

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2018.04.008

• 综述 •

解脲脲原体耐药性研究进展

郭炽鹏, 陆春, 朱国兴

中山大学附属第三医院皮肤性病科, 广州 510630

摘要:解脲脲原体是条件致病菌。目前对其耐药性的研究主要包括对喹诺酮类、大环内酯类和四环素类3种抗菌药物相关耐药突变位点的检测,以及生物膜对病原体相关药物敏感性的影响,研究方法和检验手段仍较为传统、局限,研究方案也仅停留在对前人实验的重复。近年来,有学者将多位点序列分型技术用于解脲脲原体耐药序列类型的研究。在完善耐药机制研究的基础上,如何实现对耐药株的快速鉴定,从而指导抗菌药物的合理选择等仍需进一步研究。

关键词:解脲脲原体; 喹诺酮类; 四环素类; 大环内酯类; 生物膜; 耐药机制

Research progress on drug resistance of *Ureaplasma urealyticum*

GUO Chipeng, LU Chun, ZHU Guoxing

Department of Dermatology and Venereology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Abstract: *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) is an opportunistic pathogen. At present, the study of its resistance mechanisms mainly includes the detection of the related drug-resistance mutation sites for quinolones, macrolides and tetracyclines, and the influence of biofilm on the drug susceptibility. In recent years, some researchers have applied multilocus sequence typing (MLST) technology to explore the drug-resistance sequence types of *U. urealyticum*. Rapid identification of drug-resistant strains is an urgent clinical need for rational choice of antimicrobial agents.

Key words: *Ureaplasma urealyticum*; Quinolones; Tetracyclines; Macrolides; Biofilm; Resistance mechanism

解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*, *U. urealyticum*)感染可引起泌尿生殖系统疾病,也可导致脑、肺等其他器官损伤。目前,用于治疗解脲脲原体感染的抗菌药物主要有喹诺酮类、大环内酯类和四环素类,有关解脲脲原体对上述药物的耐药性研究已有报道。解脲脲原体对氟喹诺酮类药物耐药性增加的原因主要为 *gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE* 等

基因的突变;对大环内酯类药物耐药性增加的原因主要为 23S rRNA 亚基或核糖体蛋白 L4 或 L22 基因的突变;对四环素类药物耐药性增加的原因主要为 *tet(M)* 的存在^[1-11]。不同研究表明,以上这些耐药突变位点的分布存在差异,生物膜的产生可能加重耐药现象^[12-13]。目前,关于解脲脲原体对喹诺酮类、大环内酯类和四环素类药物耐药性的研究主要

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020213023)

通信作者:陆春

Corresponding author. LU Chun, E-mail: 13710712171@163.com

集中在检测上述突变位点。研究过程主要包括以下几个步骤:①利用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增目的基因;②对 PCR 产物进行测序;③与相应 ATCC 株进行序列比对并找出突变位点等^[6,11,14]。本文通过 PubMed 检索近几年有关解脲脲原体耐药性的相关研究,对已发现的耐药位点分布和生物膜形成前后药敏变化进行归纳整理,以期加深对其耐药机制的了解并指导耐药菌快速检测,从而加强抗菌药物管理并减少耐药性产生。

1 喹诺酮类药物的耐药突变

对氟喹诺酮类药物的耐药机制研究主要集中在对 *gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE* 等基因的喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region, QRDR)相关突变位点的检测。许多研究表明,发生于 *parC* 基因的典型突变 S83L 是导致解脲脲原体对喹诺酮类药物耐药性增加的常见原因^[15-16], Kawai 等^[14]研究表明,该突变可能导致喹诺酮类药物对解脲脲原体的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)增加 32 倍。然而,并非所有研究均在耐药菌株中检测到上述 4 个基因突变^[15,17]。在部分关于左氧氟沙星耐药分离株的研究中,未能在 *gyrA*、*gyrB* 或 *parE* 等基因中检出突变位点存在。

