

• 临床检验研究 •

某地区淋球菌流行株耐药性及质粒谱型研究

初瑞雪, 孟卫东

(山东省聊城市人民医院 252000)

摘要:目的 检测该地区淋病奈瑟菌(NG)临床分离株的耐药性和质粒谱型,为临床合理用药和连续监测 NG 耐药性动态改变提供参考。方法 从本院门诊淋病患者分泌物中分离 NG 菌株,检测其对常用治疗药物的最小抑菌浓度、是否产青霉素酶,提取并分析质粒谱型。结果 分离获得 52 株 NG,其中产青霉素酶 17 株(32.69%),四环素耐药 15 株(28.85%),环丙沙星耐药 51 株(98.08%),大观霉素耐药 1 株(1.92%),未发现头孢曲松钠耐药株;45 株(86.54%)检出 4 种质粒,6 种质粒谱型。结论 大观霉素和头孢曲松钠可作为该地区淋病治疗首选用药;该地区 NG 耐药性以质粒介导耐药为主。了解质粒谱型变化有助于对流行株进行跟踪和从分子水平上为流行病学研究提供信息。

关键词:抗菌药; 抗药性,细菌; 微生物敏感性试验; 质粒; 质粒图谱; 奈瑟氏淋球菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)02-0203-02

The Research on the Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of Neisseria Gonorrhoeae in Liaocheng

Chu Ruixue, Meng Weidong

(Liaocheng People's Hospital, Shandong 252000, China)

Abstract: Objective To analyse the resistance of Neisseria gonorrhoeae(NG) to commonly used antibiotics and related plasmids profiles, to provide reference for rational drug use and continuous monitoring of dynamic changes of their drug resistance. **Methods** NG strains were isolated from clinical patients with gonorrhoeae. Minimal inhibitory concentration, penicillinase and plasmids profiles were detected. **Results** 52 strains of NG were collected, among which there were 17(32.69%) producing penicillinase, 15(28.85%) resistant to tetracycline, 51(98.08%) resistant to ciprofloxacin and 1(1.92%) resistant to spectinomycin and not any strain resistance to ceftriaxone. 4 kinds of plasmids and 6 of plasmids profiles were detected in 45(86.54%) strains. **Conclusion** Ceftriaxone and spectinomycin could be the first choice for the therapy of gonorrhoeae. Most of drug resistance of NG in Liaocheng were mediated by plasmid. Plasmid profiles detection is helpful for the research of prevailing strains and epidemiologic study.

Key words: anti-bacterial agents; drug resistance, bacterial; microbial sensitivity tests; plasmids; plasmid profiles; neisseria gonorrhoeae

淋病是由淋病奈瑟菌(NG)引起的常见性传播疾病之一,常为黏膜感染,主要包括男性尿道炎和女性宫颈炎。青霉素曾是治疗淋病首选药物,但随着青霉素广泛应用,NG对青霉素出现低水平耐药且耐药程度渐增。近年来由于抗菌剂的滥用和错用,尤其是不规则用药导致 NG 耐药性不断升高,加重了治疗难度,引起疾病流行。笔者对临床分离 NG 菌株进行了耐药检测与质粒谱型分析,以探讨二者相关性。结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 (1)临床菌株:52 株 NG 分离自本院性病门诊 2009 年 1~12 月确诊的淋病患者尿道或宫颈脓性分泌物。临床标本采集后 30 min 内接种于 TM 培养基,培养并分离菌株。所有菌株均经形态学检查、氧化酶试验、糖发酵试验确定。(2)标准菌株:世界卫生组织 A、B、E、J 标准 NG 菌株,其中菌株 A 为产青霉素酶 NG(PPNG),E、J 为非产青霉素酶菌株(non-PPNG);标准菌株由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 主要试剂 青霉素、四环素、大观霉素、头孢曲松钠、环丙沙星标准粉剂由中国医学科学院南京皮研所提供;GC 琼脂为 OXOID 公司产品;质粒提取试剂盒 E. Z. N. A. TM Plasmid Mini Kit I 为 OMEGA 公司产品。

1.3 最小抑菌浓度(MIC)测定 将各抗菌剂稀释成不同浓

度,取 15 μ L 抗菌剂与未凝固培养基混匀,培养基凝固后即含有不同浓度抗菌剂的培养基;将浓度为 10^4 /mL 的菌悬液接种于培养基,35~36 $^{\circ}$ C,5%~10% CO_2 条件下培养 18~24 h,观察结果。以标准菌株作为质控菌株。

