

· 论 著 ·

# 生殖道支原体对米诺环素的耐药性及相关耐药基因分析

谢明水, 刘 杨<sup>△</sup>

(湖北医药学院附属随州医院检验科 441300)

**摘要:**目的 探讨生殖道支原体对米诺环素的耐受性及其相关耐药基因携带情况。方法 分别从 1 076 例生殖道感染者的生殖道分泌物中分离得到生殖道支原体,通过支原体鉴定药敏试剂盒鉴定支原体及其对米诺环素的敏感性,然后采用耐药基因检测试剂盒检测各菌株四环素耐药基因 TetM 的阳性率。结果 共分离得到 387 株支原体阳性菌株,其中解脲支原体(UU)占 71.06%,人型支原体(MH)占 5.43%,UU+MH 占 23.51%;随着米诺环素浓度增大,菌株耐受性逐渐降低,当米诺环素浓度为 1.000 0 mg/L 时抑菌效果最佳;TetM 基因在中介菌株检出率显著高于敏感菌株,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );TetM 基因在耐药菌株中的阳性检出率最高,显著高于中介菌株、敏感菌株,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 生殖道支原体对米诺环素米诺环素有一定耐受性,TetM 基因与菌株米诺环素耐受性密切相关,可以作为判断米诺环素耐药性的重要参考依据。

**关键词:**人型支原体; 解脲支原体; 米诺环素; TetM

**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2017.15.034 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)15-2264-03

## Resistance of genital Mycoplasma to minocycline and the related resistant gene

XIE Mingshui, LIU Yang<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Suizhou Hospital Affiliated of Hubei University of Medicine, Suizhou, Hubei 441300, China)

**Abstract:**Objective To explore the resistance of genital Mycoplasma to minocycline and the distribution of related resistant gene. **Methods** Genital Mycoplasma was isolated from 1 076 genital tract infections. Imm-Mark Myco-Test Kit was used to identify Mycoplasma and their sensibilities to tetracyclines were detected. Then positive rate of Mycoplasma with minocycline-resistance gene TetM through Kit was investigated. **Results** A total of 387 strains of Mycoplasma positive strains were isolated, UU strains were accounted for 71.06%, MH strains were accounted for 5.43%, UU+MH strains were accounted for 23.51%. With the increase of the concentration of minocycline, strain tolerance was decreased gradually, when minocycline concentration was 1.000 0 mg/L, the antibacterial effect was the best. The detection rate of TetM gene in intermediate strains was significantly higher than that of the susceptible strain( $P < 0.05$ ). The positive detection rate of TetM in the drug resistant strains was significantly higher than that of the intermediate strains and the sensitive strains( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Genital Mycoplasma strains have shown varying degrees of tetracycline minocycline resistance. Tetracycline-resistance of strains is closely related to TetM gene, which could be an important reference to assess the tetracycline resistance of Mycoplasma infections.

**Key words:** Mycoplasma hominis; Ureaplasma urealyticum; tetracycline; TetM

支原体是目前已知最小的原核微生物,介于细菌和病毒之间。对人类有致病作用的支原体有 4 种,其中人型支原体(MH)和解脲支原体(UU)是人类生殖道中常见的病原体。临床研究表明<sup>[1-3]</sup>,UU 和 MH 不仅能够引起慢性前列腺炎、阴道炎、宫颈炎等泌尿生殖系统疾病,甚至还有可能导致流产、死胎、男性不育和女性不孕等严重后果。数据显示<sup>[4]</sup>,在西方国家,生殖道支原体感染率位居传播疾病之首,在我国的发病率逐年上升。米诺环素是目前临床治疗支原体感染的首选药物,由于广谱抗菌药物的滥用和不规则治疗使得支原体对米诺环素的敏感性不断改变。Martinez 等<sup>[5]</sup>研究发现,TetM 基因与生殖道支原体对米诺环素的耐药性密切相关。为进一步了解生殖道支原体对米诺环素的耐受性及其耐药基因携带情况,本研究从 1 076 例生殖道感染患者的生殖道分泌物中分离出 387 株支原体阳性菌株,并对其四环素类药物(以米诺环素为例)耐受性和相关耐药基因 TetM 携带情况进行了分析,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2013 年 3 月至 2016 年 3 月本院妇产科和泌尿外科接收的 1 076 例生殖道感染患者的生殖道分泌物

