维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0346-02

淋球菌对环丙沙星耐药机制的研究

郭光辉，朱道银
（重庆医科大学微生物教研室 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨淋球菌对环丙沙星耐药机制。方法：从临床分离102株淋球菌，进行药敏试验，菌内聚积的环内沙星浓度测定，聚合酶链反应（PCR）扩增gyrA和parC基因片段，PCR产物作单链构象多肽性（SSCP）分析检测其点突变，对PCR产物直接测序。结果：环丙沙星耐药株占72.5%，敏感性下降株占20.6%，敏感株占6.9%。敏感菌内聚积的环丙沙星浓度为6ng/mg，敏感性下降株和耐药株约为3ng/mg和0.6ng/mg。SSCP分析显示敏感性下降株和耐药菌株都存在gyrA点突变，经测序显示以GyrA第91位氨基酸（Ser→Phe）和95位（Asp→Asn）双点突变常见，仅MIC≥0.5μg/ml的菌株才存在parC基因点突变，经测序显示以ParC第87位氨基酸(Ser→Arg)和104位（Cys→Tyr）双点突变常见。结论：作用靶位（gyrA和parC）的改变和膜耐药机制是淋球菌对环内沙星耐药的主要机制，DNA促旋酶是环丙沙星主要作用靶位，parC基因突变与较高水平耐药有关。

【关键词】淋球菌；gyrA；parC；环丙沙星抗药性
【中国图书分类法分类号】R37 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-10-15

Study on the mechanisms of resistance to ciprofloxacin in Neisseria gonorrhoea

GUO Guanghui, et al
(Department of Microbiology, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore mechanisms of resistance to ciprofloxacin in Neisseria gonorrhoea(NG). *Methods*: A total of 102 isolates were collected, antibiotic susceptibility tests performed ,accumulation of ciprofloxacin in isolates of NG was determined and gyrA and parC gene were amplified by PCR. The PCR products were assayed by SSCP. The PCR product which had the most common mutation was directly sequenced. *Results*: 72.5% were resistant to ciprofloxacin, 20.6% showed reduced susceptibility, 6.9% were susceptible and average accumulation of ciprofloxacin in the susceptible isolates was about 6ng/mg. However, in reduced-susceptiblity and rsistance isolates it was about 3ng/mg and 0.6ng/mg respectively. SSCP profiles revealed that the point mutations in gyrA gene occurred in all of isolates of reduced susceptibility and resistance, mutations (Ser-91 → Phe, Asp-95 → Asn) were most common, but the mutation points in parC gene only existed in the isolates which showed MIC 0.5 μg/ml. Double-point mutations(Ser-87 → Arg, Cys-104 → Tyr) were most common. *Conclusion*: The mechanisms of resistance to ciprofloxacin in NG were mainly involved in alteration of target molecules(GyrA and ParC) and resistance of membrane, and DNA gyrase was the main target molecule of ciprofloxacin, while the mutations in ParC were associated with high-level resistance to Ciprofloxacin quionolone.

【Key words】Nesseria gonorrhoea; GyrA; ParC ;Ciprofloxacin resistance

淋病是我国一种最常见的性病。淋球菌对青霉素、四环素耐药率已相当高，因而临床应用环丙沙星治疗淋病，导致淋球菌对环内沙星耐药率和耐药程度日益上升，临床治疗失败屡见不鲜。细菌对环丙沙星耐药机制主要涉及作用靶位的改变和膜耐药机制。淋球菌对环丙沙星耐药机制的研究国内报道很少，本文用PCR—SSCP、DNA测序、荧光法检测菌内药物聚积等方法初步探讨临床分离的淋球菌对环丙沙星耐药机制。

作者介绍：郭光辉（1973- ），男，硕士。
主要研究方向：性传播疾病的病原学。

1 材料和方法

1.1 菌株

1999年9月～2000年6月从重庆市第一人民医院性病监测中心分离102株淋球菌。标准菌株采用ATCC49226。

1.2 主要试剂

环丙沙星标准品由重庆制药六厂提供。PCR扩增gyrA基

维普资讯 http://www.cqvip.com

因上游引物为：5'-CGCGGATGCACGAGCTGAAAAA-3'，下游引物为：5'-ATTTCGGTATAGCGATGCTG-3'。ParC基因上游引物为5'-AAGCCGCGTGAAATCGGCGCGC-3'，下游引物为5'-GTCGCCGTCGCGCGAACCGAA-3'，均委托上海生工合成，Taq酶、dNTP、DNA Mark均购自上海生工，DNA银染试剂、PCR产物纯化试剂购自Promega公司，甘氨酸购自重庆化学试剂厂。

