

湖南省福氏和宋内志贺菌的耐药性及其毒力基因表型分析

夏昕 覃迪 湛志飞 蔡亮 张红

(湖南省疾病预防控制中心 湖南长沙 410005)

通讯作者: 张红 邮箱:931525821@qq.com

作者简介: 夏昕(1978—), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主管技师, 主要从事病原微生物检验工作。联系方式: 13808473847; 邮箱:xiaxin@126.com

通讯作者: 张红 邮箱:931525821@qq.com

基金项目: 国家科技重大专项“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”(No. 2013ZX10004-203-002)

[摘要] **目的:**了解湖南地区福氏志贺菌和宋内志贺菌对抗菌药物的敏感性及其毒力基因的携带情况。**方法:**纸片扩散法检测 30 株福氏志贺菌和 30 株宋内志贺菌对 12 种抗生素的敏感性;同时对两类志贺菌的四种毒力基因进行 PCR 扩增检测,绘制毒力基因的表型。**结果:**

在测定的12种抗生素中,两种志贺菌对氨苄西林、萘啶酸、四环素以及利福平均有较高的耐药性,对左旋氧氟沙星、庆大霉素均有较高的敏感性,两者在对头孢噻吩、头孢噻肟、诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明的耐药性的差异有统计学意义($P<0.05$),多重耐药性较严重。30株福氏志贺菌经PCR扩增后,绝大部分菌株均含set1和ipaH基因,30株宋内志贺菌经PCR扩增后,13株菌未扩出现任何条带,多数菌仅含ipaH一个毒力基因。**结论:**志贺菌的耐药性较严重,福氏志贺和宋内志贺菌在耐药谱上有明显不同。福氏志贺菌毒力基因携带率高,大多含2—3个毒力基因,毒力基因表型更复杂,宋内志贺菌毒力基因携带率较低,可能与其症状多为轻型有关。

[关键词] 福氏志贺菌;宋内志贺菌;耐药性;毒力基因

Antibiotics resistance and virulence genotype analysis of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Hunan Province.

XIA Xin, QIN Di, ZHAN Zhi-fei, CAI Liang, ZHANG Hong

Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan, 410005

Corresponding author: ZHANG Hong, E-mail:813456441@qq.com

[Abstract] **Objective** To investigate the antibiotic resistance and the virulence genes of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Hunan Province. **Methods** Susceptibility to 12 antibiotic agents was tested by the disc diffusion method and virulence genes were detected by PCR in 30 *Shigella flexneri* and 30 *Shigella sonnei* strains. **Results** Two kinds of *Shigella* to ampicillin, nalidixic acid, tetracycline and rifampicin on average have a higher resistance, while levofloxacin, gentamicin have a higher sensitivity both *Shigella* strains to ampicillin, nalidixic acid, tetracycline and rifampicin had the highest resistance of all the 12 antibiotic agents. The two *Shigella*'s resistance rates had significant differences in the Cefalotin, cefotaxime, norfloxacin, ciprofloxacin, cotrimoxazole($p<0.05$). *Shigella* had serious multi-drug resistance. Most of 30 *Shigella flexneri* strains had the set1 and ipaH genes. 13 *Shigella sonnei* strains did not amplify any bands, most *Shigella sonnei* strains only had the ipaH gene by PCR test. **Conclusion** *Shigella* resistance to

antibiotics was very serious, the *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* were significantly different in the resistance patterns. *Shigella flexneri* strains had a high carrier rate of virulence genes, the majority of strains containing 2-3 virulence genes, and the virulence phenotype was complex; *Shigella sonnei* strains had a low carrier rate of virulence genes maybe associated with the mild symptoms.

