

南昌地区淋球菌对抗生素的耐药性及质粒谱分析

谢大泽¹, 湛学军¹, 陶雪花², 王 军³, 舒向荣⁴, 杨淑华¹, 徐燕萍¹, 谭力伟¹ (1. 江西省医学
科学研究所检测中心, 南昌 330006; 2. 江西省南昌市第六人民医院 330003; 3. 广东省
人民医院, 广州 510080; 4. 江西省妇幼保健院, 南昌 330003)

【摘要】 目的 了解南昌地区淋病患者感染的淋球菌对抗生素的耐药状况, 探讨质粒在介导淋球菌耐药中的作用。**方法** 采用纸片法分析 69 株淋球菌对头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、青霉素、壮观霉素、环丙沙星的敏感性; 头孢硝基噻吩显色法测定 β -内酰胺酶; 碱裂解法提取淋球菌菌株质粒, 琼脂糖凝胶电泳法分析质粒谱型。**结果** 对青霉素、环丙沙星、壮观霉素耐药的菌株分别为 39 株 (39/69, 56.52%)、67 株 (67/69, 97.10%)、1 株 (1/69, 1.45%), 头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶未发现耐药株。 β -内酰胺酶阳性菌株为 35 株 (35/69, 50.72%)。检出质粒菌株 37 株 (37/69, 53.62%), 质粒谱型共 5 型, 以 39.5 Kb 和 39.5 Kb+42.5 Kb 型为主。**结论** 青霉素、环丙沙星的耐药率较高, 在本地区已不适宜作为治疗淋病的药物, 头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶的敏感性较高, 可作为本地区治疗淋病的首选药物, 壮观霉素已出现耐药株应引起重视。质粒的介导在淋球菌耐药性的形成中起着重要的作用。

【关键词】 淋球菌; 碱裂解法; 耐药质粒

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.020

中图分类号: R378.16

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)23-2605-02

Analysis on antibiotic resistance and plasmid profiles of *Neisseria gonorrhoeae* in Nanchang area XIE Da-ze¹, ZHAN Xue-jun¹, TAO Xue-hua², WANG Jun³, SHU Xiang-rong⁴, YANG Shu-hua¹, XU Yan-ping¹, TAN Li-wei¹. 1. Department of Detection Center, Jiangxi Provincial Institute of Medical Sciences, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Nanchang Sixth People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330003, China; 3. Guangdong Provincial People's of Hospital, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 4. Jiangxi Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China

【Abstract】 Objective To survey the antibiotic resistance and the role of plasmid-on mediating resistance of *Neisseria gonorrhoeae* (N. gonorrhoeae) in Nanchang area. **Methods** The disk diffusion method was used to determine the resistance of six antibiotics including cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, penicillin, spectinomycin and ciprofloxacin to N. gonorrhoeae. Penicillinase-producing N. gonorrhoeae (PPNG) was determined by using the Nitrocefin-disk method. Extraction and analysis of the plasmids in 69 N. gonorrhoeae were determined by alkaline-lysis and sepharose electrophoresis technic. **Results** The strains of 39 (39/69, 56.52%), 67 (67/69, 97.10%) and 1 (1/69, 1.45%) were found to be resistant to penicillin, ciprofloxacin and spectinomycin, respectively. No strains were found to be resistant to cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime. There were 35 (50.72%) strains of PPNG among 69 N. gonorrhoeae. 37 strains of N. gonorrhoeae harboured plasmids and the detected percentage accounting for 53.62%. A total of five types of plasmids were detected. The plasmid profiles types of 39.5 Kb (24.63%) and 39.5 Kb+42.5 Kb (13.04%) were prominent. **Conclusion** Resistance rate of penicillin and ciprofloxacin is higher than others. In Nanchang region, penicillin and ciprofloxacin have been inappropriate as a treatment for gonorrhea drug. Susceptibility of cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime is high and can be used as the first choice for treatment of gonorrhea drugs in this region. Clinical doctors need to pay more attention to spectinomycin because resistant strain has been detected. Plasmid plays an important role in formation of resistance in *Neisseria gonorrhoeae*.

