

· 基础论著 ·

北京地区 2006 ~ 2007 年霍乱弧菌耐药状况及霍乱毒素基因的研究

李洁 严寒秋 刘桂荣 梁慧洁 刘园 黄芳 窦相峰 吴晓娜 王全意

【摘要】 目的 了解北京地区 2006 ~ 2007 年 O1 群和 O139 群霍乱弧菌耐药性和霍乱毒素(cholera toxin, CT)基因的特征,探讨其耐药特征与 CT 基因和菌种来源的关系。**方法** 用 PCR 方法检测 124 株霍乱弧菌 CT 基因;用 WHO 推荐的改良 K-B 纸片法,对所有菌株进行 5 种常用抗菌药物的药敏试验;用卡方检验对结果进行统计学分析。**结果** 124 株 O1 群和 O139 群霍乱弧菌对诺氟沙星和环丙沙星的敏感率均达 85% 以上。103 株 O1 群霍乱弧菌中,21 株 CT 阳性的 O1 群霍乱弧菌对丁胺卡那的耐药率为 81%,82 株 CT 阴性的 O1 群霍乱弧菌的耐药率为 4.9%;59 株外环境来源的 O1 群霍乱弧菌对丁胺卡那的耐药率为 33.9%,44 株人源性的 O1 群霍乱弧菌对其耐药率为 2.3%。21 株 O139 群霍乱弧菌中,6 株 CT 阳性的 O139 群霍乱弧菌对强力霉素的耐药率为 66.7%,15 株 CT 阴性的 O139 群霍乱弧菌对其耐药率为 13.3%;10 株外环境来源的 O139 群霍乱弧菌对强力霉素的耐药率为 60%,11 株人源性的 O139 群霍乱弧菌对其耐药率为 9.1%。经卡方检验,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 诺氟沙星和环丙沙星对霍乱弧菌有较高的敏感性,可以作为霍乱防治的首选药物。霍乱弧菌对部分抗生素的耐药特征与 CT 基因和菌种来源有一定的关系。

【关键词】 霍乱弧菌;药敏试验;霍乱毒素基因

A study on antibiotic resistance and virulence gene of *Vibrio cholerae* in Beijing from 2006 to 2007 LI Jie, YAN Han-qiu, LIU Gui-rong, LIANG Hui-jie, LIU Yuan, HUANG Fang, DOU Xiang-feng, WU Xiao-na, WANG Quan-yi. Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China

Corresponding author: LI Jie, Email: lijie304@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the characteristics of antibiotic resistance and cholera toxin(CT) genes of *Vibrio cholera* and discuss the relationships between antibiotic resistance and CT genes and origin of *Vibrio cholera*. **Methods** CT genes of 124 *Vibrio cholera* isolates were detected by PCR. Antibiotics susceptibility test was also performed against 5 kinds of antibiotics in common use with Kirby-Bauer method, which was introduced by WHO. The experiment results were analyzed by statistic method. **Results** Among the 124 *Vibrio cholera* O1 and *Vibrio cholera* O139

isolates, over 85 percent were sensitive to Norfloxacin and Ciprofloxacin. Among the 103 *Vibrio cholera* O1 isolates, the drug resistant rate of 21 isolates with CT genes against Amikacin was 81% and the remained 82 isolates without CT genes against Amikacin was 4.9%. Among the 103 *Vibrio cholera* O1 isolates, the drug resistant rate of 59 environmental isolates against Amikacin was 33.9% and the remained 44 clinical isolates against Amikacin was 2.3%. Among the 21 *Vibrio cholera* O139 isolates, the drug resistant rate of 6 isolates with CT genes against Doxycycline was 66.7% and the remained 15 isolates without CT genes was 13.3%. Among the 21 *Vibrio cholera* O139 isolates, the drug resistant rate of 10 environmental isolates against Doxycycline was 60% and the remained 11 clinical isolates was 9.1%. The statistical significance of the above results have been showed at the 95% level ($P < 0.05$). **Conclusions** *Vibrio cholera* exhibit high sensitivity to Norfloxacin and Ciprofloxacin and may be the first choice in the treatment and prevention against cholera. The drug resistance feature of *Vibrio cholera* against some of the antibiotics are related with the CT genes and the origin of the isolates.