1.3 药敏试验

采用琼脂稀释法，根据WHO推荐的标准[1]，淋球菌对环内沙星MIC≥1μg/ml为耐药，MIC为0.06～0.5μg/ml为敏感性下降，MIC≤0.03μg/ml为敏感。

1.4 PCR扩增gyrA和parC基因的喹诺酮耐药决定区（QRDR）

提取细菌DNA，PCR扩增方法按文献进行[2]。

1.5 单链构象多态性（SSCP）[3]分析

在PCR产物中加入甲酚胺95℃变性10min后，作10%聚丙烯胺凝胶电泳，硝酸银染色，观察结果，按带型分布为不同的突变类型。

1.6 DNA测序

菌株99001（为gyrA的SSCP图谱显示为最常见的突变类型的菌株）的gyrA的PCR产物及菌株99002（为parC的SSCP图谱显示为最常见的突变类型的菌株）的parC的PCR产物经纯化试剂盒纯化，在ABI377自动测序仪上测序。

1.7 细菌内聚积的环丙沙星浓度的测定

由于环内沙星具有自发产生荧光的特点，以荧光分光光度法[4]测定7株环丙沙星敏感菌、21株敏感性下降株及随机选取的26株耐药株的菌内环丙沙星聚积的浓度，激发波长为280nm，发射波长465nm。

2 结 果

2.1 药敏试验

102株淋球菌中，敏感株占6.9%，敏感性下降株占有20.6%，耐药株占72.5%。

2.2 PCR

扩增所有的淋球菌的gyrA和parC基因都分别得到长度约为225bp和162bp的DNA片段。

2.3 SSCP分析

与标准菌比较，gyrA基因SSCP图谱显示所有非敏感株都存在gyrA基因点突变，共有6种点突变类型，以II型最常见。ParC基因点突变则仅存在于MIC≥0.5的菌株，共有6种点突变类型，以IV型最常见。

2.4 DNA测序

经测序显示，GyrA最常见的点突变是第91位氨基酸（Ser→Phe）和95位氨基酸(Asp→Asn)双点突变，ParC最常见的点突变是第87位氨基酸（Ser→Arg)和104位氨基酸（Cys→Tyr）的双点突变常见。

2.5 菌体内环丙沙星聚积浓度

所有菌株对环内沙星聚积在5min达到平衡，敏感株平均聚积的浓度6ng/mg湿菌，敏感性下降株和耐药株仅为其1/2和1/10，约为3ng/mg和0.6ng/mg明显低于敏感株（$P<0.05$）。

3 讨 论

环丙沙星为广谱、强效抗菌剂，近年来在临床上用于感染疾病的治疗。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等多种细菌产生对环丙沙星的耐药性，耐药程度也日益加重，且呈蔓延趋势。本研究显示重庆地区的淋球菌对环丙沙星的耐药已相当严重，耐药率达72.5%，MIC≥8的高水平耐药株占39.2%，与李国民[5]报道82.56%的耐药率较接近，Tanaka等[6]报道日本1993年～1998年耐药率从6.6%上升到24.4%。表明环丙沙星已不能作为治疗淋病的一线药物。细菌对环丙沙星耐药由染色体基因介导，尚未发现由质粒介导。DNA促旋酶（由2个gyrA亚基和2个gyrB个亚基组成，亦称拓扑异构酶）和拓扑异构酶IV（由2个parC业基和2个parE亚基组成）是喹诺酮类药物作用的靶位，编码这两种酶的基因发生点突变，可能影响细菌对喹诺酮类药物的敏感性。利用检测点突变高度敏感的SSCP技术研究发现所有敏感株都无gyrA和parC基因的点突变，非敏感株都存在gyrA点突变，而parC基因点突变仅发生于MIC≥0.05μg/ml的菌株。我们共发现6种gyrA点突变和6种parC点突变类型，这些点突变的SSCP图谱的建立为今后发现新的突变位点打下基础。国外[6]已发现GyrA突变所致的gyrA氨基酸取代有：(1) Ser-91→Phe，Tyr，Cys；(2) Asp-95→Gly，Asp；(3) Ala-75→Ser；(4) Ala-84→Pro。ParC基因突变所致的ParC氨基酸取代：(1) Ser-87→Ile,

表1 102株淋球菌对环丙沙星MIC的概况

MIC	≤0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
菌株数	7	2	7	8	4	8	14	16	16	20

