

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.01.025

男性泌尿道来源的脲原体对氟喹诺酮类药物耐药性研究*

高志琴¹ 莫小辉² 陆海空³ 钱伊弘³ 柴喆³ 顾昕³ 管志芳³ 龚伟明^{3△}

(1 上海市皮肤病医院真菌科 上海 200443;

2 上海市皮肤病医院中心实验室 上海 200443; 3 上海市皮肤病医院性病科 上海 200443)

摘要 目的:运用酶链聚合反应(PCR)技术分析和比较不同生物群的脲原体对氟喹诺酮类药物的耐药情况。**方法:**以脲原体 16S rRNA 保守区域基因为扩增靶序列检测脲原体的不同生物群,采用 PCR 方法扩增拓扑异构酶 *gyrA* 和 *parC* 基因并进行测序,分析基因突变与耐药的关系。**结果:**脲原体生物一群对左旋氧氟沙星的耐药性高于生物二群,二者差异有统计学意义($t=2.071, P=0.044$)。*gyrA* 基因主要为 112 号编码蛋白 D112E 的变异,*parC* 基因主要为编码蛋白 S83L 的变异,即 83 号位丝氨酸(TCA)到亮氨酸(TTA)的变异的变异。与未突变株相比,拓扑异构酶基因突变株对环丙沙星 MIC 存在统计学差异($P<0.001$)。**结论:**不同生物群的脲原体对部分氟喹诺酮类耐药存在差异,拓扑异构酶基因突变与脲原体对喹诺酮类耐药存在相关性。

关键词:脲原体;聚合酶链反应;氟喹诺酮;耐药性

中图分类号:R69 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)01-116-04

A Study on Resistance to Fluoroquinolones in Ureaplasma from Male Urinary Tract*

GAO Zhi-qin¹, MO Xiao-hui², LU Hai-kong³, QIAN Yi-hong³, CHAI Zhe³, GU Xin³, GUAN Zhi-fang³, GONG Wei-ming^{3△}

(1 Fungal reference laboratory, Shanghai dermatology hospital, Shanghai, 200443, China;

2 Central laboratory, Shanghai dermatology hospital, Shanghai, 200443, China;

3 Department of STD Institute, Shanghai dermatology hospital, Shanghai, 200443, China)

ABSTRACT Objective: To explore the association between different biovars of Ureaplasma and the resistance to fluoroquinolones.

Methods: Ureaplasma from male urinary tract were detected using 16s rRNA gene by PCR to identify the biovars of Ureaplasma. The relationship between biovars of Uu and symptoms was analyzed. PCR and DNA sequencing were conducted to analyze the genes of *gyrA* and *parC*. **Results:** There was a significant difference in the resistance to Levofloxacin between the biovar 1 of Ureaplasma and the biovar 2 of Ureaplasma ($P=0.044$). Sequencing analysis revealed the mutation of D112E and S83L in *gyrA* and *parC* respectively. Compared with non-mutation strain of Ureaplasma, the mutation strain had a higher level of the resistance to Ciprofloxacin ($P<0.001$).

Conclusion: There were differences in resistance to quinolones among Ureaplasma urealyticum in different biovars of Ureaplasma and there had a correlation between the mutation of topoisomerase gene and the resistance of Ureaplasma to quinolones.

Key words: Ureaplasma; Polymerase chain reaction; Fluoroquinolones; Drug resistance

Chinese Library Classification(CLC): R69 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)01-116-04

前言

脲原体是泌尿生殖道常见的病原体,与男性非淋菌性尿道炎(NGU)等疾病密切相关^[1-3]。脲原体分为 2 个生物群,其下又可分为 14 个血清型。生物群 1 或微小脲原体(*Ureaplasma parvum*, Up)包括血清型 1、3、6 和 14;生物群 2 或解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*, Uu)由其余 10 个血清型组成^[4,5]。目前,临床脲原体耐药株的出现使得 NGU 的治疗成为难点,国内外均有 Uu 对氟喹诺酮类药物耐药性研究的报道,脲原体的耐药性与血清型存在相关性,不同地区流行的血清型不同,其耐药性也存在差异^[6,7]。本研究为探讨本地区不同脲原体血清型对

