

· 基础实验研究论著 ·

## 淋球菌耐药性分析及相关耐药基因检测

陈桂山<sup>1</sup>, 林超萍<sup>2</sup>, 张秀明<sup>1</sup>, 孙各琴<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属中山医院检验医学中心, 广东中山 528403; 2. 佛山市第一人民医院检验科, 广东佛山 528000)

**摘要:**目的 了解佛山地区淋球菌对 5 种抗菌药物的耐药性, 并检测相关耐药基因突变情况。方法 收集 57 株淋球菌, 药敏试验采用琼脂稀释法。PCR 法扩增相关耐药基因, PCR 产物测序结果在 GenBank 中用 blastn 进行核酸序列同源性搜索。结果 淋球菌对青霉素、四环素、环丙沙星、头孢曲松、大观霉素的敏感率分别为 0.0%、8.8%、7.0%、61.4%、100.0%, 产  $\beta$ -内酰胺酶淋球菌和质粒介导的四环素高度耐药淋球菌阳性率分别为 35.1%、56.1%。耐药基因突变率均在 80% 以上。结论 头孢曲松、大观霉素可以作为佛山地区治疗淋球菌的首选药物。淋球菌耐药机制较复杂, 应加强对相关耐药基因分子流行病学监测。

**关键词:**淋球菌; 耐药性; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)20-2726-03

### Drug resistance analysis of *Neisseria gonorrhoeae* and its related drug resistant gene detection

Chen Guishan<sup>1</sup>, Lin Chaoping<sup>2</sup>, Zhang Xiuming<sup>1</sup>, Sun Geqin<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine Center, Affiliated Zhongshan Hospital of Sun Yat-sen University, Foshan, Guangdong 528403, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Foshan First People's Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

**Abstract:** **Objective** To understand the drug resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Foshan area and to detect the related drug resistant gene mutation situation. **Methods** 57 strains of *Neisseria gonorrhoeae* were collected. The drug susceptibility test was performed by adopting the agar dilution method. The related drug resistance genes were amplified by PCR and the PCR product sequencing results were performed the homological searching in GenBank by the BLAST algorithm. **Results** The sensitive rates of *Neisseria gonorrhoeae* to penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, ceftriaxone and spectinomycin were 0.0%, 8.8%, 7.0%, 61.4% and 100.0%, respectively. The rates of beta lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae* were 35.1% and 56.1%, respectively. The mutation rate of drug resistance genes were over 80%. **Conclusion** Ceftriaxone and spectinomycin can be used as the first choice drug for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae* in Foshan region. The drug resistance mechanism of *Neisseria gonorrhoeae* is complex. The epidemiological monitoring of the *Neisseria gonorrhoeae* related drug resistance genes should be strengthened.

**Key words:** *Neisseria gonorrhoeae*; susceptibility; drug resistance gene

随着抗菌药物的广泛使用, 淋球菌作为淋病的病原体其耐药率在不断增高, 1989 年 WHO 和美国 CDC 推荐青霉素、四环素、环丙沙星、大观霉素和头孢曲松作为淋病治疗的首选药物, 并作为淋球菌耐药性监测的 5 种核心药物。本研究主要了解佛山地区分离的淋球菌耐药现状, 并对相关的耐药基因突变进行检测。

### 1 材料与与方法

**1.1 菌株来源** 57 株淋球菌来自广东省中山市人民医院 2010 年 7 月至 2012 年 1 月临床送检的非重复标本。按照《全国临床检验操作规程》对本标进行淋球菌的分离、培养和初步鉴定, 再用梅里埃公司 API NH 试剂进一步确定。5 株淋球菌标准菌株 A、B、C、D、E 由中国疾病预防控制中心性病控制中心赠送, 其中 E 株为产  $\beta$ -内酰胺酶 (PPNG) 菌株。

**1.2 药敏试验** 采用琼脂稀释法, 临床菌株和标准菌株选用 16~18 h 的新鲜培养物制成 0.5 麦氏浓度 (约为  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL) 菌悬液, 接种于含各种不同浓度抗菌药物的琼脂平板, 35 °C 条件下置于 5% CO<sub>2</sub> 环境中培养, 24 h 后观察结果记录

