

河南省2011—2014年D群宋内志贺菌病原学监测与分子流行病学研究

赵嘉咏 张白帆 穆玉姣 苏佳 黄丽莉 夏胜利 许汴利

450016 郑州,河南省疾病预防控制中心传染病预防控制所

通信作者:许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.04.024

【摘要】 目的 分析2011—2014年河南省腹泻患者粪便中分离的216株D群宋内志贺菌毒力基因携带情况、耐药谱及代表性菌株的PFGE指纹图谱特征,为志贺菌病的病原学监测及暴发溯源提供基线数据与方法学参考。方法 采集腹泻患者粪便样本,SS平板分离培养18~24 h,采用克氏双糖铁(KIA)/动力-吲哚-尿素(MIU)与API20E系统进行生化鉴定,利用志贺菌分型血清进行玻片凝集;使用热裂解法制备DNA模板,采用多重PCR鉴定毒力基因种类。根据国际PulseNet细菌性传染病分子分型监测网络公布的宋内志贺菌PFGE分型技术方案进行PFGE分子分型与聚类分析。结果 216株D群宋内志贺菌中,98株为宋内I型,118株为宋内II型;各菌株均携带不同的毒力因子编码基因,包括SHET-1B、SHET-2、ial、ipaH,具有4种毒力基因组合类型;216株宋内志贺菌均为耐2种以上抗生素的多重耐药菌株,其中耐2~4种为34株(15.7%),耐5~8种为147株(68.1%),耐9~10种为24株(11.1%),耐11种为7株(3.2%),耐13种为4株(1.9%)。100株宋内志贺菌经*Xba* I酶切与PFGE后共分为31种不同带型,相似度为68.6%~100.0%,各带型包含菌株数为1~13株不等。结论 2011—2014年河南省宋内志贺菌均携带致病性毒力基因,菌株耐药现象比较严重,其PFGE指纹图谱呈现多样性的同时又具有较显著的优势带型特点,部分带型与其对应的耐药谱具有一定的关联性。与相同的聚集性。

【关键词】 志贺菌,D群;毒力基因;药敏测试;脉冲场凝胶电泳

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004201,2013ZX10004203)

Surveillance on the etiology and molecular epidemiology of *Shigella sonnei* isolated in Henan province from 2011 to 2014 Zhao Jiayong, Zhang Baifan, Mu Yujiao, Su Jia, Huang Lili, Xia Shengli, Xu Bianli

Institute of Infectious Disease Control and Prevention, Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

Corresponding author: Xu Bianli, Email: xubl@hncdc.com.cn

【Abstract】 Objective To detect and analyze the distribution of virulence factors, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns of *Shigella sonnei*, isolated in Henan province from 2011 to 2014. **Methods** Samples of diarrhea patients were collected and isolated with SS selective culture medium in 37 °C for 18–24 hours. All strains were identified under the Kligler iron agar/motility-indol-urea biochemical action and API20E biochemical system. Serological typing and prepared DNA template were carried out with thermal cracking method and multiplex PCR, to detect the virulence genes of *Shigella sonnei*. According to the molecular typing method and K-B drug susceptibility testing method published by the international PulseNet bacterial infectious disease monitoring network and USA clinical and Laboratory Standards Institute, antimicrobial susceptibility tests and PFGE molecular characteristics of these positive strains isolated from sentinel hospitals patients stool samples were analyzed. **Results** Among the 98 strains of *Sonnei* type I and 118 strains of *Sonnei* type II, all the strains carried carry different virulence genes including SHET-1B, SHET-2, ial, ipaH genes, with 4 kinds of virulence gene combination types. All the 216 strains of *Shigella sonnei* belonged to the multi-drug resistant strains, including 34 isolates resistant to 2–4 kinds of antibiotics (15.7%), 147 isolates to 5–8 kinds of antibiotics (68.1%), 24 to 9–10 kinds of antibiotics (11.1%), 7 to 11 kinds of antibiotics (3.2%), and 4 to 13 kinds of antibiotics (1.9%). A total of 100 strains of *Shigella sonnei* were divided into 31 molecular patterns, digested by *Xba* I and PFGE. Each pattern contained

1-13 strains with similarities ranged from 68.6%-100.0%. **Conclusions** All the *Shigella sonnei* strains carried virulence pathogenic factors, presenting serious status on drug resistance. PFGE fingerprinting patterns showed high polymorphism and dominant characteristics. PFGE patterns of partial strains and corresponding antidrug spectrum presented certain relevance and with same aggregation relationship.

