

## • 临床检验研究论著 •

## 淋病奈瑟菌临床分离株对抗菌药物敏感性及 TEM-1 基因质粒分型研究\*

劳丽嫦<sup>1</sup>, 方镇强<sup>2</sup>, 吴文伟<sup>3</sup>, 郭灿星<sup>4△</sup>, 蒋敏慧<sup>4</sup>, 徐碧红<sup>4</sup>, 吴兴中<sup>5</sup>

(1. 广州市番禺区中心血站检验科 511400; 2. 广州市番禺区慢性病防治站皮肤科 511400; 3. 广州市番禺区石基人民医院检验科 511450; 4. 广州市番禺区慢性病防治站检验科 511400; 5. 广东省皮肤性病防治中心, 广州 510095)

**摘要:**目的 检测 2010~2011 年度本地区临床分离的淋病奈瑟菌流行株对青霉素、四环素、大观霉素、头孢曲松和环丙沙星的敏感性, 对质粒介导的产  $\beta$ -内酰胺酶淋球菌(PPNG)进行耐药质粒 TEM-1 基因分型。方法 采用琼脂稀释法测定菌株对 5 种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC), 判断敏感性按 WHO 西太区淋病奈瑟菌耐药性监测统一标准。用滤纸片酸度法检测 PPNG 菌株, 多重 PCR 方法鉴定  $\beta$ -内酰胺酶质粒并进行 TEM-1 基因分型。结果 150 株淋病奈瑟菌中检出 105 株对青霉素耐药(70%); 四环素和环丙沙星耐药率分别为 84% 和 98%; 未发现对大观霉素和头孢曲松耐药菌株, 但头孢曲松低敏率达到 48%(72/150); 青霉素、四环素和环丙沙星的 MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 均已超过耐药标准, 尤以青霉素和四环素为甚, 其 MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 均超过耐药标准的 2 倍和大于 32 倍。检出 PPNG 46 株, 阳性率为 30.7%, 耐药质粒 TEM-1 基因分型以亚洲型为主(91.3%, 42/46), 只有 4 株携带非洲型质粒。结论 淋病奈瑟菌对青霉素、四环素和环丙沙星耐药率较高, 对大观霉素和头孢曲松的敏感性较高, 可作为治疗的首选药物; TEM-1 基因质粒分型以亚洲型为主。

**关键词:** 奈瑟菌, 淋病; 抗药性, 微生物; TEM-1 基因型;  $\beta$ -内酰胺酶; 质粒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)15-1801-02

### In vitro susceptibility to 5 antimicrobial agents and TEM-1 Genotyping of clinical strains of *Neisseria gonorrhoeae*\*

Lao Lichang<sup>1</sup>, Fang Zhenqiang<sup>2</sup>, Wu Wenwei<sup>3</sup>, Guo Chixing<sup>4△</sup>, Jiang Minhui<sup>4</sup>, Xu Bihong<sup>4</sup>, Wu Xingzhong<sup>5</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Panyu Blood Centre, Guangzhou, Guangdong 511400, China; 2. Department of Dermatology, Chronic Disease Prevention and Control Stations of Panyu District, Guangzhou, Guangdong 511400, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Shiji People's Hospital of Panyu District, Guangzhou, Guangdong 511450, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Chronic Disease Prevention and Control Stations of Panyu District, Guangzhou, Guangdong 511400, China; 5. Dermatology and STD Prevention and Control Center, Guangzhou, Guangdong 510095, China)

**Abstract:** **Objective** To assess the in vitro susceptibility to 5 antimicrobial agents and TEM-1 genotypes of clinical strains of *Neisseria gonorrhoeae* (N. gonorrhoeae) isolated from this region from 2010 to 2011. **Methods** The agar dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) to 5 antibiotics, including penicillin G, tetracycline, ciprofloxacin, ceftriaxone and spectinomycin. The resistance of all strains to 5 antibiotics was interpreted according to criteria used in the project of surveillance of gonococcal antibiotic susceptibility in the WHO Western Pacific Region. Penicillinase ( $\beta$ -lactamase) producing N. gonorrhoeae (PPNG) was analyzed by the paper acidometric method. A multi-PCR was used to distinguish subtypes of TEM-1. **Results** 150 strains N. gonorrhoeae isolates, collected in this district, were studied. Penicillin-resistant rate was 70% (105/150). The prevalence of tetracycline- and ciprofloxacin-resistance was 84% and 98%, while none of strains appeared to be resistant to ceftriaxone and spectinomycin, respectively. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of penicillin, tetracycline and ciprofloxacin were significantly higher than resistant standards, especially 2 and over 32 times higher for penicillin and tetracycline. 46 (30.7%) strains were PPNG. Subtyping TEM-1 gene of  $\beta$ -lactamase plasmids of PPNG showed that 42 (91.3%) PPNGs carried the Asian-type plasmids, but only 4 African-type plasmids were found. **Conclusion** Resistance to penicillin, tetracycline and ciprofloxacin spread seriously in this district. Ceftriaxone and spectinomycin should be used as the first-line agents in treating gonorrhoea. The Asian-type  $\beta$ -lactamase plasmids in PPNG were dominated, while African-type plasmid was sporadic.

