·论　著·

广州地区淋球菌耐药性的趋势分析

黎小东，梁景耀，毕　超，李　平，梁艳华，林路洋，王焕丽，张锡宝，曹文苓△
（广州市皮肤病防治所检验科，广东广州 510095）

摘　要：目的　了解广州地区 13 年的产青霉素酶淋球菌（PPNG）和高水平耐四环素淋球菌（TRNG）的流行状况及对 5 种抗菌药物的耐药趋势。**方法**　用琼脂稀释法测定最低抑菌浓度（MIC）以及用纸片碘量法检测 β-内酰胺酶。**结果**　1 324 株淋球菌中，2000～2005 年度 PPNG 检出率占 23.5%（156/665），2008～2014 年度 PPNG 检出率占 36.4%（240/659），差异有统计学意义（$P<0.05$）。2000～2005 年度 TRNG 检出率占 33.4%（222/665），2008～2014 年度 TRNG 检出率占 42.6%（281/659），差异有统计学意义（$P<0.05$）。青霉素耐药率从 71.1%（473/665）升高至 87.1%（574/659），差异有统计学意义（$P<0.05$）；环丙沙星耐药率由 88.9%（591/665）升至 98.0%（646/659），差异有统计学意义（$P<0.05$）；头孢曲松中度敏感率从 12.3%（82/665）提升到 21.5%（142/659），差异有统计学意义（$P<0.05$）；大观霉素未发现耐药菌。**结论**　持续进行淋球菌耐药性监测非常重要，大观霉素在临床上可以作为治疗淋病的优选药物，具有良好疗效。

关键词：淋球菌；　最低抑菌浓度；　耐药性
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.017　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2016)04-0472-04

Trends of antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae isolated from Guangzhou

Li Xiaodong, Liang Jingyao, Bi Cao, Li Ping, Liang Yanhua, Lin Luyang, Wang Huanli, Zhang Xibao, Cao Wenling△
(*Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Institute of Dermatology, Guangzhou, Guangdong* 510095, *China*)

Abstract: Objective　To investigate, in the past thirteen years, the developing trends of resistance of Neisseria gonorrhoeae to 5 antibiotics and the prevalence of penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae (PPNG) and high level tetracycline resistant Neisseria gonorrhoeae (TRNG). **Methods**　Minimum inhibitory concentration (MIC) to ceftriaxone, spectiomycin, ciprofloxacin, and Penicillin were determined using the agar dilution method, and β-lactamase by paper iodine quantitative method. **Results**　A total of 1 324 Neisseria gonorrhoeae isolates were studied, including 665 samples from 2000 to 2005 and 659 samples from 2008 to 2014. Between 2000－2005 and 2008－2014, the rates of PPNG and TRNG isolates significantly increased from 23.5%(156/665) to 36.4%(240/659), the difference was statistically significant($P<0.05$) and from 33.4%(222/665) to 42.6%(281/659), the difference was statistically significant($P<0.05$) respectively. The proportion of resistant strains to penicillin remarkably rose from 71.1%(473/665) to 87.1%(574/659), the difference was statistically significant($P<0.05$). Like penicillin, the percentage of resistant strains to ciprofloxacin significantly increased from 88.9%(591/665) to 98.0%(646/659), the difference was statistically significant($P<0.05$). Intermediate susceptible isolates to ceftriaxone increased from 12.3%(82/665) to 21.5%(142/659), the difference was statistically significant($P<0.05$). No isolates resistant to spectinomycin were identified over the years. **Conclusion**　The study shows that it is important to strengthen the Neisseria gonorrhoeae surveillance of antimicrobial resistance as well as spectinomycin is successively as first drug of choice for treatment of Neisseria gonorrhoeae.

