

• 论 著 •

阿奇霉素耐药及头孢曲松低敏淋球菌基因分型与多态性研究

黎小东, 梁景耀, 毕超, 杨日东, 李平, 梁艳华, 张锡宝, 曹文苓[△]

(广东省广州市皮肤病防治所检验科 510095)

摘要:目的 分析广州地区阿奇霉素耐药及广谱头孢菌素低敏淋球菌基因分型和基因多态性特征。方法 检测阿奇霉素(AZM)和头孢曲松(CRO)最小抑菌浓度(MIC)。检测 AZM 耐药(AZM-R)淋球菌 23S rRNA、多重可传递耐药调节(mtrR)基因和青霉素结合蛋白 2(PBP2)编码基因(penA)突变类型。采用淋球菌多抗原序列分型法(NG-MAST)检测菌株基因型。结果 共检测淋球菌 485 株,包括 AZM-R 菌株(MIC ≥ 1 mg/L)77 株(15.9%),其中 AZM 低度耐药(AZM-LLR, MIC=1 mg/L)菌株 33 株(6.8%)、AZM 中度耐药(AZM-MLR, MIC ≥ 2 mg/L)菌株 44 株(9.1%)。AZM-MLR 菌株中 CRO 低敏(MIC ≥ 0.125 mg/L)菌株 19 株(占 43.2%),构成比高于 AZM-LLR 菌株中的 CRO 低敏株(18.2%, $P < 0.05$)。各类菌株间 23S rRNA、mtrR、penA 基因突变或联合突变检出率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。AZM-LLR 与 CRO 低敏菌株,以及 AZM-MLR 与 CRO 低敏菌株间各类突变检出率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。未检出 A2059G 突变及 AZM 高度耐药株(MIC ≥ 256 mg/L)。77 株 AZM-R 菌株经 NG-MAST 检测,检出 67 株序列类型,其中 30 株有异常。多数序列类型表现为单一表型。结论 该地区出现的 AZM 耐药及 CRO 低敏淋球菌值得持续监测和进一步研究,以明确其耐药机制。

关键词:淋球菌; 阿奇霉素; 抗菌药物耐药性; 多抗原序列分型法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1495-05

Genotyping and gene polymorphism of *Neisseria gonorrhoeae* with azithromycin-resistance and decreased susceptibilities to ceftriaxoneLI Xiaodong, LIANG Jingyao, BI Chao, YANG Ridong, LI Ping, LIANG Yanhua, ZHANG Xibao, CAO Wenling[△]

(Clinical Laboratory, Institute for the Prevention and Treatment of Skin Diseases, Guangzhou, Guangdong 510095, China)

Abstract: **Objective** To analyze the characteristics of genotyping and gene polymorphism of *Neisseria gonorrhoeae* (N. go) with azithromycin (AZM)-resistance (AZM-R) and decreased susceptibility to ceftriaxone (CROD). **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) of AZM and CRO were determined. AZM-R isolates were detected for mutations in 23S rRNA, mtrR and penA genes. Genotypes were analyzed by using N. go multi-antigen sequence typing (NG-MAST). **Results** All total of 485 isolates of N. go were detected. 77 (15.9%) strains were AZM-R (MIC ≥ 1 mg/L), including 33 (6.8%) isolates of AZM low-level resistant (AZM-LLR, MIC=1 mg/L) strains and 44 (9.1%) isolates of AZM middle-level resistant (AZM-MLR, MIC ≥ 2 mg/L) strains. There were more CROD (MIC ≥ 0.125 mg/L) strains in AZM-MLR isolates (43.2%), compared with those in AZM-LLR isolates (18.2%, $P < 0.05$). The detected rates of 23S rRNA, mtrR, penA single or combined mutations were without significant differences between AZM-LLR isolates and AZM-MLR isolates ($P > 0.05$). Similar results were found between combined AZM-LLR/CROD isolates and combined AZM-MLR/CROD isolates ($P > 0.05$). No mutation of A2059G and AZM high-level resistant (AZM-HLR, MIC ≥ 256 mg/L) isolate were found. Among 77 AZM-R isolates, 67 sequence types (ST) were identified by NG-MAST, of which 30 types were novel. Most ST were represented by a single isolate. **Conclusion** AZM-R and CROD isolates, presented in this area, might be deserved continuous surveillance to identify the mechanism of concurrent resistance.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*; azithromycin; antimicrobial resistance; NG-MAST

