

无锡地区淋病奈瑟菌 TEM-1 基因分子流行病学研究

糜祖煌 秦玲

【摘要】 目的 调查无锡地区淋病奈瑟菌株 TEM-1 基因流行情况。方法 参照国外的 β-内酰胺酶阳性的淋病奈瑟菌株内含 TEM-1 基因的质粒序列,自行设计淋病奈瑟菌 TEM-1 基因的半套式聚合酶链反应(heminested PCR)检测方法。并对 2002 年 1~10 月自无锡地区分离的 195 株菌进行检测。结果 195 株淋病奈瑟菌临床分离株中有 138 株为 TEM-1 基因阳性,阳性率为 70.8%。1 株无锡地区分离株的 TEM-1 基因半套式 PCR 产物经 DNA 测序与核酸库登录的 β-内酰胺酶阳性的淋病奈瑟菌质粒 pFA7 序列 99% 同源。结论 含 TEM-1 基因的淋病奈瑟菌株是无锡地区的流行株。

【关键词】 淋病奈瑟菌;基因;流行病学;分子

A molecular-epidemiologic study on TEM-1 genes of *Neisseria gonorrhoeae* in Wuxi area MI Zu-huang, QIN Ling. Wuxi Clone Gen-Tech Institute, Wuxi 214026, China

【Abstract】 Objective In order to study the epidemiology of TEM-1 genes of *Neisseria gonorrhoeae* (Ng) in Wuxi area. **Methods** In the light from foreign literature that positive Ng strains of β-lactamase contain plasmid sequences of TEM-1 genes, heminested PCR for TME-1 genes of Ng detection was self-designed. Ng of 195 strains were detected, that were isolated in Wuxi area from Jan to the Oct, 2002. **Results** There were 138 TEM-1 genes positive in 195 isolated strains with a positive rate of 70.8%. There was one case of heminested PCR product of TEM-1 genes which showed the homogeneity was 99% in Wuxi area, when comparing with pFA7 sequences of positive Ng plasmid of β-lactalase from register GenBank. **Conclusion** Data showed that the Ng strains with TEM-1 genes were the prevalent ones in Wuxi area.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Gene; Epidemiology; molecular

淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, Ng)获得内含 TEM-1 基因的质粒可表达 β-内酰胺酶,从而表现为对 β-内酰胺类抗生素耐药^[1]。此类菌也曾称为产青霉素酶的淋病奈瑟菌(PPNG)。国内有关 Ng 临床分离株的 β-内酰胺酶活性和质粒谱分析已有报道^[2,3],但 Ng 临床分离株的 TEM-1 基因的分子流行病学研究尚未见报道。我们根据国外报道的具 β-内酰胺酶活性 Ng 临床分离株质粒中 TEM-1 基因序列^[1,4],自行设计了半套式聚合酶链反应(heminested PCR, hnPCR)检测体系,对 195 株 2002 年 1~10 月分离自无锡地区 Ng 进行了 TEM-1 基因检测,现将结果报道如下。

材料与方 法

一、材料

1. Ng 临床分离株:均为 2002 年 1~10 月自无锡地区淋病患者分离,共 195 株。将临床标本拭子

在培养基平板上划线后,置于 5% CO₂ 环境,35℃ 培养 48 h,取可疑菌落作涂片形态学鉴定,同时作氧化酶试验、糖发酵试验和 Ng cppB 基因 PCR 检测,后三项检查均阳性者列入本研究对象。

2. β-内酰胺酶阳性与阴性的 Ng 株:β-内酰胺酶阳性、青霉素耐药的 Ng(CZ200218 株);β-内酰胺酶阴性、青霉素敏感的 Ng(CZ200234 株)均由常州市妇幼保健院检验科提供。

二、方法

1. Ng TEM-1 基因 hnPCR 引物设计:从美国国立生物信息中心(网址:www.ncbi.nlm.nih.gov)核酸库中含 TEM-1 基因的 Ng 质粒 pFA7、pJD4 和 pAS84/417 DNA 序列(基因存取号分别为 M36543、U20374 和 U20422)。在 TEM-1 基因序列的保守区自行设计引物 P₁、P₂、P₃。其中 P₁、P₂ 用作外套扩增, P₃、P₂ 用作内套扩增,最终扩增产物长 535 bp。引物序列:P₁:5'-AGT TAT CTA CAC GAC GG-3'; P₂:5'-GGC GTA CTA TTC ACT CT-3';

P₃ 5'-GCG TCA GAC CCC TAT CT-3'。

2. 外套扩增体系(已优化):引物 P₁、P₂ 各 0.5 μmol/L, dNTPs 各 200 μmol/L, KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, NP40 0.5%, Taq DNA 聚合酶 1 U。总反应体积 20 μl, 其中模板液 5 μl。热循环参数为:94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s→55℃ 复性 30 s→72℃ 延伸 60 s, 共 30 周期。最后 72℃ 延长至 5 min。