Key words: Neisseria gonorrhoeae;　minimal inhibitory concentration;　antimicrobial resistance

随着国内抗菌药物的大量使用和时间的推移，淋球菌对抗菌药物的耐药性也有所不同。本所统一采用了世界卫生组织（WHO）西太区淋球菌耐药监测规划推荐的琼脂稀释法和药物敏感性判断标准进行监测[1-2]。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　本所从性病门诊患者的泌尿生殖道分泌物中分离得到 1 324 株淋球菌，其中 2000～2005 年 665 株，2008～2014 年 659 株，所有菌株经革兰染色、氧化酶试验和糖发酵试验证实后，传代一次后洗于脱脂牛奶中，于－78 ℃低温冰箱冻存备用。抗菌药物：青霉素、环丙沙星、四环素、头孢曲松和大观霉素由中国疾病预防中心性病控制中心提供。培养基：淋球菌（GC）基础培养基（OXOID 公司生产）加入 10%脱纤维新鲜羊血。标准菌株：WHO 标准淋球菌菌株 A、B、C、D、E 由中国疾病预防中心性病控制中心提供。

1.2　方法

1.2.1　菌悬液制备　实验菌株和标准菌株用巧克力平板培养 18～24 h 的淋球菌菌苔，用生理盐水制成 10^7 CFU/mL 的菌悬液。

1.2.2　最低抑菌浓度（MIC）测定　采用 WHO 西太区淋球菌耐药监测规划推荐的琼脂稀释法，具体如下。（1）先将 5 种抗菌药物按要求配成原液，再倍比稀释成不同的浓度。青霉素和环丙沙星是 0.008～16 μg/mL 12 个浓度；四环素 16、8 μg/mL 两个浓度；头孢曲松 0.002～1 μg/mL 10 个浓度；大观霉素2～128 μg/mL 7 个浓度。（2）将 3.7%GC 基础琼脂高压灭菌，水浴冷却至 50 ℃，加入脱纤维新鲜羊血（终浓度 10%）。取 0.2 mL 倍比稀释好的 5 种抗菌药物工作液，加入 20 mL GC 血液

作者简介：黎小东，女，副主任技师，主要从事微生物学和免疫学研究。　△　通讯作者，E-mail：CLLaz@163.com。

基础培养基，混匀后倾倒平板。从低浓度至高浓度配制各种浓度的平板。用多头接种器将实验菌株和标准菌株菌悬液接种于各种浓度的平板，置 36 ℃、5% CO_2 环境下培养 36 h 后观察结果，记录无菌落生长的 MIC。以 WHO 的 A、B、C、D、E 标准菌株作质控。(3)WHO 在 2012 年对头孢曲松、大观霉素有了新的判断标准[3]，各药物判断标准如下：青霉素和环丙沙星小于或等于 0.03 μg/mL 判为敏感(S)，0.06～0.50 μg/mL 判为中度敏感(D)，≥1 μg/mL 判为耐药(R)；头孢曲松 MIC＜0.125 μg/mL 敏感，MIC≥0.125 μg/mL 中度敏感，大观霉素 MIC≤64 μg/mL 敏感，MIC≥128 μg/mL 耐药。产青霉素酶淋球菌(PPNG)是 β-内酰胺酶阳性和耐四环素淋球菌(TRNG)是四环素 MIC≤16 μg/mL。

1.2.3 β-内酰胺酶测定　采用纸片碘量法测定菌株的 β-内酰胺酶，具体如下。取 1 试管加入 100 μL 青霉素溶液(10 000 U/mL)，100 μL 淀粉溶液(1%)，50 μL 碘试剂，呈蓝色混合物，在一滤纸条上滴 50 μL 试剂，将一接种环培养物涂在蓝点上，放置 1～2 min，如蓝色变成无色即为 β-内酰胺酶阳性，颜色无变化则为阴性。每次试验以 WHO E 株作阳性对照，A 株作阴性对照。

1.3 统计学处理　采用 SPSS17.0 进行统计学分析，计数资料比较采用 χ^2 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

1 324 株淋球菌中，2000～2005 年度 PPNG 检出率占 23.5%(156/665)，2008～2014 年度 PPNG 检出率占 36.4%(240/659)，两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。2000～2005 年度 TRNG 检出率占 33.4%(222/665)，2008～2014 年度 TRNG 检出率占 42.6%(281/659)，两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。青霉素耐药率从 71.1%(473/665)升高至 87.1%(574/659)；环丙沙星耐药率由 88.9%(591/665)升至 98.0%(646/659)；头孢曲松中度敏感率从 12.3%(82/665)提升到 21.5%(142/659)，差异有统计学意义($P<0.05$)；大观霉素未发现耐药菌，详见表 1。

