

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.13.008

武陵山区淋病奈瑟菌对 7 种抗菌药物的耐药情况及分子生物学特征分析*

向波¹, 向辉², 周卫华³, 刘龙亚⁴, 印道春⁵, 龙文志⁶, 张建军⁷, 符自清^{1△}

吉首大学第一附属医院(湘西土家族苗族自治州人民医院):1. 检验科;2. 肿瘤科;

3. 产前诊断中心;4. 泌尿一科;5. 皮肤科, 湖南湘西 416000;6. 湖南省湘西土家族苗族自治州凤凰县

民族中医医院检验科, 湖南湘西 416200;7. 湖南省张家界市人民医院

检验科, 湖南张家界 427000

摘要:目的 通过监测武陵山区淋病奈瑟菌的抗菌药物耐药情况及分子生物学特征, 了解该地区是否存在头孢曲松耐药菌株及相关流行病学信息。方法 回顾性分析 2018 年 4 月 1 日至 2019 年 3 月 31 日该地区培养分离出的 122 株淋病奈瑟菌的临床资料。药敏试验参考欧洲药敏试验委员会(EUCAST)标准, 采用 K-B 法和琼脂稀释法检测淋病奈瑟菌对头孢曲松和阿奇霉素等 7 种抗菌药物的敏感性。采用多抗原序列分型法(NG-MAST)对头孢曲松低敏感性耐药菌株进行基因分型, 并用 MEGA6 构建 POR 和 TBPB 基因系统发育树。结果 122 株淋病奈瑟菌对头孢曲松、头孢泊肟、头孢克肟、壮观霉素、阿奇霉素、四环素和环丙沙星的敏感率分别为 98.36%、92.62%、90.16%、81.15%、78.69%、37.70%和 12.29%。2 株头孢曲松耐药菌株最低抑菌浓度(MIC)分别为 1.000 μg/mL 和 0.250 μg/mL, NG-MAST 型分别为 ST2987 型和 ST14155 型。结论 该研究发现 1 株高水平头孢曲松耐药的淋病奈瑟菌, 但未发现流行病学同源耐药菌株。武陵山区淋病奈瑟菌耐药形势严峻, 应严控头孢曲松耐药菌株传播。

关键词:淋病奈瑟菌; 抗菌药物; 头孢菌素**中图分类号:**R446.5**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2020)13-1822-04

Analysis of biological characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* and its resistance to the seven kinds of antibiotics at Wuling mountain area*

XIANG Bo¹, XIANG Hui², ZHOU Weihua³, LIU Longya⁴, YIN Daochun⁵,
LONG Wenzhi⁶, ZHANG Jianjun⁷, FU Ziqing^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Oncology; 3. Prenatal Diagnosis Center; 4. First Department of Urology; 5. Department of Dermatology, First Affiliated Hospital of Jishou University (People's Hospital of Xiangxi Tujia and Miao Autonomous Prefecture), Xiangxi, Hunan 416000, China; 6. Department of Clinical Laboratory, National Chinese Medicine Hospital of Fenghuang, Xiangxi, Hunan 416200, China; 7. Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Zhangjiajie, Zhangjiajie, Hunan 427000, China

Abstract: **Objective** To understand whether there are ceftriaxone resistant strains and related epidemiological information by monitoring the drug resistance and molecular biological characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* in Wuling mountain area. **Methods** A retrospective study was conducted to analyze the clinical data of 122 *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated from April 1, 2018 to March 31, 2019. The susceptibility test was carried out by referring to the EUCAST standard. The sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to 7 kinds of antibiotics such as ceftriaxone and azithromycin were measured by K-B method and agar dilution method. And strains with ceftriaxone low sensitivity strains and resistant strains were genotyped by NG-MAST. POR and TBPB gene phylogenetic trees were constructed with MEGA6. **Results** The sensitivity rates of 122 *Neisseria gonorrhoeae* strains to ceftriaxone, cefpodoxime, cefaclor, spectinomycin, azithromycin, tetracycline and ciprofloxacin were 98.36%, 92.62%, 90.16%, 81.15%, 78.69%, 37.70% and 12.29%, respectively. The minimum