多重耐药淋球菌的传播是日益严峻的公共卫生问题之一。淋病治疗首选经验药物广谱头孢菌素(ESCs)单药治疗疗效不佳,因此目前多采用联合抗菌疗法,推荐疗法为肌肉注射 250~500 mg 头孢曲松(CRO),或口服 400 mg 头孢克肟(患者具有 CRO 禁忌证时)、1~2 g 阿奇霉素(AZM)联合用药^[1-3]。2000 年,因具有较好的疗效,国内推荐 AZM 作为淋病及淋球菌、沙眼衣原体混合感染治疗的首选用药^[4]。广州地区于 2009 年第一次分离鉴定出 AZM 耐药(AZM-R)淋球菌^[5]。各种基因突变,如 23S rRNA、多重可传递耐药调节(mtrR)基因和青霉素结合蛋白 2(PBP2)编码基因(penA)突变,是染色体途径介导 AZM 和 ESCs 耐药的主要机制^[6-8]。本研究分析了广州地区 2009 年 9 月至 2013 年 10 月 AZM-R 及头孢曲松敏感性下降(CROD)淋球菌流行情况及其基因特征。现将研究结果报道

如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 2009 年 9 月至 2013 年 10 月,于本院就诊的淋病性传播疾病患者 485 例,年龄 17~69 岁,男 445 例(占 91.8%)、女 40 例(占 8.2%),男性均为尿道炎患者,女性均为宫颈炎患者。采集患者尿道或宫颈口拭子标本,经培养、分离、鉴定的淋球菌分离株 485 株。

1.2 药敏实验 AZM 药敏实验采用欧洲抗菌药物敏感试验委员会(EUCAST)推荐实验方法和标准, CRO 药敏实验采用世界卫生组织(WHO)2012 年推荐实验方法和标准^[9]。AZM-R 判断标准为最小抑菌浓度(MIC) ≥ 1.0 mg/L, CROD 判断标准为 MIC ≥ 0.125 mg/L。产 β -内酰胺酶淋球菌检测采用纸片法。淋球菌质控株采用 ATCC49226 与 2008 年 WHO 推荐的

淋球菌参考株 G、J、L、P。参考既往研究,将 AZM-R 淋球菌分为 AZM 低度耐药株(AZM-LLR, MIC=1 mg/L)、AZM 中度耐药株(AZM-MLR, MIC≥2 mg/L)和 AZM 高度耐药株(AZM-HLR, MIC≥256 mg/L)^[10]。

1.3 分子序列检测 AZM-R 淋球菌 DNA 提取采用 TIANamp 细菌 DNA 提取试剂(北京天根公司),按试剂盒说明书操作。23S rRNA、mtrR 和 penA 基因突变,及 porB 和 tpbB 基因多态性检测采用聚合酶链反应(PCR),PCR 扩增产物纯化后进行测序^[8,11-12]。根据基因测序结果判断 23S rRNA 基因是否突变。mtrR、penA 基因测序结果与相关数据库进行比对,并分析其编码的氨基酸序列。采用淋球菌多抗原序列分型法(NG-MAST)对淋球菌分离株进行基因分型^[12],包括 proB(490 bp)、tpbB(390 bp)易变片段等。采用 NG-MAST 网站数据库分析 porB、tpbB 及 ST 序列类型等位基因数。采用多序列比对软件(ClustalX 软件)和 Mega 软件进行进化树分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏实验结果 共检出 AZM-R 淋球菌 77 株,占 15.9%,包括 AZM-LLR 淋球菌 33 株(占 6.8%)和 AZM-MLR 淋球菌 44 株(占 9.1%),见表 1。AZM-LLR 淋球菌耐药率从 2009—2010 年的 14.0%(24/171)下降到 2011—2013 年的 2.9%(9/314)($P<0.05$),而 AZM-MLR 淋球菌耐药率从 2009—2010 年的 4.7%(8/171)上升至 2011—2013 年的 11.5%(36/314, $P<0.05$)。2011—2013 年检出 7 株淋球菌 MIC>8 mg/L,占 2.2%(7/314),见图 1。淋球菌分离株中,CROD 菌株百分率是 22.3%(108/485),其中 AZM-LLR/CROD 菌 18.2%(6/33),AZM-MLR/CROD 菌占 43.2%(19/44),显著高于所有淋球菌或 AZM-LLR 菌株的百分率($P<0.05$),见表 2。