【Key words】 *Vibrio cholera*; Antibiotics susceptibility test; CT genes

霍乱是我国的甲类传染病,以急性无痛性水样腹泻为主要症状。它主要是由 O1 群和 O139 群霍乱弧菌引起的,起病急、传播快、可引起暴发流行。由于北京地区经济发达,有大量的流动人口,在很长的一段时间内,霍乱仍威胁着人民健康、经济发展和社会稳定。霍乱弧菌的致病因素主要包括毒素和定居因子,其中 CT 在霍乱致病中起关键作用,病原菌的 CT 基因携带情况和耐药状况与霍乱的致病性和流行强度密切相关。为了掌握北京地区 2006 ~ 2007 年霍乱弧菌的耐药动态,便于医院合理使用抗生素,给患者的治疗提供科学的依据,笔者分析了这两年北京市霍乱弧菌的耐药状况,同时利用 PCR 方法检测霍乱弧菌是否携带 CT 基因,分析霍乱弧菌的耐药性是否与携带 CT 基因和菌种来源有关联。

材料与方法

一、菌株来源

选择 2006 年 1 月 ~ 2007 年 12 月由疫情和外环境监测获得的霍乱弧菌菌株 124 株。其中 O1 群霍乱弧菌 103 株(外环境来源为 59 株,人来源 44 株),O139 群霍乱弧菌 21 株(外环境来源为 10 株,人来源 11 株)。全部菌株均经形态学、血清学、生化学鉴定,鉴定符合卫生部疾控司 1999 年编制的《霍乱防治手册》制定的标准。药敏质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922,为本实验室保存。

二、材料与方法

1. PCR 检测霍乱弧菌 CT 基因:实验所用试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司,引物序列、实验具体操作及扩增条件均参照 Schwartz 等^[1]的实验方法。

2. 培养基和药敏纸片:选用 5 种常用的抗生素(强力霉素、诺氟沙星、环丙沙

星、复方新诺明、丁胺卡那),5种抗生素药敏纸片及 Muller-Hinton 琼脂均购自 OXOID 公司,均在其有效期内使用。

3. 药敏试验:采用 WHO 推荐的改良 Kirby-Bauer(K-B)纸片法进行药物敏感试验。试验结果的判定参照卫生部制定的《纸片法抗菌药物敏感试验标准》(WS/T125-1999)。

结 果

一、CT 基因的检测

对 124 株 O1 群、O139 群霍乱弧菌进行 CT 基因的 PCR 扩增,结果显示:O1 血清群中 CT 基因阳性的霍乱弧菌共 21 株,其中患者来源的 2 株,外环境来源的 19 株;CT 基因阴性的霍乱弧菌共 82 株,其中患者来源的 42 株,外环境来源的 40 株。O139 血清群中 CT 基因阳性的霍乱弧菌共 6 株,其中患者来源的 2 株,外环境来源的 4 株;CT 基因阴性的霍乱弧菌共 15 株,其中患者来源的 9 株,外环境来源的 6 株。

二、药敏试验

所有菌株均采用 WHO 推荐的改良 K-B 纸片法进行药敏试验。124 株 O1 群霍乱弧菌和 O139 群霍乱弧菌对诺氟沙星和环丙沙星的敏感率均达 85% 以上,21 株 CT 毒素阳性的 O1 群霍乱弧菌对丁胺卡那霉素的耐药率达 81% (17 株/21 株)(见表 1)。6 株 CT 毒素阳性的 O139 群霍乱弧菌对强力霉素和复方新诺明有较高耐药性,耐药率分别达 66.7% (4 株/6 株)和 83.3% (5 株/6 株)(见表 2)。CT 毒素阴性的 O1 群霍乱弧菌和 O139 群霍乱弧菌对复方新诺明的耐药率分别为 23.2% (19 株/82 株)和 53.3% (8 株/15 株)(见表 1、表 2)。外环境来源的 O139 群霍乱弧菌对强力霉素和复方新诺明的耐药率分别为 60% (6 株/10 株)和 70% (7 株/10 株)(见表 4)。人来源的 O139 群霍乱弧菌对复方新诺明的耐药率为 54.5% (6 株/11 株)(见表 4)。

三、药敏结果的统计学分析

将 CT 阳性和 CT 阴性的 O1 群霍乱弧菌的药敏试验结果,CT 毒素阳性和阴性的 O139 群霍乱弧菌的药敏试验结果,外环境来源的和人来源的 O1 群霍乱弧菌的药敏试验结果,外环境来源的和人来源的 O139 群霍乱弧菌的药敏试验结果均用软件 SPSS 11.5 软件进行卡方检验,结果见表 1~4。

讨 论

霍乱的腹泻特征主要是由 CT 引起的,对引起霍乱弧菌疾病起关键作用^[2]。它主要导致肠液分泌功能增强,由组织向肠腔分泌液量增多,以致超过肠管再吸收能力,出现剧烈腹泻和呕吐。O1 群霍乱弧菌产生的 CT 毒素和 O139 群霍乱弧菌产生的 CT 毒素完全相同^[3]。霍乱弧菌毒力基因携带情况与霍乱弧菌的致病性和流行强度密切相关,所以监测霍乱弧菌毒株是否带有毒力基因对实际的监测工作有重要的指导意义。本实验结果显示 44 株人来源的 O1 群霍乱弧菌中,CT

