

阿奇霉素耐药淋球菌菌株的耐药机制分析和分子流行病学特征

兰倩¹, 蒋法兴¹, 王娜¹, 裘越²

摘要 目的 探讨阿奇霉素耐药淋球菌菌株的分子流行病学特征, 分析耐阿奇霉素淋球菌的耐药机制。方法 对 36 株耐阿奇霉素淋球菌 [最小抑菌浓度 (MIC) ≥ 1 mg/L] 的核糖体 23SrRNA、mtrR 基因及核糖体蛋白 L4/L22 基因进行 PCR 扩增测序分析, 寻找可能的突变位点, 比较耐药基因突变在中度耐药组 (MIC 1 ~ 64 mg/L) 和高度耐药组 (MIC ≥ 256 mg/L) 间的差异。采用 NG-MAST 对基因序列进行分型, 获得阿奇霉素耐药菌株的基因型别及分布特征。结果 高度耐药淋球菌菌株核糖体 23SrRNA 的 4 个等位基因均有 A2143G 的突变, 中度耐药菌株中有 3 株 (8 mg/L \leq MIC \leq 32 mg/L) 核糖体 23SrRNA 4 个等位基因为 C2599T 突变。36 株阿奇霉素耐药菌株中鉴定出 28 个不同的序列型别 (ST), 其中 16 个为新发现的 ST, 2 个未分型。结论 淋球菌核糖体 23SrRNA 基因不同位点突变可能与阿奇霉素不同程度的耐药相关, A2143G 突变可能导致高度耐药, C2599T 可能与中度耐药有关, mtrR 基因 G45D 的突变可能参与阿奇霉素耐药。通过 NG-MAST 分型显示阿奇霉素耐药菌株的基因型具有多样性, 且覆盖范围也较为广泛; 经过系统进化树推断 por581 基因型有较大可能影响阿奇霉素高度耐药。

关键词 淋病奈瑟球菌; 23SrRNA; mtrR; 点突变; 阿奇霉素; 抗药性

中图分类号 R 759.2; R 378.1+6; R 978.1+2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)03-0360-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.012

淋病是由淋球菌引起的全球流行率第 2 位的性传播疾病, 每年全球约有 1.06 亿的新发病例, 2015 年在我国位居甲乙类法定传染病报告发病数的第 5 位^[1]。继淋球菌对青霉素、四环素和喹诺酮类药物的高度和普遍耐药, 广谱头孢菌素低敏/耐药的淋球菌在全球多个地区的出现^[2-3], 联合用药成为治疗淋病的最佳方法, 而其却受到阿奇霉素耐药 (尤其是高度耐药) 的威胁。研究^[4-5]表明淋球菌对阿奇

霉素的耐药分子机制主要涉及 23SrRNA、mtrR (启动区和编码区) 等基因突变。该研究对采集的 36 株耐阿奇霉素淋球菌 [最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) ≥ 1 mg/L] 的耐药相关基因 (23SrRNA 基因、mtrR 基因等) 进行 PCR 扩增、测序分析和 NG-MAST 分型, 并针对菌株的基因型分布特征进行了一系列分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 试验菌株来自 2014 年 ~ 2015 年安徽医科大学附属省立医院及安徽医科大学第一附属医院性病门诊有症状的淋球菌患者中分离出的 126 株淋球菌菌株, 已做过抗生素敏感性测定。所有菌株经过革兰染色显微镜镜检、氧化酶实验、糖发酵实验鉴定为淋球菌后, 保存于 20% 甘油肉汤, 置 -80 °C 冰箱备用。