年度	MIC		合计
	1 mg/L	≥2 mg/L	
2009	19.3(17/88)	4.5(4/88)	23.9(21/88)
2010	8.4(7/83)	4.8(4/83)	13.3(11/83)
2011	0.9(1/114)	7.9(9/114)	8.8(10/114)
2012	2.0(2/100)	17.0(17/100)	19.0(19/100)
2013	6.0(6/100)	10.0(10/100)	16.0(16/100)
合计	6.8(33/485)	9.1(44/485)	15.9(77/485)

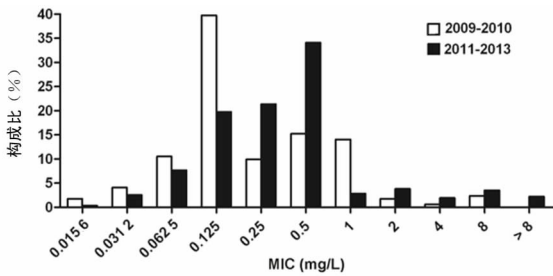


图 1 2009—2010 年与 2011—2013 年 AZM-R 淋球菌 MIC 分布

2.2 AZM-R 淋球菌 23S rRNA、mtrR 和 penA 突变检测结果

(1)33 株 AZM-LLR 淋球菌中,检出 32 株[97.0%(32/33)]包含 4 个 23S rRNA 等位基因区域 V 的野生型序列,1 株[3.0%(1/33)]包含 1 个单一等位基因突变 C2611T,见表 2。44 株 AZM-MLR 淋球菌中,检出 38 株[86.4%(38/44)]野生型序列,1 株[2.2%(1/44)]AZM MIC 为 2 mg/L 且包含 1 个单一等位基因突变 C2611T,5 株[11.4%(5/44)]AZM MIC 分别为 4、8、8、8、64 mg/L 且包含 4 个等位基因突变 C2611T。检出 7 株包含等位基因突变 C2611T 的 CROD 淋球菌(MIC≥0.125 mg/L)。(2)mtrR 启动子 13 bp 反向重复序列(5'-AAA AAG ACY YYY Y-3')腺嘌呤单核苷酸缺失发生率,在 AZM-LLR 淋球菌[87.9%(29/33)]和 AZM-MLR 淋球菌[95.5%(42/44)]菌株间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。mtrR 编码区野生型仅在 2 株 AZM-LLR/头孢曲松敏感(CROS)和 2 株 AZM-MLR/CROS 联合菌株中检出,AZM-LLR/CROD 及 AZM-MLR/CROD 联合菌株中没有检出。A39T/F62I、A40D/T86A、T86A/H105Y、A40D/T86A/H105Y 或 D79N/T86A/H105Y 联合突变仅在 AZM-MLR 淋球菌菌株中检出。(3)77 株 AZM-R 淋球菌菌株中,检出有 1 个 Asp-346 镶嵌的 PBP2,以及 F504I、A510V 及 A516G 突变。共检出 13 种 penA 突变模式,包括 3 种新突变模式,第 1 种为 A501Y/F501V/A516G/H541N/P552V/I556V,第 2 种为 F504L/A501V/A516G/Y554H,第 3 种为 A501V/F504L/A510V/A516G/H541N/I566V。AZM-LLR 淋球菌菌株 penA 基因突变以 V(18.2%)、XⅧ(15.2%)和 XⅪ(21.2%)模式为主。AZM-MLR 淋球菌菌株 penA 基因突变也以 V(18.2%)、XⅧ(29.4%)、XⅪ(18.2%)模式为主。AZM-LLR/CROD 和 AZM-MLR/CROD 菌株突变模式构成比比较差异无统计学意义($P>0.05$)。AZM-MLR 菌株或 AZM-MLR/CROD 联合菌株 23S rRNA/mtrR/penA 联合突变模式构成比比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

突变类型	AZM-LLR 淋球菌(n=33)		AZM-MLR 淋球菌(n=44)	
	总数	CROD 淋球菌	总数	CROD 淋球菌
AZM-R	33(100.0)	6(18.2)	44(100.0)	19(43.2)
23S rRNA				
野生型	32(97.0)	5(15.2)	43(86.3)	13(29.5)
C2611Ts	1(3.0)	1(3.0)	4(2.3)	1(2.3)
C2611T ^{all}	0(0.0)	0(0.0)	45(11.4)	5(11.4)
mtrR				
单核苷酸缺失	29(87.9)	6(18.2)	42(95.5)	19(43.3)