【Key words】 *Shigella sonnei*, D group; Virulence gene; Antimicrobial susceptibility test; Pulsed field gel electrophoresis

Fund programs: National Science and Technology Major Project of China (2012ZX10004201, 2013ZX10004203)

志贺菌病(Shigellosis)是由志贺菌(*Shigella* spp.)感染引起的急性直肠-结肠炎。临床症状表现为水样泻、黏液脓血便、里急后重、部分患者有剧烈头痛、嗜睡、意识模糊、惊厥等症状。志贺菌分为A群痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)、B群福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)、C群鲍氏志贺菌(*Shigella boydii*)、D群宋内志贺菌(*Shigella sonnei*) 4个血清群^[1]。本研究对分离自河南省腹泻患者粪便样本中的D群宋内志贺菌进行病原学检测与分子分型,深入了解和掌握其病原学特点,为相关疾病的监测、暴发预警与溯源提供基线数据与方法学参考。

对象与方法

1. 菌株来源:2011—2014年河南省腹泻病多病原监测系统收集并分离自腹泻患者粪便的216株宋内志贺菌。

2. 主要试剂与仪器:

(1)主要试剂:SS选择性培养基(北京陆桥技术股份有限公司)、志贺菌分型血清(日本生研公司)、克氏双糖铁(KIA)/动力-吲哚-尿素(MIU)、脑心浸液肉汤/M-H琼脂及药敏纸片(英国Oxoid公司)、API20E肠杆菌科细菌鉴定板条(法国BioMérieux公司)、TaqDNA聚合酶(美国Promega公司)、dNTP MIX(上海生工生物工程股份有限公司)、引物(上海英骏生物技术有限公司,HPLC纯化)、琼脂糖(西班牙Biowest公司)、50×TAE(北京索莱宝科技有限公司)、SeakemGold琼脂糖(美国Lonza公司)、蛋白酶K(英国Roche公司)、限制性内切酶*Xba* I [宝生物工程(大连)有限公司]、Tris-HCl/EDTA/5XTBE(北京索莱宝科技有限公司)

(2)主要仪器:药敏纸片分配器(英国Oxoid公司)、去离子水系统(美国Milipore公司)、Minispin台式离心机、PCR仪(德国Eppendorf公司)、PFGE及成像系统(美国Bio-Rad公司)、VITEK浊度仪(法国BioMérieux公司)。

3. 研究方法:

(1)志贺菌的分离培养与生化鉴定:采集患者粪

便拭子于Cary-Blair氏运送培养基中送至实验室,接种SS选择性平板,三区划线,37℃培养过夜(16~18h);挑取疑似志贺菌落(无色半透明、突起、光滑、湿润)进行生化鉴定。用无菌接种针挑取疑似菌落分别穿刺接种于KIA和MIU培养基上,37℃培养18~24h。对于符合发酵葡萄糖不发酵乳糖(K/A)、不产气(gas-)、硫化氢阴性(H₂S-)、动力和吲哚阴性(-)、尿素酶阴性(URE-)的菌株可初步判定为志贺菌,将其转入营养琼脂平板37℃过夜培养后用志贺菌分型血清进行玻片凝集试验。阳性菌株用API20E系统生化板条最终确认并进一步进行病原学检测。

(2)药敏试验:参照WHO推荐的Kirby-Bauer法,将宋内志贺菌转种脑心浸液琼脂平板,37℃培养16h后0.85%生理盐水制成0.5麦氏单位悬液。用无菌棉拭子蘸取菌液均匀涂布于M-H平板表面,用分配器将药敏纸片压盖其上,15min内送37℃温箱培养18h以后测量各药敏纸片抑菌圈直径,参照美国临床实验室标准化协会2009年标准进行耐药表型判定,以大肠埃希菌ATCC25922作为质控菌株。

