

159株淋球菌对7种抗生素的耐药性实验研究

杨寒淞¹, 曹应葵¹, 曾志君², 王红梅¹, 李玉叶^{1*}

(1. 昆明医科大学第一附属医院, 云南 昆明 650032; 2. 云南省疾病预防控制中心, 云南 昆明 650022)

【摘要】 目的 通过实验研究了解本地区淋球菌对7种抗生素的耐药情况、产 β -内酰胺酶淋球菌(PPNG)和质粒介导高度耐四环素淋球菌(TRNG)流行情况。**方法** 用琼脂稀释法测定环丙沙星、四环素、青霉素、阿奇霉素、大观霉素、头孢曲松和头孢克肟的最低抑菌浓度(MIC), 根据世界卫生组织(WHO)的标准判定其敏感性; 用纸片酸度法检测 β -内酰胺酶。**结果** 159株淋球菌检出PPNG为78.9%, TRNG为48.4%, 多重耐药菌株占比73.6%; 对环丙沙星、四环素、青霉素、阿奇霉素的耐药率分别是100%、89.9%、89.3%、14.5%; 对大观霉素、头孢曲松、头孢克肟的敏感率分别为100%、95.6%和92.5%。**结论** 本地区淋病患者不宜使用青霉素、四环素、环丙沙星和阿奇霉素, 大观霉素、头孢曲松和头孢克肟均可作为治疗药物。多重耐药菌株比例增高, 应长期动态监测耐药性变化。

【关键词】 淋球菌; 耐药监测; 抗生素

中图分类号: R959.3; R759.2 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1002-1310.2021.03.002

The resistance of neisseria gonorrhoeae to seven antimicrobial agents in vitro

YANG Han-song¹, CAO Ying-kui¹, ZENG Zhi-jun², WANG Hong-mei¹, LI Yu-ye^{1*}

(1. First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming, Yunnan 650022, China)

【Abstract】 Objective To analyze antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* (NG) to seven antimicrobial agents and the penicillinase-producing NG(PPNG) and tetracycline resistant NG(TRNG) in Kunming from 2019 to 2020. **Methods** One hundred fifty-nine NG strains were isolated and cultured from our clinical department. Minimum inhibitory concentration (MIC) of ciprofloxacin, tetracycline, penicillin, azithromycin, spectinomycin, ceftriaxone, cefixime were determined by agar dilution method; β -lactamase was measured by paper iodine quantitative method. **Results** PPNG and TRNG accounted for 78.9% and 48.4% of the NG isolates respectively, and the proportion of multiple drug-resistant strains was 73.6%. The resistant rate of ciprofloxacin, tetracycline, penicillin, azithromycin were 100%, 89.9%, 89.3% and 14.5%, respectively. The sensitivity rate of spectinomycin, ceftriaxone and cefixime were 100%, 95.6% and 92.5%, respectively. **Conclusion** Penicillin, tetracycline, ciprofloxacin and azithromycin should not be used in patients with gonorrhoeae in Kunming, while spectinomycin, ceftriaxone and cefixime can be used as treatment options for gonorrhoeae. The increasing proportion of multi-drug resistant strains suggests that the dynamic changes of drug resistance should be monitored for a long time.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Antimicrobial resistance; Antibiotics

淋病奈瑟菌(淋球菌)感染后引起的淋病,是我国最常见的性传播疾病之一,因临床滥用抗生素及不规范治疗,淋球菌的耐药性日趋严重。本研究旨在了解本单位于(2019~2020)年期间收集的159株淋球菌分离株对7种抗生素的耐药情况,及其产 β -内酰胺酶淋球菌(PPNG)和质粒介导高度耐四环素淋球菌(TRNG)的流行情况,为本地区淋病患者的治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 159株淋球菌源于(2019~2020)年在本单位性病门诊就诊的淋病患者的泌尿生殖道分泌物培养男145株,女14株,年龄(15~61)岁。男性标本取自尿道口内(2~3)cm处分泌物,女性标本取自宫颈口内(1~2)cm处分泌物,获得的菌株培养(24~48)h后经革兰染色、菌落形态、氧化酶及糖发酵试验鉴定,分纯后洗脱于肉汤中, -70℃冰箱冻存备