无菌落生长的最低药物浓度。药敏结果的判断标准参考 CLSI 2012 版。

**1.3 PPNG 和 TRNG 测定** 产  $\beta$ -内酰胺酶淋球菌 (PPNG) 测定采用纸片酸度法。质粒介导的四环素高度耐药淋球菌 (TRNG) 判断标准为最低抑菌浓度 (MIC) 大于或等于 16  $\mu$ g/mL。

**1.4 PCR 扩增** 随机选取对于抗菌药物耐药的淋球菌进行相关耐药基因检测, DNA 提取参考文献 [1], DNA 模板放在 -20 °C 保存。PCR 反应总体积 50  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 5  $\mu$ L, dNTP 终浓度为 200  $\mu$ mol/L, 上下游引物浓度为 0.2  $\mu$ mol/L, DNA 模板 5  $\mu$ L, TaqDNA 聚合酶 1.25 U, 加入灭菌去离子水至 50  $\mu$ L。反应条件为 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 1 min, 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PBP-1、PBP-2、Porin PIB、mtrR 启动子与 mtrR 区域, Tem-1 退火温度分别为 52 °C、51 °C、52 °C、53 °C、50 °C。GyrA、ParC 退火温度分别为 52 °C、50 °C。rpsJ、Tet-M 退火温度分别为 49 °C、53 °C。取 PCR 产物 5  $\mu$ L, 加 1  $\mu$ L 6 $\times$ buffer 上样, 5% 琼脂

糖电泳,使用 5 μL DL1000 相对分子质量标准。相关耐药基因引物序列见表 1,PCR 产物送华大基因科技公司进行纯化并双

向测序,利用 DNASTar 软件对序列结果进行分析,在 GenBank 中用 blastn 进行核酸同源性搜索,分析基因类型。

表 1 淋球菌相关耐药基因 PCR 扩增的引物序列

耐药基因	引物名称	引物序列(5'~3')	参考文献
PBP-1	PonA1-F	GAG AAA ATG GGG GAG GAC CG	[1]
	PonA1-R	GGC TGC CGC ATT GCC TGA AC	
PBP-2	PenA-F	AAA ACG CCA TTA CCC GAT GGG	[2]
	PenA-R	TAA TGC CGC GCA CAT CCA AAG	
Porin PIB	Por-F	CAA GAA GAC CTC GGC AA	[3]
	Por-R	CCG ACA ACC ACT TGG T	
mtrR 启动子与 mtrR	mtrA-F	GCC AAT CAA CAG GCA TTC TTA	[4]
	mtrA-R	GTT GGA ACA ACG CGT CAA AC	
Tem-1	Tem1-F	ATG AGT ATT CAA CAT TTT CGT G	[1]
	Tem1-R	TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G	
GyrA	GyrA-F	TCC GCC ACG ACC ACA AAT TC	[1]
	GyrA-R	CTG CCA GCA TTT CAT GTG AG	
ParC	ParC-F	GCC ATG AGC GTG GTC AAA G	[1]
	ParC-R	ACC GTC CCC TGA TTG ATT TC	
rpsJ	rpsJ-F	GTG CTG TTG TAA AAG GCC CG	[4]
	rpsJ-R	CGG CCG GCA AAT CCA GCT TC	
Tet-M	Tet(M)-F	ATC CTT TCT GGG CTT CCA TTG	[4]
	Tet(M)-R	CCG AGC AGG GAT TTC TCC AC	

2 结 果

2.1 药敏试验 57 株青霉素耐药率 84.2%(48/57),产 β-内酰胺酶淋球菌(PPNG)阳性率为 35.1%(20/57)。四环素的耐药率 91.2%(52/57),质粒介导的四环素高度耐药淋球菌(TRNG)阳性率为 56.1%(32/57)。环丙沙星的耐药率为 93.0%(53/57),未发现头孢曲松及大观霉素耐药株。具体分布结果见表 2。

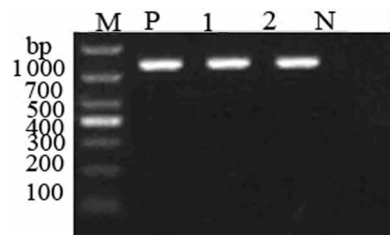
表 2 57 株淋球菌对 5 种抗菌药物药敏结果(%)