表 1　2000～2005 年和 2008～2014 年淋球菌的药敏结果

年度(年)	菌株(*n*)	头孢曲松				大观霉素		
		S(*n*)	D(*n*)	MIC_{50}(μg/mL)	MIC_{90}(μg/mL)	S(*n*)	MIC_{50}(μg/mL)	MIC_{90}(μg/mL)
2000	100	87	13	0.03	0.13	100	16	16
2001	112	103	9	0.02	0.06	112	16	16
2002	100	90	10	0.03	0.06	100	16	32
2003	116	103	13	0.03	0.13	116	16	16
2004	127	113	14	0.03	0.13	127	16	32
2005	110	87	23	0.06	0.13	110	32	32
2000～2005	665	583	82	0.03	0.13	665	16	32
2008	74	59	15	0.06	0.13	74	8	16
2009	88	68	20	0.06	0.25	88	16	32
2010	83	66	17	0.02	0.25	83	16	64
2011	114	79	35	0.06	0.13	114	16	32
2012	100	76	24	0.06	0.13	100	16	32
2013	100	88	12	0.03	0.13	100	16	32
2014	100	81	19	0.06	0.13	100	16	32
2008～2014	659	517	142	0.06	0.13	659	16	32

续表 1　2000～2005 年和 2008～2014 年淋球菌的药敏结果

年度(年)	菌株(*n*)	环丙沙星					青霉素					PPNG(*n*)	TRNG(*n*)
		S(*n*)	D(*n*)	R(*n*)	MIC_{50}(μg/mL)	MIC_{90}(μg/mL)	S(*n*)	D(*n*)	R(*n*)	MIC_{50}(μg/mL)	MIC_{90}(μg/mL)		
2000	100	4	23	73	2	8	8	49	43	1	32	21	17
2001	112	3	29	80	2	8	0	52	60	2	32	15	20
2002	100	0	2	98	8	32	0	38	62	2	32	15	28
2003	116	0	8	108	4	16	0	25	91	4	32	30	36
2004	127	0	1	126	8	16	0	13	114	4	32	37	65
2005	110	0	4	106	8	32	0	7	103	4	32	38	56
2000～2005	665	7	67	591	4	16	8	184	473	4	32	156	222

续表 1　2000～2005 年和 2008～2014 年淋球菌的药敏结果

年度(年)	菌株(n)	环丙沙星					青霉素					PPNG (n)	TRNG (n)
		S(n)	D(n)	R(n)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	S(n)	D(n)	R(n)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)		
2008	74	0	2	72	8	16	0	15	59	8	32	31	19
2009	88	1	0	87	16	32	0	8	80	8	32	34	51
2010	83	1	0	82	16	32	0	6	77	8	32	24	50
2011	114	1	1	112	8	32	0	10	104	4	32	59	46
2012	100	0	3	97	8	32	0	5	95	8	32	33	46
2013	100	0	2	98	8	32	0	7	93	4	32	33	40
2014	100	0	2	98	8	32	1	7	66	4	32	26	29
2008～2014	659	3	10	646	8	32	1	58	574	8	32	240	281