1.1.2 培养基与培养条件 ① 固体培养基: 淋球菌分离培养基购自珠海银科医学工程公司。后续的琼脂稀释法 MIC 实验使用的是 GC 巧克力培养基 (GC 琼脂基础 3.7 g + 血红蛋白粉 1.1 g) 溶于 100 ml 体积双蒸水中, 121 °C 高压灭菌 15 min 后冷却至 50 °C, 加入增菌剂 Vitox Supplement 2 ml, 4 °C 保存, 1 周内用完。淋球菌均在 37 °C、5% CO₂ 环境下培养 18 ~ 24 h。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感性实验 实验药物均购于美国 Sigma 公司。淋球菌的药物敏感性试验采用琼脂稀释法, 以倍比稀释法制备含不同浓度大观霉素的琼脂培养基 (0.06 ~ 8 192 mg/L)。以淋球菌 ATCC49226 和 WHO 标准菌株 WHO G、K、M、O、P 作为药敏质控菌株, 以美国临床和实验室标准协会推荐的标准判断结果, 即: MIC ≤ 0.25 为敏感, MIC = 0.5 中度敏感, MIC 1 ~ 64 mg/L 为中度耐药, MIC ≥ 256 mg/L 为高度耐药。

1.2.2 细菌 DNA 的提取 取复苏后的淋球菌一环加入 200 μ l DNA Extraction Kit 中, 金属浴 65 °C 15

2016-12-26 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 090413143)

作者单位: ¹安徽医科大学附属省立医院皮肤科, 合肥 230001

²安徽医科大学第一附属医院性病实验室, 合肥 230022

作者简介: 兰倩, 女, 硕士研究生;

蒋法兴, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: jiangfxing@126.com

表1 耐药相关基因的引物序列

基因名称	引物	序列(5'-3')
23SrRNA(外引物)	NG23S1F	GGCTATGAAGGCGGCGA
	NG23S2F	TTCAGATGAGTAATGTACACC
	NG23S3F	CAATCCGCAAGTCTGCCGA
	NG23S4F	CTCTCCGATCCCGAACTCG
23SrRNA(内引物)	NG23SR	GAAGATGTGCAAGCATCGGA
23SrRNA(巢式PCR)	NG23s1905-F	ACGGTCTAAGGTAGCGA
	NG23s2769-R	TCTCATCTTCAGCCGAGTT
mtrR	mtrA-F	GCCAATCAACAGGCATTCTTA
	mtrA-R	GTTGGAACAACGCGTCAAAC
rplD	NGL4-F	CAGCGATGTTGTAGTTTCGT
	NGL4-R	ACTCAAGTAATCTTGCCGC
rplV	NGL22-F	TCAGCGACAATATGGTTGGT
	NGL22-R	AGCCCACTCTTTAGTTACC

rplD: 编码核糖体蛋白 L4; rplV: 编码核糖体蛋白 L22

min, 95 °C 5 min, 11 000 r/min 离心 3 min, 取上清液即为基因组 DNA。提取后的 DNA 放于 -20 °C 储存备用。

1.2.3 PCR 扩增

1.2.3.1 NG-MAST 分型相关基因的扩增 条件(参照 NG-MAST 网站: www.ng-mast.net): 95 °C 变性 4 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C (tbpB 基因为 69 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 25 次; 72 °C 延伸 10 min。依据 NG-MAST 网站, 合成 PCR 引物: Por-F: 5'-CAA GAA GAC CTC GGC AA-3'; Por-R: 5'-CCG ACA ACC ACT TGG-3'; TbpB-F: 5'-CGT TGT CGG CAG CGC GAA AAC-3'; TbpB-R: 5'-TTC ATC GGT GCG CTC GCC TTG-3'。

1.2.3.2 耐药相关基因的扩增引物序列 具体序列见表 1。

1.2.3.3 巢式 PCR 扩增 23SrRNA 基因 第一轮 PCR 反应: 分别以 23S1F1 + 23SR、23S2F1 + 23SR、23S3F1 + 23SR、23S4F1 + 23SR 为正向和反向引物, 扩增 23SrRNA 的 4 个等位基因。PCR 反应总体系 50 μl, 其中 rTaq 酶 0.25 μl, dNTP(2.5 mmol/L), 模板 DNA 1 μl, 引物 1 μl(0.4 mmol/L)。反应条件: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1.5 min, 72 °C 延伸 2.5 min 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。第二轮巢式 PCR: 吸取第一轮产物 0.5 μl 作为第二轮 PCR 反应模板, 反应条件为: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min 共 35 个循环, 最后 4 °C 至永久。