* 基金项目: 湖南省卫生和计划生育委员会 2015 年度科研计划课题项目(C2015-83)。

作者简介: 向波, 男, 医师, 主要从事淋病耐药机制方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 2623780595@qq.com。

inhibitory concentration (MIC) values of the two ceftriaxone resistant strains were 1.000 $\mu\text{g/mL}$ and 0.250 $\mu\text{g/mL}$, and genotype of NG-MAST of two ceftriaxone resistant strains were ST2987 and ST14155, respectively. **Conclusion** The research has reported one strain of high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, but epidemiologically homologous strains haven't found. The transmission of resistant strains to ceftriaxone should be strictly controlled, because the drug resistance of *Neisseria gonorrhoeae* is severe in Wuling mountain area.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*; antibiotics; cephalosporins

自 20 世纪 30 年代以来,人们已成功使用百浪多息治疗淋病,抗菌药物治疗淋病已有近百年历史。然而,淋病奈瑟菌(NG)是一种对抗菌药物具有强大抵抗力的特殊细菌,其借助耐药基因水平转移和耐药质粒传播等方式,先后对磺胺类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类、四环素类、氟喹诺酮类等多种抗菌药物产生较强的耐药性^[1]。目前,NG 是 WHO 重点监测的病毒细菌之一。头孢曲松(CRO)是最后一种可以单独用于治疗淋病的一线抗菌药物。因此,头孢菌素耐药 NG 的出现和播散给淋病的治疗带来了极大的威胁^[2-4]。国际上已经将多重耐药 NG 的传播视作能影响全球公众健康的重大公共卫生事件^[5]。目前,WHO 估计全球有 7 830 万成人患有淋病,中国每年新增 11 万例;并且低收入国家尚缺乏有效管控淋病的资源和措施^[6-7]。

武陵山区为国家集中连片特困山区,医疗资源有限,淋病的防控需求更大。因此,本研究检测了武陵山区 NG 菌株对 7 种抗菌药物的敏感性,筛查了 CRO 耐药的 NG,并对 CRO 低敏感和耐药菌株采用多抗原序列分型法(NG-MAST)进行分型,构建了 POR 和 TBPB 基因系统进化树,从分子生物信息学角度探讨耐药菌株的流行病学特征。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 4 月 1 日至 2019 年 3 月 31 日武陵山区(吉首、张家界、凤凰、龙山、永顺、花垣和怀化)各地区医院就诊的 122 例 NG 培养阳性的淋病患者为研究对象。其中男 97 例,女 25 例;年龄 13~66 岁,中位年龄 35.1 岁。

1.2 方法 标本采集方法参照文献[8]。转运培养基采用美国 BD 公司生产的 GC 琼脂、血红蛋白、1% 生长添加剂、粘菌素、万古霉素、制霉菌素和甲氧苄氨嘧啶。

1.2.1 菌种鉴定与保存 分离培养基使用改良 Thayer-Martin 琼脂平板(美国 BD 公司)。并使用革兰染色和 Vitek NH 卡(梅里埃公司)进行菌种鉴定,所有菌株在-75 $^{\circ}\text{C}$ 保存于 20% 的脱脂牛奶中。

1.2.2 抗菌药物与药敏试验 CRO、头孢泊肟(CPD)和头孢克肟(CFM)浓度为 0.015~4.000 $\mu\text{g/}$

mL,阿奇霉素(AZM)浓度为 0.06~4.00 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma Aldrich 公司,琼脂稀释法)。环丙沙星(CIP) 5 μg 、四环素(TCY) 30 μg 、壮观霉素(SH) 100 μg (OXOID 公司,K-B 法)。质控菌株 ATCC 49226。用琼脂稀释法检测 3 种头孢菌素及 AZM 对所有菌株的最低抑菌浓度(MIC)^[8]。K-B 法检测其余 3 种抗菌药物敏感性。所有 CRO 低敏感性及耐药菌株均送吉首大学第一附属医院检验科复检。