用。确诊淋病患者签署知情同意书后,按要求登记各项临床资料。上述已通过相关伦理审查。

7种抗生素(环丙沙星、四环素、青霉素、阿奇霉素、大观霉素、头孢曲松、头孢克肟)以及WHO标准淋球菌菌株K、G、J、L、P、49226均由云南省疾病预防控制中心提供;淋球菌GC培养基(英国OXOID公司生产),10%脱纤维新鲜羊血(南京便诊生物科技有限公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 制备菌悬液 实验菌株和标准菌株用巧克力平板培养(18~20)h,用生理盐水将淋球菌菌苔制成 10^7 CFU/ml菌悬液。

1.2.2 MIC 采用WHO西太区淋球菌耐药监测规划推荐的琼脂稀释法^[1],先将7种抗生素按要求配成原液,再倍比稀释成不同浓度,环丙沙星(0.015~8)mg/L,四环素(0.5~16)mg/L,青霉

【收稿日期】 2021-03-29 *通信作者 E-mail: yyeli2000@126.com 基金项目: 云南省防治艾滋病项目; 云南省“万人计划”名医专项; 云南省卫生和计划生育委员会医学领军人才(L-201613); 云南省皮肤免疫疾病临床医学研究中心(2019ZF012); 云南省皮肤与免疫性疾病临床医学中心(ZX2019-03-02); 云南省创新团队(2018HC005)

素 (0.015 ~ 8) mg/L, 阿奇霉素 (0.03 ~ 8) mg/L, 大观霉素 (4 ~ 128) mg/L, 头孢曲松和头孢克肟 (0.008 ~ 1) mg/L。将淋球菌基础琼脂高压灭菌, 水浴冷却至 50℃, 加入 10% 脱纤维新鲜羊血。取 0.2ml 倍比稀释好的 7 种抗生素工作液, 加入 20ml 淋球菌血液基础培养基, 混匀后倾倒入平板。从低浓度至高浓度配制各浓度平板。用接种器将实验和标准菌株菌悬液接种于各平板, 置 37℃、5%CO₂ 环境下培养 24h 后观察结果, 记录无菌落生长的 MIC。以 WHO 的 D、G、J、L、P、49226 标准菌株作质控。药物敏感性判断标准按照 WHO 西太区淋球菌耐药监测规划制定的标准^[1]。

1.2.3 PPNG 与 TRNG 测定 采用纸片酸度法测定菌株是否产 β-内酰胺酶, 其阴性和阳性对照分别为 L、J 标准菌株, 先将滤纸吸足青霉素溶液 (以溴甲酚紫为指示剂), 取待检菌涂于滤纸上, 置 37℃ 温育 30min, 滤纸上菌落颜色由紫色变为黄色即为 β-内酰胺酶阳性, 颜色无变化为阴性。采用琼脂稀释法测定, 当四环素 MIC ≥ 16mg/L 时判定为 TRNG 阳性株。

2 结果

2.1 患者信息资料 采集分泌物并培养出淋球菌的患者有 159 人, 男女比例为 10.3 : 1 (145 : 14), 47.8% 的患者年龄分布在 (20 ~ 29) 岁, 90.1% 为汉族, 70.4% 居住在本市, 35.3% 的文化程度是高中或中专, 23.7% 的职业是工人, 94.7% 的患者主诉泌尿生殖道有异常分泌物, 84.8% 的病程在 7d 以内, 67.7% 的患者在发生性行为时未坚持使用安全套。

2.2 淋球菌耐药性及 PPNG、TRNG 检出情况 所有菌株对大观霉素均敏感, 未发现头孢曲松和头孢克肟耐药菌株, 对环丙沙星、四环素、青霉素和阿奇霉素的耐药菌株分别有 159 株 (100%)、143 株 (89.9%)、142 (89.3%) 和 23 株 (14.5%)。检出 PPNG 为 124 株 (78.9%), TRNG 为 77 株 (48.4%)。详见表 1。

表 1 159 例淋球菌分离株对药物的抗菌活性结果统计 (n, %)

