

· 实验室研究 ·

北京地区福氏志贺菌 Xv 新亚型毒力基因与致病力研究

苏文莉 陈琛 王中强 李婧 何湘 孙走南 杨益 刘京梅
邱少富 王勇 宋宏彬

【摘要】 目的 了解北京地区福氏志贺菌 Xv 新亚型生化特征、毒力基因与致病力。**方法** 对分离自北京地区的 61 株福氏 Xv 新亚型志贺菌采用 API 生化板条鉴定,血清分型采用玻片凝集法,应用 PCR 技术检测其 *ipaH*、*sen*、*virF* 和 *ial* 毒力基因,采用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 了解分型特征,以鼠肺切片检测其致病力。**结果** 61 株福氏 Xv 志贺菌只发酵葡萄糖、甘露醇、密二糖和阿拉伯糖;血清凝集抗原结构式为 (IV : 7, 8); *ipaH*、*sen*、*virF* 和 *ial* 毒力基因携带率分别为 100%、81.97%、75.41% 和 80.30%;全部菌株 PFGE 分型可分为 25 种带型,鼠肺切片显示呈炎症改变。**结论** 福氏 Xv 志贺菌毒力基因携带率高,表现出遗传多态性,具有侵袭力。

【关键词】 福氏 Xv 志贺菌; 毒力基因; 侵袭力

Virulence genes and pathogenicity of *Shigella flexneri* Xv isolated in Beijing SU Wen-li¹, CHEN Chen^{1, 2}, WANG Zhong-qiang¹, LI Jing¹, HE Xiang¹, SUN Zou-nan¹, YANG Yi¹, LIU Jing-mei¹, QIU Shao-fu¹, WANG Yong¹, SONG Hong-bin¹. 1 Institute of Disease Control and Prevention Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 2 Tai'an Center for Disease Control and Prevention, Shandong

Corresponding authors: QIU Shao-fu, Email: qiushf0613@hotmail.com; WANG Yong, Email: ywang7508@yahoo.com.cn; SONG Hong-bin, Email: hongbinsong@263.net

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81001267/H2609) and Beijing Science and Technology Nova Program (No. 2010B067).

【Abstract】 Objective To understand the biochemical characteristics, virulence genes and pathogenicity of *Shigella flexneri* Xv isolated in Beijing. **Methods** 61 strains of *S. flexneri* Xv isolated from diarrhea patients in Beijing were systematically determined through biochemical reactions and serological tests. Application of PCR technique in detection of virulence genes on *ipaH*, *sen*, *virF*, *ial* and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to identify the related characteristics and on rat lung slices to determine its pathogenicity. **Results** All of the *S. flexneri* Xv could ferment glucose, mannitol, melibiose and arabinose. Using serum agglutination, we found that the antigen structure was (IV : 7, 8). *IpaH*, *sen*, *virF* and *ial* that carried rates of virulence genes appeared to be 100%, 81.97%, 75.41% and 80.30%, respectively. Among 61 strains of *S. flexneri* Xv, the PFGE typing of *Shigella* bacteria could be divided into 25 belt types while the results from rat lung slices showed inflammatory change of Xv. **Conclusion** *S. flexneri* Xv was found that it carried high rate of *Shigella* virulence genes, exhibiting genetic polymorphism and highly invasive.

【Key words】 *Shigella flexneri* Xv; Virulence gene; Invasiveness

我国每年约有 50 万人发生志贺菌感染^[1]。我国志贺菌流行一直以福氏 2a 血清型为主,但 2005 年全

国细菌性痢疾监测数据提示我国志贺菌流行菌型有所变化^[2],出现一种新的福氏志贺菌,由于该血清型的基因组中不携带 4 型特有的 *gtrIV*,故命名为福氏 Xv^[1]。目前新型福氏 Xv 血清型引发腹泻病例数有明显上升趋势。近年来,福氏 Xv 志贺菌作为致病菌,已多次在我国造成大面积流行^[2-4]。因此本研究选择近年来北京地区分离的 61 株福氏新亚型 Xv 志贺菌,对其进行生化特征、血清凝集反应、主要毒力基因 (*ipaH*、*sen*、*virF* 和 *ial*)、脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型、抗生素敏感试验和动物试验分析研究。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.01.014

基金项目:国家自然科学基金(81001267/H2609);北京市科技新星项目(2010B067)

