

·论 著·

广西2000~2010年O139群霍乱弧菌毒力检测及耐药性分析

权怡,方锦嵩,李翠云,王鸣柳,周凌云,谭冬梅,秦卫文

摘要:目的 研究广西O139群霍乱弧菌毒力基因携带情况及其药物敏感性。方法 采用PCR方法检测广西2000~2010年分离到的14株O139群霍乱弧菌霍乱肠毒素(ctxA)毒力基因,同时用K-B法对10种推荐用抗生素氟哌酸(NOR)、庆大霉素(GEN)、复方新诺明(SXT)、四环素(TET)、氨苄青霉素(AMP)、阿米卡星(AMI)、环丙沙星(CIP)、强力霉素(DOX)、氯霉素(CHL)和链霉素(STR)进行耐药性检测。结果 64.29%的菌株携带ctxA毒力基因,其中病人株携带ctxA毒力基因为100%,所有菌株对氟哌酸、阿米卡星和环丙沙星敏感,对其余7种抗生素高度耐药,病人及病家环境菌株的耐药性高于外环境菌株。结论 庆大霉素、复方新诺明、四环素、氨苄青霉素、强力霉素、氯霉素和链霉素7种传统药物已不宜用于临床病人治疗,提示在疫情监测中应关注试验检测结果,指导临床用药,及时做好防控工作。

关键词: O139群霍乱弧菌,毒力基因,药物敏感试验

中图分类号:R516.5 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)9-1068-03

Resistance and virulence gene of *Vibrio cholera* O139 in Guangxi in 2000~2010. QUAN Yi, FANG Jin-song, LI Cui-yun, etc. (Guangxi Zhuang Autonomous Region for Disease Prevention and Control, Nanning, 530028, China.)

Abstract:Objective To investigate the virulence gene and the antimicrobial susceptibility of *Vibrio cholera* O139 in Guangxi. Methods The method of PCR was applied to detect the virulence gene of cholera enterotoxin (ctxA) in 14 strains of *Vibrio cholera* O139 isolated from 2000 to 2010 in Guangxi, and the assay of K-B was applied to test the antimicrobial susceptibility of 10 kinds of antibacterial. Results Virulence gene was detected in 64.29% of strains *Vibrio cholera* serogroup O139, and in 100% of strains isolated from the patients. Antimicrobial susceptibility tests showed that all of the strains were susceptible to norfloxacin, amikacin and ciprofloxacin, and were resistant to the other 7 categories of antibiotics. The strains isolated from patients and environment of the patients' families were more resistant to antibiotics than the strains isolated from the environment outside. Conclusions The conventional medications, Gentamycin, SXT, tetracycline, ampicillin, doxycycline, chloramphenicol and streptomycin, are not suitable for clinical treatment any more. It is suggested that the results of laboratory tests should be taken into account in epidemic surveillance to guide clinical treatment and disease control.

Key words: *Vibrio cholera* O139, Virulence gene, Antimicrobial susceptibility testing

霍乱是由O1血清群和O139血清群霍乱弧菌引起的急性肠道传染病,是以发病急、传播快、波及范围广、能引起大流行特征的国际检疫传染病之一。1993年我国首例由O139群霍乱弧菌引起的疫情暴发后,在我国多个省也相继检出O139群霍乱弧菌。广西从病人及病家环境标本中共分离出14株O139群霍乱弧菌,我们对14株菌进行了毒力基因和药物敏感性试验,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 现症病人和病家环境标本以及广西历年外环境监测标本分离菌株共14株。

1.2 方法

1.2.1 毒力基因ctxA检测 采用常规PCR方法,用煮沸法提取菌株核酸。挑取单个纯菌落于200μl无菌水中煮沸10min,冷却后3000r/min离心5min,取上清2μl作为PCR反应模板,扩增体系50μl,含ddH₂O 34.75μl,10×Buffer 5.0μl,上下引物各2μl, Taq-E 0.25μl, DNA 2μl。扩增条件:94℃ 5min; 94℃

30s; 55℃ 40s; 72℃ 1min, 35个循环; 72℃ 7min。ctxA引物序列(749bp): P1: 5'-ATT TTG AGG TGT TCC ATG TG-3', P2: 5'-ATA AAG CAG TCA GGT GGT CT-3'。引物合成于上海生物工程有限公司。