抗菌药物	敏感株	低敏株	耐药株	PPNG 株	TRNG 株
青霉素	0	17(10.7)	142 (89.3)	124 (78.9)	—
四环素	16 (10.1)	—	143 (89.9)	—	77 (48.4)
环丙沙星	0	0	159 (100)	—	—
大观霉素	159 (100)	—	0	—	—
头孢曲松	152 (95.6)	7 (4.4)	—	—	—
头孢克肟	147 (92.5)	12 (7.5)	—	—	—
阿奇霉素	136 (85.5)	—	23(14.5)	—	—

注: “—”表示未检测。

2.3 多重耐药性 检出多重耐药株 117 株 (73.6%)。三重耐药菌株中, 对环丙沙星、青霉素和四环素同时

耐药的有 106 株 (66.7%); 四重耐药菌株中, 对环丙沙星、青霉素、四环素和阿奇霉素同时耐药的有 14 株 (8.8%)。详见表 2。

表 2 159 株淋球菌的多重耐药 (n, %)

耐药种类	耐药率
环丙沙星 + 四环素 + 青霉素	106 (66.7)
环丙沙星 + 四环素 + 阿奇霉素	21 (13.2)
环丙沙星 + 青霉素 + 阿奇霉素	15 (9.4)
环丙沙星 + 四环素 + 阿奇霉素 + 青霉素	14 (8.8)
多重耐药	117 (73.6)

3 讨论

淋病作为全世界广泛流行的性传播疾病之一, 据 WHO 估计 2016 年世界范围内新增淋病 8 700 万例^[2], 我国 2019 年淋病报告发病率为 8.45/10 万^[3]。近年来, 抗生素的滥用及细菌染色体基因突变和耐药质粒的转移, 使淋球菌的耐药性在全球较为普遍。

本研究统计, 男女淋病发病比例为 10.3 : 1, 与国内报道类似^[4], 近年来男性发病率愈发高于女性, 可能原因是女性患者多无明显症状, 临床易漏诊, 或女性主动求医者少、性伴通知不到位等, 因此要加大对性病门诊女性患者的淋病筛查力度, 并重视确诊患者性伴侣的检测。患者年龄主要集中在 (20 ~ 29) 岁, 为性活跃人群, 与文献报道^[5、6]类似, 淋病发病年龄近年来呈年轻化趋势, 提示应重视青少年人群的性健康知识教育。患者多为低学历和低收入人群, 常发生无保护性行为, 应加强对患者的性健康知识科普。

本研究中 PPNG 检出率为 78.9%, 高于 2013—2016 年广西的 43.71%^[7] 和 2016—2018 年东莞的 38.5%^[8], 青霉素耐药率为 89.3%, 不能作为淋病治疗药物, 并应警惕与其他 β-内酰胺酶类抗生素交叉耐药的可能。

89.9% 菌株检出四环素耐药株, 其中 48.4% 为 TRNG, 高于 2019 年广州地区 13%^[9], 提示本地区 TRNG 已高于全国水平^[10]。四环素已不能作为本地区治疗淋病的药物, 用药时注意与其他四环素类药物 (如多西环素、米诺环素等) 交叉耐药的可能。

20 世纪开始喹诺酮类药物治疗淋病的成功率已不足 10%^[11], 本研究发现环丙沙星全部耐药 (100%), 与 2018 年成都 (100%)^[12]、2015—2019 年北海 (98.9%)^[13] 数据相近, 说明本地区环丙沙星已高度耐药, 可能与泌尿系统感染时广泛使用喹诺酮药物有关。

阿奇霉素曾被推荐为治疗淋球菌感染的首选药物, 但由于临床使用广泛, 全国各地阿奇霉素耐药率逐年上升, 2016 年广州地区阿奇霉素耐药率为 14.7%^[14], 2018—2019 年武陵山区 78.7%^[15]。本研究中发现阿奇霉素耐药率为 14.5%, 已不适合作为淋病治疗药物。

本研究未发现大观霉素、头孢曲松及头孢克肟耐药菌株。但头孢曲松和头孢克肟的低敏率分别为4.4%和7.5%，其中头孢曲松低敏率和国内的平均水平接近^[16]，头孢克肟低敏率则低于广西地区^[17]。在我国其他地区已发现头孢曲松耐药菌株^[17]，因此应持续监测淋球菌对头孢曲松的敏感性，防止耐药菌株的暴发流行。大观霉素作为氨基糖苷类药物，国内外也有耐药菌株报道^[18、19]，使用大观霉素时应关注大观霉素的敏感性，及时发现耐药菌株。