氟喹诺酮类药物耐药特点,旨在为脲原体的防治提供临床依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集上海市皮肤病医院 2015 年 5 月~2016 年 5 月性病门诊 NGU 患者尿道分泌物标本。

1.1.2 仪器及试剂 核酸扩增仪为美国 ABI 公司,型号为 9902;PCR 试剂为 Promega 公司产品;DNA 提取试剂盒为天根生化科技有限公司产品;PCR 引物由上海生工合成。抗生素为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

* 基金项目:上海市卫生局科研计划资助项目(20134324)

作者简介:高志琴(1970-),本科,主管技师,主要研究方向:皮肤病性病实验室诊断,E-mail: gaozhiqin@126.com

△ 通讯作者:龚伟明(1963-),本科,主任医师,主要研究方向:皮肤病性病临床诊治,E-mail: gongweiming101@163.com

(收稿日期:2018-03-08 接受日期:2018-03-30)

1.2.1 标本 DNA 的提取 将粘有患者尿道分泌物标本的拭子置入 1 mL 生理盐水中充分悬浮, 10 000 r/min 离心 5 min。弃上清后留沉淀物, 按照 DNA 提取试剂盒说明书提供的步骤提取 DNA。

1.2.2 脲原体药敏试验 采用微量稀释法测定环丙沙星、氧氟沙星和左旋氧氟沙星等 3 种抗生素的抑菌浓度。在 96 孔板上用倍比稀释法进行最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC)测定, 同时每组均设阳性及阴性对照, 以加药孔 72 h 不出现红色变化的最小药物浓度为脲原体生长的 MIC。

1.2.3 PCR 扩增和电泳 按 20 μ L 反应体系进行反应, 包括 DNA 标本模板 1 μ L。设置阳性对照(脲原体生物一群使用标准血清 3 型、脲原体生物二群使用标准血清 8 型)和阴性对照, 按文献条件进行扩增^[8]。gyrA 耐药基因和 parC 基因检测按文献条件进行扩增^[9], 扩增产物送上海生工进行序列检测。配制 1% 琼脂糖凝胶, 取 5 μ L 扩增产物与 1 μ L 溴酚蓝载样缓冲液混合,

在电压 100V 电泳凝胶板中电泳 20 min, 凝胶成像仪上观察。

1.2.4 统计学分析 使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计数资料采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 检测脲原体的生物群

尿道分泌物标本中脲原体生物 1 群和脲原体生物 2 群在 1300 bp 左右位置出现特异扩增条带判断为阳性(见图 1)。

2.2 脲原体对喹诺酮药物的药敏试验

对从临床标本中分离 25 株脲原体生物 1 群和 25 株脲原体生物 2 群进行药敏实验, Uu 对喹诺酮药物的敏感性(结果见表 1、表 2)。生物一群对左旋氧氟沙星的耐药性高于生物二群, 二者差异有统计学意义($P=0.044$)。生物一群对环丙沙星、氧氟沙星的耐药性与生物二群无明显差异, 二者差异无统计学意义($P=0.0781$; $P=0.118$)。

