

# 一起由宋内志贺菌引起的寄宿学校细菌性痢疾暴发病原学和流行病学分析

孟昭倩<sup>1</sup> 段然<sup>2</sup> 卜戈<sup>1</sup> 郭国侠<sup>1</sup> 郭靛子<sup>1</sup> 胡允凯<sup>1</sup>

<sup>1</sup>安徽省阜阳市疾病预防控制中心 236000; <sup>2</sup>中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206

通信作者: 胡允凯, Email: fyhyk@126.com

**【摘要】** 目的 对安徽省阜阳市某寄宿学校感染性腹泻暴发开展流行病学调查与病原学分析, 为有效控制和处置疫情提供科学依据。方法 根据病例流行病学特征对2017年9月13—15日发病病例溯源假设进行检验, 采集患者和厨师粪便、肛拭子、水样和食堂食品等进行致病菌分离与检测, 对可疑致病菌进行生化鉴定、毒力基因检测、药敏试验、PFGE和多位点序列分型。结果 浅水井供水范围内宿舍楼的罹患率(3.41%)高于深水井(0.98%), 差异有统计学意义( $\chi^2=17.215$ ,  $P<0.001$ )。从患者样品中分离到16株宋内志贺菌, 均携带 ipaH 基因且不携带 set1 基因, 其中7株携带 sen 基因和 ial 基因。16株宋内志贺菌对氨苄西林、四环素、复方新诺明、头孢唑啉、头孢噻肟、庆大霉素、萘啶酸、链霉素高度耐药, 9株宋内志贺菌对多西环素耐药。16株宋内志贺菌的PFGE带型相似度为100.0%, ST型均为ST152。结论 本次细菌性痢疾暴发的病原为宋内志贺菌, 浅水井水可能为感染来源。

**【关键词】** 宋内志贺菌; 药敏试验; 毒力基因

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX10713003-002-005)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.08.021

## Epidemiological and pathogenic features of a bacillary dysentery outbreak in a boarding school caused by *Shigella sonneri*

Meng Zhaoqian<sup>1</sup>, Duan Ran<sup>2</sup>, Bu Ge<sup>1</sup>, Guo Guoxia<sup>1</sup>, Guo Liangzi<sup>1</sup>, Hu Yunkai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fuyang Municipal Center for Disease Control and Prevention of Anhui Province, Fuyang 236000, China;

<sup>2</sup>National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: Hu Yunkai, Email: fyhyk@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the etiologic and epidemiologic features of an infectious diarrhea outbreak in a boarding school in Fuyang city, Anhui province. **Methods** Traceability hypothesis of this study was tested according to the epidemiological characteristics of the cases. Feces, anal swabs, water samples and food residues related to the patients and chefs were collected for pathogen isolation and detection. Biochemical identification, virulence gene detection, drug susceptibility test, PFGE and multilocus sequence typing were performed. **Results** The incidence rate (3.41%) of different dormitory buildings within the water supply area by shallow wells was higher than that (0.98%) of the deep wells, with statistical significance ( $\chi^2=17.215$ ,  $P<0.001$ ). Sixteen strains belonged to the *Shigella Sonneri* family were isolated from the patient's samples, and all carrying the ipaH gene. Seven strains belonged to sen and ial genes. Set1 gene that did not appear in all the 16 strains were highly resistant to ampicillin, tetracycline, compound xinnomine, cefazoline, cefotaxime, gentamicin, naphthidinic acid and streptomycin, including 9 strains to doxycycline. The pulse field pattern of the 16 strains of *Shigella sonneri* appeared the same, with the ST type as ST152. **Conclusion** When combined data from the etiological and epidemiological investigation, it was confirmed that *Shigella sonneri* was the pathogen of this outbreak, and water from the shallow wells might be responsible for the source of infection.

**【Key words】** *Shigella sonnei*; Drug susceptibility test; Virulence genes

**Fund program:** National Science and Technology Major Project of China (2018ZX10713003-002-005)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.08.021

志贺菌为革兰阴性菌,兼性厌氧,对营养要求不高。根据生化反应和O抗原不同分为4个血清群(痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌和宋内志贺菌)。痢疾主要通过患者生活接触、污染的水源、食物及苍蝇等生物媒介传播。2017年9月13日,安徽省阜阳市某学校向阜阳市CDC报告,发现13日前后有多名学生出现发热、腹痛、腹泻,自述以稀便和水样便为主,有里急后重感。至2017年9月15日,发热或每天腹泻 $\geq 3$ 次的病例共168例。本研究对此进行流行病学与病原学分析。