标本,患者年龄 20~64 岁,平均(36.07±6.19)岁。所有患者均为初次就诊,其中男 387 例,女 689 例。患者就诊时多有不洁性行为史和不同程度的临床症状,男性主要表现为尿痛、尿道灼热痒痒或尿道有白色黏液分泌物等,女性主要表现为白带增多、宫颈糜烂或外阴痒痒等,少数患者无显著临床症状。排除采集标本前 2 周内使用抗菌药物和有淋球菌感染的患者。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 男性患者取材前 1 h 内禁止排尿,用无菌棉球擦拭生殖道口,然后用含肉汤的无菌棉拭子插入生殖道口内 2 cm 左右,轻转棉拭子 2 周并停留 20 s 后取出,置于无菌试管中送检;女性患者取材前先对外阴部进行消毒,然后用窥阴器扩开阴道,将含肉汤的专用拭子插入宫颈管内 1~2 cm 并旋转 2 周,停留 20 s 后避开阴道壁黏膜取出,置于无菌试管后立即送检。

**1.2.2 检测方法** 生殖道支原体对米诺环素的耐受性通过支原体鉴定药敏试剂盒(培养法)进行鉴定,试剂盒购自 Bio Mérieux 有限公司。将米诺环素(米诺环素购自哈药集团三精制药有限公司;批号:H10940059;每粒 50 mg)分为不同浓度 0.030 0、0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0、

2.000 0、4.000 0 mg/L,严格按照操作说明书将待检棉拭子接种于尿素-精氨酸肉汤培养基中,混匀后通过移液器以每孔 55  $\mu$ L 的量加入反应杯孔中并覆盖无菌矿物油 2~3 滴,盖好试纸条并置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h(UU)和 48 h(MH)。菌株 TetM 基因的检测通过 TetM 耐药基因检测试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)进行鉴定,具体过程如下:(1)扩增模板的制备。取 200  $\mu$ L 培养物,高速离心 5 min 后弃上清;分别加入裂解液混匀,55  $^{\circ}$ C 水浴 1 h 后 95  $^{\circ}$ C 水浴 5 min;12 000 r/min,30 s 离心后取上清即为扩增模板。(2)PCR 扩增。以 5'-TTA TCA ACG GTT TAT CAG G-3'为正向引物,5'-CGT ATA TAT GCA AGA CG-3'为反向引物,取 2  $\mu$ L 模板在 50  $\mu$ L 体系中按照表 1 中的程序进行扩增。(3)电泳检测。取 5  $\mu$ L 扩增产物与 1  $\mu$ L Loading buffer 混匀后在加有 DNA 染料溴化乙锭(EB)的琼脂糖凝胶(2%)中与阴性对照和阳性对照同时进行电泳,并通过凝胶成像系统鉴定。

表 1 耐药基因 TetM PCR 程序

过程	温度( $^{\circ}$ C)	时间	循环
预变性	94	5 min	1
变性	94	1 min	35
退火	58	30 s	
延伸	72	1 min	
终延伸	72	10 min	1

表 2 不同米诺环素浓度下存活菌株数[n(%)]

组别	n	米诺环素浓度(mg/L)							
		0.030 0	0.062 5	0.125 0	0.250 0	0.500 0	1.000 0	2.000 0	4.000 0
UU	275	156(56.73)	68(24.73)	32(11.64)	14(5.09)	4(1.45)	1(0.36)	0(0.00)	0(0.00)
MH	21	10(47.62)*	6(28.57)*	3(14.29)*	1(4.76)*	1(4.76)*	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
UU+MH	91	48(52.75)	22(24.17)	10(10.99)	7(7.69)	4(4.40)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)

注:与 UU 组比较,\*  $P < 0.05$

**2.3 耐药基因 TetM 的检测结果** 本研究共检出敏感菌株、中介菌株、耐药菌株分别为 283、69 和 35 株。TetM 基因在中介菌株中检出 64 株,检出率为 66.67%;显著高于敏感菌株 [22.97%(65/283)],差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在耐药菌株中的阳性检出率 [82.86%(29/35)]显著高于中介菌株、敏感菌株,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

目前,从人体中分离的支原体中已发现 7 种对人体有致病作用,其中 MH 和 UU 是引起泌尿生殖道感染的主要类型<sup>[6]</sup>。研究表明<sup>[7-8]</sup>,MH 和 UU 感染可引起多种泌尿生殖道相关疾病,且感染率也在不断上升。本研究结果显示,2013 年 3 月至 2016 年 3 月在本院诊治的 1 076 例生殖道感染患者中有 387 例支原体阳性,其中 275 例为 UU 阳性,占支原体阳性总数的比例较高,与大多数报道一致<sup>[7-9]</sup>。支原体无细胞壁的独特结构,使得其对通过作用于细胞壁抗菌的头孢菌素类和青霉素类等药物有天然抗性,因此临床中常用四环素类抗菌药物进行治疗<sup>[10]</sup>。米诺环素主要通过与其核糖体 30 s 亚基结合,抑制核蛋白体与氨酰 tRNA 的结合,从而阻断蛋白合成达到抗菌效果。由于临床上支原体易反复感染,加上部分患者治疗不规范和抗菌药物滥用等现象,使得 MH 和 UU 对常用抗菌药物均产生了不同程度的耐药性<sup>[11-12]</sup>。本次临床研究中,UU、MH 和

