

# 上海市浦东地区淋病奈瑟菌分型与耐药性的相关分析

张铁军 张颖华 张涛 任燕华 周晓明 俞顺章 姜庆五

**【摘要】** 目的 了解上海市浦东地区淋病病原体奈瑟双球菌的不同基因分型及各基因型与耐药性之间的对应关系。方法 运用随机扩增多态性 DNA(RAPD)指纹图谱对 78 株分离自不同患者淋球菌菌株进行区分,从分子水平对淋球菌进行基因分型,并在此基础上探讨不同的基因分型与耐药性之间的关系。结果 78 株淋球菌分离株 RAPD 图谱上相似,但各菌株基因图谱之间有明显不同 DNA 多态性,可将菌株区分为 I、II、III 三种基因分型,对此三种基因分型与 A、B、C、D 四种不同的耐药类型进行对应分析,发现耐药类型与基因型别之间存在对应关系。结论 通过研究发现浦东地区淋球菌流行株有着不同的耐药特点及基因型别,耐药性与不同的基因分型之间存在着一定相关性。

**【关键词】** 淋球菌; 基因分型; 流行病学, 分子

**Correspondence analysis on random amplified polymorphic DNA genotyping and drug-resistance of neisseria gonorrhoeae strains in Pudong area, Shanghai** ZHANG Tie-jun\*, ZHANG Ying-hua, ZHANG Tao, REN Yan-hua, ZHOU Xiao-ming, YU Shun-zhang, JIANG Qing-wu. \*School of Public Health Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: ZHOU Xiao-ming, JIANG Qing-wu

**【Abstract】 Objective** Using molecular epidemiology methods to investigate relationship between genotypes and drug-resistance of neisseria (*N.*) gonorrhoeae in Shanghai area. **Methods** A random amplified polymorphic DNA(RAPD) fingerprint method at the molecular level was used to differentiate the strains which were isolated from the outpatients of sexually transmitted disease clinics. The sensitivity to antibiotic of the 78 *N. gonorrhoeae* strains on 9 different antibiotics was tested and the relationship between different genotypes and phenotypes was studied. **Results** Selected RAPD primer could give out a group of amplification polymerase chain reaction bands with some main segments common to all the *N. gonorrhoeae* strains tested and some segments were different among the *N. gonorrhoeae* strains. All the 78 *N. gonorrhoeae* strains could be classed as three different groups ( I , II and III ). The strains could also be distinguished as four types ( A, B, C and D ) according to drug-resistance status. Using correspondence analysis method, the relationship between the three genotypes and four resistance types could be identified.

**Conclusion** RAPD fingerprint seemed a useful genotyping method and could be used for molecular epidemiological studies.

**【Key words】** *Neisseria gonorrhoeae*; Genotype; Epidemiology, molecular

淋病是目前世界上发病人数最多的性传播疾病之一,从早期使用抗生素治疗以来,淋球菌经历了对抗生素敏感性不断改变的过程,过去的 20 年淋球菌对曾使用过的抗生素先后出现了高水平耐药<sup>[1,2]</sup>。目前对抗生素耐药的淋球菌正成为一个不断增长的公共卫生课题。本文运用分子生物学的方法对淋球菌菌株进行基因分型,并研究淋球菌菌株的基因型别与耐药性类型之间的相关关系,为淋病的预防控

制提供科学依据。

## 材料与方 法

### 1. 材料:

(1)标准菌株:淋球菌标准菌株 WHO-A、WHO-B、WHO-C、WHO-D 由中国药品生物制品鉴定所提供。PPNG、TRNG 标准菌株由上海市皮肤性病医院检验科惠赠。

(2)仪器:PCR 扩增仪为德国 Biometra 产品;一次性成像系统系 pharmacia biotech 产品。

(3)试剂:随机扩增多态性 DNA(RAPD)任意引

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院流行病学教研室(张铁军、张涛、周晓明、俞顺章、姜庆五);上海市浦东新区疾病预防控制中心(张颖华、任燕华)

通讯作者:周晓明,姜庆五

物、dNTP、Taq DNA 聚合酶、MgCl<sub>2</sub>、10× PCR buffer 为 Sangon 公司产品; DNA Marker 上海申能博彩生物工程公司产品。