1.2.3 结果判读 MIC_{CRO} $\leq$ 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 为敏感,0.060~0.125 $\mu\text{g/mL}$ 为低敏感性,其余为耐药;MIC_{CPD} $\leq$ 0.500 $\mu\text{g/mL}$ 为敏感,其余为耐药;MIC_{CFM} $\leq$ 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 为敏感,其余为耐药。CIP 的抑菌圈直径 $\geq$ 41 mm 为敏感,28~40 mm 为中介, $\leq$ 27 mm 为耐药;TCY 的抑菌圈直径 $\geq$ 38 mm 为敏感,31~37 mm 为中介, $\leq$ 30 mm 为耐药;SH 的抑菌圈直径 $>$ 18 mm 为敏感,15~17 mm 为中介, $<$ 14 mm 为耐药。MIC_{AZM} $\leq$ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 为敏感, $>$ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 为耐药。琼脂稀释法的折点参考欧洲药敏试验委员会(EUCAST)公布的数据(www.eucast.org),由于 EUCAST 无 CPD 数据,故参照美国临床和实验室标准协会(CLSI) M100-S28 进行判断。K-B 法的折点也参照 CLSI M100-S28 进行判断。

1.2.4 POR 基因和 TBPB 基因系统发育树的构建 提取 MIC_{CRO} $\geq$ 0.060 $\mu\text{g/mL}$ NG 菌株的基因组 DNA(上海生工试剂),PCR 引物及扩增条件参考 NG-MAST 进行基因分型,采用 MEGA6 构建系统发育树。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 对数据进行分析。计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NG 菌株的耐药率 CRO 药率最低(1.64%),CIP 耐药率最高(84.43%)。非头孢菌素类药物耐药率高于头孢菌素类。3 种头孢菌素的耐药率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.330, P = 0.026$),CFM 和 CPD 耐药率高于 CRO($P < 0.05$),见表 1。

2.2 NG 菌株对相关抗菌药物的 MIC 值 2 株 CRO 耐药菌株,其中 1 株属于高水平 CRO 耐药, MIC_{CRO}

为 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。31 株为 CRO 低敏感性菌株。26 株 AZM 耐药菌株, $\text{MIC}_{\text{AZM}} \geq 0.500 \mu\text{g}/\text{mL}$, 见表 2。

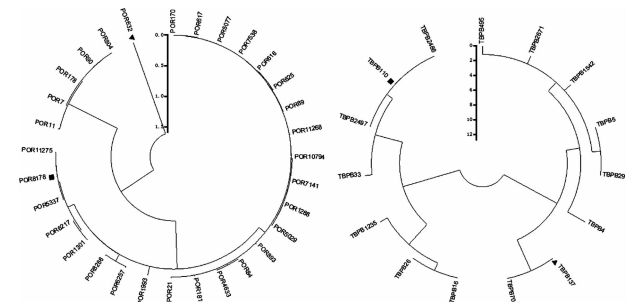
表 1 122 株 NG 菌株对 7 种抗菌药物敏感性[n(%)]			
抗菌药物	敏感	中介	耐药
CRO	120(98.36)	0(0.00)	2(1.64)
CPD	113(92.62)	0(0.00)	9(7.38)
CFM	110(90.16)	0(0.00)	12(9.84)
SH	99(81.15)	5(4.10)	18(14.75)
AZM	96(78.69)	0(0.00)	26(21.31)
TCY	46(37.70)	2(1.64)	74(60.66)
CIP	15(12.29)	4(3.28)	103(84.43)

注:不同抗菌药物的耐药率进行比较时,将中介数据归为耐药。

表 2 NG 菌株对相关抗菌药物 MIC 值的检测情况(n)	
抗菌药物	MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	0.015 0.030 0.060 0.120 0.250 0.500 1.000 2.000 4.000
CRO	24 65 16 15 1 0 1 0 0
CPD	10 35 23 11 12 22 6 1 2
CFM	18 47 22 23 6 0 3 1 2
AZM	— — 32 53 11 13 9 0 4