【Key words】 neisseria gonorrhoeae; alkaline-lysis method; resistance plasmid

淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 是引起最常见的性传播疾病——淋病的病原体, 全球每年新增发病例超过 6 000 万。由于抗生素的广泛使用和细菌的变异等原因, 使淋球菌的耐药性逐年增加。淋球菌产生的耐药性机制与以质粒介导的耐药以及染色体基因突变等有关。作者从南昌地区的部分淋病患者标本中分离、培养、鉴定了 69 株淋球菌菌株; 应用纸片法分析了淋球菌对 6 种抗生素的敏感性; 碱裂解法提取淋球菌

质粒, 琼脂糖凝胶电泳法分析质粒谱型。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 淋球菌基础培养基: GC 琼脂 (Oxoid, 英国); APINH 鉴定试纸条 (法国梅里埃公司); 头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、青霉素、壮观霉素、环丙沙星药敏试纸 (北京天坛生物技术开发公司); 碱裂解液 I (葡萄糖, Tris-Cl, EDTA), 碱裂解液 II (0.2N NaOH, 1% SDS), 碱裂解液 III (pH4.8 mol/L

KAc 溶液), Tris-HCl 饱和酚, 1 mol/L Tris-cl 溶液, 二氧化碳培养箱, 高速离心机, 电泳仪, 紫外凝胶-显微成像仪。

1.2 实验菌株 69 株淋球菌由省妇幼保健院性病科、妇产科患者的泌尿生殖道分泌物中分离培养获得。所有菌株经革兰染色、氧化酶及糖发酵试验初步鉴定并用 APINH 鉴定试纸条确证后, 传代 1 次洗于无菌脱脂牛乳中, 于 -70℃ 冰箱保存备用。

1.3 实验方法 K-B 法测定临床分离的淋球菌对头孢曲松、头孢他啶、头孢噻肟、青霉素、壮观霉素、环丙沙星等 6 种抗生素的敏感性: 参照美国临床实验室标准化委员会标准^[1]判断耐药性。

1.4 头孢硝基噻吩显色法测定产青霉素酶淋球菌(PPNG)^[2] 将待测淋球菌少许均匀涂于室温平衡的头孢硝基噻吩纸片上, 1 min 内观察纸片颜色变化, 变红者为阳性, 不变色者为阴性, 每次试验均以已知的阴性和阳性菌株作对照。

1.5 SDS 碱裂解法微量提取质粒 DNA^[3] 接种环挑取淋球菌菌苔悬于含 1.0 mL 生理盐水的 1.5 mL 微量离心管中, 15 000 r/min 离心 3 min, 倾去上清, 加 100 μL 裂解液 I 剧烈振荡, 加 200 μL 新配制的裂解液 II 颠倒 5 次加 150 μL 裂解液 III, 颠倒数次静置 3~5 min, 15 000 r/min 离心 5 min, 将上清液移至另一微量离心管内离心, 加等体积酚氯仿液, 振荡混合后按 15 000 r/min 离心 2 min, 将上清液转到另一微量离心管, 加两倍体积的无水乙醇沉淀核酸, 混匀搁置 2 min 后离心 5 min, 收集核酸晾干, 加 50 μL 含 RNase 20 μg/mL 的 TE 缓冲液, 振荡数秒后存放 -20℃ 冰箱保存备用。

1.6 琼脂糖电泳检测质粒 DNA 条带 取 5 μL 质粒 DNA 样品用 TBE 电泳缓冲液配制的 0.8% 琼脂糖进行电泳, 60 V 电压电泳 2 h, 以 DNA/HindIII Marker 作为相对分子质量标记。于紫外灯下观察并拍照。

2 结 果

2.1 经过分离、培养、鉴定的淋球菌共 69 株 对 6 种抗生素的药敏试验结果表明, 淋球菌对头孢噻肟, 头孢曲松, 头孢他啶敏感性较高, 对壮观霉素的耐药率较低, 对青霉素, 环丙沙星的耐药率较高(表 1)。

表 1 69 株淋球菌对 6 种抗生素的药敏试验结果[n(%)]

敏感度	头孢曲松	头孢他定	头孢噻肟	壮观霉素	青霉素	环丙沙星
敏感(S)	69(100.0)	69(100.0)	69(100.0)	68(98.6)	11(15.9)	0(0.0)
中介(I)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	19(27.5)	2(2.9)
耐药(R)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(1.4)	39(56.5)	67(97.1)

