

中国 1993~2000 年分离淋球菌的流行病学和细菌学特征

叶顺章 王千秋 苏晓红 尹跃平 戴秀芹 孙厚华

【摘要】 目的 研究中国 1993~2000 年分离的淋球菌对青霉素、四环素、环丙沙星、大观霉素和头孢曲松的敏感性及其营养分型和携带质粒情况,为制订淋病治疗方案和防治对策的参考依据。方法 用琼脂稀释法测定菌株对抗菌药物的敏感性,用改良 Catline 法和碱裂解法测定菌株的营养分型和携带耐药质粒的情况。结果 8 年来共检测了 4 976 株淋球菌对抗生素的敏感性,发现对青霉素耐药率为 71.60%,产青霉素酶淋球菌(PPNG)菌株占 15.54%;对四环素的耐药菌株占 93.02%,由质粒介导的高度耐四环素淋球菌(TRNG)菌株占 10.48%,环丙沙星的耐药菌株占 53.30%;对大观霉素和头孢曲松的耐药菌株分别占 0.36% 和 0.46%。1995 年和 1996 年南京地区菌株的营养分型原型(proto)占 46.4% 和 47.53%,脯氨酸(pro⁻)型占 48.4% 和 50.22%。对 40 株淋球菌作了质粒分型:30 株非 PPNG 菌株中,2 株(15%)不含任何质粒;28 株含有 4.2 kb、4.9 kb、5.4 kb 和 39.5 kb 质粒;10 株 PPNG 菌株中,8 株含 4.2 kb、5.4 kb 和 39.5 kb 质粒;2 株除上述三种质粒外,尚含有 4.9 kb 质粒。PPNG 株和非 PPNG 株所含有的 5.4 kb 质粒虽分子量相近,但酶切点不尽相同。结论 1993~2000 年分离的淋球菌对青霉素、四环素和环丙沙星耐药率较高,对大观霉素和头孢曲松仍较敏感。南京地区 1995~1996 年流行的淋球菌的营养分型无大变化。含 5.4 kb 质粒的 PPNG 和非 PPNG 菌株所含核苷酸的排列顺序可能有所不同。

【关键词】 淋球菌;耐药性;营养分型;质粒

Epidemiological and bacteriological characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in China YE Shun-zhang, WANG Qian-qiu, SU Xiao-hong, YIN Yue-ping, DAI Xiu-qin, SUN Hou-hua. Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, National Center for STDs and Leprosy Control, Nanjing 210042, China

【Abstract】 Objective To investigate the antimicrobial susceptibility, auxotype, and plasmid profile of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in China and to provide evidence for the development of treatment guideline and policy for control. **Methods** Agar dilution was used to detect antimicrobial susceptibility. The auxotype was determined by GC genetic medium. The plasmid was extracted by alkaline cleavage and electrophoresed. **Results** A total of 4 976 gonococcal isolates were tested in the last 8 years. The resistant rate for penicillin was 71.60% with PPNG being 15.54%. Tetracycline-resistant (TRNG) isolates accounted for 93.02% with 10.48% high level tetracycline-resistant. The resistant rate for ciprofloxacin was also relatively high (31.78%). The resistant rates for spectinomycin and ceftriaxone were 0.36% and 0.46%. The predominant auxotypes of gonococcal isolates were proto and pro⁻ during 1995-1996 in Nanjing accounted for 46.4% and 47.53%, 48.4% and 50.22%, respectively. There were 8 strains harboring 4.2, 5.4, 39.5 kb plasmids and 2 harboring 4.2, 4.9, 5.4, 39.5 kb plasmids in 10 PPNG strains; 2 harboring no plasmid, 28 harboring 4.2, 4.9, 5.4, 39.5 kb plasmids in 30 non-PPNG strains. The 5.4 kb plasmid of PPNG could be digested with restriction endonuclease BamHI while the 5.4 kb plasmid of non-PPNG could not. **Conclusion** The gonococcal isolates were highly resistant to penicillin, tetracycline, and ciprofloxacin, while were still sensitive to spectinomycin and ceftriaxone. No significant auxotyping change was found in terms of predominant gonococcal strains in the last two years in Nanjing while 5.4kb plasmid might be the most prevalent resistant plasmid in Nanjing.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Antimicrobial susceptibility; Auxotype; Plasmid

