

淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物的耐药性与 *gyrA* 和 *parC* 基因突变关系的研究

徐金水 王蓓 王长娟 郭海健 糜祖煌 凌健华

【摘要】 目的 探讨江苏省淋球菌对氟喹诺酮的耐药状况、耐药基因突变型的分布情况及二者之间的关系。方法 采用琼脂稀释法检测淋球菌氟喹诺酮类药物(环丙沙星、左氧氟沙星)的最小抑菌浓度(MIC),采用 PCR 法扩增含有喹诺酮耐药决定区的 *gyrA* 和 *parC* 基因片段,并进行测序分析。结果 根据所测 MIC,本研究分离的 95 株淋球菌对环丙沙星 100% 的耐药;通过测序分析,在 54 株淋球菌中检测到 *gyrA* 和 *parC* 的 18 种突变形式,*parC* 基因突变点越多,MIC 相对也较高。结论 *parC* 基因的突变导致淋球菌对喹诺酮类药物的高水平耐药。

【关键词】 淋病奈瑟菌;环丙沙星;耐药性;*gyrA* 基因;*parC* 基因

Study on Fluoroquinolone resistance and the relationship between resistance and mutations of *gyrA* and *parC* in *Neisseria gonorrhoeae* XU Jin-shui*, WANG Bei, WANG Chang-xian, GUO Hai-jian, MI Zu-huang, LING Jian-hua. *Department of Epidemiology, Public Health School of Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: WANG Bei, Email: wangbeixb@seu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the phenotypic and genotypic resistance to Fluoroquinolones in *Neisseria gonorrhoeae* (NG) isolated in Jiangsu province of China. **Methods** In-vitro, susceptibility testing of ciprofloxacin and levofloxacin against ninety-five clinical isolates were determined by agar dilution method. Detection of mutation in the *gyrA* and *parC* genes was performed by polymerase chain reaction (PCR) assay and sequence analysis. **Results** The clinical isolates demonstrated 100% resistance to ciprofloxacin. Based on *gyrA* and *parC* mutations, 18 types could be categorized among the 54 isolates. Based on the same *gyrA* mutations, isolates with high MIC appeared to have had more mutations in *parC* gene. **Conclusion** The status of resistance to ciprofloxacin in NG was quite serious, and ciprofloxacin treatment for the treatment of NG infections in Jiangsu province should not be recommended. The results from this study suggested that mutations in the *parC* gene had contributed to the development of high Fluoroquinolone resistance in NG.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Ciprofloxacin; Drug resistance; *gyrA* genes; *parC* genes

淋病奈瑟菌(NG)是性传播疾病(STD)最主要和常见的病原体,WHO 估计全球每年淋病新发病例数为 6200 万。目前,NG 对氟喹诺酮的耐药性逐渐上升,在世界各地都存在氟喹诺酮耐药菌株的流行^[1,2]。为了进一步了解江苏省 NG 对氟喹诺酮类药物的耐药情况以及耐药机制,我们对来自江苏省的 95 株临床分离菌株进行了氟喹诺酮药物敏感性检测及耐药基因的研究。

材料与方 法

1. 菌株来源:95 株 NG 来自南京、徐州和无锡地区的性病门诊患者病灶部位,采用法国生物梅里埃(Biomerieux)的 NG T-M 培养基进行分离,并经菌落形态、革兰染色、氧化酶试验及法国 Biomerieux API[®] 淋球菌鉴定系统证实。

2. NG 对氟喹诺酮药物的敏感性试验:采用琼脂稀释法测定最小抑菌浓度(MIC),按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准进行操作与判断^[3],质控菌株为 ATCC49226。环丙沙星(Ciprofloxacin)为 Bayer 产品、左氧氟沙星(Levofloxacin)为 Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd 产

基金项目:江苏省卫生厅预防基金资助项目(Y200408)

作者单位:210009 南京,东南大学公共卫生学院流行病与卫生统计系(徐金水、王蓓、王长娟、郭海健);无锡市克隆遗传技术研究所(糜祖煌);香港中文大学微生物学系(凌健华)

通讯作者:王蓓,Email: wangbeixb@seu.edu.cn

品, T-M培养基为英国 OXOID 公司产品, 该项试验在香港中文大学微生物学系实验室完成。

3. *gyrA* 与 *parC* 基因片段的扩增与测序分析: 取菌悬液 100 μ l, 离心 (10 000 r/min) 5 min, 弃上清后加入裂解液 50 μ l (内含 200 ng/ml 蛋白酶 K), 混匀, 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 然后置 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 离心, 上清液即为 NG 的 DNA 模板液。

PCR 扩增 *gyrA* 基因片段的正向引物为: 5'-GTA CTG TAC GCG ATG CAC GA-3', 反向引物为: 5'-CGA GCC GTT GAC GAG CAG T-3', 扩增产物为 372 bp。检测用试剂盒由无锡市克隆遗传技术研究所提供, 按使用说明进行操作, 在 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 s 共循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延长 2 min。