Piccinelli 等^[18]对筛选出的 85 株对环丙沙星和(或)氧氟沙星耐药的支原体进行分析,证实了一些已报道的突变位点,如 *parC* 中出现的 S83L、E87Q 和 E87K, *ParE* 中的 R448K 等。该研究结果显示,对于从 *gyrA* 扩增出的基因片段,最常见的突变是 L176F, 其他突变位点包括存在于微小脲原体(*Ureaplasma parvum*, *U. parvum*)中的 F67I、K78I、G179D、S174R, 以及解脲脲原体(T960)中的 D77V。在 *parC* 中检出 4 个突变:微小脲原体中的 V141I(该突变导致对氧氟沙星产生中等程度耐药),以及解脲脲原体(T960)中的 I52N、L49F 和 E153D。通过对 *gyrB* 基因序列进行检测,发现微小脲原体分离株中存在 E502Q、R523 等突变,并在 1 株解脲脲原体(T960)分离株中发现三重突变。在 5 株微小脲原体菌株中检测到 *parE* 基因中的 6 个点突变:Q412K、Q412P、S413N、H491Q、E466K 和 M404L。上述突变导致相应表达蛋白发生 7 个氨基酸替换。

不同突变可存在于同一基因中,如有研究发现耐喹诺酮类药物的解脲脲原体血清型 1 中同时存在 F67I 和 K78I 两个点突变^[18]。同一菌株中也可能存在两个基因的双重突变。对于微小脲原体不同血清型和解脲脲原体两种生物群混杂感染的分离株,Piccinelli 等在其中 3 株分离株中发现了如下突变:*gyrA* 中的 L176F、双重突变(*gyrA* 基因中的 L176F 和 *parE* 基因中的 Q412T)。Kawai 等^[14]在一份 DNA 样品中同时检出存在于 *gyrB* 基因和 *parC* 基因中的点突变(分别为 P462S 和 S83L)。

并非所有基因突变均能导致耐药性产生。例如,在一些多重突变菌株中检测到 S83L,因此除 S83L 外可能存在中性突变。Valentine-King 等^[17]在对喹诺酮类药物敏感的解脲脲原体分离株中发现了存在于 *parE* 基因 QRDR 内的两个突变位点,其中一个导致 R437I 非同义替换,另一个导致 G480S 非同义替换,该分离株对左氧氟沙星和环丙沙星均较敏感(MIC 分别为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$),与其他受试菌株的敏感性一致。因此,这种突变虽然位于 *parE* 的 QRDR,但似乎不会降低喹诺酮类药物的有效性。

在对耐药位点的检测中还发现了一些尚未证明是否介导耐药的突变位点,如发生于 *gyrA* 基因的 L176F, *gyrB* 基因的 E502Q, 以及 *parE* 基因的 Q412K、Q412P、Q412T 等^[18]。

为评价 *parC* 基因 S83L 和 S83W 突变对表达产物结构变化的影响,Kawai 等^[14]通过同源建模等技术对各肽的结构模型进行预测分析,发现喹诺酮 C-3 羧酸、C-4 羰基和 Mg²⁺ 对其与 DNA 拓扑异构酶的相互作用有重要影响,而 S83L 和 S83W 可通过位阻作用干扰菌株与喹诺酮类药物的适当结合。

2 四环素类药物的耐药突变

对四环素类药物的耐药机制研究主要集中在 *tet(M)* 检测。Valentine-King 等^[17]对四环素类耐药解脲脲原体分离株和 4 株敏感分离株中的 *tet(M)* 片段进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测,获得约 400 bp 的条带,相当于解脲脲原体 ATCC 33175 中的 *tet(M)* 位置,而敏感分离株中未检测到该基因。

然而,并非检测出 *tet(M)* 决定簇的菌株均对四环素类产生耐药。Fernández 等^[15]在 250 株分

离株中筛选与四环素类耐药相关的 *tet(M)* 决定簇,发现 10 株(4.9%)微小脲原体分离株呈阳性(其中仅 1 株对四环素耐药,另外 9 株的四环素和多西环素 MIC 均较低),而在解脲脲原体(T960)中未分离出该基因。Kotrotsiou 等^[19]利用 A7 琼脂平板,从 100 例成人泌尿生殖系统中分离出解脲脲原体,其中 87 份标本分离出微小脲原体,12 份标本分离出解脲脲原体(T960),两生物群均从单一样品中分离出来,且所有分离株均对四环素表型敏感。检测上述样本,发现 35 株携带 *tet(M)*,其中 29 株(82.9%)为微小脲原体、5 株(14.3%)为解脲脲原体(T960)、1 株(2.9%)为微小脲原体/解脲脲原体(T960)混合株,3 组间无统计学差异。10 例有症状男性患者中有 4 例(40%) *tet(M)* 携带者,34 例有症状女性患者有 11 例(32.4%) *tet(M)* 携带者,而 56 例无症状妇女中亦有 20 例(35.7%) *tet(M)* 携带者,3 组间无统计学差异。