近年来,性病在我国持续流行^[1]。2000 年全国报告病例数为 85.9 万,其中淋病的发病人数占全部性病病人的 33.25%,发病率达到 22.92/10 万。淋球菌对抗菌药物的耐药性研究关系到对病人疗效的判断和性病防治对策的制订。为了解我国近年性病流行中淋球菌对抗生素的敏感性及其流行病学和细菌学特征,我们自 1987 年起参加了 WHO 西太区淋球菌耐药监测协作规划,每年从 10 个代表性的城市收集一定数量菌株,按统一方法进行耐药测定。1987~1992 年的耐药测定结果已有报道^[2],本文报道 1993~2000 年分离的淋球菌对抗生素的耐药性研究结果和有关的细菌学特征。

材料与方法

1. 菌株的收集:全国共 10 个协作城市分别代表东北、西北、西南、华南和华东等地区。每年各点收集 100~200 株淋球菌按统一的方法进行耐药测定。男性标本取自尿道口内 3~4 cm 处,女性取自宫颈口内 1~1.5 cm 处。分泌物接种于选择性培养基上,于 36℃ 培养 24~36 h 后用无选择性培养基转种 1~2 次,再将菌洗入脱脂牛奶,保存于 -70℃ 冰箱中待用。

2. 菌株对抗菌药物的敏感性测定:采用琼脂稀释法^[3]。用于试验的抗生素需纯品,由西太区耐药监测地区协调人 Tapsell 提供。青霉素和头孢曲松溶于 pH 6.5 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液中,大观霉素、四环素和环丙沙星则直接溶于蒸馏水作为贮存液保存于 -20℃ 冰箱,半年内使用。试验前将贮存液用蒸馏水对倍稀释成适合当地检测水平的浓度范围。

将淋球菌菌株先在无选择性培养基上传代数次,刮取若干菌落制成浓度为 10^8 cfu/ml 的悬液,用多头接种器或特制接种环蘸取菌液接种于琼脂平皿上(每点约 10^4 菌)经 36℃ 培养 24 h 观看结果。以能抑制淋球菌生长的最小浓度为该药物的最小抑菌浓度(MIC)。关于判定耐药的标准,按 WHO 的规定,青霉素、四环素、头孢曲松和环丙沙星为 $MIC \geq 1.0 \mu\text{g/ml}$,大观霉素为 $\geq 128 \mu\text{g/ml}$,如四环素的 $MIC \geq 16 \mu\text{g/ml}$ 则判为耐四环素淋球菌(TRNG)。每次试验需同时接种 WHO 提供的 5 株参考菌株作质控。本实验室接受 WHO 淋菌耐药协作组的外部考核。

3. 测定产青霉素酶淋球菌(PPNG)菌株的纸片酸度法:参照文献[4]。简言之,先让滤纸片吸足青

霉素试液(以溴甲酚紫为指示剂),取待检菌在滤纸片上涂一直径为 5 mm 的涂膜,置 37℃ 温箱培养 30 min。指示剂颜色由紫变黄者为阳性,涂膜颜色不变者为阴性。

4. 淋球菌质粒的提取:用改良碱裂解法提取质粒,即在 100 μl 溶液 I (50 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L Tris、10 mmol/L EDTA) 中加入待检菌后,加入新配制的溶液 II (0.2 N NaOH、1% SDS) 200 μl ,使菌裂解变性 20 min,再加入溶液 III (5 mol/L 醋酸钾) 150 μl ,在室温下放置 10 min,然后以 10 000 r/min 离心 15 min,取出上清,加入等体积的氯仿混合液(氯仿:异戊醇:饱和酚 = 24:1:25),振荡 30 s,以 6 000 r/min 离心,取上清。如此反复抽提 2~3 次。再在上清中加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠溶液和 2 倍体积的无水乙醇,充分混匀后于 -70℃ 冰箱保存过夜。次日融化后以 14 000 r/min 离心 20 min 以获得质粒 DNA。用 70% 乙醇洗一遍,风干 2~3 h 后溶于 20 μl TE 液中(10 mmol/L Tris、1 mmol/L EDTA, pH 8.0) -70℃ 冰箱冻存待检。