作者单位:100071 北京,解放军疾病预防控制中心(苏文莉、陈琛、王中强、李婧、何湘、孙走南、杨益、刘京梅、邱少富、王勇、宋宏彬);山东省泰安市疾病预防控制中心(陈琛)

苏文莉、陈琛同为第一作者

通信作者:邱少富, Email: qiushf0613@hotmail.com; 王勇, Email: ywang7508@yahoo.com.cn; 宋宏彬, Email: hongbinsong@163.net

材料与方 法

1. 材料:

(1) 菌株来源: 61株福氏 Xv 志贺菌分离自 2005—2011 年北京市城乡 5 家一至三级哨点医院收集的 2300 例腹泻患者粪便标本。标准菌株 F2a 301、Mark H9812、ATCC25923 (金黄色葡萄球菌) 和 ATCC25922 (大肠埃希菌) 为本实验室保存。

(2) 主要试剂: LB 增菌液、SS 琼脂、营养琼脂、MH 琼脂购自北京陆桥技术公司; API 20E 生化试纸条购自法国 BioMerieux 公司; 志贺菌属诊断血清购自日本 Denka Seiken 公司; 基因组提取试剂盒购自天根生化科技公司; Taq DNA 聚合酶、dNTP、Buffer 和 DL2000 Marker 购自 TaKaRa 大连宝生物公司; 蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司; 限制性内切酶 *Not* I 购自 TaKaRa 大连宝生物公司; PCR 引物由上海生工合成; 药敏纸片购自英国 OXOID 生物公司。试剂均在有效期内使用。

2. 方法:

(1) 生化鉴定: 参照 API 20E 生化试纸条操作说明, 稀释分纯培养菌落至浊度为 0.5 个 McFarland (麦氏单位), 加入生化试纸条, 37 °C 孵育 18 h 后加入附加试剂, 10 min 后观察结果, 生化鉴定使用 APIlabplus 软件分析。

(2) 血清凝集: 使用日本 Denka Seiken 公司志贺菌诊断血清进行玻片凝集试验, 并以生理盐水作为阴性对照。

(3) 毒力基因检测: 挑取单个菌落接种至 LB 增菌液, 37 °C 振荡培养 8 h。取 1 ml 菌液参照基因组提取试剂盒操作说明书提取基因组 DNA 模板。F2a 301 标准菌株为阳性对照。应用 PCR 技术检测该菌株的侵袭性质粒抗原 H (*ipaH*)、SHET2 肠毒素 (*sen*)、主要调控基因 (*virF*) 和侵袭相关位点 (*ial*)。50 μl 的 PCR 反应体系 (含 10 × ExTaq buffer 5 μl, 2.5 mmol/L dNTP Mixture 4 μl, 5 U/μl ExTaq DNA 聚合酶 0.25 μl, 约 50 ng 菌液模板 2 μl, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μl, 加灭菌蒸馏水至 50 μl) 混匀, 放入 PCR 仪。经 94 °C 5 min 预变性后, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延长 5 min。反应结束后, 加 10 μl 6 × loading buffer, 以 DL2000 作为 DNA Marker 上样至含 EB 的 1% 琼脂糖胶, 100 V 恒压、100 mA 电流, 电泳 2.5 h。

(4) 药敏实验: 抗生素敏感性试验采用药敏纸片法^[2]。药敏结果判定及结果解释参照 CLNS 标准。

选用 14 种抗菌药物 [诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、头孢他啶、氨苄西林、复方新诺明、萘啶酸、头孢噻肟、奥格门丁 (即阿莫西林 + 克拉维酸)、庆大霉素、氯霉素、四环素、亚胺培南、氨苄西林舒巴坦]。大肠埃希菌 ATCC25922 作为质控菌。

(5) PFGE: 采用 PulseNet 推荐的标准方法^[5]。刮取适量纯培养细菌, 均匀悬浊于 CSB 使其 A 值至 4.0 左右后制备胶块。裂解后洗胶, 200 μl *Not* I 酶切体系 (含 10 × H buffer 20 μl, 0.1% BSA 20 μl, 0.1% Triton-100 20 μl, *Not* I 限制性内切酶 1.5 μl, 加无菌纯水至 200 μl) 混匀酶切。加样后, 设置电泳参数: 最小片段设置为 30 kb, 最大片段 600 kb。电压 6 V, 温度 14 °C, 脉冲转换时间 2.16 ~ 54.17 s, 电泳时间 20 h。电泳完毕后, 洗胶拍照并进行结果分析。选用 UPGMA (非加权配对算术平均法) 进行聚类分析。