### 资料与方法

1. 流行病学调查:该校为寄宿制,共80个班级、5 655名在校生,均为住宿生。学校唯一的食堂为承包制,学校周围有较多小吃店。该学校未接通市政供水,共有4口自备水井,1口270 m深水井用于全校的饮用水及部分生活用水,其余3口50 m浅水井用于部分生活用水。CDC接到报告的9月13日前10 d左右,阜阳市连续降雨,校内积水情况严重,排水困难,化粪池离浅水井很近,且浅水井蓄水池没有消毒措施。9月15日浅水井蓄水池消毒后,新发病例数呈逐渐递减趋势,9月20日后无新发病例出现。浅水井仅供应2、3、4、5号宿舍楼和教学楼的生活用水;深水井供应除2、3、4、5号宿舍楼外(1、6、7号宿舍楼、教学楼、行政楼、食堂)的生活用水及全校的饮用水。深水井水经纯水机过滤后为饮用水。发病例全部为学生,教职工及食堂员工均无发热、腹泻或腹痛病例。截止9月15日各宿舍楼发病情况与供水来源见表1。

表1 安徽省阜阳市某寄宿学校宿舍楼发病情况与供水来源

宿舍楼	总人数	发病人数	罹患率(%)
2号楼	1 016	51	5.02
3号楼	1 176	51	4.34
4号楼	1 200	15	1.25
5号楼	1 240	41	3.31
1号楼	273	3	1.10
6号楼	512	5	0.98
7号楼	238	2	0.84

2. 样品来源与主要试剂仪器:采集样品共计88份:包括发热或腹泻患者的粪便5份,肛拭子33份;食堂厨师等工作人员肛拭子23份;学校食堂剩余食品11份;食堂案板、刀具、餐具等涂抹物样品4份;学生生活饮用水、宿舍饮用水12份。限制性内切酶*Xba* I(日本TaKaRa公司)、仪器包括全自动微

生物鉴定仪VITEK2(法国梅里埃公司)、脉冲场凝胶电泳仪及凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

3. 病原检测与药敏试验:参照GB 4789食品卫生微生物学检验,对88份样品进行沙门菌、志贺菌与副溶血弧菌培养与系统生化鉴定,同时用荧光定量PCR方法检测沙门菌、志贺菌、诺如病毒与轮状病毒。

参照《国家致病菌识别网监测工作方案》推荐的最小抑菌浓度(MIC)法:吸取50  $\mu$ l已经制备好的0.5麦氏单位菌悬液,加入1支12 ml M-H肉汤培养基内混匀后,注入测试板药敏孔,每孔100  $\mu$ l。同时吸取无菌M-H肉汤培养基100  $\mu$ l做阴性对照,36  $^{\circ}$ C孵育18~20 h后判读结果。

4. 毒力基因与分子分型:毒力基因检测将志贺菌划线接种LB平板36  $^{\circ}$ C 24 h,取单个菌落转种5 ml LB增菌液,36  $^{\circ}$ C 220 r/min震荡过夜培养,取4 ml菌液按照说明书提取DNA,取1  $\mu$ l即为扩增模板。检测志贺菌*ipaH*、*set1*、*sen*和*ial*基因。扩增条件:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 1 min,56  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1 min,35个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min。取5  $\mu$ l扩增产物进行电泳。志贺菌4个毒力基因的检测引物及产物大小见参考文献[1]。

PFGE:制备16株志贺菌和沙门菌标准株(H9812)DNA胶块,用限制性内切酶*Xba* I酶切,37  $^{\circ}$ C 3 h,电泳19 h,初始转换时间2.2 s,终末转换时间54.2 s,电泳后经染色拍照,采用BioNumerics 7.6软件分析PFGE电泳图谱。

多位点序列分型:采用*adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA*、*recA*共7对管家基因引物进行扩增,志贺菌属7对管家基因引物序列、产物长度见参考文献[2]、电泳鉴定后送测序。双向测序结果使用Chromas及Seqman软件进行检验与拼接,以Mega软件截取比对序列。与Enterobase数据库中大肠埃希菌/志贺菌的管家基因进行序列比对,确定管家基因的等位基因编码,形成菌株ST型。

### 结果

1. 一般情况:浅水井供水范围内宿舍楼的罹患率(3.41%)高于深水井(0.98%),差异有统计学意义( $\chi^2=17.215, P<0.001$ )。

2. 病原检测与药敏试验:88份样品经过荧光定量PCR筛选,志贺菌阳性27份,沙门菌、诺如病毒和轮状病毒均为阴性。直接分离和增菌培养后检出志贺菌16株,经过血清凝集试验鉴定为宋内志贺菌II相。见表2。