(3)DNA模板制备:刮取营养平板宋内志贺菌2~3个单菌落至预先加入1ml 0.85%灭菌生理盐水的EP管内,充分振荡悬浮。4℃,8000×g离心5min,弃去上清,沉淀加入100μl灭菌去离子水,再次充分振荡悬浮混匀。100℃煮沸20min,8000g离心5min,取上清作为PCR扩增模板。

(4)多重PCR检测:反应体系为25μl:其中PCR反应液(含有Taq酶、特异性引物、dNTP及反应缓冲液)23μl,模板DNA2μl。检测引物为针对志贺菌毒力基因设计的4对引物SHET-1B/SHET-2/ial/ipaH,引物浓度为25μmol/L。多重PCR反应参数:预变性94℃5min;变性94℃50s,复性从63℃开始,每次降落0.3℃,90s,72℃延伸120s,15个循环。随后,变性94℃50s,复性53℃90s,72℃延伸120s,20个循环;72℃延伸7min。取10μl PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳(120V,30min)。

(5)PFGE分型:按照国际Pulsenet网络实验室公布的宋内志贺菌PFGE标准分型方法,对100株D群宋内菌进行分子分型,沙门菌标准株H9812作为分子质量标记。限制性内切酶Xba I (75 U), 37℃酶切2.5 h。电泳参数:电压6 V/cm,分子质量范围30~600 kb,脉冲时间2.16~54.17 s,线性转换,电场角度120°,电泳时间19 h,电泳液0.5×TBE,电泳液温度14℃。电泳结束后胶块用GelRed染料染色30 min,纯水清洗40 min,凝胶成像仪拍照(曝光时间3.0 s,去过饱和成像)。用BioNumerics 6.6软件对电泳图谱进行数据分析,绘制聚类分析树状图。聚类算法为非加权配对平均法(UPGMA),电泳条带位置优化度(Position tolerance)1.5%,相似度100%认定为同一PFGE带型。

结 果

1. 菌株背景资料:216例D群志贺菌患者男女比例1.4:1(126:90);16~18岁44例(20.4%),19~40岁145例(67.1%),41~60岁18例(8.3%),>60岁9例(4.2%);分离时间多集中于每年的5—10月。

2. 型别鉴定与毒力基因分布:216株志贺菌经血清学凝集试验鉴定均为D群宋内志贺菌,其中宋内I型98株,宋内II型118株。均携带有不同类型的毒力基因,具有4种不同的毒力基因组合型别,见表1。

表1 2011—2014年河南省216株D群宋内志贺菌毒力基因携带情况

型别	毒力基因型	菌株数
宋内 I	SHET-1B+SHET-2+ial+ipaH	68
	SHET-2+ial+ipaH	12
	SHET-1B+SHET-2+ial	8
	SHET-1B+SHET-2+ipaH	10
宋内 II	SHET-1B+SHET-2+ial+ipaH	79
	SHET-2+ial+ipaH	16
	SHET-1B+SHET-2+ial	21
	SHET-1B+SHET-2+ipaH	2

注:SHET-1B:志贺菌肠毒素1基因;SHET-2:志贺菌肠毒素2基因;ial:侵袭力相关基因;ipaH:侵袭性质粒抗原H基因

3. 药敏试验:216株宋内志贺菌对青霉素类抗生素氨苄西林的耐药率为98.1%;对三代头孢类抗生素头孢他啶的耐药率为46.3%;对头孢噻肟的耐药率为32.4%;对四代头孢类抗生素头孢吡肟的耐药率为44.4%;对一代喹诺酮类抗生素萘啶酸的耐药率为100%;对三代氟喹诺酮类抗生素环丙沙星的耐药率为33.3%;对诺氟沙星的耐药率为38.4%;对氨基糖苷类抗生素庆大霉素、链霉素的耐药率为

17.1%和41.7%;对氯霉素类抗生素的耐药率为38.4%;对增效磺胺类抗生素甲氧苄氨嘧啶与复方新诺明的耐药率为25.0%和33.8%;对四环素的耐药率为60.2%。216株宋内志贺菌均为多重耐药菌株,其中耐2~4种的为34株(15.7%),耐5~8种的为147株(68.1%),耐9~10种的为24株(11.1%),耐11种的为7株(3.2%),耐13种的为4株(1.9%),见表2,3。