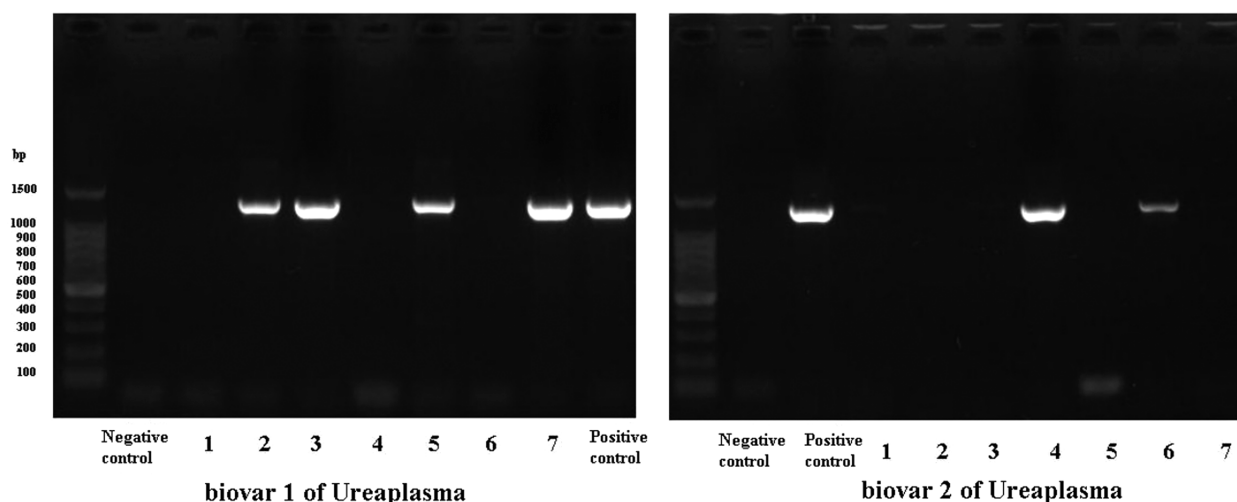


图 1 脲原体生物分群 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1 Detection of biovars of Ureaplasma by PCR amplification

表 1 25 株脲原体生物 1 群对氟喹诺酮类药物的药敏检测结果

Table 1 Fluoroquinolones susceptibility testing in the 25 strains of biovar 1 of Ureaplasma

Antibiotics	MIC(mg/L)									
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0
Ciprofloxacin.	0	0	1	2	4	6	6	3	2	1
Ofloxacin	0	0	0	1	1	3	4	8	7	2
Levofloxacin	0	3	5	5	5	4	3	0	0	0
Total	0	3	6	8	10	13	13	11	9	3

2.3 PCR 检测脲原体的突变基因

标准菌株和临床标本 gyrA 和 parC 基因目的片段分别为 331 bp 和 220 bp(见图 2)。12 株 Uu 临床株 gyrA 基因和 15 株 parC 基因发生了点突变, 其中有 3 株 gyrA 基因和 parC 基因均有点突变。gyrA 基因主要为 112 号编码蛋白 D112E 的变异, 即天冬氨酸(GAC)到谷氨酸(GAG)的变异; parC 基因主要为编码蛋白 S83L 的变异, 即 83 号位丝氨酸(TCA)到亮氨酸(TTA)的变异的变异。gyrA 基因和 parC 基因变异 Uu 临床株对环丙沙星 MIC 值为 1~16 μ g/mL 之间。与未突变株相比,

