

淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类耐药性研究进展

侯临平

淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)简称淋球菌,淋球菌是性传播疾病淋病的病原体。淋病奈瑟菌常引起泌尿生殖道的化脓性感染,也可引起泌尿生殖系统之外如眼睛、口咽、直肠、盆腔等部位的感染^[1]。

50 年代,喹诺酮类药物用于治疗淋病,效果较好,即使对于产青霉素酶和对四环素耐药的菌株也有很强的杀菌活性^[2]。随着抗菌药物的广泛应用,在抗菌药物选择性压力的作用下,淋病奈瑟菌耐药株逐渐增多。近年来大量研究表明淋病奈瑟菌对环丙沙星等喹诺酮类药物敏感性降低直至耐药,因此引起了研究者的高度重视。

一、淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物耐药概况

喹诺酮类药物有多种,因很多结构含氟,也称为氟喹诺酮类药物,其典型的代表药物为环丙沙星。80 年代末,鉴于质粒介导的高度耐受青霉素和四环素的淋病奈瑟菌的出现和流行,世界卫生组织及美国疾病控制中心不再推荐青霉素和四环素作为治疗淋病的首选药物,以新的药物如第三代头孢菌素、大观霉素及喹诺酮类药物等取而代之。起初,喹诺酮类药物对淋病奈瑟菌包括对青霉素和四环素耐药在内的菌株有很好的抗菌活性,但随着该药的广泛应用,近年来人们发现淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物敏感性明显降低,甚至出现耐药现象。

1. 国外报道淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物耐药状况:英国首先报道淋病奈瑟菌对环丙沙星的敏感性下降,患者对剂量为 250 mg 环丙沙星口服液治疗无效。日本学者对 6 株淋病奈瑟菌临床分离株和 5 株 WTO 标准参考菌株的诺氟沙星摄取量和蓄积量进行了检测,发现 4 株耐药株的平均初始药物摄取量及 20 min 后菌体内药物蓄积量明显低于 7 株敏感株。有研究对澳大利亚 1984 ~ 1990 年间 2141 株淋病奈瑟菌进行检测,发现有 43 株为喹诺酮类药物耐药;进一步跟踪调查显示,淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药率有迅速增长的趋势。

2. 国内报道淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物耐药状况:栾玉泉等^[3]对 2005 年 1 月至 2007 年 12 月大理市第一人民医院 108 例淋病奈瑟菌临床分离株进行耐药性检测,发现其对喹诺酮类药物的耐药率为 98%。

杨胜辉等^[4]采用琼脂稀释法调查了衡阳地区淋病奈瑟菌流行株对抗菌药物的耐药状况,结果发现 101 株淋病奈瑟菌对环丙沙星的耐药率为 91.1%。

王蓓等^[5]对南京、徐州、无锡地区的 2004 ~ 2005 年间的淋病奈瑟菌临床分离

株进行耐药性检测,发现上述地区淋病奈瑟菌对环丙沙星的耐药率均为 100%。

谢国艳^[6]报道上海地区淋病奈瑟菌临床分离株对环丙沙星的耐药率为 100%,其中高水平耐药为 73.3%,低水平耐药为 26.7%。

从上述情况来看,淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物耐药十分严重,因此研究其耐药机制,为临床治疗淋病开发新药物提供理论依据具有重要现实意义。

二、淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物耐药机制

随着遗传学和分子生物学的发展,人们对淋病奈瑟菌耐药机制的认识越来越清楚,许多研究表明淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药机制主要存在以下几个方面。

1. 作用靶位的改变:此为其主要耐药机制,早期研究发现淋病奈瑟菌氟喹诺酮耐药性的发生与细菌染色体上氟喹诺酮耐药性决定区(quinolone resistance-determining region, QRDR)上 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶 IV 有关。