生殖器支原体对四环素类产生耐药性主要是由于获得了 *tet(M)* 决定簇,该过程通常与 Tn916/Tn1545 家族的接合转座子元件相关。Mardassi 等^[20]对取自突尼斯境内部分不育症患者的 20 株微小脲原体和 2 株解脲脲原体(T960)分离株进行四环素耐药性评估,并通过 PCR 检测 *tet(M)* 和 *int-Tn*(*int-Tn* 基因编码 Tn916/Tn1545 样转座子的整合酶)。微小脲原体对四环素的耐药率为 22.72%,且所有耐药菌株均含 *tet(M)* 和 *int-Tn* 序列。对 *tet(M)* 扩增子的核苷酸序列进行分析,发现微小脲原体和解脲脲原体(T960)中所有耐四环素分离株均具有一种独特的序列。分子分型研究表明,单个 *tet(M)* 基因序列最有可能通过 Tn916/Tn1545 样转座子来传递,从而导致微小脲原体和人型支原体(*Mycoplasma hominis*)分离株中出现大部分四环素耐药突变株。*tet(M)* 基因序列存在于不同支原体属中,且广泛存在于系统发育状态不同的菌株中。一个合理的解释是,它可能受益于有效的水平转移环境,从而具有高度的传播能力。

3 大环内酯类药物的耐药突变

对大环内酯类药物的耐药机制研究主要集中在对 23S rRNA 亚基或核糖体蛋白 L4 或 L22 基因的检测。Govender 等^[11]在对红霉素(2 株)和红霉素+阿奇霉素(1 株)产生耐药性的 3 株微小脲原体中

观察到 L22 核糖体蛋白突变,其中菌株 Up-8 显示 6 个氨基酸改变,Up-38 显示 3 个氨基酸改变,Up-71 显示 6 个氨基酸改变。而在另一株红霉素+阿奇霉素抗性菌株中未检测到 L22 蛋白变化。4 株菌株未发现以下序列突变:两个 23S rRNA 操纵子;大环内酯修饰基因 *erm(A)*、*erm(B)*、*erm(C)* 和 *erm(E)*;外排泵基因 *msr(A)*、*msr(B)*、*msr(C)* 和 *msr(D)*。

Dando 等^[21]通过实验研究,对 12 只怀孕母羊于妊娠 55 d 时进行羊膜内接种,接种物为含多种微小脲原体亚型的临床株。随后于妊娠 100 d 时用红霉素治疗(肌内注射,每日 30 mg/kg, n=6)或注射生理盐水(肌内注射, n=6),并于妊娠 125 d 后经外科手术取出胎羊。尽管所有母羊注射了相同接种物,但慢性羊膜内感染后,在羊水和绒毛膜羊膜内检测到的脲原体存在显著差异。从绒毛膜羊膜(而不是羊水)中分离出的脲原体 23S rRNA 基因的结构域 V 中观察到许多多态性,导致镶嵌样序列形成。绒毛膜羊膜分离株还含有大环内酯类抗性基因 *erm(B)* 和 *msr(D)*,且与罗红霉素 MIC 有关。值得注意的是,这种变化与脲原体是否接触红霉素无关,表明低剂量红霉素不会诱导子宫内脲原体对大环内酯类药物的耐药。

4 生物膜形成与耐药性

解脲脲原体具有形成生物膜的能力,有研究提示其生物膜形成后药物敏感性下降。García-Castillo 等^[12]对 9 株具有生物膜形成能力的解脲脲原体进行研究,发现生物膜形成前后菌株的耐药性发生如下变化:红霉素 0% 对 44% (P=0.02),泰利霉素 22% 对 77% (P=0.02),环丙沙星 66% 对 100%,左氧氟沙星 0% 对 33%,四环素 0% 对 33%;所有菌株在生物膜形成前后均对克拉霉素敏感。Feng 等^[13]对 69 株解脲脲原体进行研究,发现 42 株为耐药株(同时耐环丙沙星和氧氟沙星),27 株为敏感株(对环丙沙星和氧氟沙星均敏感),且耐药菌比敏感菌产生更多生物膜(P<0.05)。研究发现,生物膜形成后 MIC 增加,代谢相关基因 *ureC* 表达增加(P<0.05),但喹诺酮类耐药相关基因 *gyrA* 的表达在生物膜形成前后无统计学差异。