(6) 动物实验: 小鼠肺侵袭试验参考文献 [6]。将同时携带 *ipaH* 和 *ial* 两种毒力基因的福氏 Xv 型志贺菌培养至生长中期时, 用 PBS 冲洗, 调整浓度为 0.5 个麦氏单位后, 20 μl 菌液鼻腔滴入已麻醉的 BALB/C 小鼠, 侵袭 4 h, 肌注硫酸庆大霉素, 20 h 后断颈处死小鼠, 解剖取肺组织切片。

结 果

1. 生化特征: 61 株福氏 Xv 志贺菌均呈现一致的生化反应结果, 即 100% 分解葡萄糖、发酵甘露醇、发酵蜜二糖和阿拉伯糖。

2. 血清凝集: 61 株福氏 Xv 志贺菌均呈现相同凝集反应谱, 即福氏多价血清、IV 型多价、群因子血清 7(8) 凝集, 其抗原结构式为 (IV: 7, 8)。

3. 毒力基因检测: 61 株福氏 Xv 志贺菌 *ipaH* 基因扩增结果均为阳性, 其中 49 株携带 *ial* 基因 (80.3%), 50 株携带 *sen* 基因 (81.97%), 46 株携带 *virF* 基因 (75.41%)。

4. 药敏实验: 61 株福氏 Xv 型志贺菌均为多重耐药菌株。其中对亚胺培南、庆大霉素、头孢他啶敏感率最高, 分别为 98.36% (60/61)、95.08% (58/61)、93.44% (57/61); 耐药性较高的 4 种抗菌药物为萘啶酸 (100%, 61/61)、四环素 (96.72%, 59/61)、氨苄西林 (93.44%, 57/61)、氨苄西林-舒巴坦 (91.80%, 56/61)。