5. 淋球菌营养分型方法:用改良的 Catline 法,即将在 GC 血液琼脂培养基上于 36℃ 培养了 24 h 的淋球菌混悬于淋球菌遗传培养基(GGM)中,使菌浓度为 McFarland 管 0.5 号(约 1×10^8 cfu/ml),以接种环挑取 1 满环接种于营养分型培养基上,再在 36℃ 培养 48 h 后观看结果。无生长或仅少量生长(薄雾状)者为阴性,生长者为阳性。在所有营养分型培养基上均生长的菌株定为原型(proto),在缺乏某一成分的培养基上不生长的菌定为需该成分的营养型。每批菌株试验时均以已知营养型的标准菌株作对照。标准株来自美国疾病预防控制中心和瑞典国立细菌实验室。

结 果

1. 我国 1993~2000 年分离的淋球菌菌株对 5 种抗菌药物的耐药菌百分率(表 1):由表 1 可见,8 年来共检测菌株 4 976 株。其中对青霉素的耐药株为 3 563 株,耐药菌百分率为 71.60%,由质粒介导的 PPNG 为 15.54%。四环素耐药株占 93.02%,由质粒介导的高度 TRNG 为 10.48%。环丙沙星耐药株占 53.30%。对大观霉素和头孢曲松的耐药株比例较少,分别为 0.36% 和 0.46%。

2. 连续 2 年检查了南京地区分离的淋球菌的营

养分型情况见表 2。

表1 我国 1993~2000 年分离的淋球菌对 5 种抗菌药物的耐药率测定结果

年份	抗菌药物耐药菌株百分率(阳性株数/检查株数)						
	青霉素		四环素		环丙沙星	大观霉素	头孢曲松
	耐药菌总百分率	PPNG	耐药菌总百分率	TRNG			
1993	60.24(100/166)	8.72(15/172)	90.00(54/60)	20.00(12/60)	-	0.52(2/388)	1.91(3/157)
1994	65.00(169/260)	1.58(5/316)	89.57(189/211)	7.11(15/211)	-	1.31(2/153)	4.52(9/199)
1995	84.07(380/452)	1.95(5/257)	95.88(419/437)	8.05(35/435)	15.48(61/394)	0(0/437)	0(0/387)
1996	82.11(381/464)	22.76(61/268)	92.05(324/352)	6.52(23/353)	13.53(46/340)	0.28(1/353)	0(0/401)
1997	56.02(507/905)	14.07(102/725)	-	2.32(21/905)	28.46(257/903)	0.44(4/905)	0(0/896)
1998	62.62(588/939)	3.19(30/939)	-	2.90(24/828)	52.30(398/761)	0.53(5/939)	0.53(4/761)
1999	80.46(630/783)	16.86(132/783)	-	11.49(90/783)	78.16(612/783)	0(0/782)	0(0/782)
2000	80.24(808/1 007)	34.16(344/1 007)	-	25.82(260/1 007)	85.20(858/1 007)	0.4(4/1 007)	0.5(5/1 007)
合计	71.60(3 563/4 976)	15.54(694/4 467)	93.02(986/1 060)	10.48(480/4 582)	53.30(2 232/4 188)	0.36(18/4 964)	0.46(21/4 590)

表2 南京地区分离的淋球菌营养分型情况

年份	检查株数	各营养型株数(%)								
		proto ⁻	pro ⁻	Met ⁻	Arg ⁻	pro ⁻ Met ⁻	pro ⁻ Arg ⁻	Hyx ⁻	Met ⁻ Hyx ⁻	pro ⁻ Hyx ⁻
1995	506	23(46.40)	24(48.40)	5(1.00)	4(0.80)	10(2.00)	2(0.4)	1(0.2)	1(0.2)	1(0.2)
1996	223	106(47.53)	112(50.22)	2(0.89)	2(0.89)	1(0.45)	0	0	0	0

由表 2 可见,1995 年和 1996 年南京地区流行的淋球菌以原型(proto⁻)和脯氨酸型(pro⁻)为主,分别占 46.4% 和 47.53% 以及 48.4% 和 50.22%。