续表 2 AZM-R 及 CROD 淋球菌基因基因突变类型分布[*n*(%)]

突变类型	AZM-LLR 淋球菌(<i>n</i> =33)		AZM-MLR 淋球菌(<i>n</i> =44)	
	总数	CROD 淋球菌	总数	CROD 淋球菌
突变				
野生型	2(6.1)	0(0.0)	42(45)	0(0.0)
A39T	7(21.2)	4(12.1)	46(13.6)	4(9.1)
G45D	8(24.2)	1(3.0)	45(11.3)	2(4.5)
H105Y	16(48.5)	1(3.0)	426(59.1)	11(25.0)
A40D/T86A/H105Y	0(0.0)	0(0.0)	1(2.3)	1(2.3)
其他突变	0(0.0)	0(0.0)	44(9.1)	1(2.3)
PBP2 突变模式				
Ⅱ 或 ⅩⅣ	3(9.1)	0(0.0)	44(9.1)	0(0.0)
V	6(18.2)	1(3.0)	48(18.2)	3(6.8)
ⅩⅢ	2(6.1)	0(0.0)	42(4.6)	1(2.3)
ⅩⅧ	5(15.2)	2(6.1)	413(29.4)	10(22.6)
ⅩⅪ	7(21.2)	1(3.0)	48(18.2)	3(6.8)
ⅩⅩⅩⅦ	4(12.2)	0(0.0)	46(13.6)	1(2.3)
新模式 1	1(3.0)	0(0.0)	40(0.0)	0(0.0)
新模式 2	1(3.0)	1(3.0)	40(0.0)	0(0.0)
新模式 3	0(0.0)	0(0.0)	41(2.3)	0(0.0)
其他模式	4(12.2)	1(3.0)	42(4.6)	1(2.3)
23S rRNA/mtrR/penA 突变				
WT/A-,H105Y/ⅩⅧ	2(6.1)	0(0.0)	4(9.1)	3(6.8)
WT/A-,H105Y/V	6(18.2)	1(3.0)	6(13.6)	3(6.8)
WT/A-,H105Y/ⅩⅪ	2(6.1)	0(0.0)	6(13.6)	2(4.5)
WT/A-,G45D/ⅩⅪ	4(12.1)	3(9.1)	0(0.0)	0(0.0)
WT/A-,A39T/ⅩⅧ	3(9.1)	3(9.1)	5(11.4)	3(6.8)
C2611T ^{all} /A-,H105Y/ⅩⅧ	0(0.0)	0(0.0)	42(4.5)	2(4.5)
其他	16(48.5)	2(6.1)	419(43.2)	4(9.1)

注:C2611Ts 表示 C2611T 单一等位基因突变;C2611T^{all}表示 C2611T 全部 4 个等位基因突变;新模式 1 为 A501Y/F501V/AS16G/H541N/P552V/I556V;新模式 2 为 F504L/A501V/A516G/Y554H;新模式 3 为 A501V/F504L/A510V/A516G/H541N/I566V;WT 表示野生型。

2.3 NG-MAST 和进化树分析结果 77 株 AZM-R 淋球菌中,NG-MAST 鉴定出 67 株 ST 序列类型(29 株 AZM-LLR 和 38 株 AZM-MLR)。AZM-LLR 菌株 ST 序列类型以 ST1766 (3 株)、ST1866(2 株)和 ST421(2 株)为主,AZM-MLR 菌株 ST 类型包括 ST1766(3 株)、ST6987(2 株)、ST1055(2 株)、ST304(2 株),以及 1 个新 ST 序列,即 porB 等位基因 822 和 tpbB 等位基因 156,共检出 2 株。其余菌株以单一 ST 序列类型为主。porB(490 bp)和 tpbB(390 bp)基因序列进化树分析结果显示,29 株 AZM-LLR 淋球菌和 38 株 AZM-MLR 淋球菌具有不同的 ST 序列类型,二者比较差异有统计学意义(*P*< 0.05)。