5. PFGE: 61 株福氏 Xv 型志贺菌可分为 25 种带型, 其中 11 株 (18.03%) FN11.001 带型为优势带型 (图 1)。

6. 动物实验: 正常对照组小鼠肺内细支气管上皮完整, 管壁上皮、肌层及管周均为正常肺组织 (图

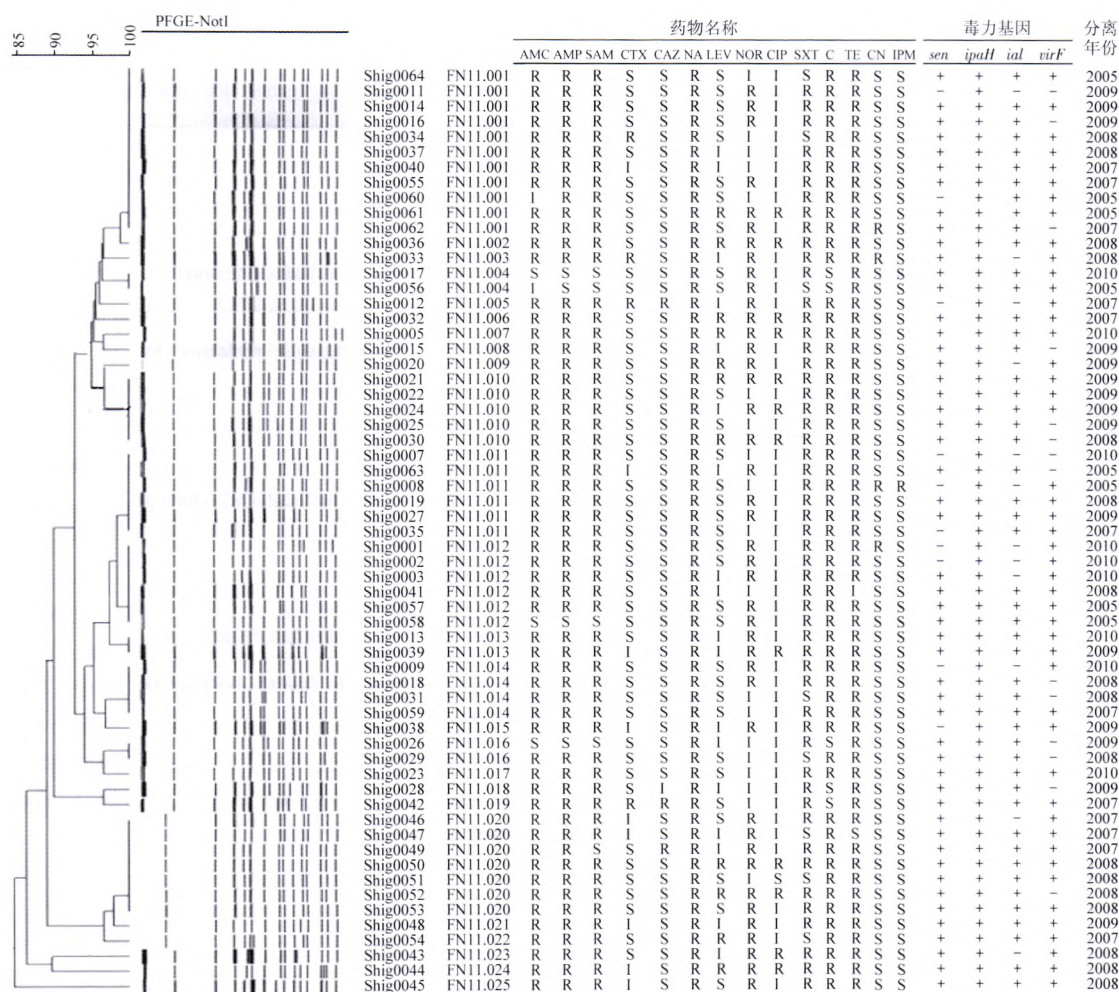


图1 北京地区61株福氏Xv志贺菌PFGE聚类分析

2A)。感染1 d后小鼠肺泡壁增厚,管周充血水肿,炎细胞浸润(图2B)。

讨论

福氏Xv型志贺菌作为一种新型致病菌,目前不仅在很多地区可监测到,且在全国范围内呈现上升趋势,并在某些地区造成大面积流行,但关于该菌基本生化特性和致病性研究尚未完全开展。本研究在病原学监测中发现该菌在北京地区分布也较为广

泛,菌株虽来自不同的哨点医院,血清型和生化特性均完全相同,结合流行病学资料分析,近年来北京地区福氏Xv型志贺菌呈散发状态。

福氏志贺菌作为志贺菌的一群,其毒力基因甚多,致病过程复杂。影响其致病力的重要基因为ipaH和ial两个基因。Phantouamath等^[7]认为ipaH阳性者,多为志贺菌的携带者,并不一定发病,而ipaH和ial基因检测同时阳性才可证明感染且具有致病性。志贺菌ipaH基因是志贺菌属的鉴定基因,常与

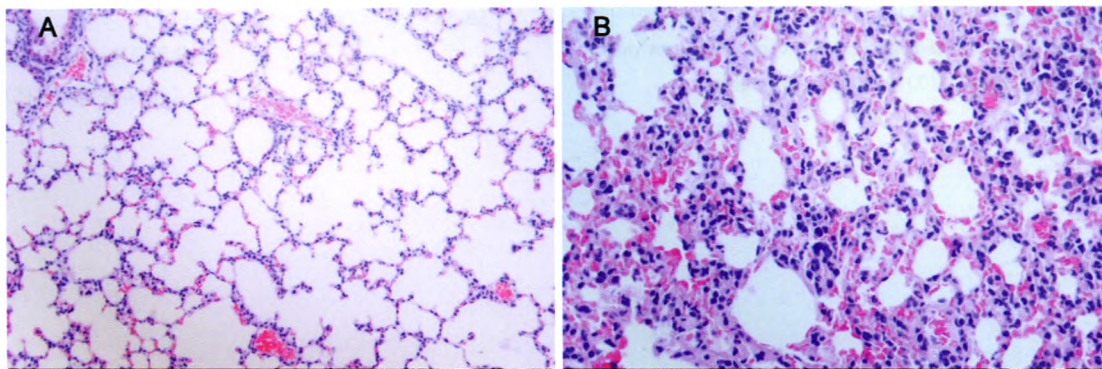


图2 携带ipaH和ial两种毒力基因福氏Xv型志贺菌侵袭小鼠肺组织切片(HE, ×100)