(4) 抗生素: 青霉素钾、头孢三嗪、四环素、多西环素、氧氟沙星、诺美沙星、环丙沙星、阿奇霉素和壮观霉素购自卫生部中国药品生物制品检定所。

(5) 样本菌株的分离: 上海市浦东新区选择全区内不同地理位置的 5 所二级甲等医院中的性病专科门诊, 收集其前来就诊的门诊病例, 采集淋球菌样本, 男性患者由尿道 3~4 cm 处采样, 女性患者由宫颈 1 cm 处采样。

(6) 病例资料: 共收集前来就诊门诊患者 102 例, 成功分离病原体奈瑟淋球菌 78 例, 其中男性病例 70 例、女性病例 8 例; 已婚者 52 例 (66.7%)、未婚者 26 例 (33.3%); 年龄分布: < 20 岁组 3 例 (3.8%)、20~ 岁组 70 例 (89.7%)、50~ 岁组 4 例 (5.1%)、> 60 岁组 1 例 (1.3%); 职业分布: 工人 35 例 (44.9%)、干部 10 例 (12.8%)、民工 9 例 (11.5%)、无业人员 8 例 (10.3%)、服务人员 4 例 (5.1%)、其他人员 12 例 (15.3%); 地区分布: 本市患者 55 例 (70.5%)、外地患者 23 例 (29.5%)。

## 2. 方法:

(1) 细菌接种与培养: GC 培养基 (Oxoid 英国) + 10% 无菌脱纤维羊血配制成改良 Thayer-Martin 培养基, 在 5% CO<sub>2</sub> 37℃ 培养 24~48 h, 菌株经染色、菌落形态观察和氧化酶试验鉴定确定为淋球菌后, 在淋球菌营养培养基中纯培养。

(2) 淋球菌基因组 DNA 制备: CTAB 法取 1.5 ml eppendorf 管加入 TE 缓冲液, 挑取单克隆淋球菌落, 混匀, 加入 10% 的 SDS 及 20 mg/ml 的蛋白酶 K 于 37℃ 温育 1 h。加入 5 mol/L NaCl 和 CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 于 65℃ 温育 10 min, 标准酚-氯仿抽提, 将上清液转入新管中, 加入 0.6 体积异丙醇沉淀 DNA, 离心, 70% 乙醇洗涤沉淀, TE 溶解 - 20℃ 保存<sup>[3]</sup>。

(3) 淋球菌流行株耐药性测定: WHO A、B、C、D 及 PPNG 和 TRNG 标准菌株作质控, 9 种抗生素的浓度范围分别是: 青霉素钾 0.0078~16.0 mg/L、头孢三嗪 0.002~2.0 mg/L、四环素 0.0078~16.0 mg/L、多西环素 0.0078~16.0 mg/L、环丙沙星 0.002~16.0 mg/L、氧氟沙星 0.0078~16.0 mg/L、诺美沙星 0.0078~16.0 mg/L、阿奇霉素 0.0078~1.0 mg/L、壮观霉素 2.0~256.0 mg/L。

按照美国疾病预防控制中心 (CDC) 淋球菌耐药性实验室监测方案判断各菌株耐药性情况<sup>[4]</sup>。

3. PCR 扩增: 任意引物为 S29 5' GGGTAACGCC-3' (上海生工生物工程技术有限公司合成) 进行 RAPD 扩增。反应体系: 总体积为 25 μl, 加入 ddH<sub>2</sub>O、RAPD 引物 (5 μmol/L)、10× PCR buffer、dNTP 0.2 mmol/L、Taq 酶 1 U、模板 DNA 2 μl。扩增反应程序为 92℃ 2 min 预变性; 92℃ 1 min、37℃ 1 min、72℃ 1 min 40 个循环; 4℃ 保存反应产物。

4. 制胶与电泳: 使用 1% 琼脂糖电泳缓冲液电泳体系、0.5 μg/ml 溴化乙锭、6× 加样缓冲液: 30% 甘油, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸, 0.5% 溴酚蓝, 取 10 μl PCR 产物加入上样缓冲液 2.5 μl, 在 1~10 V/cm 凝胶的电压下进行电泳, 约 50~60 min, 当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段的距离时, 关闭电源, 于紫外灯下观察成像。