表2 2011—2014年河南省216株D群宋内志贺菌对13种抗生素的耐药情况

抗生素	耐药	中介	敏感	耐药率(%)
AMP	212	0	4	98.1
CTX	70	2	144	32.4
GEN	37	4	175	17.1
FEP	96	0	120	44.4
TMP	54	1	161	25.0
CAZ	100	3	113	46.3
CIP	72	4	140	33.3
TET	130	9	77	60.2
STR	90	11	115	41.7
NAL	216	0	0	46.3
CHL	83	8	125	38.4
NOR	83	19	114	38.4
SXT	73	2	141	33.8

注:AMP:氨苄西林;CTX:头孢噻肟;GEN:庆大霉素;FEP:头孢吡肟;TMP:甲氧嘧啶;CAZ:头孢他啶;CIP:环丙沙星;TET:四环素;STR:链霉素;NAL:萘啶酸;CHL:氯霉素;NOR:诺氟沙星;SXT:复方新诺明

表3 2011—2014年河南省216株D群宋内志贺菌多重耐药谱

耐药种数	耐药谱	菌株数	耐药率(%)
2	AMP+NAL	8	3.7
3	AMP+NAL+CHL	3	1.4
4	AMP+TMP+NAL+CHL	23	10.6
5	AMP+CTX+TMP+NAL+SXT	32	14.8
6	AMP+GEN+TMP+STR+NAL+SXT	81	37.5
	AMP+TET+STR+NAL+CHL+SXT		
	AMP+FEP+TET+NAL+CHL+SXT		
	AMP+TET+NAL+CHL+NOR+SXT		
	AMP+CTX+CIP+TET+NAL+CHL		
7	AMP+GEN+TMP+TET+STR+NAL+CHL	26	12.0
	AMP+TMP+TET+STR+NAL+CHL+NOR		
8	AMP+TMP+CIP+TET+STR+NAL+CHL+NOR	8	3.7
9	AMP+GEN+TMP+CIP+TET+STR+NAL+CHL+SXT	7	3.2
10	AMP+GEN+TMP+TET+STR+NAL+CHL+NOR+SXT+CAZ	17	7.9
11	AMP+GEN+TMP+CIP+TET+STR+NAL+CHL+NOR+SXT+CTX	7	3.2
13	AMP+GEN+TMP+CIP+TET+STR+NAL+CHL+NOR+SXT+CAZ+CTX+FEP	4	1.9

注:AMP:氨苄西林;NAL:萘啶酸;CHL:氯霉素;TMP:甲氧嘧啶;CTX:头孢噻肟;SXT:复方新诺明;GEN:庆大霉素;STR:链霉素;TET:四环素;FEP:头孢吡肟;NOR:诺氟沙星;CIP:环丙沙星;CAZ:头孢他啶

4. PFGE分子分型:100株宋内志贺菌分为31种不同带型,分别命名为SN1~31,带型相似度为68.6%~100.0%,各带型包含菌株数为1~13株不等。其中99株的带型相似度在90.0%以上。其中SN8、SN16、SN26、SN29包含2株菌,SN23包含3株

菌,SN1、SN21包含4株菌,SN2、SN3、SN5包含6株菌,SN15包含11株菌,SN12、SN22分别包含13株菌,为该血清型主要优势带型,其余17种带型仅包含1株菌,见图1。100株宋内志贺菌PFGE带型与耐药谱之间的关系较为复杂,从型内看,SN5中4株