**Key words:** *Neisseria gonorrhoeae*; drug resistance, microbial; TEM-1 genotype;  $\beta$ -lactamases; plasmids

淋病是经典性病之一, 抗菌药物的选择是淋病治疗首先考虑的问题, 然而随着淋病奈瑟菌的耐药性的变化和耐药质粒流行株的播散, 临床选用抗菌药物显得日益重要。为了解本区 2010~2011 年度淋病奈瑟菌流行株的耐药性和产  $\beta$ -内酰胺酶淋球菌(PPNG)耐药质粒 TEM-1 基因分型情况, 对临床分离的 150 株淋病奈瑟菌流行株测定了 5 种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)和 PPNG 耐药质粒 TEM-1 基因分型的研究, 报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

**1.1.1 临床菌株** 150 株淋病奈瑟菌由广州市番禺区慢性病防治站性病门诊患者的泌尿生殖道分泌物中分离得到, 男性标本自尿道口内 3~4 cm 处, 女性由宫颈口内 1~2 cm 处取材, 接种于选择性培养基(TM), 所有菌株经革兰染色、氧化酶和过氧化氢酶试验及糖发酵试验确证后冻存备用。

**1.1.2 质控菌株** PPNG 阳性和阴性质控菌株(WHO J 和 WHO D 株), 由中国 CDC 性病艾滋病控制中心赠送。质粒分型标准质粒由加拿大 Jo-Anne R. D 教授赠送。

**1.2 抗菌药物** 大观霉素(普强公司, 商品名曲必星)、头孢曲

\* 基金项目: 广州市番禺区科技计划资助项目(2011-Z-03-74)。 △ 通讯作者, E-mail: star.008@163.com。

松(Roche 公司)、青霉素(SmithKline 公司)、四环素(Sigma 公司)和环丙沙星(Bayer Leverkusen 公司)等 5 种抗菌药物均为标准品,由中国 CDC 性病控制中心提供。

**1.3 培养基** GC 基础培养基(OXOID 公司)加入 10% 新鲜羊血。

**1.4 标准菌株** 6 株淋病奈瑟菌标准菌株 D、G、J、L 由中国疾病预防控制中心性病控制中心赠送,其中 D、G、L 株为产 β-内酰胺酶阴性菌株, J 株为产 β-内酰胺酶(PPNG)菌株。

**1.5 试剂及仪器** Taq DNA 聚合酶, 10 × Buffer、MgCl<sub>2</sub>、dNTP 等 PCR 试剂购自宝生生物工程(大连)有限公司。DNA 相对分子质量标准标记物购自立陶宛 Fermentas 公司。PCR 引物由上海 Invitrogen 生物工程公司合成。PCR 仪为美国 PEPKIN ELMER 公司产品,电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品,凝胶成像系统为法国 Bio-print 公司产品。

**2 方 法**

**2.1 菌株对抗菌药物敏感性测定** 采用 WHO 西太区淋病奈瑟菌耐药监测规划协作组推荐的琼脂稀释法测定 MIC<sup>[1]</sup>。先将各抗菌药物用适当的缓冲液溶解,配成溶液,再倍比稀释,各抗菌药物在培养基平皿上的最终浓度分别为:青霉素、四环素和环丙沙星均为 0.03~32 μg/mL,头孢曲松 0.001~1 μg/mL,大观霉素 0.5~128 μg/mL。试验菌株和标准菌株先在无选择性培养基(GC)上传代 2 次,用 16~18 h 的新鲜培养物制成 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> cfu/mL 的菌悬液,用多头接种器蘸取菌液接种于各抗菌药物琼脂平皿,经 35 °C 培养 24 h 观察结果,以能抑制淋病奈瑟菌生长的最小药物浓度为该药的 MIC。每批试验均由标准菌株作质控,按 WHO 西太平洋地区淋病奈瑟菌耐药监测项目推荐的标准判断药物敏感性<sup>[1]</sup>,并统计出 MIC<sub>50</sub> 和 MIC<sub>90</sub>。