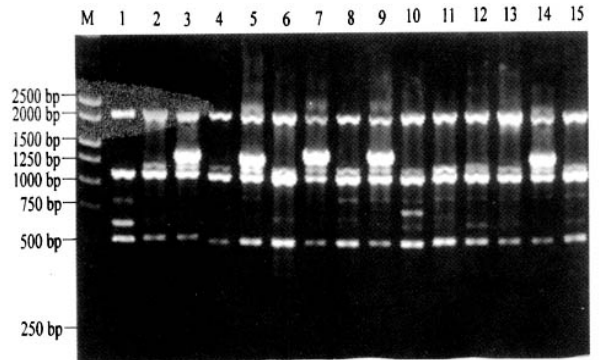
5. 统计学分析: 所有资料在 SPSS 11.0 软件建立数据库, 并对流行株耐药性及基因分型资料进行 Correspondence 分析。

## 结 果

1. RAPD 指纹图谱分型: 对所有测试的 78 株淋球菌菌株进行指纹检测和图谱比对、归纳, 经 S29 号任意引物扩增出 RAPD 片段数约 1~8 条之间, 略去弱条带后, 只计强条带, 得到有效扩增片段数为 1~5 条。该 78 株淋球菌菌株多有两条 1000~1250 bp 间的主条带, 各种带型之间具有较高的相似性 (图 1)。可将所有菌株归为三种 RAPD 指纹, 图 1 中 I 型 (如 2、4、6、8、10、11、12、13、15 号), II 型 (如 3、5、7、9、14 号), III 型 (1 号), 在所有测试的 78 株淋球菌菌株中 I 型占 44.9% (35/78), II 型占 52.6% (41/78), III 型 2.5% (2/78), 且此三种基因型别菌株的分布与患者年龄、性别、职业等无明显相关。

2. 流行株的耐药性情况: 经过 78 株淋球菌流行株对 9 种临床常用抗生素耐药性进行监测表明, 目前淋球菌菌株的耐药特征可以分为大致四种: A 只对大观霉素、头孢曲松敏感, 对其余抗生素均耐药; B 对大观霉素、头孢曲松敏感, 强力霉素中度敏感, 对其余抗生素均耐药; C 对大观霉素、头孢曲松敏感, 青霉素、四环素类 (包括) 强力霉素中度敏感, 对其余抗生素均耐药; D 对大观霉素、头孢曲松、阿奇霉素敏感, 对其余抗生素中度或完全耐药。此四种

主要耐药种类与基因分型情况见表 1。



M: Marker; 1~15: 分别为 1~15 号淋球菌菌株所产生的 RAPD 指纹图谱

图1 部分不同淋球菌菌株的 RAPD 指纹图谱

表1 4 种不同耐药类型菌株的耐药分型

耐药类型	基因分型			合计
	I 型	II 型	III 型	
A	28	12	0	40
B	1	25	1	27
C	5	3	0	8
D	1	1	1	3
合计	35	41	2	78

注: I、II、III 为三种不同的基因分型

3. 不同耐药类型与基因分型之间的对应分析:

(1) 将 4 种不同的耐药类型与三种不同耐药基因型的数据变换后, 得其协方差矩阵的第一个特征根累积方差贡献率已达到 70% 以上, 总的  $\chi^2$  为 41.58, 即第一维惯量值为 0.386 87, 占总信息量的 72.58%, 第二维惯量为 0.146 14, 占总信息量的 27.42%, 此二维特征可以完整表达两变量间的信息, 并且观察时以第一维度为主。按照特征值累积贡献率 0.9 以上选取主因子, 可选出两个主因子, 及可知耐药类型及基因型别所选主因子上载荷量。四种耐药类型在两个公因子上负荷可表示为: A = -0.650 Dim1 - 0.040 Dim2; B = 1.033 Dim1 - 0.249 Dim2; C = -0.464 Dim1 - 0.106 Dim2; D = 0.602 Dim1 + 3.055 Dim2。