也有研究显示,生物膜形成前后解脲脲原体的药物敏感性无统计学差异。Pandelidis 等^[22]检测来

自早产新生儿的 43 株临床分离株和 5 株 ATCC 菌株在生物膜形成前后的药物敏感性,发现生物膜形成前后阿奇霉素和红霉素的药物敏感性无统计学差异。阿奇霉素对解脲脲原体(T960)临床分离株的 MIC₅₀ 和 50% 最小生物膜形成抑制浓度(50% minimum biofilm inhibitory concentration, MBIC₅₀)高于微小脲原体,但支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD) 婴儿与非 BPD 婴儿的 MIC 或 MBIC 无差异。

5 药物敏感性与多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)

上述研究主要集中于对已知突变位点的检测,而 MLST 为研究解脲脲原体耐药株的分布提供了新的思路。为更好地了解解脲脲原体的分子流行病学和群体结构,Zhang 等^[23]开发了基于解脲脲原体 4 个管家基因(*ftsH*、*rPL22*、*valS*、*thrS*)的 MLST 方案,应用于药物敏感性菌株研究,并检测超流行谱系和致病株。Fernández 等^[15]使用针对 4 个管家基因的引物,对 46 株分离株[30 株微小脲原体和 16 株解脲脲原体(T960)]进行 MLST 分析,包括左氧氟沙星耐药分离株、所有携带 *tet(M)* 分离株,以及代表不同研究时期和样品来源的一组敏感分离株,利用 eBURST 软件建立克隆性并确定分离物之间的潜在关系。MLST 结果显示,30 株微小脲原体存在 14 个克隆群,属于同一克隆复合体(clonal complex, CC)且具有 3 个共有基因座的 ST1 和 ST56 是最常见的克隆群,分别有 6 株和 5 株。16 株解脲脲原体(T960)中存在 7 个谱,其中 ST47(5 株)和 ST9(3 株)属于同一 CC,且最为常见。eBURST 软件分析提示,有 3 个主要簇(I、II、III)和 1 个独立的不可分组的克隆群(两个分离物)存在。I 类群包括整个微小脲原体分离株,而解脲脲原体(T960)分离株大部分分布在 II 类和 III 类群,但该研究未观察到 ST 与微生物耐药性之间的相关性。目前,解脲脲原体药物敏感性与 MLST 相关研究仍较少,需更多研究来支持。

6 结语

解脲脲原体耐药性研究对指导临床用药及减少耐药性发生有重要意义,但目前研究方法和检验手段仍较为传统、局限,研究方案也仅停留在对前人实

验的重复。在完善耐药机制研究的基础上,如何实现对耐药株的快速鉴定,从而指导抗菌药物的合理选择等仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Shimada Y, Ito S, Mizutani K, Sugawara T, Seike K, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Yasuda M, Deguchi T. Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men [J]. Int J STD AIDS, 2014, 25(4): 294-298.
- [2] Deetjen P, Maurer C, Rank A, Berlis A, Schubert S, Hoffmann R. Brain abscess caused by *Ureaplasma urealyticum* in an adult patient [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 695-698.
- [3] Lal CV, Xu X, Jackson P, Atkinson TP, Faye-Petersen OM, Kandasamy J, Waites K, Biggio JR, Gaggar A, Ambalavanan N. *Ureaplasma* infection-mediated release of matrix metalloproteinase-9 and PGP: a novel mechanism of preterm rupture of membranes and chorioamnionitis [J]. Pediatr Res, 2017, 81(1-1): 75-79.
- [4] Stirling KM, Hussain N, Sanders MM, Campbell W. Association between maternal genital mycoplasma colonization and histologic chorioamnionitis in preterm births [J]. J Neonatal Perinatal Med, 2016, 9(2): 201-209.
- [5] Qian L, Bian GR, Li HB, Zhou Y, Dong SD, Wang WJ, Song J. Effects of *Ureaplasma urealyticum* infection on sperm quality and concentrations of nitric oxide and cytokine in the semen of infertile males [J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 75(6): 605-608.
- [6] Schneider SC, Tinguey R, Droz S, Hilty M, Donà V, Bodmer T, Endimiani A. Antibiotic susceptibility and sequence type distribution of *Ureaplasma* species isolated from genital samples in Switzerland [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10): 6026-6031.
- [7] Beeton ML, Chalker VJ, Kotecha S, Spiller OB. Comparison of full *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* gene sequences between all *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non-resistance polymorphism [J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64: 529-538.
- [8] Beeton ML, Chalker VJ, Maxwell NC, Kotecha S, Spiller OB. Concurrent titration and determination of antibiotic resistance in *Ureaplasma* species with identification of novel point mutations in genes associated with resistance [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(5): 2020-2027.
- [9] Beeton ML, Chalker VJ, Jones LC, Maxwell NC, Spiller OB. Antibiotic resistance among clinical *Ureaplasma* isolates recovered from neonates in England and Wales between

