

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.22.002

淋病奈瑟菌对阿奇霉素的敏感性及 mtrR 基因突变分析*

廖娟, 林滢, 方凤, 詹文芳, 刘继来[△]

福建中医药大学附属人民医院检验科, 福建福州 350004

摘要:目的 探讨淋病奈瑟菌对阿奇霉素的敏感性及其相关耐药基因 mtrR 的突变特征。方法 收集该院 2018—2020 年检出的 43 株淋病奈瑟菌菌株, 采用琼脂稀释法检测淋病奈瑟菌对阿奇霉素的最小抑菌浓度 (MIC), 采用 PCR 和测序技术分析阿奇霉素非敏感组 (对阿奇霉素非敏感的菌株 11 株) 和阿奇霉素敏感组 (随机抽取的 10 株对阿奇霉素敏感的菌株) 淋病奈瑟菌 mtrR 基因的突变特征。结果 43 株菌株中检出对阿奇霉素非敏感的菌株共 11 株 (25.6%)。mtrR 基因启动子区域 A 碱基缺失突变及编码区突变在阿奇霉素非敏感组、阿奇霉素敏感组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但阿奇霉素非敏感组菌株在 mtrR 基因编码区可见多个位点突变。结论 临床应根据淋病奈瑟菌的药敏报告结果选择抗菌药物, mtrR 基因编码区多个位点的突变可能导致淋病奈瑟菌对阿奇霉素的耐药性升高。

关键词: 淋病奈瑟菌; 阿奇霉素; mtrR 基因; 耐药性; 突变

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)22-3221-04

Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to azithromycin and mtrR gene mutation analysis*

LIAO Juan, LIN Ying, FANG Feng, ZHAN Wenfang, LIU Jilai[△]

Department of Clinical Laboratory, Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350004, China

Abstract: **Objective** To investigate the susceptibility of *Neisseria* (N.) *gonorrhoeae* to azithromycin and the related drug-resistant mtrR gene mutation characteristics. **Methods** A total of 43 strains of *N. gonorrhoeae* isolated in this hospital during 2018—2020 were collected. The minimal inhibitory concentration (MIC) of azithromycin to *N. gonorrhoeae* was determined by the agar dilution method. The mtrR gene mutation characteristics in the azithromycin sensitive group (randomly extracted 10 strains) and azithromycin-non sensitive group (11 strains) were analyzed by PCR and sequencing technique. **Results** In 43 strains, 11 strains (25.6%) of non-sensitive to azithromycin were detected out. There was no statistically significant difference in the A base deletion mutation and coding region mutation of the mtrR promoter region between the azithromycin sensitive group and azithromycin non-sensitive group ($P > 0.05$). But the multi-site mutations in the mtrR gene coding region could be seen in the azithromycin non-sensitive group. **Conclusion** Clinic should choose antibacterial drugs according to the drug sensitivity report results of *N. gonorrhoeae*. The multi-site mutations in the mtrR gene coding region may cause the increase of resistance of *N. gonorrhoeae* to azithromycin.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*; azithromycin; mtrR gene; drug resistance; mutation

淋病奈瑟菌是性传播疾病淋病的致病菌, 其显著特点是能迅速累积不同的突变, 从而获得对抗菌药物的耐药性^[1]。自 20 世纪 30 年代中期开始使用磺胺类药物以来, 淋病奈瑟菌对于治疗淋病的大部分抗菌药物都产生了耐药性^[2]。世界卫生组织 (WHO) 推荐将头孢菌素联合阿奇霉素作为无并发症淋病的一线药物^[3], 但不断增加的耐药性给淋病的治疗带来了

巨大的挑战, 已经出现淋病奈瑟菌对阿奇霉素耐药的相关报道^[4-5]。本文通过检测淋病奈瑟菌对阿奇霉素的耐药性并对其相关耐药基因 mtrR 进行测序分析, 以了解该菌的耐药特征及耐药机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集本院 2018—2020 年临床分离的 43 株淋病奈瑟菌菌株, 质控菌株为 ATCC49226。

* 基金项目: 福建省中青年教育科研项目 (JT180220)。

作者简介: 廖娟, 女, 主管技师, 主要从事细菌耐药机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: 450599054@qq.com。

本文引用格式: 廖娟, 林滢, 方凤, 等. 淋病奈瑟菌对阿奇霉素的敏感性及 mtrR 基因突变分析 [J]. 检验医学与临床, 2021, 18(22): 3221-