**2.2 PPNG 测定** 采用纸片酸度法<sup>[2]</sup>。以标准菌株 J 株作为阳性对照,标准菌株 D 株为阴性对照。

**2.3 PCR 模版 DNA 的提取** 取 GC 培养基上纯培养 18h 淋球菌,用灭菌水配成菌悬液,浓度相当于 1 个麦氏单位,取该菌悬液 100 μL 离心去掉灭菌水,加入 50 μL 裂解液,100 °C 沸水浴 10 min,冷却后以 10 000 r/min 的速度在低温离心机中离心 5 min,上清液即为 DNA 模板,将上清液转移到一干净无菌微量离心管,-20 °C 保存备用。

**2.4 多重 PCR** 采用 Palmer 多重 PCR 方法测定 TEM-1 基因型<sup>[3]</sup>。引物包括 BL1:5'-TAC TCA ATC GGT AAT TGG CT-3',BL2:5'-CAC CTA TAA ATC TCG CAA GC-3',BL3:5'-CCA TAG TGT TGA GTA TTG CGA A-3',BL4:5'-TCA TTC GTG CGT TCT AGG A-3',其中亚洲型质粒引物对为 BL2+BL3,预期扩增产物为 958 bp,非洲型质粒引物对为 BL1+BL3,预期扩增产物为 1 191 bp,BL2+BL4 为多伦多型质粒引物对,预期扩增产物为 650 bp。反应总体积 25 μL,包括 Taq 酶(5U)0.125 μL,dNTP(2.5 μmol/L)2 μL,10 × PCR 缓冲液 2.5 μL,引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,模板 DNA 2 μL。PCR 反应条件:预变性 94 °C,3 min;变性 94 °C,15 s;退火 64 °C,15 s;延伸 72 °C,1 min;30 个循环。每批试验作阴性和阳性对照。PCR 扩增产物以 0.8% 琼脂糖凝胶中进行电泳后,紫外分析仪观察结果,最后用 BIO-PRINT 凝胶成像系统观察并照相。

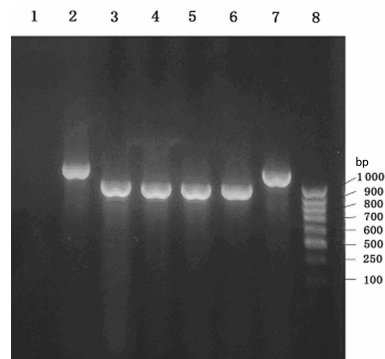
**2 结 果**

**2.1 MIC 测定结果** 青霉素耐药株为 105 株(70%),四环素和环丙沙星耐药率分别为 84% 和 98%,青霉素、四环素和环丙沙星的 MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 均已超过耐药标准。未发现对头孢曲松和大观霉素耐药株,头孢曲松低敏率为 48%(72/150)。详见表 1。

**2.2 PPNG 及其 TEM-1 基因质粒分型检测结果** 150 株淋病奈瑟菌共检出 46 株 PPNG,阳性率为 30.7%。对 46 株 PPNG TEM-1 基因质粒分型检测出 42 株携带亚洲型质粒,4 株携带非洲型质粒。见图。

表 1 150 株淋病奈瑟菌对 5 种抗菌药物的敏感性

抗菌药物	敏感性[n(%)]			MIC (μg/mL)		
	敏感	中敏	耐药	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC 范围
青霉素	2(1.3)	43(28.7)	105(70.0)	2	>32	<0.03~>32
四环素	24(16.0)	0(0.0)	126(84.0)	2	>32	0.125~>32
环丙沙星	2(1.3)	1(0.7)	147(98.0)	8	32	0.15~>32
头孢曲松	78(52.0)	72(48.0)	0(0.0)	0.03	0.125	<0.002~0.5
大观霉素	150(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	16	32	2~64



1:阴性对照;2:非洲型标准质粒 PJD5(1191bp);3:亚洲型标准质粒 PJD4(958bp);4~6:含亚洲型质粒 PPNG 临床分离株;7:含非洲型质粒 PPNG 临床分离株;8:标准参照物。