1.2.3.4 mtrR、rplD(L4) 及 rplV(L22) 基因扩增 反应体系: 5 μl 10 × Buffer, dNTP、引物-F、引物-R、DNA 模板均为 1 μl, 41 μl DEPC 水, 0.25 μl Taq

DNA 聚合酶。反应条件: 94 °C 预变性 1 s, 94 °C 变性 30 s, mtrR(51 °C)、rplD(65 °C)、rplV(55 °C) 分别退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 34 个循环, 最后 4 °C 至永久。

1.2.3.5 NG-MAST 分型与系统发育树的创建 首先对所有 2014 年~2015 年在合肥收集的阿奇耐药菌株进行 NG-MAST 分型, 根据分型结果使用 MEGA5.1 创建系统发育树, 进行阿奇霉素耐药表型与基因型间的关联分析。

2 结果

2.1 DNA 测序分析结果

2.1.1 23SrRNA 突变情况 在 36 株菌株中, 高度耐药菌株中 100% (13/13) 出现 23SrRNA 基因 4 个等位基因的 A2143G 突变, 且不出现在中度耐药菌株中 ($\chi^2 = 36.00, P < 0.001$)。17.4% (4/23) 阿奇中度耐药的菌株 23SrRNA 的 4 个等位基因的突变为 C2599T, 该突变并没有在高度耐药菌株中发生 ($\chi^2 = 2.50, P = 0.150$), 见图 1。所有菌株未检测出 rplD 和 rplV 基因突变。

2.1.2 mtrR 突变情况 高度耐药组中 mtrR 启动子区 13 bp 反向重复序列中 A 缺失突变的比例是 92.3% (12/13), 而中度耐药组中此突变的比例是 91.3% (21/23), 两组间差异无统计学意义。mtrR 编码区出现 G45D 替换在高度耐药组和中度耐药组的比例分别为 100% (13/13) 和 52.2% (12/23), 两组间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.953, P = 0.002$); H105Y 突变在高度耐药组和中度耐药组的比例为 0, 两组间差异无统计学意义。编码区出现 A39T 突变在高度耐药组和中度耐药组的比例为 0, 两组间