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 采用琼脂稀释法检测淋病奈瑟菌对阿奇霉素的最小抑菌浓度(MIC),阿奇霉素购于上海陶素生化科技有限公司,GC 琼脂粉购于上海艾礼生物科技有限公司,无菌脱纤维羊血购于广州鸿泉生物科技有限公司。药敏试验结果判断标准参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2020 年标准^[6]。

1.2.2 mtrR 基因扩增测序 选取对阿奇霉素非敏感的菌株(阿奇霉素非敏感组,MIC>1.000 μg/mL)和随机挑选的 10 株对阿奇霉素敏感的菌株(阿奇霉素敏感组,MIC≤1.000 μg/mL)进行基因组 DNA 提取,采用天根生物有限公司的基因组提取试剂盒,提取 DNA 后经核酸蛋白检测仪确认 DNA 浓度和纯度后保存于-20 ℃冰箱备用。参考文献[7],由上海生工生物有限公司合成引物(mtrR-F: 5'-GCCAAT-CAACAGGCATTCTTA-3'; mtrR-R: 5'-GTTG-GAACAACGCGTCAAAC-3')。PCR 试剂盒购于 Promega 公司,反应体系参考试剂说明书,mtrR 基因的扩增条件:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环;然后 72 ℃延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳获取 PCR 产物后,送至上海生工生物有限公司进行测序。

1.3 统计学处理 采用 Bioedit 软件对测序结果进行分析,利用 ORF Finder 进行阅读框架的翻译;采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

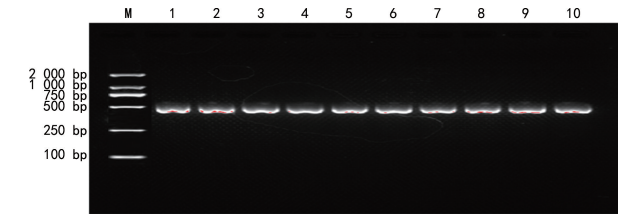
2 结 果

2.1 药敏试验结果 43 株菌株中共检出对阿奇霉素非敏感的菌株 11 株,对阿奇霉素敏感的菌株 32 株,阿奇霉素的非敏感率为 25.6%(11/43),其 MIC 结果见表 1。

2.2 mtrR 基因的检出情况及突变特点 选择的 21 株菌株(11 株对阿奇霉素非敏感,10 株对阿奇霉素敏感)均扩增出 mtrR 基因,部分标本琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。其中阿奇霉素非敏感组在 mtrR 启动子区 13 bp 反向重复序列中 A 碱基缺失突变的比例为 45.5%(5/11),而阿奇霉素敏感组 A 碱基缺失突变的比例为 70.0%(7/10),两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。阿奇霉素非敏感组在 mtrR 编码区发生突变的比例为 54.5%(6/11,分别为菌株 18010080、18011026、18015369、20014066、20018372、20019431)。阿奇霉素敏感组在 mtrR 基因编码区发生突变的比例为 50.0%(5/10,分别为菌株 18015432、19003706、19015308、20006226、20007603),两组之间差异无统计学意义($P>0.05$),但可见阿奇霉素非敏感组在 mtrR 基因编码区存在多个位点的突变。见表 2。

表 1 淋病奈瑟菌对阿奇霉素的 MIC 结果

MIC(μg/mL)	菌株 (n)	占比 (%)	MIC(μg/mL)	菌株 (n)	占比 (%)
≤0.016	10	23.26	1.000	5	11.63
0.031	1	2.33	2.000	2	4.65
0.062	2	4.65	4.000	2	4.65
0.125	2	4.65	8.000	6	13.95
0.250	7	16.28	16.000	0	0.00
0.500	5	11.63	64.000	1	2.33



注:M 为标志物;1~10 分别为菌株 18006276、18009808、18010080、18011026、18015369、18015432、19003706、19008415、19012656、19014501。

图 1 部分标本 mtrR 基因琼脂糖凝胶电泳图

表 2 mtrR 基因突变情况

组别	n	菌株编号	MIC(μg/mL)	mtrR 基因启动子区	mtrR 基因编码区
阿奇霉素非敏感组	11	18009808	2.000	A 缺失	WT
		18010080	8.000	WT	G45D
		18011026	8.000	WT	T4P、A39T、M1del/R2E
		18015369	4.000	WT	A39T
		19008415	8.000	A 缺失	WT
		19012656	8.000	A 缺失	WT
		19014501	4.000	A 缺失	WT
		20006205	2.000	A 缺失	WT
		20014066	8.000	WT	M1del/R2E、A39T
		20018372	8.000	WT	M1del/R2E、T4P
		20019431	64.000	WT	A39D