1.4 青霉素酶测定 将一小片滤纸用 PPNG 测试液浸湿,用接种环挑取单个菌落并涂于滤纸上,35 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,滤纸颜色由紫色变为黄色者为 PPNG,不变色者为 non-PPNG。

1.5 质粒提取及质粒谱型分析 质粒提取按试剂盒说明书进行;以凝胶电泳的方法分离质粒条带并成像,应用 Photoshop 软件测量不同条带距加样孔的距离,条带泳动距离与质粒相对分子量的对数存在线性关系,根据标准质粒电泳结果制备线性回归方程,并计算质粒标本条带所对应的相对分子质量。

1.6 耐药结果判读 按《全国临床检验操作规程》(3 版)药敏试验判断标准判读耐药结果。

1.7 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理。

2 结 果

2.1 MIC 检测结果 见表 1。

2.2 抗菌剂敏感性检测结果 见表 2。

2.3 质粒谱型检测结果 见表 3。

表 1 52 株 NG 对 4 种抗菌剂 MIC 检测结果 (n)

淋球菌 MIC(μg/mL)	0.004	0.0078	0.0156	0.0312	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
四环素	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	15	0	0	0
大观霉素	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	16	26	7	0	0
头孢曲松钠	3	7	13	13	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
环丙沙星	—	0	0	0	0	0	1	1	8	18	25	0	0	0	0	0

注：“—”表示无数据。

表 2 52 株 NG 对 5 种抗菌剂敏感性检测结果 [n(%)]

抗菌剂	敏感	中敏	耐药	阳性	阴性
青霉素	—	—	—	17(32.69)	35(67.31)
四环素	—	—	—	15(28.85)	37(71.15)
环丙沙星	0(0.00)	1(1.92)	51(98.08)	—	—
大观霉素	52(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	—	—
头孢曲松钠	36(69.23)	16(30.77)	0(0.00)	—	—

注：“阳性”及“阴性”表示相关耐药基因阳性或阴性；“—”为无数据。

表 3 52 株 NG 质粒谱型检测结果

质粒谱型(kb)	菌株数(n)	构成比(%)
无	7	13.46
4.2 kb	2	3.85
(7.4+42.5)kb	3	5.77
(4.2+7.4)kb	16	30.77
(4.2+7.4+42.5)kb	13	25.00
(7.4+39.2+42.5)kb	8	15.38
(4.2+42.5)kb	3	5.77
合计	52	100.00

3 讨 论

随着淋病不断流行和抗菌剂的广泛使用,NG 耐药性不断发生变化^[1],并逐年增加。NG 染色体水平转移的唯一机制是转化,不依赖于任何可溶性感受态因子,且 NG 仅摄取种属特异性 DNA 完成转化;NG 的 IV 型分泌系统与细菌转化有关,可促进抗原变异和耐药性传播^[2]。NG 对青霉素和四环素的耐药性由耐药质粒介导,且耐药质粒可在不同菌属间进行交换,导致耐药性在不同菌株、不同种属间传递,引起耐药性流行^[3]。NG 因可分泌青霉素酶而对青霉素产生耐药,而对四环素的耐药主要有质粒介导和染色体介导两种。带有 *tem* 决定簇的 25.2 MD 质粒导致 NG 对四环素耐药, *mtr*, *penB* 和 *tet* 基因若同时突变则导致对四环素高水平耐药。引起 NG 对喹诺酮类药物耐药的主要机制为药物作用靶位点突变, *gyrA* 或 *pa1C* 基因突变导致靶位点 A 亚基或 *pa1C* 亚基发生改变,与药物结合的能力降低,从而引起耐药^[4]。

本研究结果中 NG 对青霉素、四环素和环丙沙星的耐药率与其他研究报道各不相同^[5-12]。在多数地区 NG 对青霉素和四环素都已产生严重耐药性,二者已不能作为一线用药使用;对环丙沙星的耐药性各地区差异较大,可能与 NG 在各地因流行时间不同导致菌株变异不同和各地临床用药习惯不同有关。本研究显示,环丙沙星已不能作为本地区淋病治疗用药。本地区 NG 对大观霉素和头孢曲松钠的敏感性分别为 100.00% 和 69.23%,与文献报道基本一致^[5,13-16],因此,大观