**1.3 判定标准** 支原体鉴定:当鉴定孔中培养液颜色由亮黄色转为红色时,判定该孔为支原体阳性,颜色没有变化的为支原体阴性。药敏试验鉴定:鉴定孔变色而两个浓度的药物孔均不变色时,认为该支原体对米诺环素敏感;鉴定孔和两个药物孔均变红时,认为该支原体耐药;鉴定孔和低浓度的药物孔变红而高浓度的药物孔不变色,表示中介。支原体耐药率(%)=(中介菌株数+耐药菌株数)/菌株总数 $\times 100\%$ 。通过 DNA Marker 比对 TetM 基因的分子量(377 bp)并与阳性对照和阴性对照进行对比。

**1.4 统计学处理** 采用统计学软件 SPSS22.0 对数据进行分析,计数资料采用百分数表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 支原体检测结果** 本次研究的 1 076 例患者中共分离得到 387 株支原体阳性菌株,阳性率为 35.97%。支原体阳性菌株中,UU 阳性 275 株,占总阳性菌株的 71.06%;MH 阳性菌株 21 株,占总阳性菌株的 5.43%;UU+MH 阳性菌株 91 株,占阳性菌株总数的 23.51%。说明 UU 阳性菌株最多,其次为 UU+MH 混合菌株,MH 阳性菌株数目显著少于 UU 阳性菌株。

**2.2 阳性菌株耐受试验结果** 随着米诺环素浓度增大,菌株耐受性逐渐降低,当米诺环素浓度为 1.000 0 mg/L 时抑菌效果最佳。见表 2。

UU+MH 3 种类型均对米诺环素产生了一定的耐受性,且 UU 对米诺环素的耐受性高于 MH,这可能与临床中 UU 感染率较高有关。

国内外研究显示<sup>[13-15]</sup>,TetM 基因与支原体的四环素耐受性显著相关,该基因可以编码合成核蛋白保护蛋白,与核蛋白体相互作用,从而使蛋白合成不受米诺环素的影响。本次研究结果显示,82.86%的耐药菌株和近半数中介菌株均检测到 TetM 基因,说明 TetM 与菌株的米诺环素耐药性密切相关。但敏感菌株中也有 3 株菌株显示 TetM 阳性,而 35 株中介菌株未检测到 TetM 基因存在,这一结果表明,TetM 基因并不是米诺环素耐药菌株特有的基因,可能存在 TetM 基因以外的其他机制与其一起作用使菌株对米诺环素产生耐受性。

综上所述,在生殖道支原体感染中,UU 感染率和四环素耐药性均显著高于 MH 感染,在应用米诺环素时对 UU 感染患者进行治疗时要适当加大药量。TetM 基因与支原体米诺环素耐受性密切相关,可在临床中作为判断患者米诺环素耐受性的参考依据。

### 参考文献

[1] 潘伟毅,陈宇.阴道分泌物支原体检测及耐药性分析[J].中国性科学,2015,24(1):61-63. (下转第 2324 页)