3　讨　　论

淋球菌耐药性因时间和地区的不同而有所变化。本单位从 1998 年加入了中国区域的淋球菌耐药监测网，连续十几年收集菌株，按规定时间统一进行 MIC 测定。表 1 中 2000～2005 年度对青霉素的耐药率与 2008～2014 年度对青霉素的耐药率比较，差异有统计学意义（$\chi^2=51.0$，$P<0.05$），与广州[3]、上海[4]、南京[5]等相关报道类似；而且从 2001 年开始，没有发现对青霉素敏感的菌株，2014 年偶然出现 1 株敏感株。近几十年来，世界各地出现了越来越多对青霉素和四环素的耐药菌株，该药物已经不再作为治疗淋病的首选药物，但是 PPNG/TRNG 仍然作为淋球菌耐药监测的主要指标。从本研究结果显示，2008～2014 年度 PPNG 检出率 36.4%和 TRNG 检出率 42.6%，较本单位于 1998 年淋球菌耐药监测的 PPNG 3.2%和 TRNG 1.6%上升了接近 11.3 倍以上[6]。2000～2005 年度 PPNG 23.5%和 TRNG 33.4%与 2008～2014 年度比较差异有统计学意义（$\chi^2=26.5$，$\chi^2=12.0$，$P<0.05$），与广州相关报道一致，1999～2001 年 PPNG 从 2%广泛迅速地升到 21.8%[3]；上海地区 PPNG 37.8%和 TRNG 20.1%[4]。类似报道还有南京地区 PPNG 从 8.0%～44.4%和 TRNG 从 8%～32.8%[5]。而韩国 PPNG 从 2000 年 64%下降到 2006 年 21%，同时 TRNG 则从 3%上升到 9%[7]。2000～2009 年加拿大 PPNG 从 3.0%上升到 9.0%，TRNG 从 3.4%下降到 1.6%，呈递减趋势[8]。这些全球不同地域的不同变化，是否与临床有效的诊断、有效的抗菌药物治疗及性活动、性行为的变化有关系，有待进一步研究，从而提示了对青霉素、四环素进行追踪监测有重大意义。

十九世纪八十年代后期，喹诺酮类是治疗淋病的首选药物，但近二十多年，一些国家耐喹诺酮类药物的淋球菌株急剧出现。本次监测结果显示从 2002 年开始对环丙沙星耐药率高达 93%以上，2000～2005 年度从 88.9%升至 2008～2014 年度的 98.0%，差异有统计学意义（$P<0.05$），耐药性非常高（$MIC_{50}\geqslant 8$ μg/mL 和 $MIC_{90}\geqslant 32$ μg/mL）。随时间推移，有连续报道中国的其他地方对环丙沙星耐药率有类似的增高[4-5]，因此，目前中国，环丙沙星不再作为治疗淋病的推荐药物，临床多数用第三代头孢菌素类治疗淋病。

与青霉素和环丙沙星对比，表中两个阶段没有发现对大观霉素耐药（MIC≥128 μg/mL）的菌株。在大观霉素敏感判断点 MIC（64 μg/mL）附近，2000～2005 年度没有出现淋球菌菌株，而 2008～2014 年度首次发现菌株 40/559（7.2%该菌株在敏感范围），预示着对大观霉素持续药物监测十分重要。尽管 80 年代中期，淋球菌对大观霉素的耐药菌株非常稀少，但一些国家还是有报道分离出少数耐药菌株，如 1990～1998 年的哥伦比亚、委内瑞拉[9]，2000 年的越南、韩国和巴布亚新几内亚[10]，中国的广州（2/793）和南京（8/1 208）也有少数耐大观霉素药物的菌株报道[3-5]。WHO 认为，当一种药物的耐药率超过 5%时，该药物就不应该作为治疗该病的一线药物。然而，尽管中国及其他国家偶然检测到大观霉素耐药菌株，大观霉素仍然是有效药物，继续作为广州地区初次治疗淋病的首选药物，也是头孢菌素过敏患者治疗淋病的选择药物[11]。

中国没有报道头孢曲松临床治疗失效的案例，但头孢曲松 MIC_{50}、MIC_{90} 逐年增高，一些国家已经提出了一个重大的公共卫生问题——无法治愈淋病（“超级淋病”）。本资料显示头孢曲松 MIC_{50}（0.015 6～0.062 5 μg/mL）和 MIC_{90}（0.062 5～0.250 0 μg/mL）差异不明显，活性较强。头孢曲松的中度敏感率和 MIC_{50}、MIC_{90} 一样，都是值得关注的，中度敏感（MIC≥0.125 μg/mL）菌株，从 2000～2005 年度 12.3%增至 2008～2014 年度 21.5%，经 χ^2 检验，差异有统计学意义（$\chi^2=20.0$，$P<0.05$）。头孢曲松中度敏感率与上海的分析结果相似 11.9%[4]，但低于南京最近的报道 32.9%[12]。此外，在2000～2005 年值得关注的是对头孢曲松中度敏感的菌株已经超过 5%，而 2008～2014 年度头孢曲松 MIC 0.5 μg/mL 首次检测分离出 6/559，提示了头孢曲松 MIC 值不断上升及广州地区淋球菌对头孢曲松可能耐药。一些国家建议加大头孢曲松的肌注剂量，以减缓淋球菌的头孢菌素耐药菌株扩散[13]。2007 年，中国推荐使用单剂量 250 mg 头孢曲松进行肌肉注射作为淋病的首选治疗；借鉴国际组织指导方针建议和中国南京一样[12]，广州治疗淋病使用较高剂量（≥500 mg）头孢曲松肌注。