gyrA 基因和 parC 基因突变株对环丙沙星 MIC 存在统计学差异($P<0.001$)。

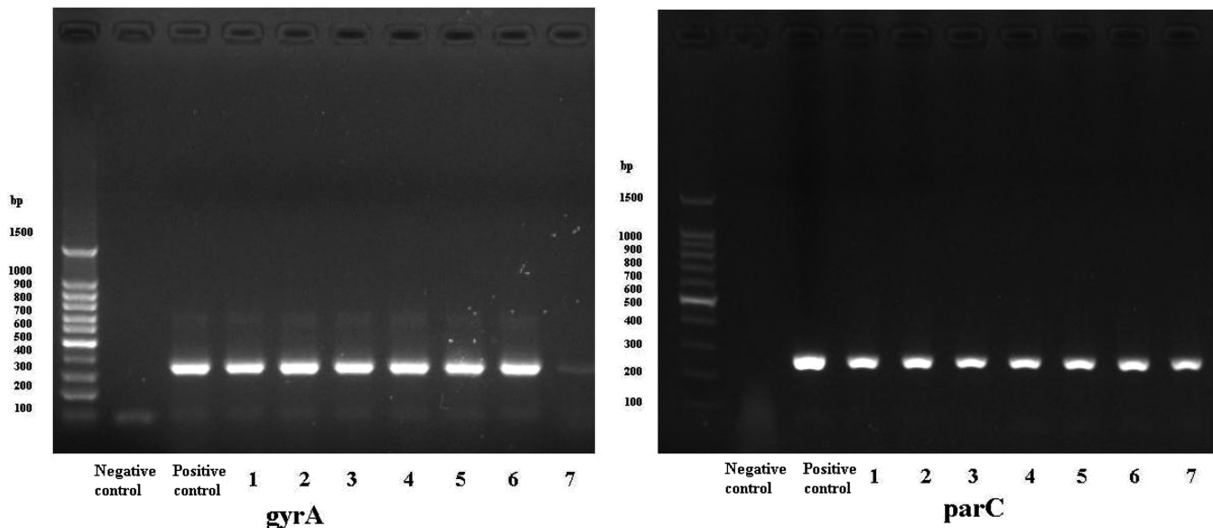
3 讨论

脲原体是导致的性传播疾病(STD)主要病原体之一。由于脲原体缺乏细胞壁结构, 它对作用于细胞壁合成的抗菌药物如青霉素类、内酰胺类等药物完全不敏感, 其次对磺胺类、多粘菌素等药物耐受。目前, 治疗脲原体的药物主要包括干扰蛋白质合成的药物如四环素类、大环内酯类和以及对干扰 DNA 复制

表 2 25 株脲原体生物 2 群对氟喹诺酮类药物的药敏检测结果

Table 2 Fluoroquinolones susceptibility testing in the 25 strains of biovar 2 of Ureaplasma

Antibiotics	MIC(mg/L)									
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0
Ciprofloxacin.	0	0	1	2	6	5	6	3	2	0
Ofloxacin	0	0	0	2	2	5	6	7	1	2
Levofloxacin	1	5	8	4	4	3	0	0	0	0
Total	1	5	9	8	12	13	12	10	3	2

图 2 PCR 方法扩增脲原体 *gyrA* 和 *parC* 基因Fig. 2 Detection the genes of *gyrA* and *parC* from Ureaplasma by PCR amplification

的药物如喹诺酮类等三类抗生素^[10-14]。由于临床治疗存在不规范的使用,脲原体对上述种抗生素的耐药性日益增多, Lee 等人报道,孕妇生殖道来源的 Uu 对环丙沙星的耐药率达 62.1%,对氧氟沙星的耐药率为 11.2%。而另有文献报道 Uu 对环丙沙星的耐药率可达 80%左右^[15,16]。不同的脲原体生物群对药物的耐药情况也存在差异。有研究认为,与 Uu 相比,Up 对四环素更为敏感,而在喹诺酮类药物的无明显差异^[7,13]。不同区域和生物群的脲原体对药物的耐药情况可能存在较大的差异。本实验检测了脲原体对喹诺酮类抗生素环丙沙星、氧氟沙星和左旋氧氟沙星的 MIC 及耐药情况。结果显示,Uu 和 Up 对氧氟沙星和环丙沙星耐药性基本一致,而 Uu 对左旋氧氟沙星的耐药性高于 Up,其差异有统计学意义。

有关病原体介导喹诺酮类耐药的机制复杂,其中包括药物外排蛋白的表达、膜渗透性降低、拓扑异构酶基因的突变等。近来研究发现,脲原体对喹诺酮类药物的耐药机制主要与编码拓扑异构酶 II (*gyrA*/*gyrB*)和拓扑异构酶 IV (*parC*/*parE*) 亚单位的基因突变有关。脲原体拓扑异构酶 II/IV 基因的突变可导致对喹诺酮类耐药,其中拓扑异构酶 II 为四聚体,由 2 个 A 亚基和 2 个 B 亚基组成,分别由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码;拓扑异构酶 IV 也为四聚体,亦由 2 个 A 亚基和 2 个 B 亚基组成,分别由 *parC* 和 *parE* 基因编码^[17-22]。有研究发现脲原体存在 *gyrA* 基因第 83 位氨基酸谷氨酰胺(Gln)突变为精氨酸(Arg),而第 95 位氨基酸天冬氨酸(Asp)突变为谷氨酸(Glu),如果两个突变同时