图 1 PPNG 株 β-内酰胺酶 TEM-1 质粒扩增产物琼脂糖凝胶电泳

**3 讨 论**

WHO 建议对淋病奈瑟菌耐药性监测的核心组抗菌药物有 5 种分别是:青霉素、四环素、大观霉素、头孢曲松和环丙沙星,并以该监测项目的方法和标准菌株作为质控菌株<sup>[1]</sup>。本次研究结果显示 5 种抗菌药物中,淋病奈瑟菌对环丙沙星的耐药率最高,达到 98%,与本地区 2009 年报道的环丙沙星的耐药率 99.1% 相似<sup>[4]</sup>,四环素的耐药率也达到了 84%,与本区近年的监测结果近似<sup>[4]</sup>。大观霉素和头孢曲松的敏感性最高,分别为 100% 和 52%,未发现有耐药株出现,与本区近年监测的结果相似<sup>[4]</sup>,但本次监测中头孢曲松低敏率达到 48%,与全国淋球菌耐药监测网监测的头孢曲松低敏率 47.42% 相似<sup>[5]</sup>,而美国淋球菌耐药监测项目(GISP)报道的头孢曲松低敏率只有 0.5%<sup>[6]</sup>,澳大利亚报道头孢曲松低敏率 1.1%<sup>[7]</sup>,面对如此严峻的情况,应引起足够重视,治疗时应注意剂量和疗效,防止头孢曲松耐药株在本地区出现,而日本东京在 2009 年从淋球菌咽炎患者中分离出 1 株对头孢曲松耐药淋球菌<sup>[8]</sup>。大观霉素的耐药株较为少见,据报道近年国内陕西和山东偶见有大观霉素耐药株出现,但其耐药率介于 1.97%~2.78%<sup>[5,9]</sup>,本区尚未发现大观霉素耐药株。提示大观霉素和头孢曲松这两种药物在本地区具有较好的敏感性,可作为治疗淋病奈瑟菌感染的首选药物,MIC 结果分析显示四环素和环丙沙星的 MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 分别超过耐药标准的 32 倍及大于 32 倍和 8 倍及大于 32 倍,比本区近年报道的四环素的 MIC<sub>50</sub> 提高了 1 倍<sup>[4]</sup>,MIC<sub>50</sub> 达到了 32 μg/mL,MIC<sub>90</sub> 高达大于 32 μg/mL。青霉素的 MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 也超过了耐药标准。提示青(下转第 1805 页)

组的 UmAlb/UCr、Scr 和 Urea 水平及阳性率均与正常妊娠组和健康对照组比较差异有统计学意义,而正常妊娠组和健康对照组比较差异无统计学意义。另外,通过对 GDM 组的 UmAlb/UCr、Scr 和 Urea 阳性率进行比较,发现 GDM 组的 UmAlb/UCr 阳性率高于 Scr 和 Urea 的阳性率。以上研究结果表明,随机尿 UmAlb/UCr 可作为 GDM 患者早期肾损伤的灵敏指标,肾功能评价的灵敏度优于传统的肾功能检查指标,可早期发现肾脏的微小病变。罗丽贞等<sup>[12]</sup>亦报道随机尿 UmAlb/UCr 对原发性高血压病患者早期肾损害的诊断具有较高灵敏度和临床实用价值。连续监测尿 UmAlb/UCr 对 GDM 的早期发现,早期治疗,有效减少母婴并发症,防止 GDM 发展为糖尿病肾病具有重要的临床价值,且该指标简单易行、安全无创伤、可靠方便,可为处于妊娠期的特殊患者提供很大的方便,值得临床推广使用。

参考文献

[1] 中华医学会妇产科学分会产科学组和中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病临床诊断与治疗指南(草案)[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 42(6): 426-428.  
 [1] American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus[J]. Diabetes Care, 2004, 27(Supl 1): 88-90.  
 [3] 杨慧霞, 魏玉梅, 孙伟杰. 妊娠期糖尿病诊断标准的新里程碑[J]. 中华围产医学杂志, 2010, 13(3): 177-180.  
 [4] International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel, Metzger BE, Gabbe SG, et al. International associa-

tion of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy[J]. Diabetes Care, 2010, 33(3): 676-682.  
 [5] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2011[J]. Diabetes Care, 2011, 24(Supl 1): 11-61.  
 [6] 杨慧霞. 推进循证依据在妊娠期糖尿病诊治实践中的应用[J]. 中华围产医学杂志, 2011, 14(4): 193-195.  
 [7] Hadar E, Oats J, Hod M. Towards new diagnostic criteria for diagnosing GDM-the HAPO study[J]. J Perinat Med, 2009, 37(5): 447-449.  
 [8] 孙伟杰, 杨慧霞. 妊娠合并糖代谢异常孕妇的妊娠结局分析[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 42(6): 377-381.  
 [9] 陈勇, 魏云, 刘前程, 等. 24 小时尿微量清蛋白和血清胱抑素 C 联合检测在糖尿病肾损伤早期诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 262-263.  
 [10] 陈燕, 赵敏, 张家红, 等. 尿微量蛋白检查对糖尿病早期肾损伤的诊断价值[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(9): 562-564.  
 [11] 刘明开, 李达, 刘日旭, 等. 随机尿样微量白蛋白/肌酐比值与 24h 尿白蛋白定量结果的对比研究[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2007, 21(3): 171-173.  
 [12] 罗丽贞, 张艳君, 刘春林. 胱抑素 C 与随机尿微量清蛋白/尿肌酐比值对原发性高血压病早期肾损害的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1515-1517.