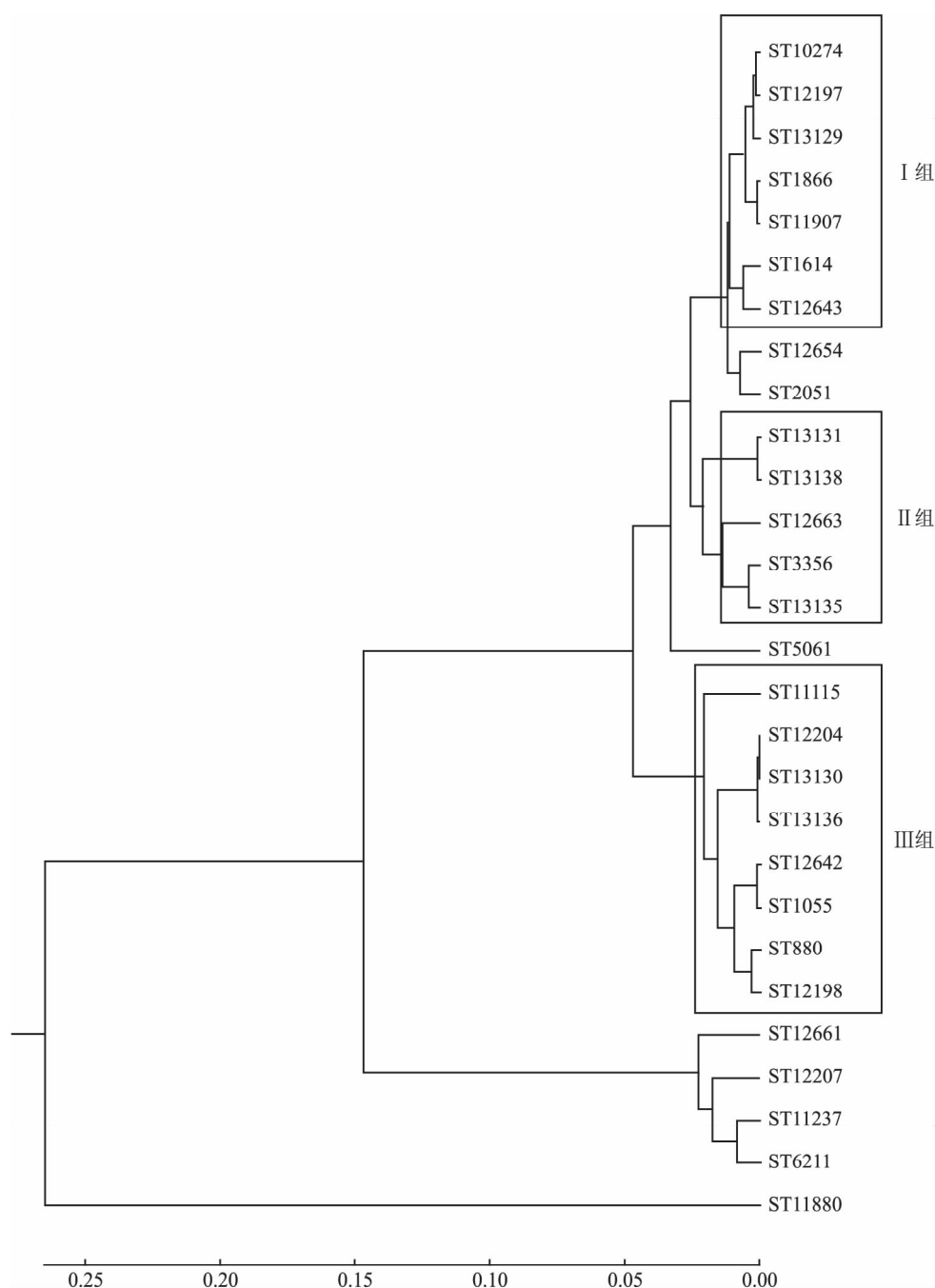


图2 系统发育树

突变,而仅有 50% 阿奇霉素中低度耐药菌株存在 G45D 突变,提示该突变可能在阿奇霉素高度耐药中发挥较重要的作用。

本研究通过对阿奇霉素耐药菌株进行 NG-MAST 分型显示,36 株阿奇霉素耐药菌株共具有 28 个不同的 ST 型别,其中 16 个为新发现的型别。另外针对 28 种不同 ST 型别的系统发育树显示,合肥地区阿奇霉素耐药菌株的基因型不仅具有多样性,其基因覆盖范围也较为广泛,说明该地区人群流动性较大。另外本研究显示,在阿奇霉素耐药菌株中比较

常见的 *tbpB* 基因型有 *tbpB33*、*tbpB566* 和 *tbpB4*,提示这 3 种基因型可能与阿奇霉素耐药性存在一定联系。值得注意的是,本研究显示多个阿奇霉素耐药菌株有相同的 *por581*,其中包括全国流行较广的 ST1866 菌株,可以推断 *por581* 基因型有较大可能影响阿奇霉素高度耐药。

目前国内阿奇霉素耐药情况相当严重,且高度阿奇霉素耐药菌株占有较大比例,因此不再提倡把阿奇霉素作为治疗淋病及其他一些传染病的一线药物。但是对于一些头孢、青霉素过敏的患者,阿奇霉