[Key words] *Shigella flexneri*; *Shigella sonnei*; Drug resistance; virulence genes

志贺菌属是在 1898 年由日本细菌学家志贺洁首先发现而得名，主要流行于发展中国家，引起人类一种急性肠道传染病——细菌性痢疾，属于我国法定的乙类传染病。根据抗原构造不同，可将志贺菌属分为四个群：A 群痢疾志贺菌 (*S. dysenteriae*)；B 群福氏志贺菌 (*S. flexneri*)；C 群鲍氏志贺菌 (*S. boydii*)；D 群宋内氏志贺菌 (*S. sonnei*)。我国常见的是 A 群和 D 群，A 群目前已发现 16 个血清型，其中 2 型多见，1 型较少见，D 群仅一个血清群，有光滑和粗糙型 2 个相。本次研究选取了湖南省各级 CDC 于 2012—2013 年度上送的福氏 A 群和宋内 D 群志贺菌各 30 株共 60 株菌，对其进行了药物敏感性实验；同时还对与志贺菌肠毒素相关的 *set1* 基因、*sen* 基因，与细菌侵袭性质粒有关的 *ial* 基因和 *ipaH* 基因进行了 PCR 检测，现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集湖南省各级 CDC 上送的 2012—2013 年度的志贺菌标本共 60 株；药敏质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 为本室留存。

1.1.2 药敏纸片 抗菌药物纸片共 12 种，氨苄西林、阿莫西林克拉维酸、头孢噻吩、头孢噻肟、萘啶酸、左旋氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星，庆大霉素、复方新诺明、四环素、利福平，均购自英国 OXOID 公司。

1.1.3 培养基及试剂 HE 琼脂、血琼脂、API 20E 革兰阴性菌鉴定试纸条购自生物梅里埃公司，志贺菌属鉴定血清购自宁波天润生物公司；引物以及 PCR 试剂购自 Takara 大连宝生物技术公司，QIAxcel DAN Screening cartridge 低分辨率卡夹购自 QIAGEN 公司。

1.2 方法

1.2.1 分离培养与鉴定 将临床病人的大便标本接种到选择性培养基 HE 琼脂上，

37℃培养过夜后，挑选绿色菌落接种到血琼脂上进行分纯培养，37℃过夜后的纯培养物再做进一步的生化和血清学鉴定，均按试剂说明书进行操作，生化和血清学均符合志贺菌的菌株则作为实验用菌株留存备用。

1.2.2 药物敏感性测定 采用 K-B 纸片扩散法，按 2013 年 CLSI 推荐的方法进行药敏测定，同时以大肠埃希菌 ATCC25922 作为质控菌株。

1.2.3 志贺菌四种毒力基因的 PCR

本实验选取了与志贺菌毒力相关的四种毒力基因进行 PCR 实验，分别为 set1 基因、sen 基因；ial 基因以及 ipaH 基因。实验反应体系：引物 1μl 浓度为

0.1μmol/L, dNTP 浓度各 20μmol, 1U Taq DNA 聚合酶，模板 5μl，最后加水至总体积为 50μl；扩增条件：95℃预变性 5 分钟；95℃50 秒，56℃50 秒，72℃1 分钟，30 个循环；72℃延伸 7 分钟，最后 4℃维持结束。引物序列详见表 1。

表1 志贺菌4种毒力基因的引物序列及片段大小

基因型	片段大小	上游引物	下游引物
set1	309bp	TCACGCTACCATCAAAGA	TATCCCCCTTTGGTGGTA
sen	799bp	ATGTGCCTGCTATTATTTAT	CATAATAATAAGCGGTCAGC
ial	320bp	CTGGATGGTATGGTGAGG	GGAGGCCAATTATTTCC
ipaH	423bp	TGGA AAACTCAGTGCCTCT	CCAGTCCGTAAATTCATTCT

1.2.4 PCR 结果检测及分析 将 PCR 反应后产物用 QIAGEN 公司的低分辨率卡夹在 QIAxcel Advanced 超快速毛细管电泳仪上进行电泳，30 分钟后电脑自动分析记录结果并保存存档。1.3 统计学分析 对同志贺菌的耐药率的结果数据进行比较，采用 SPSS 软件进行统计学处理，采用 χ^2 检验， $P < 0.05$ ，则差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 经生化和血清学鉴定复核后，共分离选取了30株福氏志贺菌以及30株宋内志贺菌，其中福氏志贺菌包含的血清型有三种，福氏1a;福氏2a和福氏2b；宋内志贺菌则包含1相和2相。