毒素阳性的菌株有2株;59株外环境来源的O1群霍乱弧菌中,CT毒素阳性的菌株有19株。11株人来源的O139群霍乱弧菌中,CT毒素阳性的菌株有2株;10株外环境来源的O139群霍乱弧菌中,CT毒素阳性的菌株有4株。外环境中存在着CT毒素阳性的O1群霍乱弧菌和O139群霍乱弧菌,均有较强的致病性,具有引起暴发流行的可能性,这提示除了对霍乱患者进行监测外,还应加强对外环境中霍乱弧菌的监测。

表1 O1群霍乱弧菌对5种抗生素敏感性试验结果

抗生素	CT 阳性(21 例)			CT 阴性(82 例)			χ^2	<i>P</i>
	高敏及中敏	耐药		高敏及中敏	耐药			
	菌株数	菌株数	率(%)	菌株数	菌株数	率(%)		
强力霉素	17	4	19	73	9	11	0.391	0.5318
诺氟沙星	21	0	0	74	8	9.76	1.068	0.3014
环丙沙星	21	0	0	70	12	14.6	2.202	0.1378
复方新诺明	20	1	4.8	63	19	23.2	2.54	0.1110
丁胺卡那	4	17	81	78	4	4.9	55.015	0.0000

表2 O139群霍乱弧菌对5种抗生素敏感性试验结果

抗生素	CT 阳性(6 例)			CT 阳性(15 例)			χ^2	P
	高敏及中敏	耐药		高敏及中敏	耐药			
	菌株数	菌株数	率(%)	菌株数	菌株数	率(%)		
强力霉素	2	4	66.7	13	2	13.3	—	0.031
诺氟沙星	6	0	0	14	1	6.7	—	1.000
环丙沙星	6	0	0	14	1	6.7	—	1.000
复方新诺明	1	5	83.3	7	8	53.3	—	0.336
丁胺卡那	5	1	16.7	15	0	0	—	0.286

注:“—”表示卡方检验四格表理论频数小于1或n小于40,SPSS软件不能获得 χ^2 值,但可获得精确的P值。

表3 不同来源的O1群霍乱弧菌对5种抗生素敏感性试验结果

抗生素	外环境来源(59 例)			人来源(44 例)			χ^2	P
	高敏及中敏	耐药		高敏及中敏	耐药			
	菌株数	菌株数	率(%)	菌株数	菌株数	率(%)		
强力霉素	49	10	16.9	41	3	6.8	2.346	0.1256
诺氟沙星	55	4	6.8	40	4	9.1	0.004	0.9496
环丙沙星	53	6	10.2	38	6	13.6	0.294	0.5877
复方新诺明	47	12	20.3	36	8	18.2	0.075	0.7842
丁胺卡那	39	20	33.9	43	1	2.3	15.531	0.0000

表4 不同来源的O139群霍乱弧菌对5种抗生素敏感性试验结果

抗生素	外环境来源(10 例)			人来源(11 例)			χ^2	P
	高敏及中敏	耐药		高敏及中敏	耐药			
	菌株数	菌株数	率(%)	菌株数	菌株数	率(%)		
强力霉素	4	6	60	10	1	9.1	—	0.024
诺氟沙星	9	1	10	11	0	0	—	0.476
环丙沙星	9	1	10	11	0	0	—	0.476
复方新诺明	3	7	70	5	6	54.5	—	0.659
丁胺卡那	9	1	10	11	0	0	—	0.476

注:“—”表示卡方检验四格表理论频数小于1或n小于40,SPSS软件不能获得 χ^2 值,但可获得精确的P值。

本实验选用临床常用的五种抗菌药物对获得的 124 株霍乱弧菌进行了耐药状况的研究,实验结果显示:O1 群霍乱弧菌和 O139 群霍乱弧菌对诺氟沙星和环丙沙星的敏感性较高,可作为临床治疗霍乱的首选药物,这与夏昕等^[4]、汪皓秋等^[5]、邓志爱等^[6]的报道一致。北京市曾对 1998 ~ 2003 年收集的 O139 群霍乱弧菌的耐药状况做过分析和研究,药敏结果显示:O139 群霍乱弧菌对诺氟沙星和环丙沙星的敏感性较高^[7],这说明 1998 ~ 2003 年 O139 群霍乱弧菌对诺氟沙星和环丙沙星未产生明显的耐药性。印度 Okuda 等^[8]的研究也发现收集的 O139 群霍乱弧菌对环丙沙星非常敏感,没有检测到一株耐药株。