存在,可以导致其对氧氟沙星和环丙沙星的 MIC 值分别增加高耐药水平(分别为 64 和 128 $\mu\text{g/mL}$)^[9]。我们的实验发现 *gyrA* 和 *parC* 的基因突变株对环丙沙星 MIC 显著高于非突变株,表明拓扑异构酶基因突变与脲原体对喹诺酮类耐药存在联系。

本研究检测脲原体的突变基因,结果显示 *gyrA* 基因出现为 112 号编码蛋白 D112E 的变异,*parC* 基因为编码蛋白 S83L 的变异,该数据与之前的研究结果相一致^[23-26]。但也有研究认为,*GyrA* 的 D112E 并不一定是喹诺酮类耐药相关突变,而是正常菌株多态性的表现^[6,27]。本研究有 3 株 *gyrA* 基因和 *parC* 基因均有点突变,并表现出对氧氟沙星和环丙沙星的较高的 MIC 值,这一结果提示多重基因突变在脲原体喹诺酮类耐药中发挥了重要作用。由于本实验仅对 50 例脲原体标本进行了基因突变的检测,未能发现新的基因点突变,在下一步研究中将扩大样本量来分析两生物群更多的基因突变以及耐药机制中是否存在差异。

临床研究显示,Up 和 Uu 的致病性存在差异,Uu 较 Up 更偏向引起症状性感染^[28]。而在临床上鲜有对 Up 和 Uu 的鉴别诊断,对 Up 和 Uu 的治疗也不加区分。而本实验显示 Uu 对左旋氧氟沙星的耐药性高于 Up,且脲原体 *gyrA* 和 *parC* 的基因突变对喹诺酮类耐药也存在影响。因此,研究脲原体的耐药性和耐药机制对合理使用抗生素及减少耐药性的发生和传播等方面有着重要临床意义。

综上所述,不同生物群的脲原体对部分喹诺酮类耐药存

在差异, 拓扑异构酶基因突变与脲原体对喹诺酮类耐药存在相关性。

参考文献(References)

