列差异来进行。本文利用 MBA 作为生物分群的靶基因。多条带抗原是 UU 感染中被识别的主要抗原,也可能是一个重要的毒力因子,具有种属特异性。MBA 编码基因长约 1 200 bp,表达肽长度为 409 个氨基酸残基,相对分子质量约为  $42 \times 10^3$ 。MBA 的 N 端 1/3 为保守区,可以作为分群序列标志。本研究结果证实:采用 MBA 作为生物分群的靶基因的 PCR 方法能有效地检测 UU 生物群。UU 分群检测显示:在本地区女性人群中,生物 1 群 56 例,占 54.4%;生物 2 群 47 例,占 45.6%,总体上 UU 生物 1 群略占优势。

生物 1 群对 9 种抗菌药均高度敏感,而生物 2 群仅对强力霉素及美满霉素高度敏感(90%以上),对于其他抗菌药均存在

不同程度耐药且其耐药性均高于生物 1 群, UU 生物 2 群的耐药较生物群 1 严重,其原因尚不清楚,仍需要进一步研究。

### 参考文献

- [1] Couldwell DL, Gidding HF, Freedman EV, et al. Ureaplasma urealyticum is significantly associated with non-gonococcal urethritis in heterosexual Sydney men[J]. Int J STD AIDS, 2010, 21(5): 337-341.
- [2] Radonic A, Kovacevic V, Markotic A, et al. The clinical significance of Ureaplasma urealyticum in chronic prostatitis[J]. J Chemother, 2009, 21(4): 465-466.
- [3] De Francesco MA, Negrini R, Pinsi G, et al. Detection of Ureaplasma biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of Ureaplasma parvum in women with or without symptoms of genital infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(6): 641-646.
- [4] Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, et al. Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men[J]. BMC Infect Dis, 2007, 7(11): 129.
- [5] 鲁梅格, 石建莉, 徐晨. 溶脲脲原体生物分型方法的建立及应用[J]. 中华男科学杂志, 2005, 11(3): 175-184.
- [6] Teng LJ, Zheng X, Glass JI, et al. Ureaplasma urealyticum biovar specificity and diversity are encoded in multiple-banded antigen gene[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(6): 1464-1469.
- [7] Teng LJ, Ho SW, Ho HN, et al. Rapid detection and biovar differentiation of Ureaplasma urealyticum in clinical specimens by PCR[J]. J Formos Med Assoc, 1995, 94(7): 396-400.
- [8] Volgmann T, Ohlinger R, Panzig B. Ureaplasma urealyticum-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? [J]. Arch Gynecol Obstet, 2005, 273(3): 133-139.
- [9] 姜世辉, 李红春, 欧阳毅, 等. 1 193 例泌尿生殖道支原体感染及药敏情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(20): 2401-2403.
- [10] Bébear CM, Pereyre S. Mechanisms of drug resistance in Mycoplasma pneumoniae[J]. Curr Drug Targets Infect Disord, 2005, 5(3): 263-271.
- [11] Duffy L, Glass J, Hall G, et al. Fluoroquinolone resistance in Ureaplasma parvum in the United States[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1590-1591.
- [12] Soroka AE, Akopian TA, Taraskina AE, et al. Allelic polymorphism of the tem(M) determinant in Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum clinical isolates resistant to tetracyclines[J]. Genetika, 2002, 38(11): 1463-1469.