续表 2 mtrR 基因突变情况

组别	<i>n</i>	菌株编号	MIC(μ g/mL)	mtrR 基因启动子区	mtrR 基因编码区
阿奇霉素敏感组	10	18006276	≤0.016	A 缺失	WT
		18015432	≤0.016	A 缺失	G45D
		19003706	0.500	WT	A40D
		19015308	≤0.016	WT	G45D
		19020201	1.000	A 缺失	WT
		20006226	0.500	A 缺失	G45D
		20007603	0.125	WT	A39D
		20009325	0.125	A 缺失	WT
		20012458	≤0.016	A 缺失	WT
		20018847	0.250	A 缺失	WT

注:WT 表示野生型;G45D 表示 mtrR 编码区第 45 位氨基酸发生由 G 到 D 的替换,T4P、A40D、A39D、A39T 等类似;M1del/R2E 表示 mtrR 编码区第 1 位氨基酸 M 缺失并且第 2 位氨基酸发生由 R 到 E 的替换。

3 讨 论

淋病是由淋病奈瑟菌引起的一类性传播疾病,男性的临床表现为尿道炎,女性则表现为宫颈炎,严重者可导致盆腔炎、不孕症及异位妊娠等不良后果。同时,淋病奈瑟菌感染还可能增强人类免疫缺陷病毒(HIV)的感染和传播^[8]。2014 年欧洲疾病预防控制中心的报告显示,在 2013—2014 年淋病奈瑟菌的感染率增长了 25%^[1],由于目前还没有针对淋病的疫苗,对淋病的控制主要依赖于流行病学监测和抗菌药物的使用^[9]。为提高治疗效果,许多国家推荐采用头孢曲松联合阿奇霉素作为无并发症淋病的一线治疗药物^[10]。然而阿奇霉素耐药菌株,特别是高度耐药菌株已经时有报道,大大降低了联合用药的有效性。因此,监测淋病奈瑟菌对阿奇霉素的耐药性,了解其耐药机制,将有利于预防淋病奈瑟菌的传播,延缓耐药性的发生。本研究中的 43 例菌株对阿奇霉素的非敏感率为 25.6%,MIC 最大值可达 64.000 μ g/mL。临床应重视淋病奈瑟菌的耐药性,根据药敏试验结果进行治疗用药的选择。

阿奇霉素是大环内酯类药物,主要通过和细菌核糖体 50S 亚基的 23S rRNA 结合,干扰信使核糖核酸(mRNA)翻译,通过阻断转肽酶的作用,从而抑制细菌蛋白质的合成。研究表明,淋病奈瑟菌对阿奇霉素的耐药机制主要涉及两个方面:一个是药物外排的加强,另一个是药物靶点的改变。其中药物外排的加强主要是由于 mtrR 基因发生突变导致。mtrR 基因编码 mtrR 蛋白,此蛋白可以负向调控外排泵,当 mtrR 基因发生突变时,可以引起 mtrR 蛋白减少或缺失,从而导致细菌外排抗菌药物的能力增强,使得细菌对阿奇霉素的敏感性下降^[11]。有研究表明,mtrR 基因启动子区域的 A 碱基缺失突变与阿奇霉素的 MIC 提高有关^[12],而 mtrR 基因编码区发生的 G45D 替换突变也与细菌对阿奇霉素高度耐药有关^[13]。本研究中阿

奇霉素非敏感组和阿奇霉素敏感组中均出现 A 碱基缺失突变,两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。而与阿奇霉素敏感组比较,阿奇霉素非敏感组在 mtrR 基因编码区可见多个位点的突变,这与文献[14]报道相似。但编码区的替换突变在两组之间的差异无统计学意义($P>0.05$),可能的原因是淋病奈瑟菌对阿奇霉素的耐药机制除了 mtrR 基因突变作用之外,还与 23S rRNA 基因突变密切相关,此外 rpID、rpIV 等基因突变也可导致细菌的耐药性升高^[15]。不同的 mtrR 基因突变方式对淋病奈瑟菌的耐药性所起的作用也可能不同^[16],有研究表明,mtrR 基因启动子区发生的缺失突变在淋病奈瑟菌对阿奇霉素耐药性中起的作用比 mtrR 基因编码区发生的替换突变更为重要^[17]。

综上所述,淋病奈瑟菌对阿奇霉素的耐药形势较为严峻,mtrR 基因发生突变可以使淋病奈瑟菌产生耐药性,临床应该重视阿奇霉素的敏感性监测及 mtrR 基因检测,并根据药敏试验结果合理选择抗菌药物,制订合理措施来控制淋病奈瑟菌的播散。

参考文献

[1] SUAY-GARCÍA B,PÉREZ-GRACIA M T. Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*:latest developments[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2017,36(7):1065-1071.