细菌侵入相关; *ial* 则介导肠细胞黏附力; *sen* 基因与志贺菌侵袭力相关。 *virF* 基因座是主要调控基因之一, 为广泛调控基因家族, *virF* 是志贺菌毒力基因的重要调节子^[8]。福氏志贺菌 Xv 新亚型作为一种新的流行株, 毒力基因及毒力岛携带尚不明确, 本研究发现携带 4 种毒力基因的福氏 Xv 型志贺菌确实具有致病性。本组菌株中 4 种毒力基因携带率超过一半以上, 且动物实验小鼠肺泡壁增厚, 管周充血水肿, 炎细胞浸润, 可见福氏 Xv 型志贺菌的侵袭力较强。耐药性分析, 本次分离到的 61 株福氏 Xv 型志贺菌均为多重耐药菌株, 对环丙沙星敏感性下降明显, 耐药谱不同于以往福氏志贺菌的耐药谱^[9,10], 提示临床应进行药敏试验采取有针对性的治疗。本研究聚类分析可见, 菌株间带型相似度较高, 说明亲缘关系较密切。61 株福氏 Xv 志贺菌可分为 25 种带型、7 个聚类群(A ~ G), 表现出明显的多态性, 说明菌株进化来源于多个克隆系, 在进化过程中存在较大变异。

综上所述, 福氏 Xv 志贺菌为致病性较强的一种新型致病菌, 可能携带大量的毒力基因及毒力岛, 极有可能在短时间内在不同地域间传播, 并在数代传播中产生变异^[11]。因此, 应加强福氏志贺菌 Xv 新亚型的监测, 并进行毒力岛携带情况和致病机制方面的研究。

参 考 文 献

[1] Ye C, Lan R, Xia S, et al. Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(2): 419-426.

[2] Yu HL, Chang ZR, Zhang LS, et al. Analysis on the status of *Shigella* spp. antimicrobial resistance through data from the National Shigellosis Surveillance System in China, in 2005. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(4): 370-373. (in Chinese)
余华丽, 常昭瑞, 张立实, 等. 国家监测点 2005 年志贺菌菌型分布和药敏结果分析. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(4): 370-373.

[3] Zhuang L, Qian HM, Geng LH, et al. Pathogenic characteristics and virulence genes of *Shigella flexneri* 4c in Jiangsu province. *Chin J Dis Surv*, 2008, 23(7): 412-414. (in Chinese)

庄菱, 钱慧敏, 耿丽华, 等. 江苏省福氏 4c 志贺菌病原特性及毒力基因检测. *疾病监测*, 2008, 23(7): 412-414.

[4] Cao JJ. The virulence genes detection and pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Shigella flexneri* serotype 4c in Henan province. Master's Thesis of Dalian Medical University, 2007. (in Chinese)
曹晶晶. 河南省福氏 4c 型志贺氏菌毒力因子检测及脉冲场凝胶电泳分型分析. 大连医科大学, 2007.

[5] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*, 2006, 3(1): 59-67.

[6] Way SS, Sallustio S, Magliozzo RS, et al. Impact of either elevated or decreased levels of cytochrome bd expression on *Shigella flexneri* virulence. *J Bacteriol*, 1999, 181(4): 1229-1237.

[7] Phantouamath B, Sithhivong N, Ichinose Y, et al. Pathogenicity of *Shigella* in healthy carriers: a study in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Jpn J Infect Dis*, 2005, 58(4): 232-234.

[8] Yoshida S, Katayama E, Kuwae A, et al. *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Racl activity and efficient bacterial internalization. *EMBO J*, 2002, 21(12): 2923-2935.

[9] Sun YX, Jin YS, Zhang J, et al. Study on drug resistance of *Shigella flexneri* 4c. *Int J Epidemiol Infect Dis*, 2005, 32(5): 263-265. (in Chinese)
孙永祥, 金以森, 章坚, 等. 福氏志贺菌 4c 亚型的药物抗性观察. *国外医学流行病学传染病分册*, 2005, 32(5): 263-265.

[10] Sun YX, Jin YS, Mao JX, et al. A study on biological characteristics and *ipaH* gene detection of *Shigella flexneri* 4c. *Chin J Health Lab Technol*, 2005, 15(5): 531-532. (in Chinese)
孙永祥, 金以森, 毛建勋, 等. 福氏志贺菌 4c 亚型生物学特性研究及 *ipaH* 基因检测. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(5): 531-532.

[11] Zhang W, Pan JC, Meng DM, et al. PFGE of *Shigella flexneri* 4c isolates from food-poisoning outbreaks and sporadic diarrhea patients. *Chin J Prev Med*, 2007, 41(1): 50-53. (in Chinese)
张蔚, 潘劲草, 孟冬梅, 等. 福氏志贺菌 4c 型爆发和散发菌株的脉冲场凝胶电泳分型. *中华预防医学杂志*, 2007, 41(1): 50-53.

(收稿日期: 2012-07-09)

(本文编辑: 张林东)