- [2] 梁乃超. VEGF 和 MMP-9 检测对非小细胞肺癌患者疗效和预后评估的价值[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(17): 2529-2530.
- [3] 李超, 陈力, 沈学远. Hsp70 与肿瘤转移相关蛋白 MMP-9、VEGF、E-cadherin 和 CD44v6 对非小细胞肺癌转移的诊断价值分析[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(15): 30-34.
- [4] 陈岳青, 涂建仁, 魏敏丽, 等. 循环血浆 dsDNA 在诊断非小细胞肺癌中的价值[J]. 广东医学, 2014, 35(15): 2353-2355.
- [5] Arbour C, Riely J. Diagnosis and treatment of anaplastic lymphoma Kinase-Positive Non-Small cell lung cancer [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2017, 31(1): 101-111.
- [6] 王丹平, 束军, 沈继龙, 等. PEDF 与 VEGF 检测在非小细胞肺癌诊断中的应用探讨[J]. 医学与哲学, 2015, 36(18): 70-72.
- [7] 黄冬云, 许文景, 周锐, 等. 血清 CYFRA21-1、NSE 和 CEA 在非小细胞肺癌辅助诊断中的应用[J]. 中国老年学, 2016, 36(6): 1378-1380.
- [8] 许浩然, 吕艳超, 韩双双, 等. 非小细胞肺癌组织中 p-mTOR、p70s6k 的表达变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2016, 56(11): 11-13.
- [9] Samson P, Crabtree T, Broderick S, et al. Quality measures in clinical stage I non-small cell lung cancer: improved performance is associated with improved survival [J]. Ann Thorac Surg, 2017, 103(1): 303-311.
- [10] 陈巧巧, 孙一奎, 王峰. 联合检测外周血游离 LUNXmRNA、SCC 和  $\beta$ 2-MG 对非小细胞肺癌的早期诊断价值[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(5): 720-721.
- [11] 努尔兰·吐尔逊, 周永, 韩文广, 等. MSCT 联合肿瘤标志物检查对中央型小细胞肺癌及非小细胞肺癌的鉴别诊断价值[J]. 临床放射学杂志, 2016, 35(5): 711-716.
- [12] Mizuno K, Mataka H, Sfki N, et al. MicroRNAs in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Hum Genet, 2017, 62(1): 57-65.
- [13] 夏申宏, 徐爱晖. 细胞质胸苷激酶-1 联合癌胚抗原、cyfra21-1 检测对非小细胞肺癌的诊断价值[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(17): 4254-4255.
- [14] 王雨涵, 王洁, 张洪为, 等. 血清 miR-141 和 miR-143 联合检测非小细胞性肺癌的诊断价值[J]. 重庆医学, 2015(7): 904-906.
- [15] 丁明, 仇铁峰, 李献文, 等. hTERT、Skp2、TTF-1 mRNA 联合检测在非小细胞型肺癌早期诊断中的意义[J]. 广东医学, 2015, 36(10): 1523-1525.

(收稿日期: 2017-02-04 修回日期: 2017-04-13)

(上接第 2265 页)

- [2] Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, et al. Detection of ureaplasma urealyticum in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery [J]. J Infect Dis, 2003, 187(3): 518-521.
- [3] 王琦, 张红云, 陈蔚清, 等. 继发性不孕不育女性生殖道支原体与沙眼衣原体的感染分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(10): 2348-2350.
- [4] 田军, 许焱. 泌尿生殖道分泌物支原体培养与药敏分析[J]. 国际医药卫生导报, 2012, 18(3): 328-330.
- [5] Martinez A, Ovalle A, Santa-Cruz A, et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma parvum* (*Ureaplasma urealyticum* biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (*Ureaplasma urealyticum* biovar 2) from patients with adverse pregnancy outcomes and normal pregnant women [J]. Scand J Infect Dis, 2001, 33(8): 604-610.
- [6] Ito S, Tsuchiya T, Yasuda M. Prevalence of genital mycoplasmas and ureaplasmas in men younger than 40 years-of-age with acute epididymitis [J]. Int J Urol, 2012, 19(3): 234-238.
- [7] 高玉芳, 赵联营, 杨进. 解脲支原体及人型支原体培养与耐药性分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2013, 27(5): 518-519.
- [8] 陈浩宇, 郭海波, 吴晓蔓, 等. 2 744 例泌尿生殖道感染患者解脲支原体和人型支原体分布及耐药性分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(4): 415-416.
- [9] Lee JS, Kim KT, Lee HS, et al. Concordance of ureaplasma urealyticum and mycoplasma hominis in infertile couples: impact on semen parameters [J]. Urology, 2013, 81(6): 1219-1224.
- [10] Cazanave C, Manhart E, Bebear C. Mycoplasma genitalium, an emerging sexually transmitted pathogen [J]. Med Mal Infect, 2012, 42(9): 381-392.
- [11] Redelinghuys J, Eelers M, Dreyer W, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1): 171.
- [12] Zhu CT, Liu JM, Ling Y, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Chinese women with genital infectious diseases [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2012, 78(3): 406-407.
- [13] 罗芳. 武汉地区生殖道支原体对四环素类药物的耐药性分析[J]. 中外医学研究, 2013, 11(6): 69-70.
- [14] Kotrotsiou T, Tzimoula K, Exindari M, et al. Detection of the tetM resistance determinant among phenotypically sensitive *Ureaplasma* species by a novel real-time PCR method [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 81(2): 85-88.
- [15] 亓春花. 解脲支原体的 tetM 基因与四环素类药物 MIC 水平的关联性研究[J]. 泰山医学院学报, 2008, 29(2): 84-86.

(收稿日期: 2017-01-15 修回日期: 2017-03-23)