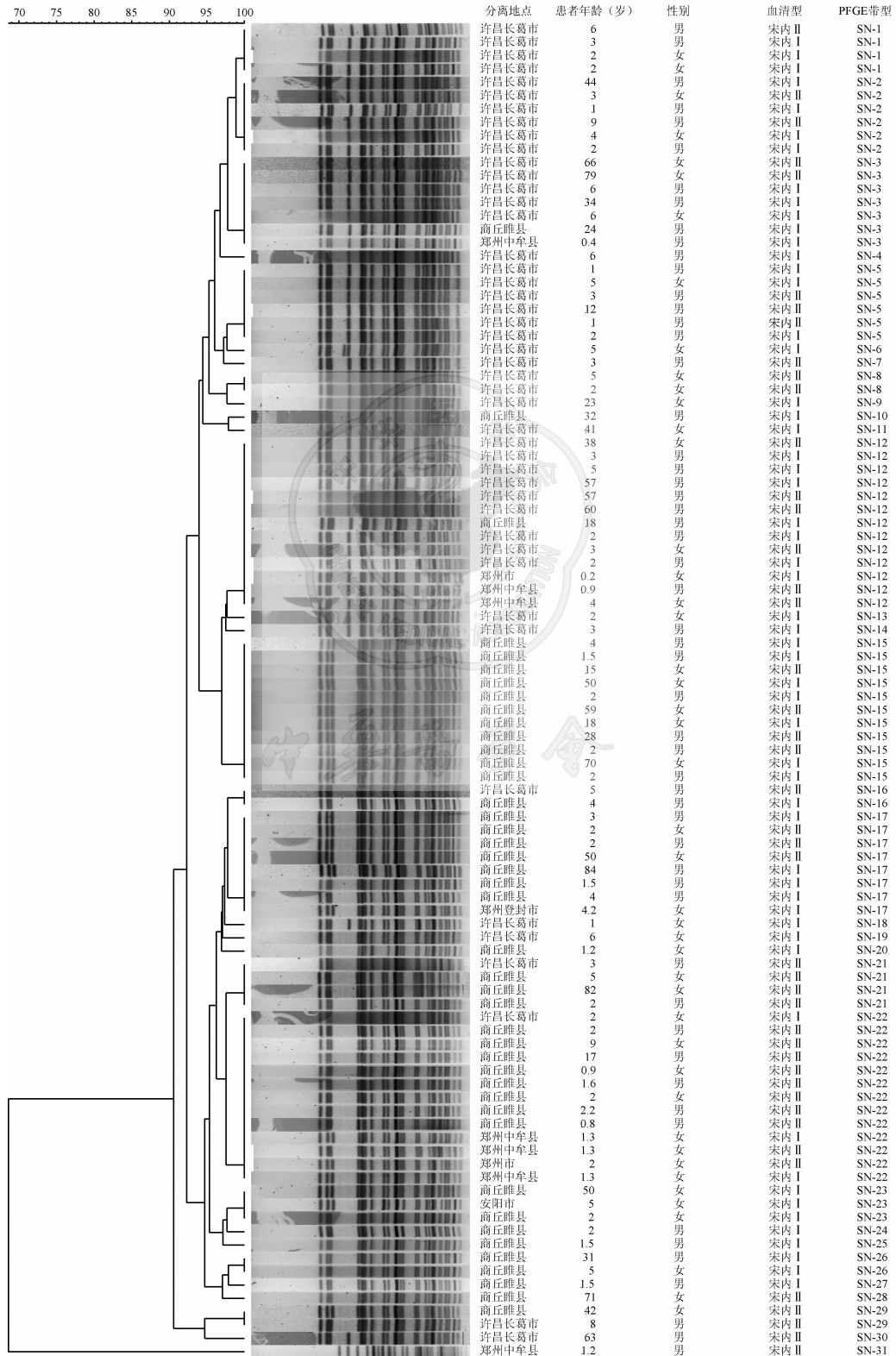


图1 2011—2014年河南省D群宋内志贺菌PFGE聚类分析

菌的耐药谱相同(AMP + GEN + TMP + NAL + CHL + SXT), SN12中6株菌的耐药谱相同(AMP + TMP + TET + STR + NAL + CHL + NOR + SXT), SN22中7株菌的耐药谱相同(AMP + TMP + CIP + TET + STR + NAL + CHL + NOR + SXT);从型间看,不同带型对应的菌株表现为相同的耐药表型,如SN3中3株菌与SN22型内菌株耐药谱相同(AMP + CTX + CIP + TET + NAL + CHL + NOR), SN15中5株菌耐药表型与SN12中3株菌表型(AMP + TMP + TET + STR + NAL + CHL + SXT)一致。在单菌株带型对应的耐药谱中,部分带型耐药表型一致,如SN20、SN7与SN18,其余带型无一致性或耐药谱呈现较高的相似性。

讨 论

志贺菌属是人类细菌性痢疾的重要和常见肠道细菌性病原体。福氏与宋内志贺菌是中国最常见的流行型别。从近几年河南省的细菌性痢疾病原学监测数据来看,仍以福氏和宋内志贺菌为主,但呈现出宋内志贺菌逐年增多的趋势,以城市监测点尤为显著。从血清型别和毒力基因携带情况看,以粗糙型的宋内Ⅱ型为主,普遍携带3~4种内毒素毒力因子^[2]。