(收稿日期: 2012-02-03)

(上接第 1802 页)

霉素、四环素和环丙沙星已不能作为治疗淋病的主要药物。大观霉素的 MIC<sub>90</sub> 为 16 μg/mL, 处在敏感范围, 头孢曲松的 MIC<sub>50</sub> 为 0.03 μg/mL 处在敏感范围, 提示这两种药物仍有较好的抗菌活性。

淋病奈瑟菌的耐药性主要由染色体和质粒介导, 但质粒介导引起的耐药更为严重。连续监测数据表明广州地区 PPNG 流行率从 2000 年的 17.1% 增加到 2008 年的 42.1%<sup>[10]</sup>, 本年度的 PPNG 检出率达到 30.7%, 比本区 2009 年报道的 24.3% 要高<sup>[4]</sup>, 提示本区 PPNG 流行率有升高的现象。而对 46 株 PPNG 进行 β-内酰胺酶 TEM-1 基因耐药质粒分型研究显示有 42 株 PPNG 携带亚洲型质粒, 占 91.3%, 非洲型质粒只有 4 株, 说明本区流行 PPNG 以携带亚洲型质粒为主, 国外的研究表明来自亚洲地区的 PPNG 流行株主要携带亚洲型质粒为主的结果相似<sup>[3]</sup>, 国内上海报道的 PPNG 流行株也是以亚洲型质粒为主<sup>[11]</sup>, 加拿大报道 59.9% PPNG 流行株携带非洲型质粒<sup>[12]</sup>。本区该年度 46 株 PPNG 流行株中的发现有 4 株 PPNG 携带非洲型耐药质粒, 与广州地区报道的 2000~2008 年 230 株 PPNG 中只发现 1 株非洲型质粒相比<sup>[10]</sup>, 似乎非洲型耐药质粒在本地区有进一步播散的现象。

参考文献

[1] World Health Organization. Sensitivity testing of Neisseria gonorrhoeae: methodologies for use by participants in the WHO Western Pacific Regional Surveillance Programme[S]. Geneva: WHO/WPR Regional Antimicrobial Surveillance Working Group Meeting Proceedings, 1992. 33.  
 [2] 叶顺章. 性传播疾病的实验室诊断[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 53.

[3] Palmer HM, Leeming JP, Turner A. A multiplex polymerase chain reaction to differentiate β-lactamase plasmids of Neisseria gonorrhoeae[J]. Antimicrob Chemother, 2000, 45(5): 777-782.  
 [4] 郭焱星, 李小婧, 郭廷学, 等. 淋球菌流行株对 5 种抗生素敏感性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6): 566-567.  
 [5] 韩燕, 尹跃平, 戴秀琼, 等. 2008 年中国淋球菌临床分离株耐药性的流行病学研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2011, 44(7): 472-475.  
 [6] Bolan GA, Sparling PF, Wasserheit JN, et al. The emerging threat of untreatable Gonococcal infection[J]. N Engl J Med, 2012, 366(9): 485-487.  
 [7] Australian Gonococcal Surveillance Programme, Tapsall J. Annual report of the Australian Gonococcal Surveillance Programme, 2008[J]. Commun Dis Intell, 2009, 33(3): 268-274.  
 [8] Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, et al. Is Neisseria gonorrhoeae initiating a future of untreatable gonorrhoea? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone[J]. Antimicrob Agents Chemother 2011, 55: 3538-3545.  
 [9] 初瑞雪, 孟卫东. 某地区淋球菌流行株耐药性及质粒图谱型研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 203-206.  
 [10] 吴兴中, 郑和平, 黄进梅, 等. 质粒介导的产 β-内酰胺酶淋球菌的检测及其 TEM-1 基因质粒分型[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(5): 363-365.  
 [11] 杨阳, 吴磊, 章楚光, 等. 上海地区淋球菌药物敏感性试验和耐药分子机制研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(10): 1173-1175.  
 [12] Martin I, Jayaraman G, Wong T, et al. Trends in antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae isolated in Canada: 2000-2009[J]. Sex Transm Dis, 2011, 38(10): 892-898.

(收稿日期: 2011-12-11)