注:—表示无数据。

2.3 CRO 低敏感性及耐药 NG 菌株分子生物学信息 33 株 NG 菌株有 31 种 POR 等位基因型,分为 2 个群,其中 POR632 单独构成一群,其余 30 种构成另一个大群,见图 1。TBPB 基因有 15 个等位基因型,优势基因型是 ST4、ST5、ST16、ST26、ST29、ST33、ST112、ST137 型。2 株耐药 NG 菌株 NG-MAST 型分别为 ST2987 和 ST14155。



注:▲为 $\text{MIC}_{\text{CRO}} = 1.000 \mu\text{g}/\text{mL}$;■为 $\text{MIC}_{\text{CRO}} = 0.250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 1 33 株 $\text{MIC}_{\text{CRO}} \geq 0.060 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NG 菌株 POR 基因和 TBPB 基因系统发育树

3 讨 论

广谱头孢菌素是淋病治疗的最后防线^[2]。日本、西班牙、澳大利亚和法国均报道了 CRO 耐药 NG 菌株,CRO 耐药 NG 菌株极有可能已经播散于世界各地^[9-13]。因此,临床将面临难以治疗的多重耐药 NG 菌株。本研究结果显示,共检测出 1 株 CRO 高水平耐药菌株, MIC_{CRO} 为 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,另发现 1 株

MIC_{CRO} 为 0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的耐药菌株。NG-MAST 分型研究显示,这两株耐药菌株分别为 ST2987 型和 ST14155 型;POR 和 TBPB 基因型分别为 ST632 和 ST137,ST8178 和 ST110。这两株菌株的 POR 和 TBPB 基因型在系统发育树中均分别属不同大群,遗传距离也相差较远。二者分子生物学信息差距较大,同时结合前述基因型和药敏表型的差异,可以推测这两株菌亲缘关系较远,且流行病学来源不同。鉴于此,由于 ST2987 独特的基因分型和高水平 CRO 耐药性,该菌株可能携带某种对 CRO 高水平耐药的基因。然而,国内有关 CRO 高水平耐药 NG 菌株的报道较少,这可能与淋病监控网络不健全以及检测力度欠缺有关。

本研究药敏结果显示,武陵山区 NG 菌株对头孢菌素类耐药率明显高于欧美国家^[14]。且本研究分离的 122 株 NG 菌株对 3 种第三代头孢菌素类抗菌药物(CRO、CPD 和 CFM)耐药率为 1.64%~9.84%,耐药率较高,可能与多数患者可自行购买口服头孢菌素等抗菌药物有关,导致耐药 NG 菌株产生。2012 年,欧洲淋病治疗指南指出,已经不再将 CFM 列为一线用药^[15]。目前,唯一可靠的“经验性”治疗是注射 CRO,而口服 800 mg CFM 的治疗方案,同时需要药敏试验结果的支持^[10]。因此,本地区不应再将 CPD 和 CFM 作为治疗淋病的一线药物。

AZM 亦是治疗淋病的一线药物。本研究结果显示,本地区 NG 菌株对 AZM 耐药率达 21.31%,超过 WHO 制定的治疗 NG 抗菌药物监测计划(GASP)数据上限值 4 倍(中国,0.1%~5.0%),接近日本和我国香港地区报道的数据(6%~30%),与南京地区(32.3%)的耐药率有较大差别^[14,16]。鉴于本地区 NG 对 AZM 和 CRO 均有较高耐药率,建议本地医疗机构采纳国际认可的“二联疗法”(1.5 g AZM 口服与 250 mg CRO 肌肉注射或静脉滴注^[14]),以预防“超级耐药 NG”菌株产生和传播。

此外,CIP、TCY 和 SH 耐药率分别为 84.43%、60.66%和 14.75%,与国外有关研究结果类似^[17]。上述药物可以用于治疗特殊人群,如头孢菌素类过敏患者、孕妇、哺乳期女性、儿童、有出血倾向的老年患者以及肾功能异常患者等。

武陵山区有超过 1 100 万的少数民族,存在贫困人口分布广、医疗资源有限、漏诊率高以及抗菌药物使用不合理等问题。由于本地区经济和卫生条件较为落后,NG 菌株头孢菌素类耐药情况尚需进一步研究。严密监控头孢菌素耐药的 NG 菌株播散,应是本地区今后卫生工作重心之一。总之,本地区 NG 耐药防控形势严峻,普遍开展药敏试验和深入研究耐药机