三种不同基因型别在两个公因子上负荷可表示为: I = -0.867 Dim1 + 0.087 Dim2; II = 0.676 Dim1 - 0.253 Dim2; III = 1.315 Dim1 + 3.669 Dim2。在以 Dim1 与 Dim2 作为横坐标与纵坐标的直角坐标系中, 每一个耐药类型就是一个点, 如: A 点的坐标为 -0.6050、-0.040 等, 同理可知, 基因型别的因子负荷情况。

(2) 根据因子负荷情况可作出耐药类型与基因分型的对应分析图(图 2)。在聚合图上, 综合第一

维(Dim1)和二维向量(Dim2)可以看出 A 与 C 相距较近, 说明他们在各基因型别的分布上较为一致, 离 A、C 较近的点是 I, 与 II、III 相距较远, 可以看出他们表现主要集中在基因型别 I 上, 而在其他两型不明显, 同理也知 B 与 II 相近, 基因型 II 的表现主要集中在 B 上, 基因型 III 与 D 点在此二维图标中并不是十分密切。

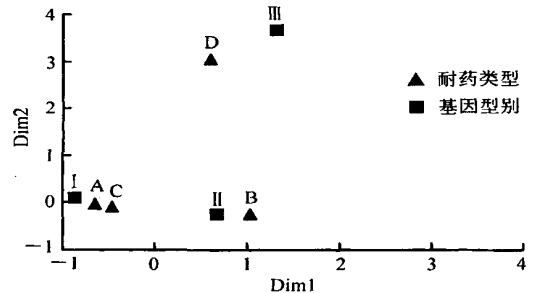


图2 淋球菌耐药性与基因分型的对应分析图

讨 论

RAPD 是由 Williams 等<sup>[5]</sup>与 Welsh 等<sup>[6]</sup>建立的一种分子生物学方法, 是建立在 PCR 技术之上的一种分子标记方法。该方法是以一系列 9~10 个不同碱基随机排列的寡聚核酸单链为引物, 对于所研究的基因组 DNA 进行扩增, 由于 10 mer 的复杂性相当于  $10^6$  bp, 故从一般复杂度为  $10^7 \sim 10^9$  bp 的微生物到人类基因组都能有效扩增出来, 扩增产物通过聚丙烯酰胺凝胶或者琼脂糖凝胶电泳分析, 经 EB 染色来检测扩增产物的多态性。RAPD 操作比较简便, 其指纹图谱能够提供充分的基因组信息, 目前 RAPD 技术已被广泛用于生物学物种鉴定和基因分型研究, 国内有学者应用该方法成功地对 5 种奈瑟菌进行 RAPD 分型, 并能够将淋球菌进一步细分为 3 个群<sup>[7]</sup>。

在本次研究中运用 RAPD 技术对上海地区淋球菌菌株进行了基因分型, 并研究耐药性与其基因分型之间的相关性。研究发现, 上海地区淋球菌菌株可以归为三种相似的 RAPD 指纹图谱, 菌株有着相同的主条带, 但指纹图谱有着明显的区别, 鉴于此结果, 可以从基因水平上对淋球菌菌株进行区分; 基因组的某些区域发生 DNA 的片段的插入或者缺失, 或者碱基突变, 可以造成特定的结合位点发生变化, 而使 PCR 的产物增加或者减少, 发生分子量的变化, 通过任意引物对淋球菌进行扩增, 就可以发现不同菌株之间的差别, 从而进一步区分子型, 这些条

带的差别可以用来证明和归类不同菌株,进而与菌株的一些流行病学特征(如感染力、耐药性等)进行联系。目前以 I、II 两种基因型别为主的淋球菌是上海浦东地区流行株,它在性活跃人群(20~49 岁)中广泛传播;进一步经过对淋球菌耐药性检测,发现上海浦东地区淋球菌菌株耐药性严重,除对大观霉素、头孢曲松敏感以外,对其他抗生素均呈较高度度的耐药性。对菌株耐药表型与基因分型进行进一步对应分析,表明耐药类型与基因型别之间对应关系达到较显著水平,按照特征值累积贡献率 0.9 以上选取两个主因子,并根据耐药类型及基因型别因子载荷矩阵作出二维聚合图,显示出不同的基因型别与耐药型别之间有一定关联,以 I、II 两种基因型及 A、B 两种耐药类型为主的淋球菌是耐药性强的淋球菌菌株,从研究得到的资料看来,多重耐药的淋球菌是上海浦东地区主要的流行株,是今后淋病防治工作的重点与难点。