本研究中73.6%为多重耐药株，高于2018年成都地区36.6%^[12]。其中，89.3%为三重耐药菌株，8.8%为四重耐药菌株，多重耐药使淋病治疗更加困难，可能与该地区患者自行用药或者用药不规范有关，建议各级卫生部门加强性病诊疗规范，同时动态监测抗菌药物的耐药状况。

综上，及时治疗及合理使用抗菌药物是控制淋病暴发流行的主要措施。本地区推荐大观霉素、头孢曲松、头孢克肟作为淋病的首选药物；阿奇霉素耐药率升高，已不再推荐为本地区的淋病治疗药物；对环丙沙星、四环素和青霉素的耐药性已极为严重，均不能作为淋病的治疗药物。本地区要持续加强对淋球菌耐药的监测，防止耐药株的暴发流行的同时，警惕“超级淋球菌”的出现。

参考文献:

[1] World Health Organization. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus[S]. World Health Organization, 2013. www.who.int.
[2] Rowley J, Vander H S, Korenromp E, et al. Chlamydia, gonorrhoeae, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates[J]. 2016. Bull World Health Organ, 2019, 97(8): 548–562.
[3] 岳晓丽, 龚向东, 李婧, 等. 2015–2019年中国淋病流行趋势与特征[J]. 中华皮肤科杂志, 2020, 53(10): 769–773.

[4] 苏兴芳, 方清艳, 杨志芳, 等. 云南省2011–2016年淋病流行趋势分析[J]. 皮肤病与性病, 2017, 39(4): 271–274.
[5] 王哲. 北京市平谷区医院581例性传播疾病病例分析[J]. 实用皮肤病学杂志, 2016, 9(3): 186–188.
[6] 陈福亭, 郑熠, 石萍, 等. 2008–2016年武汉市性传播疾病流行状况及趋势分析[J]. 实用预防医学, 2018, 25(7): 805–809.
[7] 朱邦勇, 李伟, 甘泉, 等. 广西地区淋病患者淋病奈瑟菌对七种抗生素的耐药监测[J]. 中国皮肤性病杂志, 2018, 32(9): 1052–1056.
[8] 李明, 邹裕, 黄文丽, 等. 587株淋球菌对青霉素等7种抗生素耐药观察[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2019, 26(4): 210–214.
[9] 黎小东, 梁景耀, 曹文苓, 等. 100株淋球菌对7种抗生素的耐药性结果分析[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2020, 27(4): 237–240.
[10] 周海永, 张传领, 金百治. 淋病奈瑟菌的耐药性及分子流行病学观察[J]. 中国皮肤性病杂志, 2018, 32(12): 1400–1403.
[11] Unemo M, Shafer W M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future[J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(3): 587–613.
[12] 罗才会, 李春花, 王有为, 等. 2018年成都地区淋病奈瑟菌对抗生素耐药性的结果分析[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(6): 627–631.
[13] 陈镇, 钟永军, 朱邦勇, 等. 2015–2019年广西北海地区淋球菌耐药结果分析[J]. 皮肤病与性病, 2020, 42(3): 325–327.
[14] 黎小东, 梁景耀, 毕超, 等. 2016年广州地区淋球菌耐药性结果分析[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(8): 971–973.
[15] 向波, 向辉, 周卫华, 等. 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[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(13): 1822–1825.
[16] Chen S C, Yin Y P, Dai X Q, et al. First nationwide study regarding ceftriaxone resistance and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in China[J]. Antimicrob Chemother, 2016, 71(1): 92–99.
[17] 钟娜, 郑文爱, 王芳乾, 等. 2006–2011年海南地区淋球菌耐药性监测分析[J]. 中国皮肤性病杂志, 2013, 27(1): 56–57+63.
[18] 李治清, 刘宏星, 谢江玲. 武鸣县182例淋球菌药敏检测结果分析[J]. 应用预防医学, 2016, 22(2): 155+158.
[19] Bala M, Kakran M, Singh V, et al. Monitoring antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in selected countries of the WHO South-East Asia Region between 2009 and 2012: a retrospective analysis[J]. Sex Transm Infect, 2013, 89(4): 28–35.