**表2** 安徽省阜阳市某寄宿学校88份样品志贺菌培养及核酸检测

样品	采集样品数	培养阳性数(率,%)	核酸阳性数(率,%)
患者肛拭子	33	13(39.39)	20(60.61)
患者粪便	5	3(60.00)	5(100.00)
厨师肛拭子	23	0(0.00)	2(8.70)
食堂餐具、剩余食品	15	0(0.00)	0(0.00)
生活用水、饮用水	12	0(0.00)	0(0.00)
合计	88	16(18.18)	27(30.68)

16株宋内志贺菌对氨苄西林、四环素、复方新诺明、头孢唑啉、头孢噻肟、庆大霉素、萘啶酸、阿奇霉素、链霉素高度耐药,且耐药谱高度相似。见表3。

3. 毒力基因与分子分型:16株宋内志贺菌,ipaH基因均阳性、set1基因均阴性、sen和ial基因同时阳性7株,携带率43.75%。16株宋内志贺菌PFGE经过Xba I酶切图谱相似度100%(图1)。

16株宋内志贺菌ST型均为ST152。将Enterobase数据库宋内志贺菌的全部ST型作最小生成树<sup>[3]</sup>,ST152为绝对优势ST型(图2)。

讨 论

结合病原结果及临床症状可以判定,这是一起由宋内志贺菌引起的细菌性痢疾暴发。浅水井与本次暴发存在关联。本次调查未能在水源方面追溯到病原,考虑与水样采集有关,一是未采集井水,二是浅水井所供生活用水采样数目偏少,建议有类似情况标本种类采集齐全、数量充分,以便为溯源提供依据。本次暴发分离出的16株宋内志贺菌PFGE带型

**表3** 16株志贺菌对25种抗生素药敏情况

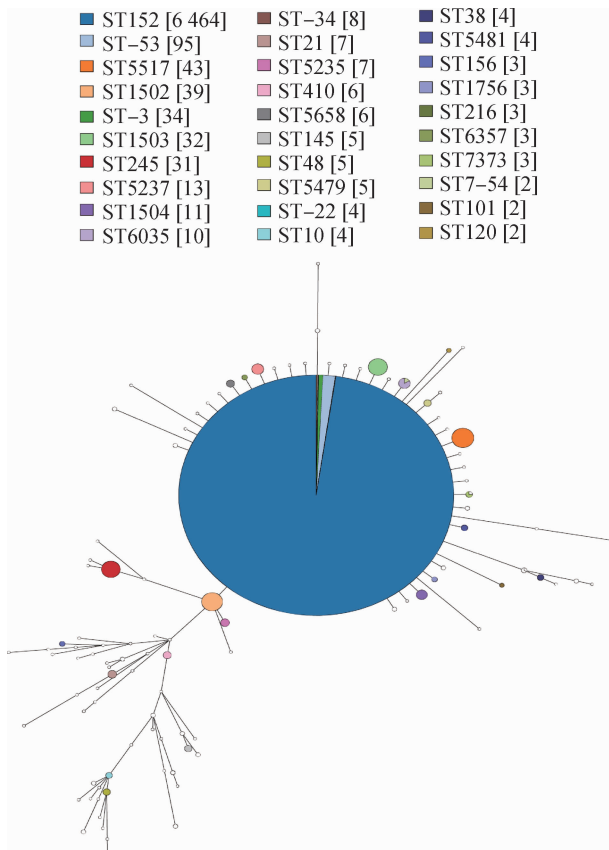
抗生素	敏感(株)	中度敏感(株)	耐药(株)	耐药比例(%)
氨苄西林	0	0	16	100.00
氨苄西林/舒巴坦	0	16	0	0.00
四环素	0	0	16	100.00
氯霉素	16	0	0	0.00
复方新诺明	0	0	16	100.00
头孢唑啉	0	0	16	100.00
头孢噻肟	0	0	16	100.00
头孢他啶	16	0	0	0.00
头孢西丁	16	0	0	0.00
庆大霉素	0	0	16	100.00
亚胺培南	16	0	0	0.00
萘啶酸	0	0	16	100.00
阿奇霉素	0	0	16	100.00
环丙沙星	16	0	0	0.00
阿莫西林/克拉维酸	16	0	0	0.00
米诺环素	15	1	0	0.00
阿米卡星	16	0	0	0.00
氨基糖苷	13	3	0	0.00
头孢吡肟	0	16	0	0.00
美罗培南	16	0	0	0.00
左氧沙星	0	16	0	0.00
多西环素	0	7	9	56.25
卡那霉素	16	0	0	0.00
链霉素	0	0	16	100.00
吉米沙星	16	0	0	0.00