霉素和头孢曲松钠仍可作为部分地区治疗淋病的首选药物。

细菌耐药性通常与其携带质粒或染色体所编码耐药基因有关^[3]。NG 所携带质粒按相对分子量分 3 类:(1)2.6 MD, 4.2 kb 隐蔽质粒。(2)24.5 MD, 39.2 kb 结合(或传递)质粒。(3)3.2~3.4 MD(非洲型), 5.4 kb 和 4.4~4.7 MD(亚洲型), 7.4 kb 耐青霉素质粒; 25.2 MD, 42.5 kb 耐四环素质粒。本研究共检出 4 种质粒(4.2 kb, 7.4 kb, 42.5 kb 和 39.2 kb),总检出率 86.54%, 4 种不同质粒及不同谱型检出率与王德霞等^[17]报道结果各不相同; 16 例 PPNG 菌株中有 13 例检出 7.4 kb 质粒, 15 例耐四环素 NG 菌株中有 12 例检出 42.5 kb 质粒,说明本地区 NG 对青霉素和四环素的耐药以质粒诱导耐药为主;另有 34 例菌株携带 4.2 kb 质粒,其意义尚待进一步研究。

加强临床菌株耐药性研究,根据细菌耐药情况及耐药原因针对性指导临床合理用药,有利于减少耐药性菌株流行;不同地区、不同时期 NG 质粒谱型有其各自的特点,了解其变化有助于区别流行株和对耐药菌株进行跟踪,从分子水平上为菌株流行病学研究提供客观可靠的信息。

参 考 文 献

- [1] 张铁军,周晓明,张颖华,等. 上海地区淋球菌临床分离株对不同抗生素的敏感性分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(4): 226-228.
- [2] 崔海燕,王欣. 淋病奈瑟菌毒力岛的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(7): 622-624.
- [3] 张铁军,姜庆五,张涛,等. 淋球菌耐药性质粒的转移性研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(1): 23-25.
- [4] 夏威为,刘超,陈建国. 淋病奈瑟菌耐药机制研究进展[J]. 河南预防医学杂志, 2008, 19(5): 327-328.
- [5] 曹文苓,黎小东,毕超,等. 广州地区 74 株淋球菌耐药性结果分析[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(6): 553-554.
- [6] 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, 570.
- [7] 朱邦勇,李伟,黄培勇,等. 淋球菌耐药监测的流行病学研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2009, 25(1): 32-34.
- [8] 马一婷,宋矿余,王辉. 深圳地区淋球菌营养分型和抗生素耐药性的研究[J]. 中国医药指南, 2009, 7(13): 13, 64.
- [9] Djajakusumah T, Sudigdoadi S, Meheus A, et al. Plasmid patterns and antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Bandung, Indonesia[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998, 92(1): 105-107.
- [10] Adegbola RA, Sabally S, Corrah T, et al. Increasing prevalence of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* and emergence of high level plasmid mediated tetracycline resistance among gonococcal isolates in the Gambia[J]. Trop Med Int Health, 1997, 2(5): 428-432.

表 2 2 774 例泌尿生殖道支原体对 12 种
抗菌剂敏感性测试结果 (%)

抗菌剂	敏感	中介	耐药
四环素 (TET)	47.56	20.36	32.08
氧氟沙星 (OFL)	24.34	36.30	39.36
红霉素 (ERY)	7.25	30.33	60.13
强力霉素 (DOX)	85.38	7.88	7.74
交沙霉素 (TOS)	79.65	11.97	8.38
司帕沙星 (SPA)	39.28	23.33	37.39
罗红霉素 (ROX)	28.1	28.90	43.00
美满霉素 (MIN)	89.75	4.96	5.29
左氧氟沙星 (LEV)	46.71	18.61	34.68
克拉霉素 (CLA)	82.09	8.89	9.02
阿奇霉素 (AZI)	35.08	16.18	48.74
诺氟沙星 (NOR)	5.14	12.11	82.75

3 讨 论

支原体是能自行繁殖的最小原核生物,1937 年 Dienes 等从一女性患者巴氏腺脓肿部位分离到 Mh。1954 年 Shepard 首次从非淋菌性尿道炎患者的尿道分泌物中分离获得 Uu^[1]。“支原体培养+药敏”试验现今已成为医生诊断和治疗支原体感染的常规检测项目。本组检测的泌尿生殖道支原体感染率达 45.1%,与相关报道接近(46.5%);女性感染率(74.9%)高于男性(25.1%),与有关报道相符^[2]。本院 2004~2008 年支原体阳性检出率从 27.8%上升到 60.2%,高于李上彦和吴道开^[3]的报道(50.5%),与叶晓涛等^[4]的报道接近,提示本地区支原体引起的泌尿生殖道感染率逐年上升的趋势。Mh 感染 2 例,占 0.16%;Uu 合并 Mh 感染 15 例,占 1.2%,显著地低于有关报道^[5]。是否说明本地区感染的特点为 Mh 和混合型感染率较低值得进一步探讨。