DNA 螺旋酶是细菌特有的一种拓扑异构酶,为 II 型 DNA 拓扑异构酶,由 2 个 *GyrA* 亚基和 2 个 *GyrB* 亚基组成,DNA 螺旋酶 A 亚基 *GyrA* 由 *gyrA* 编码,DNA 螺旋酶是氟喹诺酮类药物的主要作用靶位,*gyrA* 基因的突变可造成药物靶位点 A 亚基发生改变,影响其与药物结合的能力,使淋病奈瑟菌表现出对该类药物的耐受性;也是造成淋病奈瑟菌产生对喹诺酮类耐药的主要原因。DNA 拓扑异构酶 IV 由 2 个 *ParC* 亚基和 2 个 *ParE* 亚基组成,C 亚单位 *ParC* 由 *parC* 基因编码,*gyrA* 和 *parC* 位点改变是淋病奈瑟菌重要的耐药机制。

DNA 螺旋酶和拓扑异构酶是细菌生长所必需的酶,二者共同作用以维持细菌体内 DNA 正常的超螺旋水平,在 ATP 的参与下能使松弛的环状 DNA 转变为负超螺旋的形式,对 DNA 的复制、转录重组和修复过程起着重要作用。喹诺酮类药物的原始靶位是细菌的 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶 IV,此类药物可通过对抗该酶活性,干扰 DNA 复制、转录,破坏 DNA 结构,使细菌染色体断裂,导致细菌死亡从而起到抑菌作用。由于编码 DNA 螺旋酶 A 亚基和 DNA 拓扑异构酶 IV C 亚单位的基因发生点突变,形成编码另一种氨基酸的密码子,而使所编码的酶亚基的氨基酸发生改变,影响到氟喹诺酮类药物与靶位的结合,从而影响细菌对氟喹诺酮类药物的敏感性及耐药性的出现。这是淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物产生耐药的最重要机制^[7]。

国内外有许多研究已证明 *gyrA* 和 *parC* 基因突变与淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物产生耐药有关。有研究对来自印度新德里的 63 份淋病奈瑟菌临床分离株用琼脂稀释法检测对环丙沙星的 MIC 效应,然后全部进行 *gyrA*、*parC* 基因扩增和序列测定,结果表明耐环丙沙星淋病奈瑟菌均有 *gyrA*、*parC* 基因突变。另有研究则通过 PCR 方法对 β -内酰胺酶阳性和阴性的耐环丙沙星淋病奈瑟菌菌株分别研究,发现 *gyrA*、*parC* 基因均有基因编码的氨基酸发生替代。

在作用靶位改变的机制中,*gyrA* 和 *parC* 突变位点和突变方式各有特点。国内外学者研究表明,编码 DNA 螺旋酶的 *gyrA* 基因 QRDR 区上第 91 位丝氨酸

(Ser91) 和 95 位天冬氨酸(Asp95) 碱基的改变是导致淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药的根本原因^[8-10]。有研究已发现 *gyrA* 突变所致的 *gyrA* 氨基酸取代有: (1) Ser-91→Phe、Tyr、Cys; (2) Asp-95→Gly、Asn; (3) Ala-75→Ser; (4) Ala-84→Pro。而 *parC* 突变所致的 *parC* 氨基酸取代有: (1) Asp-86→Asn; (2) Ser-87→Arg、lie; (3) Ser-88→Pro; (4) Glu-91→Gly、Gln、Lys; (5) Arg-116→His。

淋病奈瑟菌对喹诺酮类耐药不仅与 *gyrA* 和 *parC* 突变有关,其耐药水平高低也与 *gyrA* 和 *parC* 具体突变的位点及数目有关。研究发现 *gyrA*、*parC* 同时突变的 11 株淋病奈瑟菌,其 MICs 均大于 1.0 μg/ml,而仅有 *gyrA* 突变的 7 株淋病奈瑟菌,其 MICs 在 0.12 μg/ml 至 1.0 μg/ml 之间,表现出敏感性下降或耐药。另有研究发现 *ParC* 基因两个位点同时突变淋病奈瑟菌的 MICs 自 8.0 μg/ml 上升至 64.0 μg/ml,而只有 *ParC* 单位点突变的菌株,其 MICs 仅为 1.0 μg/ml,认为 *parC* 基因双位点同时突变,可引起高度耐药。国内也有研究发现 *gyrA* 和 *parC* 基因同时突变菌株的 MICs 值较高。