3 讨 论

本研究以 2009—2013 年 AZM-R 淋球菌药敏实验和分子检测结果为基础进行联合分析。全球范围内,淋球菌对 AZM 的耐药率较高,且 MIC 呈逐年上升趋势,国内南京及重庆地区 2008—2009 年研究结果也显示相同变化趋势^[4,10,13]。WHO 建议淋球菌耐药率达到 5%时,有必要停止该抗菌药物的经验用药^[14]。因此,与其他国家类似,国内也不再推荐 AZM 用于尿道或宫颈淋病的单药治疗。为了提高淋病治疗效果和延迟头孢菌素耐药,多数指南或标准建议采用 ESCs 和 AZM 联合

治疗淋病^[2-3,10]。有研究显示,AZM-R 及 ESCs 敏感性下降淋球菌感染的疗效不佳^[10,13]。本研究同样显示,AZM-MLR/CROD 联合菌株呈增多趋势。

既往关于 AZM-R 和 CROD 基因突变的研究以 23S rRNA、mtrR 和 penA 基因突变为主^[6-8,10]。23S rRNA 基因区域 V 中心环各位置发生突变,可降低 23S rRNA 蛋白质与抗菌药物(如 AZM)的结合力,从而导致耐药^[6]。有研究显示,23S rRNA 发生 C2611T 的 4 个等位基因突变时,可以导致 AZM-LLR^[6]。A2059G(大肠杆菌编码)4 个等位基因突变中,至少 3 个可以产生 AZM-HLR;AZM 敏感株包含单一等位基因突变时,可在红霉素协同下,快速进化成 AZM-HLR^[6]。本研究中,仅有 7 株 AZM-R 淋球菌包含突变 C2611T,余下的大量菌株包含 4 个野生型等位基因,占比超过 80%,高于加拿大^[10]、美国^[7,15]等其他国家的研究报道^[6-7,10,15]。尤其是上述 7 株 AZM-R 淋球菌包含突变 C2611T,显示为 CROD。本研究未检出与 AZM-HLR 相关的突变 A2059G。mtrR 基因启动子或编码区的特殊突变可导致 MtrCDE 流出泵反应减少,使抗菌药物输出增多^[15]。MtrCDE 流出泵的缺失可显著增强细菌对 AZM、ESCs、青霉素、环丙沙星和大观霉素的敏感性^[16]。AZM-R 分离株中,mtrR 启动子单一核苷酸缺失率超过 85%,

但 AZM-R/CROS 与 AZM-R/CROD 联合菌株缺失率比较差异无统计学意义($P>0.05$),符合此缺失与 CROD 可能没有相关性的报道^[8]。H105Y 为最常见的单一突变,但在 AZM-LLR 和 AZM-MLR 分离株中的检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。特别是 mtrR 联合突变,仅仅在 AZM-MLR 菌株中有检出。penA 基因突变与低敏感性或许多 β -内酰胺类耐药有关,尤其与 ESCs 耐药密切相关^[17]。PBP2 镶嵌基因突变 G545S、I312M 和 V316T 可导致 ESCs 耐药性增强^[18]。有研究显示,该 3 类突变可增强细菌对 ESCs 的耐药性,但该作用依赖于镶嵌基因的其他突变^[19]。中国^[8]和澳大利亚^[17]学者的研究结果过显示,突变模式 X III、X VII 和 X VIII 仅出现于 CROD 菌株中。该 3 种突变模式包含 G542S、P551S 和(或)P551L 突变,与 CRO 的 MIC 升高有关^[20]。然而,对具有相同基因背景的细菌进行 penA 基因定向位点突变,并没有发现可提高 CRO 的 MIC^[21]。G542S、P551S 和(或)P551L 突变仅存在于 CROS 和 CROD 菌株中。加拿大学者研究结果显示, AZM-R 菌株最普遍突变模式为 X X IV,表现为 AZM-R 及 ESCs 敏感性下降^[10]。本研究中,较为常见的突变模式是 V、X VIII 和 X XII,其在 AZM-LLR、AZM-MLR 和 AZM-R/CROD 联合株中的检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。总之, 23S rRNA、mtrR 和 penA 基因突变具有明显的多样性,但 3 种基因任意一种单独突变或联合突变模式,在 AZM-MLR 或 AZM-R/CROD 联合菌株均未检出。

NG-MAST 和进化树分析结果显示,广州地区 2009—2013 年淋球菌基因型呈高度多样性。由于 AZM 广泛使用及半衰期较长,因此可推断 ST 序列类型多样性是细菌在抗菌药物压力下的反应之一。本研究检出的部分 ST 序列类型,如 ST3356、ST1866、ST1766 和 ST4313,与国内类似研究报道一致^[4],但不包括其他国家报道的类型,如 ST470、ST649、ST3158、ST1704、ST359 和 ST696,这些类型已被证实与 AZM-R 或 AZM-HLR 有关^[10]。