2.2 质粒的提取及分析 结果显示 69 株菌株中 37 株(53.62%)检出质粒。质粒有 5 种图谱(表 2)。

表 2 淋球菌的质粒分布

质粒谱型	质粒谱(kb)	菌株数	构成比%
无	无	32	46.37
I	4.2	4	5.79
II	39.5	17	24.63
III	39.5+4.2	9	13.04
IV	39.5+42.5	4	5.79
V	4.2+4.7+7.4+39.5+42.5	3	4.34

3 讨 论

3.1 近年来淋球菌耐药现象日益严重。本文的分析结果表明, 临床分离的淋球菌对青霉素的耐药率为 56.5%, 略低于温娟等^[4]2000 年报道的青霉素耐药率 61.1% 的结果; 对环丙沙星的耐药率为 97.1%, 接近于张铁军等^[5]、曹文苓等^[6]报道的 2003 年上海地区、广州地区淋球菌对环丙沙星耐药率(95%) 的结果, 但明显高于温娟等^[4]报道的 44.1% 的结果。由于喹诺酮类抗生素的大量使用, 使淋球菌对环丙沙星的耐药性出现广泛的播散和流行, 造成同一地区淋球菌对环丙沙星的耐药率大幅度上升。本地区青霉素、环丙沙星的高耐药率, 使它们已不适宜作为治疗淋病的药物, 头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶的敏感性较高, 可作为本地区治疗淋球菌的首选药物。壮观霉素已出现耐药株应当引起足够的重视。

3.2 自从 1976 年美国分离出 PPNG 以来, 至今已在 100 多个国家和地区发现 PPNG 的存在^[7], 在东南亚地区 1990 年已高达 25%~41%, 非洲大陆达到 50% 以上^[8]。PPNG 的上升趋势给淋病的预防和治疗带来了困难。我国自 1987 年开始监测淋病奈瑟菌的耐药性, 发现 PPNG 近年来大幅度上升, 但不同作者报道的 PPNG 有所不同。作者的实验结果显示, PPNG 的检出率为 50.72%, 明显高于曹文苓等^[6]、吴兴中等^[9]、俞莲花和曲颖^[10]报道的 PPNG 菌株阳性率 13.1%、17.0% 和 39.8% 的结果。

3.3 淋球菌对青霉素和四环素的耐药机制 包括质粒介导的高度耐药及染色体介导的低度耐药。通过对质粒介导的淋球菌耐药菌株的监测, 可以评价淋球菌耐药状况和发展趋势。本研究发现质粒在不同地区与不同时间存在一定变化, 质粒谱的构成也有差异。中山市淋球菌的质粒谱型以 4.2 Kb+7.4 Kb(30.5%) 和 4.2 Kb+7.4 Kb+39.5 Kb(26.3%) 为主^[11]; 上海地区淋球菌流行株则以 4.2 Kb+5.4 Kb+39.5 Kb(25.71%) 和 4.2 Kb+7.4 Kb+39.5 Kb(20%) 为主^[12], 本地区以 39.5 Kb(24.63%) 和 39.5 Kb+42.5 Kb(13.04%) 为主要质粒谱型。质粒的检测有助追踪传染源和流行株的耐药性, 为指导临床治疗以及淋球菌的耐药监测提供线索和依据^[13]。

参考文献

- [1] Jones RN, Gavan TL, Thornsberry C, et al. Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility test for *Neisseria gonorrhoeae*: interpretative criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin, and tetracycline[J]. Clin Microbiol, 1989, 27(12): 2758-2766.
- [2] 蔡文斌. 实用临床微生物学诊断[M]. 南京: 东南大学出版社, 1998: 934-935.
- [3] 萨姆布鲁克 DW, 拉塞尔, 黄培堂. 分子克隆实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 27-35.
- [4] 温娟, 湛学军, 谢大泽, 等. 200 例淋病及非淋球菌尿道炎患者病原学分析及疗效观察[J]. 江西医药, 2000, 35(5): 261-262.
- [5] 张铁军, 周晓明, 姜庆五. 淋病奈瑟菌对环丙沙星的耐药性与喹诺酮类耐药决定区突变的关系[J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(6): 600-603.
- [6] 曹文苓, 黎小东, 李嘉彦, 等. 淋球菌对(下转第 2608 页)