2.2 12种抗生素对30株福氏志贺菌和30株宋内志贺菌的药敏结果 结果见表2，在测定的12种抗生素中，两种志贺菌对氨苄西林、萘啶酸、四环素以及利福

平均有较高的耐药性，对左旋氧氟沙星、庆大霉素均有较高的敏感性，但两者在对头孢噻吩、头孢噻肟、诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明的耐药性上，差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ），多重耐药性较严重。

表2 30株福氏志贺菌和30株宋内志贺菌对12种抗生素的药物敏感率结果（率，%）

抗菌药物	福氏志贺菌			宋内志贺菌			耐药率比较	
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药率	X ² 值	P值
氨苄西林	13.33	0	86.67	0	0	100	2.41	$P>0.05$
阿莫西林克拉维酸	16.67	60.00	23.33	63.33	10.00	26.67	0.09	$P>0.05$
头孢噻吩	66.67	10.00	23.33	3.33	16.67	80.00	19.29	$P<0.01$
头孢噻肟	76.67	3.33	20.00	20.00	3.33	76.67	19.29	$P<0.01$
萘啶酸	13.33	0	86.67	3.33	0	96.67	0.87	$P>0.05$
左旋氧氟沙星	26.67	66.67	6.66	93.33	6.67	0	0.51	$P>0.05$
诺氟沙星	26.67	0	73.33	96.67	0	3.33	31.09	$P<0.01$
环丙沙星	40.00	0	60.00	96.67	0	3.33	22.26	$P<0.01$
庆大霉素	83.33	0	16.67	56.67	0	43.33	5.08	$P<0.05$
复方新诺明	33.33	0	66.67	3.33	0	96.67	9.02	$P<0.01$
四环素	10.00	0	90.00	0	0	100	1.40	$P>0.05$
利福平	0	0	100	0	0	100	----	----

2.3 四种毒力基因PCR检测结果

30株福氏志贺菌经PCR扩增后，大部分菌株均含set1和ipaH基因，携带率为100%和96.67%，多数含有2—3个毒力基因。30株宋内志贺菌经PCR扩增后，13株菌未扩出任何条带，约56.67%的宋内志贺菌含ipaH毒力基因。两类志贺菌对sen基因和ial基因的携带率均未超过半数。从携带毒力基因的表型来看，福氏志贺菌以含set1+ipaH基因以及含set1+ial+ipaH基因为主，分别占53.33%和33.33%；而约43.33%的宋内志贺菌任何毒力基因均不含，46.67%的宋内志贺菌仅含ipaH基因；详细结果见表3—4。

表3 30株福氏志贺菌和30株宋内志贺菌的4种毒力基因PCR结果

基因型	片段大小	福氏志贺阳性有条带	携带率(%)	宋内志贺阳性有条带	携带率(%)
set1	309bp	30	100	0	0
sen	799bp	3	10.00	3	10.00
ial	320bp	12	40.00	3	10.00
ipaH	423bp	29	96.67	17	56.67

表4 福氏志贺和30株宋内志贺菌携带毒力基因表型

所含毒力基因表型 (%)	福氏志贺检出数	百分率(%)	宋内志贺检出数	百分率
set1 sen ial ipaH				

-	-	-	-	0	0	13	43.33
-	+	+	+	0	0	3	10.00
-	-	-	+	0	0	14	46.67
+	+	+	+	2	6.67	0	0
+	-	-	+	16	53.33	0	0
+	-	+	+	10	33.33	0	0
+	-	-	-	1	3.33	0	0
+	+	-	+	1	3.33	0	0
合计				30		30	

3 讨论

志贺菌引起细菌性痢疾，传染源是患者和带菌者，通过粪一口途径传播，人类对志贺菌较易感，少至 10—150 个细菌就可使人发病，多数临床分离菌株为多重耐药性，其中痢疾志贺菌引起的病情较重，宋内志贺菌大多引起轻型感染，福氏志贺菌感染易转变为慢性，病程迁延。福氏和宋内志贺菌是我国常见的流行型别，也是我省近年来的流行群。