抗菌药物	敏感	中介	耐药
青霉素	0.0	15.7	84.2
四环素	8.8	0.0	91.2
环丙沙星	7.0	0.0	93.0
头孢曲松	61.4	38.6	0.0
大观霉素	100.0	0.0	0.0

2.2 青霉素相关耐药基因检测 对 57 株淋球菌进行青霉素相关耐药基因检测,其中 96.5%(55/57)菌株 PBP-1 存在 L421P 突变型。PBP-2 均发生插入突变,即在 345 位置插入一个天冬氨酸(Asp-345a)。93.0%(53/57)菌株 Porin PIB 存在 G120D、G120K、A121D、A121G、A121N 等突变,86.0%(49/57)菌株 mtrR 启动子有 A 缺失突变,17.5%(10/57)菌株 mtrR 存在 G45D、A39T、R44H 等突变,TEM-1 阳性率 77.2%(44/57),电泳结果见图 1。具体分布见表 3。

表 3 淋球菌耐青霉素相关基因分布

PBP-1	PBP-2	Porin PIB	mtrR 启动子	mtrR	株数
L421P	Asp-345a	G120K,A121D	A 缺失	WTa	27
L421P	Asp-345a	A121G	A 缺失	WT	12
L421P	Asp-345a	G120K,A121N	A 缺失	WT	4
L421P	Asp-345a	G120K,A121D	WT	G45D	4
L421P	Asp-345a	G120D,A121G	A 缺失	G45D	2
L421P	Asp-345a	G120K,A121N	A 缺失	WT	2
L421P	Asp-345a	WT	A 缺失	WT	2
L421P	Asp-345a	G120D,A121G	WT	A39T	2
WT	Asp-345a	WT	WT	A39T,R44H	2

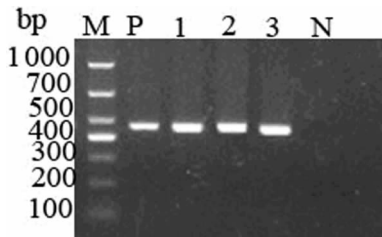


M:1 000 bp marker;P:阳性对照;N:阴性对照;1~2:阳性菌株;PCR 产物长度 861 bp。

图 1 TEM-1 基因 PCR 产物电泳结果

2.3 四环素相关耐药基因检测 对 57 株淋球菌进行四环素

相关耐药基因检测,其中 93.0%(53/57)菌株 rpsJ 存在 V57M 突变; Porin PIB、mtrR 启动子、mtrR 等突变情况见表 3; Tet-M 阳性率为 73.7%(43/57),电泳结果见图 2。



M:1 000 bp marker;P:阳性对照;N:阴性对照;1~3:阳性菌株; PCR 产物长度 437 bp。

图 2 Tet-M 基因 PCR 产物电泳结果

2.4 环丙沙星相关耐药基因检测 对 57 株淋球菌进行环丙沙星相关耐药基因检测,其中 89.5%(51/57)菌株 ParC 存在 S87R、S87N、E91Q、E91G 等突变,93.0%(53/57)菌株 GyrA 存在 S91F、D95G、D95A 等突变,具体分布见表 4。

表 4 淋球菌耐环丙沙星相关基因分布

ParC	GyrA	株数
S87R	S91F,D95G	43
S87N,E91Q	S91F,D95A	6
E91G	S91F,D95A	2
WT	S91F,D95A	2
WT	WT	4

### 3 讨论

虽然青霉素和四环素已不再作为治疗淋球菌的首选药物,但 PPNG 和 TRNG 流行率仍是淋球菌耐药性监测的重要指标。本研究的 PPNG 阳性率与珠海地区的 31.4%和广州地区的 38.6%接近<sup>[5-6]</sup>,低于重庆地区的 56.9%和南昌地区的 50.7%<sup>[5,7]</sup>。TRNG 检测率略高于珠海地区的 48.6%<sup>[5]</sup>,与广州地区的 60%接近<sup>[6]</sup>。环丙沙星的耐药性严重,广州地区、珠海地区都在 90%以上。头孢曲松与大观霉素未见耐药株,但头孢曲松的中介率已达 38.3%,国内和日本已发现头孢曲松耐药株,国内也有大观霉素耐药株出现<sup>[5,8-9]</sup>,这些都应引起临床重视。