从表 1 ~ 4 中可以观察到部分 O139 群霍乱弧菌对复方新诺明产生了耐药性,特别是 CT 阳性的 O139 群霍乱弧菌对复方新诺明的耐药率高达 83.3%,外环境来源的 O139 群霍乱弧菌对复方新诺明的耐药率达 70%。湖南省近十年的霍乱弧菌耐药状况的监测结果显示:1998 ~ 2002 年霍乱弧菌对复方新诺明的耐药率一直很高,2003 ~ 2005 年才稍下降,但也高达 80%^[4],这说明复方新诺明不能有效地对抗霍乱弧菌。本实验结果显示 O1 群霍乱弧菌对复方新诺明未产生很高的耐药性,但使用前景也不容乐观。印度 Sharma 等^[9]研究发现 2003 ~ 2005 年收集的 O1 群霍乱弧菌对复方新诺明的耐药率高达 96.6%。毒株的高耐药率应引起足够的重视。

O1 群霍乱弧菌 CT 阳性对丁胺卡那的耐药率高于 O1 群霍乱弧菌 CT 阴性,二者有显著差异($P < 0.01$),O139 群霍乱弧菌 CT 阳性对强力霉素的耐药率高于 O139 群霍乱弧菌 CT 阴性,二者有显著差异($P < 0.05$)。分析其原因可能是由于霍乱弧菌 CT 阳性有较强的致病力,患者症状明显,使用抗生素的机会较大,从而造成霍乱弧菌 CT 阳性较霍乱弧菌 CT 阴性更易产生耐药性。

外环境来源的 O1 群霍乱弧菌对丁胺卡那的耐药率高于人来源的 O1 群霍乱弧菌,二者有显著差异($P < 0.01$)。外环境来源的 O139 群霍乱弧菌对强力霉素的耐药率高于人来源的 O139 群霍乱弧菌,二者也有显著差异($P < 0.05$)。Prabhu 等^[10]在研究中也发现外环境来源的霍乱弧菌比人来源的霍乱弧菌更易产生耐药性,这与本实验的结果一致。分析原因可能是由于近些年在水产养殖过程中加入了抗生素导致外源性霍乱弧菌耐药株的产生。

霍乱是一种急性的肠道传染病,以发病急、传播快、波及范围广、能引起大流行特征,这些特征决定了霍乱的日常常规监测至关重要。由于霍乱弧菌来源不同,是否携带 CT 基因不同以及对各种抗生素的敏感程度不同,所以长期对霍乱弧菌进行耐药性监测和分析就具有十分重要的意义,可以指导临床医生合理选用抗菌药物,及时发现霍乱弧菌的耐药趋势,并为耐药机制的进一步研究提供依据。进行耐药性监测的同时,在霍乱防治工作中应注重合理用药和联合用药,防止产生更多的耐药菌株,为有效的防治霍乱打好基础、做好铺垫。

参 考 文 献

- 1 Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 1984, 37:67-75.

- 2 Levine MM, Kaper JB, Black RE, et al. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev*, 1983, 47:510-550.
- 3 中华人民共和国卫生部疾病控制司. 霍乱防治手册. 第5版. 北京: 中华人民共和国卫生部疾病控制司, 1999. 36.
- 4 夏昕, 湛志飞, 覃迪, 等. 湖南省 1996-2005 年霍乱弧菌耐药监测分析. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17:502-504.
- 5 汪皓秋, 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. *中国公共卫生*, 2006, 22:321-322.
- 6 邓志爱, 莫自耀, 李孝权, 等. 霍乱弧菌耐药性连续六年监测研究. *实用预防医学*, 2005, 12:778-78.
- 7 严寒秋, 李峰, 刘桂荣, 等. 北京市 1998-2003 年 O139 群霍乱弧菌药敏试验结果分析. *中国预防医学杂志*, 2005, 6:74-76.
- 8 Okuda J, Ramamurthy T, Yamasaki S. Antibacterial activity of ciprofloxacin against clinical strains of *Vibrio cholerae* O139 recently isolated from India. *Pharmaceutical Society of Japan*, 2007, 127:903-904.
- 9 Sharma NC, Mandal PK, Dhillon R, et al. Changing profile of *Vibrio cholerae* O1, O139 in Delhi & its periphery (2003-2005). *Indian J Med Res*, 2007, 125:633-640.
- 10 Prabhu DI, Pandian RS, Vasan PT. Pathogenicity, antibiotic susceptibility and genetic similarity of environmental and clinical isolates of *Vibrio cholerae*. *Indian J Exp Biol*, 2007, 45:817-823.

(收稿日期:2009-08-06)

(本文编辑:李卓)

李洁, 严寒秋, 刘桂荣, 等. 北京地区 2006 ~ 2007 年霍乱弧菌耐药状况及霍乱毒素基因的研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2009, 3(4): 366-371.