治疗细菌性痢疾的药物颇多，但也很容易出现多重耐药菌株，根据 2013CLSI 标准，对于从粪便中分离的志贺菌，药敏实验应选取氨苄西林、一种氟喹诺酮类和复方新诺明检测报告，本次实验我们选取了包含氨苄西林、环丙沙星、复方新诺明在内的 12 种抗菌药物进行了药敏实验，结果表明，湖南省分离到的福氏和宋内志贺菌的耐药情况均比较严峻，且两者的耐药类型各有特点。两者相似的是对氨苄西林、四环素、利福平和萘啶酸的耐药率均较高，其中福氏志贺菌的耐药率为 86.67%、90.00%，100% 和 86.67%，宋内志贺菌的耐药率为 100%、100%，100% 和 96.67%。在对阿莫西林克拉维酸的耐药率上，两者耐药率也比较接近，福氏志贺菌为 23.33%，宋内志贺菌为 26.67%。但在推荐的氟喹诺酮类和复方新诺明的药敏检测中，宋内志贺菌对环丙沙星的敏感率较高，为 96.67%，而福氏志贺菌对环丙沙星的敏感率则仅为 40.00%，反之，宋内志贺菌对复方新诺明的耐药率高达 96.67%，福氏志贺菌对复方新诺明则较敏感，耐药率只有 66.67%。在其余的抗菌药物测定中，还可以看出，宋内志贺菌对头孢类抗生素的耐药性较高，头孢噻吩和头孢噻肟的耐药率分别为 80.00%，76.67%，而福氏志贺菌则对头孢类抗菌药物较敏感，耐药率仅为 23.33%，20.00%。庆大霉素相对福氏志贺菌还算较为敏感，敏感率有 83.33%，但宋内志贺菌却仅有 56.67% 的敏感率，福氏志贺菌和宋内志贺菌在对头孢噻吩、头孢噻肟、诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明的耐药性上，两者具有极其显著性差异（P 值<0.01）。综上所述，福氏志贺菌和宋内志贺菌均具有较高的多重耐药率，宋内志贺菌的耐药形势较福氏志贺菌更为严峻，提示我们，在临床上收治到细菌性痢疾的病人时，还应根据分离到的菌株型别来正确选取抗菌药物，以达到及时有效的治疗效果同时减少耐药菌株进一步的产生。

志贺菌致病性强，细菌进入人体后，通过菌毛的黏附作用，穿入上皮细胞繁殖，再通过内毒素和外毒素共同发挥作用，使肠道通透性增加，破坏肠粘膜，引起溃疡炎症反应以及多重神经、细胞毒性和肠毒性。本次实验我们利用 PCR 扩增着重研究志贺菌所携带常见毒力基因的情况，我们选取了四种具有代表性的毒力基因，分别为 ipaH 基因、ial 基因、set1 基因以及 sen 基因。志贺菌侵袭性质粒抗原 H，主要由 ipaH 基因编码，可能为 III 型分泌系统(Mxi—

Spa)所分泌,与细菌侵入有关, Venkatesan 等^[1]在研究侵袭性大质粒抗原时发现志贺菌属侵袭性大质粒抗原 H 为多个拷贝存在,并同时存在于染色体和侵袭性大质粒上,而且质粒不会随传代而轻易丢失。本研究中,福氏志贺菌仅 1 株未检测到 ipaH 基因,其余 29 株菌均有检出,宋内志贺菌携带 ipaH 基因率也较携带其他毒力基因更高,故 ipaH 基因可作为志贺菌属尤其是福氏志贺菌快速鉴定的一个参考指标之一。ial 基因是侵袭相关位点的基因,位于侵袭性大质粒上,序列保守,介导肠细胞的黏附性,与细菌黏附肠粘膜细胞并进一步侵入肠粘膜有关,因为该基因只存在于质粒上,质粒是很容易丢失的,故检出率明显没有可存在于染色体上的 ipaH 基因那么高,福氏和宋内志贺的携带率分别为 40%和 10%,若大质粒丢失,致病菌可突变为无毒株。故国外