扩增 *parC* 基因片段的正向引物为: 5'-GCA CGC TTC CCA TAC CGA-3', 反向引物为: 5'-TCC ACC GTC CCC TGA TTG-3', 扩增产物为 410 bp。PCR 反应体系按使用说明进行配置, 在 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后按 93 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 s 共循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延长 2 min。

扩增产物由上海博亚生物技术公司进行测序, 测序引物为正向引物, 测序结果用 Blast 比对法与 GenBank 中 NG 标准株 (ATCC19424) 序列进行比较分析。

4. 统计学分析: 采用 SAS 8.1 统计软件对 *gyrA* 和 *parC* 基因突变位点与 MIC 关系进行统计分析。

结 果

1. 95 株 NG 对氟喹诺酮药物的敏感性: 琼脂稀释法测得结果显示 95 株 NG 环丙沙星 MIC 范围为 1~64 μ g/ml, 其 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 分别为 4 μ g/ml 和 16 μ g/ml。左氧氟沙星 MIC 范围为 0.5~16 μ g/ml, 其 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 分别为 4 μ g/ml 和 8 μ g/ml。根据 NCCLS 标准判断, 本研究分离的 NG 菌株对环丙沙星 100% 耐药; 由于没有左氧氟沙星的耐药判断标准, 所以无法确定 NG 对其的耐药率。

2. *gyrA* 与 *parC* 基因突变检测结果: 从 95 株耐药菌株中随机选取了 54 株进行 *gyrA* 与 *parC* 基因片段的扩增, 并对扩增产物进行测序, 分析突变位点; 结果见表 1。

实验中共检测到 5 种类型的 *gyrA* 突变, 主要集中在 *gyrA* 编码氨基酸的 91 和 95 位氨基酸的改变, 同时发现 *parC* 基因突变位点较多且相对比较分散, 发生 *parC* 基因突变的位点有 11 个, 其中错义突变位点为 7 个, 详见表 1。

3. *parC* 基因突变数量与 NG 对喹诺酮类药物 MIC 的关系: *parC* 基因突变位点的数目与 NG 耐氟喹诺酮药物的水平有一定的关系, 为了检验 *parC* 基因突变数量对 MIC 的影响大小, 我们采用方差分析比较其对数转换 MIC 在 *parC* 基因不同数量突变组之间是否在总体上有差异, 并用 *q* 检验进行两两比较 (表 2)。从表 2 可以看出对于环丙沙星, 总

表1 *gyrA* 与 *parC* 基因有意突变位点分布及相应菌株的 MIC 的范围

<i>gyrA</i> 突变类型 (氨基酸改变)	<i>parC</i> 基因编码氨基酸有意突变位点							分离菌株数	MIC 范围 (μ g/ml)	
	29Ala	86Asp	87Ser	87Ser	87Ser	88Ser	91Glu		环丙沙星	左氧氟沙星
A 型 (91-Ser \rightarrow Phe, 95-Asp \rightarrow Gly)		Asn						2	1~8	2~8
			Arg					13	4~32	2~8
							Gly	2	8~16	4~8
								2	1~4	1~4
B 型 (91-Ser \rightarrow Phe, 95-Asp \rightarrow Ala)	Pro			Asn				1	2	2
				Asn				5	2~8	1~8
		Asn			Ile			1	8	4
			Arg					5	2~16	1~8
						Pro		1	2	2
							Gly	1	2	2
C 型 (91-Ser \rightarrow Phe, 95-Asp \rightarrow Asn)		Asn						9	2~16*	2~8*
		Asn						1	1	1
		Asn						3	4~16	4~8
					Ile			2	32	16
			Arg					3	16~32	8~16
D 型 (91-Ser \rightarrow Phe, 92-Ala \rightarrow Pro)								1	2	4
								1	2	2
E 型 (91-Ser \rightarrow Phe, 95-Asp \rightarrow Asn, 102-Gln \rightarrow His)				Arg				1	16	8

* 此处 9 个菌株只有一个最高为 16 μ g/ml, 另一个最高为 8 μ g/ml, 其余大多为 2~4 μ g/ml

体上不同数量的 *parC* 基因突变组间 MIC 几何均数差异有统计学意义, 两两比较显示 MIC 的几何均数在 1 个与 2 个 *parC* 突变组间没有显著差异, 但都与没有 *parC* 突变组差异有统计学意义。

表2 *parC* 基因突变数与 NG 对喹诺酮类药物 MIC 的关系

抗生素	<i>parC</i> 基因突变数	菌株数	均数 [log(MIC)]	<i>s</i>	F 值	P 值
环丙沙星	0	13	0.96	0.76	5.67	0.006
	1	37	1.93	1.02		
	2	4	2.43	1.33		
左氧氟沙星	0	13	1.07	0.61	1.89	0.160
	1	37	1.41	0.82		
	2	4	1.91	1.04		