制是加强淋病管控的重要手段^[10,18]。

致谢：

衷心感谢南华大学附属南华医院何军主任对本课题的指导,感谢湖南省怀化市第一人民医院张勇医生,龙山县人民医院朱萍主任,花垣县人民医院向阳主任和吉首大学附属第二医院陈滔主任在病例收集和细菌培养中付出的辛勤劳动。

参考文献

[1] SUAY-GARCIA B, PEREZ-GRACIA M T. Future prospects for *Neisseria gonorrhoeae* treatment[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2018, 7(2): 49.

[2] SUAY-GARCIA B, PEREZ-GRACIA M T. Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: latest developments[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36(7): 1065-1071.

[3] HOOK I E, KIRKCALDY R D. A brief history of evolving diagnostics and therapy for gonorrhea: lessons learned[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(8): 1294-1299.

[4] FIFER H, NATARAJAN U, JONES L, et al. Failure of dual antimicrobial therapy in treatment of gonorrhea[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(25): 2504-2506.

[5] LEE H, UNEMO M, KIM H J, et al. Emergence of decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Korea[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(9): 2536-2542.

[6] GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015[J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1545-1602.

[7] YIN Y P, HAN Y, DAI X Q, et al. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to azithromycin and ceftriaxone in China: a retrospective study of National surveillance data from 2013 to 2016 [J]. *PLoS Med*, 2018, 15 (2): e1002499.

[8] 张杰, 李伟, 朱邦勇, 等. 2008—2013 年广西部分地区性病门诊患者淋球菌临床分离菌株的耐药监测[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2017, 31(2): 180-182.

[9] KATZ A R. Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(3): 608.

[10] BUDER S, DUDAREVA S, JANSEN K, et al. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany: low levels of cephalosporin resistance, but high azithromycin resistance[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 44.

[11] WHILEY D M, JENNISON A, PEARSON J, et al. Genetic characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* resistant to both ceftriaxone and azithromycin[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(7): 717-718.

[12] EYRE D W, SANDERSON N D, LORD E A, et al. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018[J]. *Euro Surveil*, 2018, 23(27): 2-7.

[13] KULARATNE R, MASEKO V, GUMEDE L, et al. Trends in *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Resistance over a Ten-Year Surveillance Period, Johannesburg, South Africa, 2008–2017[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2018, 7(3): E58.

[14] WI T, LAHRA M M, NDOWA F, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action [J]. *PLoS Med*, 2017, 14(7): e1002344.

[15] BIGNELL C, UNEMO M. European STI Guidelines Editorial. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults[J]. *Int J STD AIDS*, 2013, 24(2): 85-92.

[16] WAN C, LI Y, LE W J, et al. Increasing Resistance to Azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* in Eastern Chinese Cities: Resistance Mechanisms and Genetic Diversity among Isolates from Nanjing[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(5): e02499-17.

[17] PEDERSEN M L, POULSEN P, BERTHELSEN L A, et al. Rapid spread of *Neisseria gonorrhoeae* ciprofloxacin resistance due to a newly introduced resistant strain in Nuuk, Greenland, 2012–2015: a community-based prospective cohort study [J]. *BMJ Open*, 2016, 6 (8): e011998.

[18] UNEMO M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea—the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge[J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 364.

(收稿日期: 2019-08-15 修回日期: 2020-04-09)

(上接第 1821 页)

(BMI) Are Risk Factors for Severe Acute Pancreatitis in Patients with Hypertriglyceridemia Pancreatitis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 6097-6103.

[11] WANG J, LU X, XU X, et al. Predictive role of monocyte-to-lymphocyte ratio in patients with *Klebsiella pneumoniae* infection: a single-center experience [J]. *Medicine*, 2019,

98(38): e17215.

[12] YAYLA M E, ILGEN U, OKATAN I E, et al. Association of simple hematological parameters with disease manifestations, activity, and severity in patients with systemic sclerosis[J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 39(1): 77-83.

(收稿日期: 2019-12-10 修回日期: 2020-03-02)