总之，广州地区淋球菌对青霉素和环丙沙星耐药，从 2000～2005 年度到 2008～2014 年度，耐药（PPNG 和 TRNG）迅速增加，没有发现头孢曲松耐药菌株，但对头孢曲松（MIC≥0.5 μg/mL）和大观霉素（MIC≥64 μg/mL）的高水平 MIC 值在第二年度首次出现，与海南地区类似[14]。（下转第 477 页）

在婴幼儿感染中可以造成黄疸、肝功能受损、肝脾肿大、肺炎、瘀斑等,还可表现为局限的感染,在孕妇感染中可导致流产、早产或者引起胎儿生长发育迟缓等[3,9]。本研究表 2 的结果显示,在 1 520 例婴幼儿中,诊断为肝炎综合征的患儿中,HCMV-DNA 阳性率最高,HCMV-IgM 阳性率也最高,出现黄疸症状的、肺部感染症状 HCMV-DNA 阳性率也较高,此时 HCMV-IgM 未见阳性。表明 HCMV 更容易侵犯肝脏和肺脏。表 3 的结果表明 HCMV 在婴幼儿感染中,与婴幼儿的性别无关。

综上所述,结合本研究的结果,由于 HCMV 具有嗜上皮细胞的特性,容易感染肾脏上皮细胞,在尿标本中容易检出 HCMV-DNA[10],加上尿液标本取材方便、对新生儿无损伤性,更为家长所接受,因此,笔者认为进行尿 HCMV-DNA 检测比进行 HCMV-IgM 抗体检测来判断是否感染 HCMV 更具有快速、准确、可靠、便捷的优势。当新生儿出现肝炎综合征、黄疸症状、肺部感染症状等其他症状时,尤其是当出现肝功能受损排除乙肝、丙肝、甲肝、丁肝等肝炎病毒,以及肺部感染排除一般微生物、支衣原体、呼吸道病毒后,也应当提示临床进行尿 HCMV-DNA 检验以排除巨细胞感染的可能性,而不能只依靠 HCMV-IgM 抗体的检测结果来判断。至于是否在孕期也进行孕妇尿 HCMV-DNA 检测或者增加孕期 HCMV-IgM 检测频率来预测新生儿巨细胞感染,以及对于新生儿 HCMV-IgM 抗体阴性者经过 2 周至 1 个月的时间,其 HCMV-IgM 的阳性检出率是否会增加来辅助诊断新生儿巨细胞感染,还有待进一步调查研究。

参考文献

[1] Syggelou A,Iacovidou N,Kloudas S,et al. Congenital cytomegalovims infection[J]. Ann N Y Acad Sci,2010,120(2):144-147.

[2] 胡艳,陈黎,舒静,等. 婴儿巨细胞病毒性肝炎 88 例[J]. 实用儿科临床杂志,2009,24(19):1497.

[3] 尚世强,陶然. 儿童巨细胞病毒感染的诊断[J]. 实用儿科临床杂志,2006,21(22):1598-1600.

[4] Hamele M,Flanagan R,Loomis CA,et al. Severe morbidity and mortality with breast milk associated cytomegalovirus infection [J]. Pediatric Infect Dis J,2012,9(1):84-86.

[5] 吴碧林. 婴儿肝炎综合征 85 例病原学及临床分析[J]. 中华现代儿科学杂志,2007,4(3):228-229.