## 参 考 文 献

- 1 Ye S, Su X, Wang Q, et al. Surveillance of antibiotic resistance of *neisseria gonorrhoeae* isolates in China 1993-1998. *Sex Transm Dis*, 2002, 29:242-245.
- 2 Gorwitz RJ, Nakashima AK, Moran J, et al. Sentinel surveillance for antimicrobial resistance in *neisseria gonorrhoeae* United States, 1988-1991. *Morb Mortal Wkly*, 1993, 42(SS-3):29-33.
- 3 奥斯伯,布伦特,金斯,等著. 颜子颖,王海林,金冬雁,译. 精编分子生物学实验指南. 北京:科学出版社, 1998. 39-40.
- 4 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth International Supplement. NCCLS, Wayne, PA. 2002, M100-S12, 22:53-55.
- 5 Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18:6531-6535.
- 6 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18:7213-7218.
- 7 Zhu X, Kong F, Zhang G, et al. Identification and classification of *neisseria gonorrhoeae* by RAPD fingerprinting. *Chin Med J (Engl)*, 1995, 108:269-272.

(收稿日期:2004-04-15)

(本文编辑:尹廉)

## · 疾病控制 ·

新疆自治区喀什地区 35 岁以上维吾尔族人群  
超重和肥胖的现状调查

陈长春 王丽 牟小梅

通过对新疆维吾尔自治区喀什地区 35 岁以上维吾尔族人群超重率和肥胖率的调查,并与近年来我国中年人群超重率和肥胖率的资料进行比较,对维吾尔族中年人群超重和肥胖的现状进行了初步探讨。

1. 对象与方法:①收集 2004 年 1-6 月来南疆医院体检,以及南疆医院在喀什地区各县乡巡诊义诊人群数据资料,采用随机整群抽样法抽取 14 个乡(或单位)作为调查点,筛选 35 岁以上维吾尔族人群,按照随机化原则随机抽取男女各 1500 人的数据进行肥胖率和超重率的调查,年龄 35~75 岁。②诊断标准及数据处理,根据 WHO 制定的体重指数(BMI)标准<sup>[1]</sup>:BMI $\geq$ 25 kg/m<sup>2</sup>为超重,BMI $\geq$ 30 kg/m<sup>2</sup>为肥胖。结果用 SPSS 软件进行统计学分析。

2. 结果与分析:①男女性 BMI 比较:超重率男女性各为 62.09%和 77.10%,肥胖率各为 18.12%和 29.03%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。②按年龄组分布的超重率和肥胖率比较:调查人群中总的超重和肥胖的发生率分别为 69.60%和 23.57%;35~44 岁组最低,分别为 23.34%和 11.09%;55~64 岁最高,分别为 87.85%和 36.23%;差异有统计学意

义( $P < 0.05$ ),65 岁以上年龄段超重和肥胖率有所下降。③调查结果表明,该地区维吾尔族人群超重率和肥胖率分别为 69.60%和 23.57%,与武阳丰等在 1998 年我国中年人群超重率和肥胖率调查研究相比明显偏高,主要集中在 55~64 岁年龄段。在新疆的人口分布中,大部分为维吾尔族,喀什地区是维吾尔族聚集地,饮食结构较单一,主要以面食、肉类和奶制品为主,喜饮酒,可能是导致超重和肥胖的主要原因,是否存在先天性因素,有待于进一步研究。在本次调查中还发现,中年维吾尔族人群中,女性的超重和肥胖率均高于男性,可能与婚后的维吾尔族妇女较少参加田间劳动和户外活动的民族习俗有关。由于肥胖和健康密切相关,又使多种疾病发生的机会大大增加,因此,积极干预肥胖的后天因素和对民族地区普及相关的医疗保健知识,已成为新疆地区广大医务工作者重要的公共卫生课题。

## 参 考 文 献

- 1 WHO/NUT/NOD. Obesity: Preventing and the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. WHO, Geneva, 1998.

(收稿日期:2004-08-25)

(本文编辑:尹廉)