- 2007 and 2013 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(1): 52-56.
- [10] Duffy L, Glass J, Hall G, Avery R, Rackley R, Peterson S, Waites K. Fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma parvum* in the United States [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44 (4): 1590-1591.
- [11] Govender S, Gqunta K, le Roux M, de Villiers B, Chalkley LJ. Antibiotic susceptibilities and resistance genes of *Ureaplasma parvum* isolated in South Africa [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(12): 2821-2824.
- [12] García-Castillo M, Morosini MI, Gálvez M, Baquero F, del Campo R, Meseguer MA. Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among clinical *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(5): 1027-1030.
- [13] Feng C, Huang Y, Yu Y, Duan G, Dai Y, Dong K, Li Q. Effects on quinolone resistance due to the biofilm formation activity in *Ureaplasma urealyticum* [J]. *Turk J Med Sci*, 2015, 45(1): 55-59.
- [14] Kawai Y, Nakura Y, Wakimoto T, Nomiyama M, Tokuda T, Takayanagi T, Shiraishi J, Wasada K, Kitajima H, Fujita T, Nakayama M, Mitsuda N, Nakanishi I, Takeuchi M, Yanagihara I. In vitro activity of five quinolones and analysis of the quinolone resistance-determining regions of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates from perinatal patients in Japan [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(4): 2358-2364.
- [15] Fernández J, Karau MJ, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Patel R. Antimicrobial susceptibility and clonality of clinical *Ureaplasma* isolates in the United States [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60 (8): 4793-4798.
- [16] Xiao L, Crabb DM, Duffy LB, Paralanov V, Glass JI, Waites KB. Chromosomal mutations responsible for fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* species in the United States [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56 (5): 2780-2783.
- [17] Valentine-King MA, Brown MB. Antibacterial resistance in *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* isolates from urine cultures in college-aged females [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(10). pii: e01104-17.
- [18] Piccinelli G, Gargiulo F, Biscaro V, Caruso A, De Francesco MA. Analysis of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* serovars resistant to fluoroquinolones [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 47: 64-67.
- [19] Kotrotsiou T, Exindari M, Diza E, Gioula G, Melidou A, Malisiovas N. 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.
- [20] Mardassi BB, Aissani N, Moalla I, Dhahri D, Dridi A, Mlik B. Evidence for the predominance of a single *tet(M)* gene sequence type in tetracycline-resistant *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* isolates from Tunisian patients [J]. *J Med Microbiol*, 2012, 61(Pt 9): 1254-1261.
- [21] Dando SJ, Nitsos I, Polglase GR, Newnham JP, Jobe AH, Knox CL. *Ureaplasma parvum* undergoes selection in utero resulting in genetically diverse isolates colonizing the chorioamnion of fetal sheep [J]. *Biol Reprod*, 2014, 90 (2): 27. doi: 10.1095/biolreprod.113.113456.
- [22] Pandelidis K, McCarthy A, Chesko KL, Viscardi RM. Role of biofilm formation in *Ureaplasma* antibiotic susceptibility and development of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2013, 32(4): 394-398.
- [23] Zhang J, Kong Y, Feng Y, Huang J, Song T, Ruan Z, Song J, Jiang Y, Yu Y, Xie X. Development of a multilocus sequence typing scheme for *Ureaplasma* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(4): 537-544.

(收稿日期:2018-01-22)