（下转第349页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 1674例健康体检者血清TSGF检测结果（$\bar{x}\pm s$）

年龄（岁）	性别	例数	$\bar{x}\pm s$（U/ml）
21～40	男	240	52.28±5.18#
	女	180	52.29±5.19*
41～60	男	621	52.23±5.15#
	女	139	52.28±5.18*
61～80	男	399	52.3±5.16#
	女	95	52.33±5.13*
合计	男	1260	52.31±5.13
	女	414	52.29±5.18

*与男性比较$P>0.05$；#各年龄比较$P>0.05$

3 讨 论

对1674例健康者进行TSGF检测，初步得出正常参考值为（52.31±5.13）U/ml，其中有6例阳性，其阳性检出率为3.5‰。检测结果表明，正常人群中的TSGF含量不因年龄、性别不同而有差异。

在TSGF检查的同时也做了AST，ALT，GLU，TC，TG等项目的检查。结果发现初筛时有16例阳性，内有3例AST和ALT增高，5例TC，TG，GLU增高，7例其它指标均正常。而在复查TSGF时正常者中包括3例AST和ALT增高和4例TC，TG增高。从而，我们认为部分炎性患者可造成血清TSGF增高。而这种一过性增高是否与非特异性血管生长有关，还需作进一步的观察和分析。

TSGF的检测在自然人群和高危人群的肿瘤筛检中具有较高的应用价值。结合其他手段可用于肿瘤早期诊断，以达到早期治疗的目的。

参 考 文 献

[1] 董海珍，陈 晓，董曲文. 恶性肿瘤特异性生长因子（TSGF）在肿瘤普查中的应用[J]. 实用预防医学，2000;7(1):56-57.

[2] 高文斌，戚小军，伊淑珍，等. 血清恶性肿瘤生长因子检测在肝癌介入治疗中的意义[J]. 上海免疫学杂志，1998;18(2):126.

[3] 徐元斌，王德春，朱忠勇. 恶性肿瘤特异性生长因子（TSGF）测定及临床应用[J]. 福建医学检验杂志，1996;1(3):118.

（上接第336页）

Arg；(2) Glu-91→Gly，Lys；(3)Arg-116→Leu，His；(4) Gly-85→Cys；(5) Asp-86→Asn；(6) Ser-88→Pro。我们测序的菌株的parC氨基酸取代为Ser-87→Arg和Cys-104→Tyr双点突变，Cys－104→Tyr点突变尚未见报道。双点突变常形成更高水平的耐药。国外已有发现gyrB突变所致氨基酸取代仅见Asp419→Asn，与低水平耐药有关[7]。尚未发现parE基因突变。耐药菌和敏感性下降菌菌内聚积的环丙沙星浓度明显低于敏感菌，很显然除了靶位改变，导致达到靶位的药物减少的膜机制耐药是淋球菌对环丙沙星耐药的另一重要原因，膜机制主要包括细胞膜通透性改变和存在主动外排系统。对大肠杆菌和铜绿假单胞菌耐喹诺酮机制的研究表明细菌内聚积的药物减少与外膜蛋白改变和存在主动外排系统有关。淋球菌耐药株是否有外膜蛋白改变和存在主动外排系统尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] World Health Oganization. Senstivity testing of Nesseria gonorrhoeae:methodologies for use by participants in wht WHO Western Pacific Region Resistance Suvel lance Programme[R]. In: WHO/WPR Regional Antimicrobial Surveillance Working Group Meeting Proceedings, 1992;33.

[2] Degchi T, Yasuda M, Asano M, et al. DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of Neisseria gonorrhoeae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995;39:561-563.

[3] 伍新尧，罗超权，杨英浩. 基因诊断原理与临床[M]. 广州：中山大学出版社，1995;50-51.

[4] Chapman JS, Georgopapadakou NH. Fluorometric assay for fleroxacin uptake by bacterial cell[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1989;33:27-29.

[5] 李国民，陈 群，王胜春，等. 广东省湛江地区淋球菌株的药物敏感性研究[J]. 中国皮肤性病学杂志，2002;14:176-177.

[6] Tanaka M, Naanayama H, Haraokam M, et al. Antimicrobial resistance of Neisseria gonorrhoeae and high prevalence of ciprofloxacin-resistance isolates in Japan[J]. 1993 to 1998, J Clin Microbiol, 2000;38:521-525.

[7] Degchi T, Yasuda M, Nakan M ,et al. Uncommon occurrence of mutations in the gyrB gene associated with quinolone resistance in clinical isolates of Neisseria gonorrhoeae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996;40:2437-2438.