1.2.3 药物敏感试验 采用K-B法进行检测。选择氟哌酸、庆大霉素、复方新诺明、四环素、氨苄青霉素、阿米卡星、环丙沙星、强力霉素、氯霉素和链霉素10种药物进行试验。10种药物均为《霍乱防治手册》(第五版)推荐,其结果判断参照《霍乱防治手册》(第五版)上相关标准,采用ATCC25922大肠埃希菌和ATCC25923金色葡萄球菌作为质控菌株。M-H琼脂和抗生素纸片购自OXOID公司,均在有效期内使用。

2 结果

2.1 毒力基因ctxA检测 病人及其环境株均产生霍乱肠毒素,外环境株产生或不产生霍乱肠毒素(表1)。

2.2 药物敏感试验结果 14株菌除对氟哌酸、阿米卡星和环丙沙星敏感外,对其余7种抗生素均产生不

作者单位 广西壮族自治区疾病预防控制中心 广西 南宁 530028

作者简介 权怡(1971~)女,苗族,广西柳州市人,主管技师,主要从事微生物检验研究。

同程度的耐药。而且多重耐药情况严重 ,三耐以上菌株占 85.71%(表 2)。

2.3 不同来源的菌株药物敏感试验结果比较 结果表明,病人和病家环境菌株对复方新诺明等 4 种药物 100% 耐药 ,比单纯外环境菌株耐药情况严重(表 3)。

2.4 外环境携带与未携带毒力基因菌株的药物敏感试验结果比较 携带毒力基因菌株和未携带毒力基因菌株除对复方新诺明结果完全不同外 ,其余 9 种抗生素药敏结果相似(表 4)。

表1 14株 O139 群霍乱弧菌来源及毒力基因检测结果
Table 1 Source of 114 vibrio cholera O139 strain and detection results of virulence gene

霍乱弧菌 Vibrio cholera	菌株来源 Source of strain	毒力基因 virulence gene	霍乱弧菌 Vibrio cholera	菌株来源 Source of strain	毒力基因 virulence gene
1	病人 Patients	+	8	河水 River water	+
2	病人 Patients	+	9	河水 River water	-
3	病家环境 Environment of patient s family	+	10	河水 River water	+
4	病家环境 Environment of Patient s family	+	11	河水 River water	+
5	病人 Patients	+	12	带鱼 Trichiurus haumela	-
6	河水 River water	+	13	带鱼 Trichiurus haumela	-
7	水鱼 terrapin	-	14	莆鱼 Odontobutis obscura	-

表2 药物敏感试验结果
Table 2 Results of drug sensitivity test

药物 Drug	敏感(%) Sensitivity	中敏(%) Medium sensitivity	耐药(%) Resistance	药物 Drug	敏感(%) Sensitivity	中敏(%) Medium sensitivity	耐药(%) Resistance
NOR	85.71	14.29	0.00	AMI	100.00	0.00	0.00
GEN	57.14	42.86	54.50	CIP	85.71	14.29	0.00
SXT	28.57	0.00	71.43	DOX	64.29	7.14	28.57
TET	7.14	7.14	85.72	CHL	50.00	0.00	50.00
AMP	50.00	0.00	50.00	STR	42.86	0.00	57.14

表3 病人和病家环境菌株与外环境菌株药物敏感试验结果比较
Table 3 Comparison of bacterial strain from patients and patients families and environment with from external environment

药物 Drug	病人和病家环境菌株 Strains of patients and patients families environment			外环境菌株 Strain of external environment		
	敏感(%)	中敏(%)	耐药(%)	敏感(%)	中敏(%)	耐药(%)
	Sensitivity	Medium sensitivity	Resistance	Sensitivity	Medium sensitivity	Resistance
NOR	100.00	0.00	0.00	77.78	22.22	0.00
GEN	20.00	0.00	80.00	77.78	0.00	22.22
SXT	0.00	0.00	100.00	44.44	0.00	55.56
TET	0.00	0.00	100.00	11.11	11.11	77.78
AMP	20.00	0.00	80.00	66.67	0.00	33.33
AMI	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
CIP	100.00	0.00	0.00	77.78	22.22	0.00
DOX	0.00	20.00	80.00	100.00	0.00	0.00
CHL	0.00	0.00	100.00	77.78	0.00	22.22
STR	0.00	0.00	100.00	66.67	0.00	33.33