综上所述,AZM-R 淋球菌不断增多,尤其是检出 AZM-R/CROD 联合菌株。持续监测淋球菌药物敏感性和分子流行病学特征,发现与其相关的突变或突变模式,有助于进一步了解联合菌株的耐药机制,为临床治疗方案的确定提供一定的依据。

参考文献

- [1] Kovari H, de Melo Oliveira MD, Hauser P, et al. Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Switzerland to Cefixime and Ceftriaxone; antimicrobial susceptibility data from 1990 and 2000 to 2012[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(11): 603-607.
- [2] Bignell C, Unemo M, European STI Guidelines Editorial Board. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults[J]. Int J STD AIDS, 2013, 24(2): 85-92.
- [3] Chen C, Yin P, Dai Q, et al. Antimicrobial resistance, genetic resistance determinants for ceftriaxone and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Nanjing, China[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(11): 2959-2965.
- [4] Yuan F, Yin P, Dai Q, et al. Resistance to azithromycin of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from 2 cities in China[J].

- Sex Transm Dis, 2011, 38(8): 764-768.
- [5] 曹文苓,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.
- [6] Chisholm A, Dave J, Ison A. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(9): 3812-3816.
- [7] Wu A, Buono S, Katz A, et al. Clinical *neisseria gonorrhoeae* isolates in the United States with resistance to azithromycin possess mutations in all 23S rRNA alleles and the mtrR coding region[J]. Microb Drug Resist, 2011, 17(3): 425-427.
- [8] Liao MM, Gu M, Yang Y, et al. Analysis of mutations in multiple loci of *Neisseria gonorrhoeae* isolates reveals effects of PIB, PBP2 and MtrR on reduced susceptibility to ceftriaxone[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(5): 1016-1023.
- [9] 黎小东,梁景耀,毕超,等.广州地区淋球菌耐药性的趋势分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(4): 427-474.
- [10] Allen G, Seah C, Martin I, et al. Azithromycin resistance is coevolving with reduced susceptibility to cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(5): 2528-2534.
- [11] Ng K, Martin I, Liu G, et al. Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(9): 3020-3025.
- [12] 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.
- [13] Katz R, Komeya Y, Soge O, et al. *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin; case report of the first isolate identified in the United States[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(6): 841-843.
- [14] Kaiser C, Liang Jung, Melrose J, et al. Differences in anxiety among patients with early-versus late-onset Alzheimer's disease[J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2014, 26(1): 73-80.
- [15] Centers for Disease Control and Prevention. *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to azithromycin—San Diego County, California, 2009[J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2011, 60(18): 579-581.
- [16] Golparian D, Shafer M, Ohnishi M, et al. Importance of multidrug efflux pumps in the antimicrobial resistance property of clinical multidrug-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(6): 3556-3559.
- [17] Whiley M, Limnios A, Ray S, et al. Diversity of penA alterations and subtypes in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Sydney, Australia, that are less susceptible to ceftriaxone[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(9): 3111-3116.

球上交联的探针根据碱基互补配对原则进行杂交,加入荧光标记物后在流式点阵仪上检测荧光信号,从而判断 HPV 亚型检测结果。其试剂盒中明确说明:当脱落细胞标本包含较多血细胞时,有可能导致 PCR 实验失败,此时需适当减少标本量再行检测;但未明确不同量血细胞对检测结果的影响。在临床实际工作中,由于受不同医生采样手法差异,以及不同患者个体差异的影响,有可能使送检标本中含有不同量的血细胞,但实验操作者无法对此类标本进行最科学和准确的处理,导致不同实验室之间或不同技术人员之间的检测结果差异较大。

本研究首先根据 Hb 水平对脱落细胞标本进行分组,对不同分组的每份标本进行不同的取样量检测,旨在分析不同取样量对检测结果的影响。研究结果显示,Hb $\leq$ 30 g/L 时,不同取样量标本制备的 DNA 检测结果无差异;30 g/L<Hb $\leq$ 60 g/L 时,若取样量设为小于或等于 500 μ L,可能漏检部分 HPV 亚型,随着取样量的增加,对不同 HPV 亚型的检测灵敏度逐渐升高,因此,建议取样量为 1 000 μ L;60 g/L<Hb $\leq$ 100 g/L 时,由于 Hb 对 PCR 扩增的影响较大,取样量设为 500 μ L 时,对不同 HPV 亚型的检出率最高;Hb>100 g/mL 时,Hb 对 PCR 扩增产生明显抑制作用,若取样量设为大于或等于 500 μ L,不同 HPV 亚型检出率明显下降,多数标本在取样为 1 000 μ L 时,检测灵敏度极低,无法检出相应的 HPV 亚型,因此,建议取样量为 200 μ L。