青霉素耐药由质粒携带 TEM-1 和位于染色体基因突变导致,后者包括 mtr 外排泵活性增强、PBP1 与 PBP2 位点改变、外膜蛋白通透性 Porin PIB(PIA 和 PIB)改变<sup>[10]</sup>。mtr 外排泵系统包含 mtrR 和 mtrCDE,mtrCDE 受 mtrR 负调节。mtrR 蛋白特异结合,结合位点位于 mtrCDE 和 mtrR 两基因的启动区。当 mtrR 与启动区结合后,可抑制 mtrCDE 转录。当启动子区域或者 mtrR 基因发生突变时,可使 mtrCDE 转录水平上升。PBP-1 仅 2 株未发生突变,PBP-2 均发生 345 位插入 Asp,这些会使青霉素结合蛋白与青霉素的亲和力下降。Porin PIB 编码外膜孔蛋白,其突变可导致通过外膜蛋白渗透的抗菌药物

减少,从而产生青霉素和四环素的中度耐药,主要突变位点在 120 位与 121 位。四环素耐药主要与质粒携带的 Tet-M、mtr 外排泵活性增强、rpsJ、Porin PIB 有关,Tet-M 导致四环素高水平耐药。rpsJ 编码核糖体蛋白 S10,参与细菌蛋白质转录,常与 Porin PIB、mtrR 系统联合突变导致四环素耐药。在耐青霉素菌株和耐四环素菌株中,mtr 系统突变以 mtr 启动子为主。淋球菌对环丙沙星的耐药主要是 gyrA 基因突变导致的 DNA 回旋酶以及 parC 基因突变导致的拓扑异构酶 IV 氨基酸序列改变。本研究发现耐环丙沙星株大部分存在 GyrA 和 ParC 双突变,其中 gyrA 突变均是 91 位和 95 位发生双突变。

总之,淋球菌耐药机制较复杂,与 Porin PIB、mtrR 外排泵系统、rpsJ、GyrA、ParC 等突变高度相关。临床应加强对淋球菌耐药基因的分子流行病学研究,从而合理制定治疗方案,防止滥用抗菌药物导致耐药性的播散。

### 参考文献

- [1] Allen VG, Farrell DJ, Rebbapragada A, et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in Neisseria gonorrhoeae isolates from Ontario, Canada[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011,55(2):703-712.
- [2] Ito M, Deguchi T, Mizutani KS, et al. Emergence and spread of Neisseria gonorrhoeae clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005,49(1):137-143.
- [3] Martin IM, Ison CA, Aanensen DM, et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area[J]. J Infect Dis, 2004,189(8):1497-1505.
- [4] Ilina EN, Vereshchagin VA, Borovskaya AD, et al. Relation between genetic markers of drug resistance and susceptibility profile of clinical Neisseria gonorrhoeae strains[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008,52(6):2175-2182.
- [5] 刘小凤,伍昆山,吴兴中,等. 珠海地区淋球菌对抗生素的耐药性分析[J]. 皮肤病学杂志,2011,18(3):163-165.
- [6] 曹文冬,黎小东,毕超,等. 某地区淋球菌对 6 种抗生素耐药性的结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(19):2205-2206.
- [7] 谢大泽,湛学军,陶雪花,等. 南昌地区淋球菌对抗生素的耐药性及质粒谱分析[J]. 检验医学与临床,2010,7(23):2605-2608.
- [8] 唐桂林,覃善列,李伟,等. 694 株淋病奈瑟菌对环丙沙星、头孢曲松耐药性测定[J]. 广西医学,2008,30(11):1472-1473.
- [9] Unemo M, Golparian D, Nicholas R, et al. High-level cefixime-and ceftriaxone-resistant Neisseria gonorrhoeae in France; novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(3):1273-1280.
- [10] 祝伦,蒋法兴. 淋球菌耐药现状及耐药机制研究进展[J]. 安徽医药,2012,16(6):623-725.

(收稿日期:2014-05-01)