3 讨论

霍乱肠毒素(ctxA)是霍乱弧菌的主要致病因子 ,携带毒力基因的菌株属流行株 ,不携带毒力基因的菌株属非流行株。但在一定条件下 ,非流行株和非产毒株同样可以感染人体引起腹泻^[1]。O139 群霍乱弧菌所产生的 ctxA 与 O1 群霍乱弧菌产生的 ctxA 完全相

同 ,可导致剧烈腹泻和呕吐。本文 9 株携带毒力因子的菌株中有 4 株分离于外环境 ,但未引起疫情 ,究其原因 ,可能与当地群众的个人卫生习惯有关 ,也可能与菌株毒力弱有关。2006 年 ,我们在一内陆河水中同时分离出一株产毒株(8 号菌株)和一株非产毒株(9 号菌株) ,证实了 Dalgard A 报道的在通常情况下产

表4 外环境携带与未携带毒力基因菌株间药物敏感试验结果比较

Table 4 Comparison of drug sensitivity of bacterial strains between with virulence gene and without virulence gene

药物 Resistance	携带毒力基因 With virulence gene			未携带毒力基因 Without virulence gene		
	敏感(%)	中敏(%)	耐药(%)	敏感(%)	中敏(%)	耐药(%)
	Sensitivity	Medium sensitivity	Resistance	Sensitivity	Medium sensitivity	Resistance
NOR	50.00	50.00	0.00	100.00	0.00	0.00
GEN	50.00	0.00	50.00	100.00	0.00	0.00
SXT	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
TET	25.00	25.00	50.00	0.00	0.00	100.00
AMP	50.00	0.00	80.00	0.00	0.00	20.00
AMI	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
CIP	50.00	50.00	0.00	100.00	0.00	0.00
DOX	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
CHL	75.00	0.00	25.00	80.00	0.00	20.00
STR	50.00	0.00	50.00	80.00	0.00	20.00

毒株和非产毒株可并存观点^[2]。也有研究表明^[3] ,霍乱毒素基因可在产毒株和非产毒株的非致病性霍乱菌株间水平转移 ,从而产生新的致病菌株。因此 ,仍需警惕非产毒株变异而导致疫情暴发的危险。

药物敏感试验结果显示 ,14株菌只对氟哌酸、阿米卡星和环丙沙星敏感 ,与杭州市O139群霍乱弧菌药敏结果相似^[4] ,这3种抗生素可推荐为临床治疗O139群霍乱的首选药物。而对庆大霉素、复方新诺明、四环素、氨苄青霉素、强力霉素、氯霉素和链霉素其余7药物耐药现象十分严重 ,是什么原因造成 ,值得进一步探讨。

参考文献：

[1] LI BS, Tan HL, Wang DC, et al. Resistance and Molecular Typing of

Vibrio Cholerae from cholera in Guangdong [J].Disease surveillance, 2009 ,24(5) :319-324. (In Chinese)
(李柏生 ,谭海玲 ,王多春 ,等.广东省霍乱病例与环境来源霍乱弧菌的耐药性和分子分型研究[J].疾病监测 ,2009 ,24(5) :319-324.)
[2]Dalgard A.Ribotypes of elinical Vibrio cholerae non-O1 non-O139 strainmudens in relation O-serotypes [J].Epidemiol Infect,1998,121(3): 535.
[3] KAN B. New problem of Chorerae monitoring[J].Infection Disease Information, 2006 ,19(1) :16-17(In Chinese)
(阚飏.霍乱监测的新问题[J].传染病信息,2006 ,19(1) :16-17.)
[4] Wang HQ , Meng DM, Yu XF, et al. Variance of antibiotic resistance and virulence gene of Vibrio Cholerae O139 in Hangzhou City[J]Chinese Journal of public health,2006,22(3):321-322. (In Chinese)
(汪浩秋 ,孟冬梅 ,于新芬 ,等.杭州市O139群霍乱弧菌耐药变迁及毒力基因携带[J].中国公共卫生 ,2006 ,22(3) :321-322.)

收稿日期 2012-02-05 编辑 :谢永慧

本刊加入 中国知网(CNKI) 系列数据库的声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付(已在收取发表费时折减和换算为杂志赠阅)。如作者不同意文章被收录 ,请在来稿时向本刊声明 ,本刊将做适当处理。

本刊编辑部