3. 从 1993~1994 年由南京地区分离的淋球菌菌株中任取 40 株作了质粒分析。结果 40 株淋球菌中,10 株 PPNG 中有 8 株同时含 4.2 kb、5.4 kb 和 39.5 kb 质粒,2 株除含上述 3 种质粒外,还含有 4.9 kb 质粒。30 株非 PPNG 株中,2 株不含 2 种的任何质粒,28 株含 4.2 kb、4.9 kb、5.4 kb 和 39.5 kb 质粒。用限制性内切酶 BamH_I 能将 PPNG 株的 5.4 kb 质粒切开,但不能切开非 PPNG 株中的 5.4 kb 质粒。

讨 论

关于淋球菌对抗菌药物的敏感性测定已有不少报道^[5-7],但多数为某年度若干菌株的一次性检测结果。我们选择了代表不同地域的 10 个城市,连续十余年收集菌株按统一的方法作淋球菌对抗菌药物的敏感性测定以获得当地及我国淋球菌耐药变化情况。代表地域大、菌株多、时间长,能看出耐药率的动态变化,这在国内外是不多见的。

测定淋菌耐药的方法有多种。纸片法因其操作简便,一次试验可获得某株菌对几种抗菌药物的敏感性结果。但该法影响因素多,结果常不稳定,因而目前主要用来指导对病人的治疗。琼脂稀释法是将

抗生素溶解后加入到培养基中,将待检菌株接种于含有系列浓度的抗生素琼脂平皿上。药物浓度小时细菌生长,浓度大时细菌生长被抑制,据此可测出药物对该菌的 MIC,然后依据标准决定是否耐药株。该方法结果准确,重复性好,是 WHO 推荐用于耐药监测的方法。但用此方法时,药品要纯品(不含赋形剂),称量要准确,不同的抗菌药物要用特定的溶剂,所制的培养基要在规定的时间内使用。为了检查所制的抗生素琼脂平皿中抗生素的含量是否符合标准,每次试验需要同时接种 5 株参考菌株,只有这些菌株的 MIC 在规定范围之内,才说明所用平皿中抗生素的浓度合格,所作试验结果才是可靠的。

从我国 1993~2000 年的监测结果看,青霉素和四环素似乎已失去了对淋病的治疗作用,耐药菌百分率分别达到 71.60% 和 93.02%,由质粒介导的耐药株(PPNG 和 TRNG 株)也分别达到 15.54% 和 10.48%。美国疾病预防控制中心认为当一种抗生素对某菌的耐药百分率超过 5% 时,该药就不应作为治疗该病的第一线药物。目前令人欣慰的是淋球菌对大观霉素和头孢曲松的耐药菌率均在 1% 以内。因此,应该珍惜这一局面,规范用药。用于治疗淋病尚不太久的环丙沙星也出现了高百分率(53.39%)的耐药菌,估计也是不规范用药和菌株对喹诺酮类药物有交叉耐药性的结果。

淋球菌根据其生长时所需的营养不同可分成

35 个营养型^[8]。它们有一定的地域分布和引起特定的临床类型,在高纬度地区如美国的西雅图和加拿大,大多数播散性淋菌感染由 AHU⁻型引起,而在亚洲的菲律宾和中国台湾等地则未能分离到 AHU⁻型。日本近来报道,在 proto 和 pro⁻ 占优势的情况下, AHU⁻ 有上升的趋势^[9]。对当地流行菌株进行营养分型,可作为流行病学调查的指标。从我们 1995、1996 年对南京地区菌株进行营养分型检查的结果来看,南京地区流行的菌株以原型(proto)和脯氨酸型(pro⁻)为主,两年中菌株营养型的构成几乎未变。说明南京地区这两年流行的淋球菌的优势株未出现大的变动。

检测淋球菌耐药质粒的意义在于耐药质粒是某些耐药菌株流行的一个指数^[10,11]。对 40 株淋球菌作质粒分析,发现有 2 株不含任何质粒,质粒检出率为 95%,与文献报道一致。10 株 PPNG 菌株和 28 株非 PPNG 菌株,除含 4.2 kb 隐蔽性质粒及 39.5 kb 结合性质粒外,均含有 5.4 kb 质粒。PPNG 菌株的 5.4 kb 质粒酶切图谱和文献报道一致,然而非 PPNG 株的 5.4 kb 质粒不含上述切点,说明二者的分子量虽相近,但核苷酸排列的顺序可能不同。本试验的菌株均来自南京地区,表明 5.4 kb 质粒很可能是本地区流行的淋球菌的耐药质粒。

参 考 文 献

1 龚向东,叶顺章,张国成,等. 2000 年全国性病流行病学分析. 中

国性病艾滋病防治, 2001, 7: 131-134.