Alcala 等^[11]对 2000~2001 年耐环丙沙星淋病奈瑟菌分离株通过 PCR 和 DNA 直接测序法进行 *gyrA*、*gyrB* 和 *parC* 基因检测,发现除 1 株淋病奈瑟菌外,*gyrA* 基因的 Ser91 和 Asp95 发生替代,*parC* 基因则表现为多种变异。有研究用 PCR 和核酸探针杂交方法分析临床分离的 80 株淋病奈瑟菌,发现耐环丙沙星菌株共 42 株,均有 *gyrA*、*parC* 基因变异,且有 1 株为中介菌株有单纯 *gyrA* 基因变异,有 93% 的变异方式是完全一致的,但环丙沙星敏感菌株未发现任何变异。

此外,*gyrB* 基因的突变,在碱基 1444 和 1445 位点间有 42 对碱基插入,导致 *gyrB* 蛋白第 419 位的天冬氨酸被天冬氨酰所替代,抗菌药物对 *gyrB* 蛋白的亲合力下降而引起耐药,但这种耐药机制比较少见,所起作用不大。

可见不同地区喹诺酮耐药株有特定的 *gyrA* 和 *parC* 突变模式,这种差异可能与耐药菌株生物学特性、流行情况、耐药水平高低、是否多重耐药等多种方面密切相关。

2. 膜通透性下降:*penB* 基因是一个编码膜孔收缩蛋白的基因,其突变引起孔蛋白合成受阻,通道结构改变和功能异常,可使淋病奈瑟菌膜蛋白结构改变,致膜通透性下降,使得抗菌药物透入细菌受阻,细菌对药物摄取量减少,从而使得淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药。这种膜通透性下降也同样造成淋病奈瑟菌对其他药物耐药。

3. 外排泵作用:淋病奈瑟菌产生对喹诺酮类药物耐药的原因还包括细菌能把药物有效地排出体外,而外排过程是由细胞膜上的脂蛋白在 ATP 酶催化作用下通过外排泵作用完成的。外排泵能捕获多种不同结构的化合物,将有毒物质包括杀菌剂泵出体外,从而对抗人体宿主或细胞免疫系统,提高细菌的生存能力。该脂蛋白的过多表达与临床细菌耐药直接相关,其编码基因包括 *mtr* (multiple transferable resistance) 和 *far* (fatty acid resistance) 基因系统,通过顺式作用因子和反式作用元件来调控该外排泵的表达,使得淋病奈瑟菌能够对抗粪便中的脂类及

胆盐的毒性,这也是淋病奈瑟菌能在尿道、肠道黏膜表面生存的主要原因。

mtr 基因系统存在于淋病奈瑟菌的染色体 DNA 上,该基因系统是一个多重可传递耐药操纵子,包括 *mtrR* 和 *mtrCDE* 基因,其中 *mtrR* 为抑制基因,*mtrCDE* 为结构基因,*mtrR* 和 *mtrCDE* 分别编码相应的蛋白质(*mtrR*、*mtrC*、*mtrD*、*mtrE*)。*mtrCDE* 蛋白存在于细菌细胞膜上,其中 *mtrC* 为膜融合蛋白,*mtrD* 为外排蛋白,*mtrE* 为外膜通道蛋白,*mtrC* 使位于细胞膜的 *mtrD* 与外膜的 *mtrE* 相连接,三者紧密相连构成了跨膜的能量依赖性外排系统,该系统依赖质子耦联交换产生的质子驱动力将胞内及胞周间隙的底物泵出细菌。

mtrR 基因控制 *mtrCDE* 的表达。*mtrR* 编码一个含 210 个氨基酸残基的蛋白,该蛋白作为转录阻遏物结合于 *mtrCDE* 基因上而影响其转录。*mtrCDE* 基因位于 *mtrR* 基因的下流,其编码的蛋白质位于淋病奈瑟菌细胞膜上,该蛋白复合物能在 ATP 酶作用下通过外泵机制把药物泵出细胞外,其合成量的多少决定淋病奈瑟菌的耐药程度。由于 *mtrR* 基因编码转录阻遏蛋白,*mtrR* 基因突变使 *mtrR* 基因下游的 *mtrCDE* 基因转录开放,细胞膜脂蛋白中受其控制的 *mtrCDE* 蛋白复合物表达增加,外排泵系统功能增强,增加对多种抗菌因子的抵抗力。