- [1] Moi H, Reinton N, Randjelovic I, et al. Urethral inflammatory response to ureaplasma is significantly lower than to Mycoplasma genitalium and Chlamydia trachomatis[J]. Int J STD AIDS, 2016
- [2] Frølund M, Lidbrink P, Wikström A, et al. Urethritis-associated Pathogens in Urine from Men with Non-gonococcal Urethritis: A Case-control Study[J]. Acta Derm Venereol, 2016, 96: 689-694
- [3] Moi H, Blee K. Management of non-gonococcal urethritis [J]. BMC Infect Dis, 2015, 15: 294
- [4] Harasawa R, Kanamoto Y. Differentiation of two biovars of Ureaplasma urealyticum based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer region[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(12): 4135-4138
- [5] Shepard MC, Lunceford CD. Serological typing of Ureaplasma urealyticum isolates from urethritis patients by an agar growth inhibition method[J]. J Clin Microbiol, 1978, 8(5): 566-574
- [6] Piccinelli G, Gargiulo F, Biscaro V, et al. Analysis of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum serovars resistant to fluoroquinolones [J]. Infect Genet Evol, 2017, 47: 64-67
- [7] Beeton ML. Antibiotic resistance among Ureaplasma spp. isolates: cause for concern?[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72: 330-337
- [8] Robertson JA, Vekris A, Bebear C, et al. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of Ureaplasma urealyticum[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(4): 824-830
- [9] Bebear CM, Renaudin H, Charron A, et al. In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 2557-2560
- [10] Sviben M, Ljubin-Sternak S, Mestrovic T. Sociodemographic, Sexual Behavior, and Microbiological Profiles of Men Attending Public Health Laboratories for Testing for Sexually Transmitted Diseases[J]. Acta Dermatovenereol Croat, 2017, 25: 125-132
- [11] Le PT, Hamasuna R, Matsumoto M, et al. The detection of microorganisms related to urethritis from the oral cavity of male patients with urethritis[J]. J Infect Chemother, 2017
- [12] Ioannidis A, Papaioannou P, Magiorkinis E, et al. Detecting the Diversity of Mycoplasma and Ureaplasma Endosymbionts Hosted by Trichomonas vaginalis Isolates[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1188
- [13] Zhang Y, Hua C. The relationship between the biovars and the antimicrobial resistance of Ureaplasma urealyticum in female patients with urogenital infections[J]. J Clin Lab Anal, 2017
- [14] Kweon OJ, Choi JH, Song UH. Performance evaluation of a DNA chip assay in the identification of major genitourinary pathogens[J]. J Microbiol Methods, 2015, 109: 117-122
- [15] Lee MY, Kim MH, Lee WI, et al. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in Pregnant Women[J]. Yonsei medical journal, 2016, 57(5): 1271-1275
- [16] Fernández J, Karau MJ, Cunningham SA, et al. Antimicrobial Susceptibility and Clonality of Clinical Ureaplasma Isolates in the United States [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2016, 60(8): 4793-4798
- [17] Fàbrega A, Madurga S, Giralt E. Mechanism of action of and resistance to quinolones[J]. Microbial biotechnology, 2009, 2(1): 40-61
- [18] Kawai Y, Nakura Y, Wakimoto T, et al. In vitro activity of five quinolones and analysis of the quinolone resistance-determining regions of gyrA, gyrB, parC, and parE in Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum clinical isolates from perinatal patients in Japan[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59: 2358-2364
- [19] Stokes NR, Thomaidis-Brears HB, Barker S, et al. Biological evaluation of benzothiazole ethyl urea inhibitors of bacterial type II topoisomerases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57: 5977-5986
- [20] Schmitz J, van der Linden M, Al-Lahham A, et al. Fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae isolates in Germany from 2004-2005 to 2014-2015[J]. Int J Med Microbio, 2017, 307: 216-222
- [21] Nakase K, Sakuma Y, Nakaminami H. Emergence of fluoroquinolone-resistant Propionibacterium acnes caused by amino acid substitutions of DNA gyrase but not DNA topoisomerase IV[J]. Anaerobe, 2016, 42: 166-171
- [22] Pitondo-Silva A, Martins VV, Silva CF. Conjugation between quinolone-susceptible bacteria can generate mutations in the quinolone resistance-determining region, inducing quinolone resistance[J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 45: 119-123
- [23] Beeton ML, Chalker VJ, Kotecha S. Comparison of full gyrA, gyrB, parC and parE gene sequences between all Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non-resistance polymorphism[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64: 529-538
- [24] Beeton ML. Antibiotic resistance among Ureaplasma spp. isolates: cause for concern?[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72: 330-337
- [25] Piccinelli G, Gargiulo F, Biscaro V, et al. Analysis of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum serovars resistant to fluoroquinolones [J]. Infect Genet Evol, 2017, 47: 64-67
- [26] Maeda Y, Murayama M, Goldsmith CE, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of gyrA, gyrB, parC and parE gene loci in viridans group streptococci isolated from adult patients with cystic fibrosis [J]. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2011, 66(3): 476-486
- [27] Bébear CM, Renaudin H, Charron A, et al. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of Ureaplasma spp. and Mycoplasma hominis resistant to fluoroquinolones [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 3323-3325
- [28] Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, et al. Association of Ureaplasma urealyticum (biovar 2) with nongonococcal urethritis [J]. Sexually transmitted diseases, 2004, 31(3): 192-195