[6] 中华医学会儿科学分会感染消化学组,中华儿科杂志编委会. 巨细胞病毒感染诊断方案[J]. 中华儿科杂志,1999,37(7):441.

[7] 徐锦,陈剑平,丁韵珍,等. 尿巨细胞病毒定量检测在巨细胞病毒感染诊断中的意义[J]. 实用儿科临床杂志,2006,21(10):596-597.

[8] 陈均亚,李素华,陈益平,等. 甲泼尼龙冲击治疗小儿麻疹并重症肺炎的临床观察[J]. 中国小儿急救医学,2006,13(6):520-521.

[9] 黄绮梨,朱锋,方仲文. 孕妇血清巨细胞病毒负荷量与胎儿宫内感染研[J]. 检验医学与临床,2008,5(16):986-989.

[10] 缪芙华,邵雪君,朱宏,等. 婴幼儿人巨细胞病毒感染 154 例 PCR 与 ELISA 检测比较[J]. 南通医学院学报,2009,29(6):447-448.

(收稿日期:2015-10-18)

(上接第 474 页)

大观霉素活性仍然最强,具有良好临床疗效,可以作为治疗淋病的优选药物,因此,加强淋球菌耐药性的长期监测非常重要。

参考文献

[1] 曹文苓,费实,武明昌,等. 广州地区淋球菌对抗生素耐药性测定结果[J]. 临床皮肤科杂志,1999,4(28):223-224.

[2] Cao WL,Liang JY,Li XD,et al. Trends in antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae isolated from Guangzhou,China,2000 to 2005 and 2008 to 2013[J]. Sexually Transmitted Diseases,2015,42(1):27-29.

[3] 刁兴,郑和平,曹文苓,等. 1996～2001 年广州淋球菌耐药性和质粒介导耐药株流行趋势[J]. 中华皮肤科杂志,2002,35(6):467-469.

[4] Yang Y,Liao M,Gu WM,et al. Antimicrobial susceptibility and molecular determinants of quinolone resistance in Neisseria gonorrhoeae isolates from Shanghai[J]. J Antimicrob Chemother,2006,58(1):868-872.

[5] Su X,Jiang F. Surveillance of antimicrobial susceptibilities in Neisseria gonorrhoeae in Nanjing,China,1999－2006[J]. Sex Transm Dis,2007,34(1):995-999.

[6] 曹文苓,黎小东,李嘉彦,等. 淋球菌对五种抗生素的耐药性连续六年监测结果分析[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(1):761-763.

[7] Lee H,Hong SG,Soe Y,et al. Trends in antimicrobial resistance of Neisseria gonorrhoeae isolated from Korean patients from 2000 to 2006[J]. Sex Transm Dis,2011,38(1):1082-1086.

[8] Martin I,Sawatzky P,Allen V,et al. Emergence and characterization of Neisseria gonorrhoeae isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone and cefixime in Canada:2001－2010[J]. Sex Transm Dis,2012,39(1):316-323.

[9] Dillon JR,Ruben M,Li H,et al. Challenges in the control of gonorrhea in South America and the Caribbean:monitoring the development of resistance to antibiotics[J]. Sex Transm Dis,2006,33(1):87-95.

[10] The WHO Western Pacific Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. Survemance of antibiotic resistance in Neisseria gonorrhoeae in the WHO Western Pacific Region,2000[J]. Commun Dis Intell,2001,25(4):274-276.

[11] Bignell C,Fitz GM. UK national guideline for the management of gonorrhea in adults J]. STD AIDS,2011,22(10):541-547.

[12] Zhu BY,Yu RX,Yin Y,et al. Surveillance of antimicrobial susceptibilities of Neisseria gonorrhoeae in Nanning,China,2000 to 2012[J]. Sex Transm Dis,2014,41(1):501-506.

[13] Unemo M,Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant,extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea[J]. Future Microbiol,2012,7(1):1401-1422.

[14] 钟娜,郑文爱,王芳乾,等. 2006～2011 年海南地区淋球菌耐药性监测分析[J]. 中国皮肤性病学杂志,2013,27(1):64-65.

(收稿日期:2015-10-28)