4. 质粒介导:质粒介导在淋病奈瑟菌对喹诺酮耐药性的产生中具有重要作用。有研究将携带有耐喹诺酮类药物菌株 *gyrA* 基因的质粒导入携带正常 *gyrA* 基因的淋病奈瑟菌菌株中,结果发现原先对喹诺酮类药物敏感的菌株对其产生了耐药性。

三、小结

综上所述,淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物的耐药状况较为严重,喹诺酮类药物已经不适用于临床治疗淋病。淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物的耐药机制有以下几种:(1)作用靶位的改变:*gyrA* 基因突变是必需的。*gyrA* 的基因突变有单位点或双位点突变,双位点突变具有协同作用,可使淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物的耐药性增高。*gyrA* 基因突变主要有:Ser-91→Phe(Tyr)和 Asp-95→Asn(Gly)。在 *gyrA* 突变的基础上,*parC* 基因突变使淋病奈瑟菌获得高水平的耐药性。*parC* 基因的第 86、87、88 及 91 位密码子均可发生突变。目前检出的淋病奈瑟菌突变类型有:*gyrA* 单位点突变,*gyrA* 双位点突变或 *gyrA* 单位点突变加 *parC* 单位点突变。(2)膜通透性下降;(3)外排泵作用;(4)另外,质粒介导也是淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药很重要的一个方面。随着抗菌药物的广泛应用,淋病奈瑟菌的耐药性问题会更加突出,因此更深入地研究淋病奈瑟菌的耐药机制对于淋病的治疗和预防非常重要。

参 考 文 献

- 1 马孝. 淋病奈瑟菌性化脓性扁桃体炎 1 例. 包头医学院学报,2005,21(2):132-179.
- 2 Dan M. The use of fluoroquinolones in gonorrhoea; the increasing problem of resistance. Expert Opin Pharmacother,2004,5(4): 829-854.

- 3 栾玉泉, 王国富, 吴利先. 淋球菌的耐药性分析及其耐氟喹诺酮的分子机制研究. 中国抗生素杂志, 2009, 34(5): 319-321.
- 4 杨胜辉, 吴移谋, 余敏君, 等. 衡阳地区淋病奈瑟菌流行株对抗生素耐药性监测. 实用预防医学, 2005, 12(2): 238-241.
- 5 王蓓, 王长娴, 糜祖煌. 淋病奈瑟菌对大观霉素与环丙沙星耐药性研究. 中国公共卫生 2005, 21(3): 322-323.
- 6 谢国艳. 淋病奈瑟菌耐氟喹诺酮类药物与 *gyrA* 和 *parC* 基因突变的相关性研究. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6(2): 89-91.
- 7 Vereshchagin VA, Mina EN, Malakhova MV, et al. Fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Russia; molecular mechanisms implicated. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(4): 653-656.
- 8 邹明祥, 夏忠弟, 陈淑贞, 等. 淋病奈瑟菌 *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(3): 199-202.
- 9 Yong D, Kim TS, Choi JR, et al. Epidemiological characteristics and molecular basis of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Korea and nearby countries. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(2): 451-455.
- 10 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(6): 440-444.
- 11 Alcalá B, Arreaza L, Salcedo C, et al. Molecular characterization of ciprofloxacin resistance of gonococcal strains in Spain. Sex Transm Dis, 2003, 30(5): 395-398.

(收稿日期: 2011-03-08)

(本文编辑: 孙荣华)

侯临平. 淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类耐药性研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2011, 5(4): 489-493.

中华医学会
CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915
中藥醫學會