细菌耐药是近年来医疗卫生机构面临的重大问题。由于临床过度治疗与抗生素滥用,病原菌的耐药现象日益严重^[3-4]。从本研究药敏测试结果可以看出,志贺菌耐药问题十分严重,其对8类13种抗生素均存在不同程度的耐药,比较严重的有青霉素类、磺胺类、四环素类、氯霉素类、氨基糖苷类、四代头孢类以及一代喹诺酮类,对临床常用药物三代喹诺酮类环丙沙星和诺氟沙星也存在一定的耐药。其多重耐药情况也非常严重,临床分离菌株普遍对2~13种抗生素耐药。多重耐药表型的出现一方面归因于病原菌的自发偶发性耐药突变,但更重要的原因在于抗生素滥用产生的高选择压和耐药基因的水平传递^[5]。

PFGE是近年来快速发展的传染性病原菌分子分型技术,依托这种技术和网络化实验室实时监测、交换和比对数据,可以及时发现、识别聚集性病例^[6-7]。本研究利用该技术分析了河南省100株D群宋内志贺菌PFGE“指纹图谱”特征,结果显示,100株宋内志贺菌株分为31种带型,除1株宋内Ⅱ型外,其他带型间呈现出较高的相似度(大多数带型间的相似度大于90.0%),具有显著的优势带型与

聚集现象。同时部分宋内志贺菌的耐药表型与PFGE带型呈现聚类一致性,提示基于共同暴露源的菌株往往具有相同的基因和耐药表型特征,这种特征尽管存在变异性和不确定性,但在一定范围内可以成为及早发现聚集性病例的重要参数。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] 苗艳芳,黄薇,黄剑屏,等.脉冲场凝胶电泳技术对成都市两起细菌性痢疾暴发的分型研究[J].中华流行病学杂志,2008,29(3):282-285.
Miao YF, Huang W, Huang JP, et al. Molecular typing of isolates from two dysentery outbreaks in Chengdu, through pulsed field gel electrophoresis technology [J]. Chin J Epidemiol, 2008, 29(3):282-285.
- [2] 黄丽莉,张锦,李孟磊,等.河南省B群与D群志贺菌感染的流行病学与病原学特征对比研究[J].中华流行病学杂志,2010,31(6):712-713. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.06.029.
Huang LL, Zhang J, Li ML, et al. A study on the epidemic and etiologic characteristics of *Shigella* B and D group in Henan Province [J]. Chin J Epidemiol, 2010, 31(6):712-713. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.06.029.
- [3] 孙立梅,李晖,谭小华,等.2012年广东省5岁以下儿童腹泻病流行特征及重点病原监测[J].中华流行病学杂志,2013,34(10):989-992. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.10.011.
Sun LM, Li H, Tan XH, et al. Epidemiological and etiological characteristics of diarrheal disease among children under 5 years of age in Guangdong province, in 2012 [J]. Chin J Epidemiol, 2013, 34(10):989-992. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.10.011.
- [4] DeLappe N, O'Halloran F, Fanning S, et al. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from Western Ireland, an Area of low incidence of infection [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5):1919-1924. DOI: 10.1128/JCM.41.5.1919-1924.2003.
- [5] Tóth I, Sváb D, Bálint B, et al. Comparative analysis of the Shiga toxin converting bacteriophage first detected in *Shigella sonnei* [J]. Infect Genet Evol, 2016, 37:150-157. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.11.022.
- [6] Jain SK, Gupta A, Glanz B, et al. Antimicrobial-resistant *Shigella sonnei*: limited antimicrobial treatment options for children and challenges of interpreting in vitro azithromycin susceptibility [J]. Pediatr Infect Dis J, 2005, 24(6):494-497. DOI: 10.1097/01.inf.0000164707.13624.a7.
- [7] Uyttendaele M, Bagamboula CF, De Smet E, et al. Evaluation of culture media for enrichment and isolation of *Shigella sonnei* and *S. flexneri* [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 70(3):255-265. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00549-9.

(收稿日期:2015-09-30)

(本文编辑:万玉立)