Phantouamath 等^[2]研究认为若志贺菌仅携带 ipaH 基因,则毒力较弱,可能不会引起发病,仅为志贺菌携带者或者是慢性迁延型患者,但若同时检测到 ipaH 和 ial 基因均阳性的菌株,则可能有较强毒力及感染性,引起较严重的细菌性痢疾病情。另外两个基因与志贺菌的肠毒素相关, set1 基因位于染色体上,编码志贺菌肠毒素 1(ShET1),引起水样性腹泻。sen 基因位于一个 140Mda 的侵袭性大质粒上,编码志贺菌肠毒素 2(ShET2),与细菌的侵袭力相关。

Noriega 等^[3]研究表明 set1 基因主要存在于福氏志贺菌 B 群血清型福氏 2a 中,其他菌型均少见,本次研究中,福氏志贺菌 set1 的检出率达到了 100%,在我们的菌株中福氏 1a、2a、2b 均有检出该基因,但在 D 群宋内志贺菌的类别中,确实没有一株检测到 set1 基因,可见 set1 基因可能存在于 B 群福氏志贺菌的各血清型中,但在 D 群宋内志贺菌中少见。由于 set1 基因是编码志贺菌肠毒素的,这一结果也有可能是造成了宋内志贺菌一般多为轻型感染或者仅为携带着的原因之一。sen 基因在两型志贺菌中检出率都不是很高,均为 10%,也是因为该基因是位于质粒上,容易在传代中丢失有关,但携带该基因的菌株往往携带有多个毒力基因,造成病人的临床症状都较重,甚至多重耐药率也较严重,应引起我们的重视。

福氏志贺菌和宋内志贺菌都是我省常见的细菌性痢疾病原菌,近年来,宋内志贺菌在我省还有上升趋势,逐步成为优势菌群,在我省志贺菌毒力基因表型分布模式里,B群福氏志贺菌和D群宋内志贺菌存在着明显的不同,宋内志贺菌毒力基因的携带率以及多重耐药基因的携带率相比福氏志贺菌而言都明显偏低,而我省志贺菌携带的毒力基因表型也与我国其他地区的志贺菌的毒力基因表型不尽相同^[4-6],表明不同地区细菌性痢疾的流行都有自己的地域特征,相同地域随着时间的变迁流行的菌株群也会有相应的变迁,而毒力基因也可以随着当地菌群的变迁发生丢失和转换,毒力基因携带率的高低与菌株的毒力及致病性呈正相关,因此进一步加强对志贺菌的耐药性和毒力基因的监测,仍然是我们对细菌性痢疾防控工作的重点。

参考文献:

- [1]Venkatesan MM, Buysse JM, et al. Use of shigella flexnery ipaC and ipaH gene sequence for the general identification of shigella spp.and enterioinvasive E.coli[J]. J clin Microbiol, 1989 (27) : 2671-2691.
- [2] Phantouamath B, Sithhivong N, Ichinose Y, et al. Pathogenicity of Shigella in healthy carriers: a study in Vientiane, Lao People'S Democratic Republic[J]. Jpn J Infect Dis, 2005, 58(4): 232-234.
- [3]Noriega FR, Liao FM, Formal SB, et al. Prevalence of Shigella enterotoxin 1 among Shigella clinical isolates of diverse serotypes[J]. J Infect Dis, 1995, 172(5): 1408—1410.
- [4] 穆玉娇, 赵嘉咏, 罗琦, 等. 2009—2010年河南省志贺菌病原学监测分析 [J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46 (4) :334-337.
- [5] 陈爱平, 李海丹, 熊美琴, 等.福建省2005—2010年志贺菌分离株的毒力基因分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28 (6) :583-586.
- [6] 熊燕, 罗同勇, 余滨, 等.武汉市2006—2007年细菌性痢疾监测病原菌分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18 (9) :1794-1796.