2 Shunzhang Ye. Survey on antibiotic sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in China, 1987-1992. Sex Tran Dis, 1994, 21:237-240.

3 叶顺章,张木有. 现代性传播疾病实验诊断技术. 第 1 版. 广州: 广东科技出版社, 1999. 34-36.

4 叶顺章,黎善明,张传福,等. 淋球菌青霉素酶菌株的测定. 中华皮肤科杂志, 1990, 23:253-254.

5 de Castillo MC, de Saab OA, Fernandez NP, et al. Antibiotic susceptibility survey of *Neisseria gonorrhoeae* in Tucuman Argentina. Genitourin Med, 1996, 72:138.

6 Pham-Kanter GBT, Steinbesy MH, Baland RC. Sexually transmitted disease in South Africa. Genitourin Med, 1996, 72:160-171.

7 Ison CA. Antimicrobial agents and gonorrhoea: therapeutic choice, resistance and susceptibility testing. Genitourin Med, 1996, 72:253-257.

8 叶顺章,王千秋,张传福,等. 淋球菌营养分型方法的建立和 72 株淋球菌的分型结果. 中华皮肤科杂志, 1993, 26:139-141.

9 Nishimura M, Kumamoto Y, Hirose T, et al. Bacteriologic studies on *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Sapporo, Japan. Sex Tran Dis, 1991, 18:80-83.

10 Marguez C, Xia M, Borthagarary G, et al. Conjugal transfer of the 3.05 β -lactamase plasmid by 25.2 Mda plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Tran Dis, 1999, 26:157-159.

11 West B, Changalucha J, Grosskurth H, et al. Antimicrobial susceptibility auxotype and plasmid content of *Neisseria gonorrhoeae* in northern Tanzania: emergence of high level plasmid mediated tetracycline resistance. Genitourin Med, 1995, 71:9-12.

(收稿日期 2002-01-10)

(本文编辑:尹廉)

Global Environmental Epidemiology Network(GEENET, 全球环境流行病学网)

GEENET(<http://www.who.int/peh/geenet/>)创建于 1987 年,旨在通过加强教育、培训与环境流行病学的应用研究来提高发展中国家保护环境卫生的能力。网页特色信息为:①培训资料 提供基于问题的职业与环境流行病学练习。是一个取材于真实研究的环境流行病学病例集,为流行病学教师和学生提供一个实用性学习工具。病例集涉及暴露、疾病和地理区域并介绍了各种研究设计、流行病学概念及学习的目的,供学生结合流行病学授课和教科书使用。该资料针对学生与指导教师备有不同的版本,教师版备有答案。此外,在培训资料栏目中还提供有 Epi Info 软件教学模块,以病例研究实例介绍 Epi Info 软件的使用方法。②可持续发展战

· 网络信息 ·

略中的卫生与环境:这是 WHO 报告《可持续发展战略中的卫生与环境 地球高峰后的五年》的一个执行摘要。摘选原报告的数据与表格以及全部结论部分。这些数据、表格和结论在此仍保持在原报告中的原顺序和标题,以便读者参考阅读,但未摘录书目信息。③卫生与环境决策分析、关联分析与监测项目:由联合国环境计划(United Nations Environmental Programme, UNEP)、美国环境保护办公室(US Environmental Protection Agency, USEPA)和 WHO 联合主办的项目,它将环境流行病学、人类暴露评估与其他卫生与环境科学的方法学联系起来,生成数据并分析数据,然后将数据转换成信息,为环境保护人员提供信息依据,为环境卫生政策提供信息支持。

(黄亚明 刘树春 郭继军 整理)