12 种抗菌剂的药敏试验结果按敏感度由高到低依次为:美满霉素 (MIN)89.75%、强力霉素 (DOX)85.38%、克拉霉素 (CLA)82.09%、交沙霉素 (TOS)79.65%、四环素 (TET)

47.56%、左氧氟沙星 (LEV)46.71%、司帕沙星 (SPA)39.28%、阿奇霉素 (AZI)35.08%、罗红霉素 (ROX)28.1%、氧氟沙星 (OFL)24.34%、红霉素 (ERY)7.25%、诺氟沙星 (NOR)5.14%。说明本地区治疗泌尿生殖道支原体感染应首选美满霉素或强力霉素,与杨慧敏等^[5]的报道相同,而不同于重庆地区的有关报道^[6]。其次可选用克拉霉素和交沙霉素。泌尿生殖道支原体对罗红霉素(28.1%)、氧氟沙星(24.34%)、红霉素(7.25%)、诺氟沙星(5.14%)敏感性低,可能与这些药物在临床上长期使用或滥用有关,应对其使用作出一定的限制。同时也提示本地区泌尿生殖道支原体体外药敏试验组合应根据其耐药谱进行适当调整,减少敏感度极低的药物,增加文献报道中敏感度较高而本地区尚未长期大量使用的抗菌剂,以供临床医生选择。

参考文献

- [1] 龙北国,江丽芳.高级医学微生物学[M].北京:人民卫生出版社,2003:341-342.
- [2] Bellais S, Poirel L, Naas T, et al. Genetic-biochemical analysis and distribution of the Ambler class A beta-lactamase CME-2, responsible for extended-spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(1):1-9.
- [3] 李上彦,吴道升.295 例泌尿生殖道感染者病原体检测结果分析[J]. *国外医学:临床生物化学与检验学分册*, 2005, 26(6):328-330.
- [4] 叶晓涛,邹焕荣,郑望春.泌尿生殖道支原体感染检测及药敏试验[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 29(4):315-317.
- [5] 杨慧敏,韩荣昌,谢艳军.泌尿生殖道支原体培养基药敏分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 29(3):F3.
- [6] 吴清,许涛.泌尿生殖道溶脲脲原体感染及耐药分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 29(5):412-413

(收稿日期:2010-05-11)

(上接第 204 页)

- [11] 任荣,崔雪萍,戎建荣,等.山西地区淋球菌对抗生素的敏感性测定及多重耐药分析[J]. *中国医药导报*, 2009, 20(6):65-66.
- [12] 孙亚军,袁建芬,喻海忠.南通地区 2006~2008 年淋球菌耐药性分析[J]. *检验医学与临床*, 2009, 6(14):1144-1145.
- [13] 余克花,余劼,莫冰,等.2006~2008 年南昌地区淋球菌耐药检测结果分析[J]. *江西医学院学报*, 2009, 49(1):134-135.
- [14] 侯存军,刘庆东,吴学忠,等.济南地区淋球菌耐药性检测及质粒谱型分析[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2008, 22(1):34-36.

- [15] 黄国清,周美容,黄华泥.28 例新生儿眼结膜淋病奈瑟菌分离株的抗生素耐药性分析[J]. *医学检验与临床*, 2009, 20(4):42-43.
- [16] 柯丹,刁庆春,代祥安,等.淋球菌对 5 种抗菌药物敏感性的检测分析[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2008, 22(9):549-550.
- [17] 王德霞,时祝帅,聂青松.江苏省扬州地区淋病奈瑟菌耐药性质粒谱的研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2008, 12(7):75-76.

(收稿日期:2010-05-09)

总体与样本

根据研究目的确定的同质研究对象的全体(集合)称为总体,包括有限总体和无限总体。从总体中随机抽取的部分观察单位称为样本,样本包含的观察单位数量称为样本含量或样本大小。如为了解某地区 10~15 岁儿童血钙水平,随机选取该地区 3 000 名 10~15 岁儿童并进行血钙检测,则总体为该地区所有 10~15 岁儿童的血钙检测值,样本为所选取 3 000 名儿童的血钙检测值,样本含量为 3 000 例。类似的研究需满足随机抽样原则,即需要采用随机的抽样方法,保证总体中每个个体被选取的机会相同。