血性标本检测存在两个因素的影响。其一,取样量少可能导致宫颈上皮细胞不足,导致检测灵敏度降低。有研究显示,采用流式荧光杂交法进行 HPV 分型检测,当标本稀释度为 1:1 000 时,阳性率可降至 37.5%^[9]。其二,Hb 对 PCR 反应有一定的抑制作用,Hb 水平越高,对 PCR 的干扰越大,可导致假阴性结果。Hb 对 PCR 反应产生抑制作用,可能与 Hb 释放铁离子,进而干扰 DNA 合成有关^[10-11]。

本研究显示,随着 Hb 水平升高,需要减少取样量,以避免部分 HPV 亚型漏检。当宫颈脱落细胞标本 Hb 水平小于或等于 60 g/L 时,对 HPV 亚型检测的影响相对较小。为保证标本具有一定的宫颈上皮细胞,同时考虑到实验操作的简便性,本实验室建立的取样量标准为:Hb $\leq$ 60 g/L 时,标本取样量 1 000 μ L;60 g/L<Hb $\leq$ 100 g/L 时,标本取样量 500 μ L;Hb>100 g/L 时,标本取样量 200 μ L。

目前常用的流式荧光杂交法 HPV 分型检测试剂盒均基于无血性宫颈脱落细胞标本确定取样量,没有针对具有不同 Hb 水平的血性标本制定相应的取样量标准,而血性标本一旦处理不当,极易导致假阴性检测结果。此外,标本中的 Hb 浓

度水平不同时,对 HPV 分型检测结果的影响存在差异。因此,需要重视不同程度血性宫颈脱落细胞标本对 HPV 分型检测结果的影响。本研究建立的取样量标准可供使用相同试剂盒的实验室作为参考。

参考文献

- [1] O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of toll-like receptor signaling[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(3): 163-175.
- [2] 李政, 刘继红. HPV 分型检测的意义[J]. 实用肿瘤杂志, 2010, 25(3): 233-236.
- [3] Coglianò V, Baan R, Straif K, et al. Carcinogenicity of human papillomavirus[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(4): 204-210.
- [4] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4): 244-265.
- [5] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.
- [6] 杨忠明, 丁显平, 庞博, 等. 人乳头瘤病毒 DNA 联合液基薄层细胞学检测在宫颈癌筛查诊断中的研究[J]. 成都医学院学报, 2011, 6(4): 320-323.
- [7] 钱思宇. 人乳头瘤病毒检测方法研究[J]. 实用医技杂志, 2016, 23(8): 859-861.
- [8] 邱峰, 晁艳, 袁丽娜, 等. 流式荧光杂交法检测 26 种 HPV 亚型在不同程度宫颈病变中的分布规律[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(12): 957-959.
- [9] 崔鲂, 孟江萍, 向瑜. 流式荧光杂交技术和导流杂交基因芯片技术在 HPV 分型检测中的应用评价[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(5): 395-397.
- [10] 沈克锋, 杨默, 江千里. 血液和骨髓标本中常见 PCR 反应抑制物的探究与分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(3): 842-846.
- [11] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR[J]. Nat Protoc, 2006, 1(3): 1559-1582.

(收稿日期: 2016-11-28 修回日期: 2017-02-17)

(上接第 1498 页)

- [18] Takahata S, Senju N, Osaki Y, et al. Amino acid substitutions in Mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11): 3638-3645.
- [19] Tomberg J, Unemo M, Davies C, et al. Molecular and structural analysis of Mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations[J]. Biochemistry, 2010, 49

(37): 8062-8070.

- [20] Whitley M, Goire N, Lambert B, et al. Reduced susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* is associated with mutations G542S, P551S and P551L in the gonococcal penicillin-binding protein 2[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(8): 1615-1618.
- [21] Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future[J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(3): 587-613.

(收稿日期: 2016-11-22 修回日期: 2017-02-19)