素是首选药物之一。所以应该加强阿奇霉素耐药的检测, 以及对其耐药机制研究, 防止阿奇霉素普遍耐药的出现。

参考文献

- [1] 国家卫生计生委疾病预防控制局. 2015 年全国法定传染病疫情概况 [R/OL]. [2016-02-18]. <http://www.nhfc.gov.cn/jkj/s3578/201602/b9217ba14e17452aad9e45a5bccc6b65>.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cephalosporin susceptibility among *Neisseria gonorrhoeae* isolates: United States, 2000-2010 [J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2011, 60(26): 873-7.
- [3] Martin I, Sawatzky P, Allen V, et al. Emergence and characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone and cefixime in Canada: 2001-2010 [J]. *Sex Transm Dis*, 2012, 39(4): 316-23.
- [4] Allen V G, Farrell D J, Rebbapragada A, et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(2): 703-12.
- [5] Allen V G, Seah C, Martin I, et al. Azithromycin resistance is co-evolving with reduced susceptibility to cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(5): 2528-34.
- [6] Ng L K, Martin I, Liu G, et al. Mutation in 23SrRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(9): 3020-5.
- [7] Belkacem A, Jacquier H, Goubard A, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013-14 [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(9): 2471-8.
- [8] Demczuk W, Martin I, Peterson S, et al. Genomic epidemiology and molecular resistance mechanisms of azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Canada from 1997 to 2014 [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(5): 1304-13.
- [9] Takayama Y, Nakayama S, Shimuta K, et al. Characterization of azithromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011 [J]. *J Infect Chemother*, 2014, 20(5): 339-41.
- [10] Jacobsson S, Golparian D, Cole M, et al. WGS analysis and molecular resistance mechanisms of azithromycin-resistant (MIC > 2 mg/L) *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Europe from 2009 to 2014 [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(11): 3109-16.
- [11] Gregory S T, Dahlberg A E. Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23S ribosomal RNA [J]. *Mol Biol*, 1999, 289(4): 827-34.
- [12] Unemo M, Shafer W M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2014, 27(3): 587-613.
- [13] Zaranonelli L, Borthagaray G, Lee E H, et al. Decreased susceptibility to azithromycin and erythromycin mediated by a novel mtr (R) promoter mutation in *Neisseria gonorrhoeae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47(5): 651-4.

Analysis of drug resistance mechanism and molecular epidemiological characteristics of azithromycin resistant strains

Lan Qian, Jiang Faxing, Wang Na, et al

(Dept of Dermatology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate molecular epidemiological characteristics of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains, and analyze the resistance mechanism of azithromycin-resistant strains. **Methods** In order to detect mutated alleles and compare high-level azithromycin resistance group (MIC \geq 256 mg/L) with moderate azithromycin resistance group (1 mg/L \leq MIC \leq 64 mg/L), PCR was performed to amplify the 23SrRNA and mtrR genes of all the 36 azithromycin-resistant strains. Sequence types (STs) and distribution characteristics of the strains were obtained by the method of NG-MAST. **Results** All the isolates with high-level azithromycin resistance contained mutation A2143G in all 4 alleles of 23SrRNA, and three of moderately resistant isolates (8 mg/L \leq MIC \leq 32 mg/L) contained mutation C2599T in 4 alleles of 23SrRNA. Among 36 azithromycin-resistant isolates, 28 STs were identified by NG-MAST, of which 16 STs were novel and 2 were nontypeable. **Conclusion** Different mutated alleles of 23SrRNA gene in *Neisseria gonorrhoeae* may be related with different levels of azithromycin resistance. A2143G mutation may lead to high-level resistance, C2599T mutation may be related with moderate resistance and G45D mutation may contribute to azithromycin resistance. Moreover, genotypes of azithromycin-resistant isolates in this area have high diversity and wide range, indicating that por581 is likely associated with high resistance to azithromycin via phylogenetic analysis.

Key words *Neisseria gonorrhoeae*; 23SrRNA; mtrR; point mutation; azithromycin; drug resistance