[2] UNEMO M,SHAFFER W M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century:past,evolution, and future[J]. Clin Microbiol Rev,2014,27(3):587-613.

[3] World Health Organization. WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*[EB/OL]. [2020-12-31]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379221/>.

[4] UNEMO M,SHAFFER W M. Future treatment of gonorrhea-novel emerging drugs are essential and in progress [J]. Expert Opin Emerg Drugs,2015,20(3):357-360.

[5] MARTIN I,SAWATZKY P,LIU G,et al. Decline in de-

- creased cephalosporin susceptibility and increase in azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, Canada [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(1): 65-67.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2020.
- [7] 徐珠锦, 刘军, 谭晓群, 等. 粤西部分地区淋病奈瑟菌耐药性及 *mtrR* 基因突变特点研究 [J]. *中国艾滋病性病*, 2020, 26(10): 1092-1094.
- [8] SANYAL A, SHEN C L, DING M, et al. *Neisseria gonorrhoeae* uses cellular proteins CXCL10 and IL8 to enhance HIV-1 transmission across cervical mucosa [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2019, 81(6): e13111.
- [9] COLE M J, SPITERI G, JACOBSSON S, et al. Overall low extended-spectrum cephalosporin resistance but high azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in 24 European countries, 2015 [J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1): 617.
- [10] COSTA-LOURENCO A P R D, BARROS DOS SANTOS K T, MOREIRA B M, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat [J]. *Braz J Microbiol*, 2017, 48(4): 617-628.
- [11] BEGGS G A, ZALUCKI Y M, BROWN N G, et al. Structural, biochemical, and in vivo characterization of *mtrR* mediated resistance to innate antimicrobials by the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae* [J]. *J Bacteriol*, 2019, 201(20): e00401-e00419.
- [12] SHIGEMURA K, OSAWA K, MIURA M, et al. Azithromycin resistance and its mechanism in *Neisseria gonorrhoeae* strains in Hyogo, Japan [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(5): 2695-2699.
- [13] XUE J, NI C S, ZHOU H Y, et al. Occurrence of high-level azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates in China [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(12): 3404-3405.
- [14] 张丽君, 王峰, 彭毅, 等. 深圳市淋球菌阿奇霉素耐药的分子机制及流行特征分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(3): 219-224.
- [15] BELKACEM A, JACQUIER H, GOUBARD A, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013—2014 [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(9): 2471-2478.
- [16] ZHENG Z, LIU L, SHEN X, et al. Antimicrobial resistance and molecular characteristics among *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates in a Chinese tertiary hospital [J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12: 3301-3309.
- [17] 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): 1304-1313.
- (收稿日期: 2021-01-28 修回日期: 2021-06-29)
-
- (上接第 3220 页)
- in France from 2014 to 2017 [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(1): 96-105.
- [8] MATSUI Y, HU Y, RUBIN J, et al. Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection patients and from fecal samples of healthy subjects in a college community [J]. *Microbiologyopen*, 2020, 9(6): 1225-1233.
- [9] SEOK H, CHA M K, KANG C I, et al. Failure of ciprofloxacin therapy in the treatment of community acquired acute pyelonephritis caused by in-vitro susceptible *Escherichia coli* strain producing CTX-type extended-spectrum beta-lactamase [J]. *Infect Chemother*, 2018, 50: 357-361.
- [10] FORDE B M, ROBERTS L W, PHAN M D, et al. Population dynamics of an *Escherichia coli* ST 131 lineage during recurrent urinary tract infection [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 364.
- [11] TCHESNOKOVA V L, RECHKINA E, LARSON L, et al. Rapid and extensive expansion in the United States of a new multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group, sequence type 1193 [J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68: 334-337.
- [12] TCHESNOKOVA V, RADEY M, CHATTOPADHYAY S, et al. Pandemic fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clone ST1193 emerged via simultaneous homologous recombination in 11 gene loci [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2019, 116(29): 14741-14748.
- [13] JORGENSEN S, SUNDE M, FLADBERG Ø, et al. Fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* ST1193 another global successful clone [J]. *Euro Congress Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 34(9): 204-213.
- [14] TCHESNOKOVA V L, RECHKINA E, LARSON L, et al. Rapid and extensive expansion in the United States of a new multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group, sequence type 1193 [J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68: 334-337.
- [15] BADER M S, LOEB M, BROOKS A A. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance [J]. *Postgrad Med*, 2017, 129: 242-258.
- (收稿日期: 2021-02-21 修回日期: 2021-06-19)