3. 内套扩增体系(已优化):除将引物 P₃ 替代 P₁ 外,其余均与外套扩增体系相同。

4. Ng 分离株处理与模板液制作:用竹签挑取 Ng 菌落置入内含 100 μl 蛋白酶 K 溶液(浓度为 200 ng/ml, 0.5% 非离子去污剂 NP40 配制)的 0.5 ml 离心管中, 55℃ 消化 1 h, 95℃ 灭活 10 min。离心(10 000 r/min) 30 s, 上清液即为外套扩增的模板液。

5. TEM-1 基因 hnPCR 实验步骤:挑菌制作模板液→外套扩增→用 200 μl 纯水稀释外套扩增产物(制作内套扩增模板液)→内套扩增→凝胶电泳→紫外仪观察, 出现 535 bp 目的条带者, 判 TEM-1 基因阳性(hnPCR 实验全流程需一个工作日)。

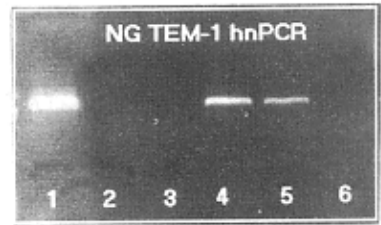
6. hnPCR 产物 DNA 测序:对 β-内酰胺酶阳性 Ng(常州 CZ200218 株)和随机抽取的无锡地区 TEM-1 基因 1 例阳性株的 hnPCR 产物进行了双脱氧末端终止法测序。测序引物为 P₂。测序在美国 ABI377 型测序仪上进行。

结 果

β-内酰胺酶阳性 Ng(常州 CZ200218 株)经 TEM-1 基因 hnPCR 扩增出现 535 bp 的目的条带, 而 β-内酰胺酶阴性 Ng(常州 CZ200234 株)无任何条带出现。无锡地区 195 株 Ng 临床分离株经 TEM-1 基因 hnPCR 扩增, 138 株呈阳性, 阳性率为 70.8%。图 1 为 TEM-1 基因 hnPCR 扩增产物电泳图。β-内酰胺酶阳性 Ng(常州 CZ200218 株)和无锡地区一 Ng 临床分离株的 hnPCR 产物经 DNA 测序二者序列完全相同, 与 pFA7 质粒(基因存取号 M36543)相应部位序列比较, 二者同源性达 99%。

讨 论

Ng 耐 β-内酰胺类抗生素的机制有二种。一是



1: 常州 CZ200218 株; 2: 常州 CZ200234 株;
3, 6: 标本阳性; 4, 5: 标本阳性

图 1 Ng 株 TEM-1 基因 hnPCR 扩增产物电泳图

获得内含 TEM-1 基因(长 1074 bp)的质粒, 所表达的 β-内酰胺酶能水解 β-内酰胺类抗生素(如青霉素), 为质粒介导的耐药; 二是 Ng 染色体上调青霉素结合蛋白 2 (penicillin-binding protein 2, PBP2) 的 penA 基因发生突变导致 PBP2 结构异常, 与 β-内酰胺类抗菌素亲和力下降所致的耐药, 为染色体介导的耐药^{5, 6}。其中前者更易传播。自 20 世纪 70 年代后期首次发现产 β-内酰胺酶的 Ng 以来, 世界各地均有报道。中国对 Ng 临床分离株 β-内酰胺酶监测发现产酶株逐年上升⁵。我们对 2002 年 1~10 月份分离自无锡地区的 195 株 Ng TEM-1 基因 hnPCR 检测示 138 株呈阳性, 阳性率达 70.8%。表明含 TEM-1 基因的 Ng 已是当地的流行株。同时从遗传学角度证实 β-内酰胺酶类抗生素已不是本地区 Ng 感染的有效治疗药物。国内 Ng TEM-1 基因 hnPCR 产物 DNA 测序显示与美国株高度同源(99%)。本次 Ng 分离株的 TetM(四环素耐药), GyrA(喹诺酮耐药), 16S rRNA(大观霉素耐药)等基因的分子流行病学研究正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Sanchez-Pescador R, Stempien MS, Urdea MS. Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM-1 β-lactamase-mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria. J Clin Microbiol, 1988, 26: 1934-1938.
- 2 向辉, 雍刚, 叶梅君, 等. 产青霉素酶的 48 株淋病奈瑟菌的耐药性、质粒特征及酶切分析. 中华微生物学与免疫学杂志, 1999, 19: 455-458.
- 3 邓艳, 张宁, 陆洪光, 等. 贵阳市淋球菌耐药质粒及其淋病流行的关系. 中国皮肤性病杂志, 2001, 15: 392-395.
- 4 Dillon JR, Li H, Yeung KH, et al. A PCR assay for discriminating *Neisseria gonorrhoeae* beta-lactamase-producing plasmids. Mol Cell Probes, 1999, 13: 89-92.
- 5 郑福兆. 耐药淋球菌感染的发生与防治. 宁波医学, 2000, 12: 391-393.
- 6 Brannigan JA, Tirodimos IA, Zhang QY, et al. Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Mol Microbiol, 1990, 4: 913-919.

(收稿日期: 2002-12-25)

(本文编辑: 尹廉)