讨 论

20 世纪 80 年代, 喹诺酮类药物广泛应用于淋病的治疗。自 90 年代出现耐药菌株以来, 耐药 NG 已广泛传播。南京地区 NG 对环丙沙星的耐药率从 1994 年的 2.89% 上升至 2002 年的 97.17%^[4]。而本次研究中 NG 对环丙沙星的耐药率已达到 100%。在短短的 10 年内耐药率上升了 30 多倍。由此可见, 曾经作为我国对淋病治疗的推荐药物的环丙沙星难以适用于临床治疗淋病。

NG 对氟喹诺酮类药物的耐药被认为与编码 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 的 *gyrA* 和 *parC* 基因上的一段核苷酸序列的改变有关, 称为喹诺酮耐药决定区 (QRDR)^[5]。以往的研究发现对氟喹诺酮敏感的菌株或者野生菌株不存在 *gyrA* 和 *parC* 基因 QRDR 的碱基突变或者仅仅是发生 *gyrA* 上的单位点突变, 发生 *gyrA* 单位点突变的菌株也比没有发生突变的菌株的 MIC 要高很多^[6]。在此次研究中没有发现对氟喹诺酮敏感的菌株, 所有的菌株都耐药, 在测序分析的 54 株中都发生了 *gyrA* 上 91-Ser→Phe 的氨基酸改变, 其中 53 株还伴随着 *gyrA* 上 95 位氨基酸的改变。同时, 发生 *gyrA* 基因突变的菌株大多伴有 1~2 个 *parC* 基因的突变, 相对于没有发生 *parC* 基因突变的菌株其 MIC 整体较高。*parC* 基因突变主要集中在 86~91 位氨基酸上的改变, 与 *gyrA* 基因突变相结合, 我们共发现耐氟喹诺酮类药物 NG 株的 18 种突变组合类型 (不包括同义突变)。以往的研究发现在 *gyrA* 有 12 种突变, *parC* 有 16 种突变类型^[6-11]。在此次研究中发现了 *gyrA* 基因一些新的突变, 导致 92-Ala→Pro、102-Gln→His 和 *parC* 基因中 29-Ala→Pro 的氨基酸改变, 这些目前尚未见报道。由于这 3 种新的突

变类型菌株各只有 1 株, 所以无法进一步分析其突变相对于其他突变类型对 MIC 的影响大小, 在今后有必要进一步加大样本量来发现和分析这些新的突变对 NG 耐喹诺酮类药物 MIC 的影响。同时文献报道的有些改变我们也未发现, 推测耐药菌株的改变可能存在一定的地域差异。

在本次研究中我们进一步分析了 *parC* 基因突变的数量与 MIC 的关系, 在 *gyrA* 基因突变数量和位置相同情况下 *parC* 基因突变数越多其 MIC 也越高, 这也进一步说明了 *parC* 基因的突变及突变数目与 NG 对喹诺酮类药物高水平的耐药有关。

研究还显示具有相同突变类型的菌株其 MIC 却相差较大, 同时具有相同 MIC 的菌株其突变类型也不尽一致, 可见, 淋球菌对氟喹诺酮类药物耐药可能还存在其他机制的共同参与, 这些均有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- Ng LK, Sawatzky P, Martin IE, et al. Characterization of ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Canada. *Sex Transm Dis*, 2002, 29: 780-788.
- Masatoshi Tanaka, Hiroshi Nakayama, Takashi Notomi, et al. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Japan, 1993 - 2002: continuous increasing of ciprofloxacin-resistant isolates. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24(s): s15-s22.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility testing: Twelfth Informational Supplement M100-S12. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- 苏晓红, 戴秀芹, 孙厚华, 等. 1999 - 2002 年南京地区淋球菌分离株抗生素敏感性监测. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37: 262-264.
- Belland RJ, Morrison SG, Ison C, et al. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of GyrA and ParC in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol Microbiol*, 1994, 14: 371-380.
- Shultz TR, Tapsall JW, White PA, et al. Correlation of in vitro susceptibilities to newer quinolones of naturally occurring quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains with changes in GyrA and ParC. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 734-738.
- 邹明祥, 夏忠弟, 陈淑贞, 等. 淋球菌 *gyrA* 和 *parC* 基因突变与氟喹诺酮类药物关系的研究. *中华皮肤科杂志*, 2002, 35: 199-202.
- Chaudhry U, Ray K, Bala M, et al. Mutation patterns in *gyrA* and *parC* genes of ciprofloxacin resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae* from India. *Sex Transm Infect*, 2002, 78: 440-444.
- Su X, Lind I. Molecular basis of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Denmark from 1995 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 117-123.
- Yoo J, Yoo C, Cho Y, et al. Antimicrobial resistance patterns (1999 - 2002) and characterization of ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. *Sex Transm Dis*, 2004, 31: 305-310.
- 叶萍, 王晓川, 吴志华. 淋球菌氟喹诺酮耐药性的分子机制探讨. *中国麻风皮肤病杂志*, 2004, 20: 424-426.

(收稿日期 2006-01-12)

(本文编辑: 尹廉)