相同,支持病原为同一来源的可能。

志贺菌是引起肠道感染的主要病原,我国以B群福氏志贺菌为主。安徽省淮北市、马鞍山市近年来流行的志贺菌均为福氏志贺菌,宋内志贺菌占比较低。2007—2013年淮北市从监测点腹泻病例中分离志贺菌215株,其中福氏志贺菌占94.42%,宋内志贺菌占5.58%<sup>[4]</sup>。2005年马鞍山市分离的67株志贺



图1 16株宋内志贺菌PFGE分子分型聚类图



注:该树构建基于Edmond's算法,适于等位基因编码有缺失的数据;每个圆圈代表的ST型包括7个等位基因编码完整的ST型,以及等位基因编码有缺失,其余编码与前者相同的ST型;圆圈直径与菌株数目成正比;括号内数据为菌株数

图2 Enterobase数据库宋内志贺菌基于7个管家基因等位基因编码的最小生成树

菌中,福氏志贺菌占71.64%,宋内志贺菌占28.36%<sup>[5]</sup>。但近年来宋内志贺菌腹泻逐渐增多,有多起因污染饮用水<sup>[6]</sup>、污染食品<sup>[7]</sup>引起的宋内志贺菌腹泻暴发。

毒力基因和耐药方面,本研究与2008—2010年安徽省分离的20株宋内志贺菌较为相似。20株宋内志贺菌 ipaH、sen、ial 基因均为阳性, set1 基因均为阴性<sup>[8]</sup>,其中 ipaH 基因、set1 基因分布与本研究一致, sen 和 ial 基因略有差别。这可能与携带这些基因的质粒丢失有关。

细菌耐药已经在世界范围内受到临床和公共卫生领域越来越多的关注,尤其是多重耐药现象日益严重<sup>[9-10]</sup>。本次暴发的宋内志贺菌对磺胺类、大环内酯类耐药,部分四环素类、三代头孢类、氨基苷类耐药,与安徽省20株宋内志贺菌相似<sup>[8]</sup>;对复方新诺明、四环素、萘啶酸均耐药,未显示肠道菌常用抗生素喹诺酮类耐药,与国内报道基本一致<sup>[11]</sup>。

多位点序列分型显示本次宋内志贺菌 ST 型均为 ST152,为世界范围内的优势型别,提示该型别具

有非常广泛的传播力。2017年中国陕西省3起志贺菌疫情的型别均为ST152型<sup>[12]</sup>,1983—2014年巴西圣保罗宋内志贺菌的ST型也均为ST152型<sup>[13]</sup>。

分子生物学方法可以快速筛选出目标基因,而传统培养可以进一步分析其耐药性和同源性。本研究采用传统培养和分子生物学方法相结合,为快速处置与疫情分析,指导临床用药及进一步的分子生物学研究,提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] 徐建国, 阚颀, 张建中, 等. 现场细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 7-9, 42-43.  
 Xu JG, Kan B, Zhang JZ, et al. Field bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2011: 7-9, 42-43.  
 [2] Wirth T, Falush D, Lan RT, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective[J]. Mol Microbiol, 2006, 60(5): 1136-1151. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.  
 [3] Alikhan N, Zhou ZM, Sergeant MJ, et al. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*[J]. PLoS Genet, 2018, 14(4): e1007261. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007261.  
 [4] 王敏, 张春梅, 李振华, 等. 淮北市志贺菌菌型分布及耐药性分析[J]. 安徽预防医学杂志, 2014, 20(2): 148-150.  
 Wang M, Zhang CM, Li ZH, et al. Distribution and drug resistance analysis of shigella in Huaibei city[J]. Anhui J Prev Med, 2014, 20(2): 148-150.  
 [5] 葛大放, 陈道利, 姜璐, 等. 安徽省马鞍山市细菌性痢疾监测与耐药性分析[J]. 疾病监测, 2007, 22(2): 96-97. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2007.02.011.  
 Ge DF, Chen DL, Jiang L, et al. Surveillance on bacterial dysentery in the city of Maanshan and analysis on its drug resistance[J]. Dis Surveill, 2007, 22(2): 96-97. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2007.02.011.  
 [6] 罗铭, 孙贵娟, 李文, 等. 一起水污染宋内志贺菌所致腹泻暴发检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(2): 259-260.  
 Luo M, Sun GJ, Li W, et al. Detection and analysis of diarrhea outbreak caused by *Shigella sonnei* for water contamination[J]. Chin J Health Lab Tec, 2017, 27(2): 259-260.  
 [7] 张庆吉, 李心朋. 一起由宋内志贺菌引起食物中毒的病原菌检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(6): 827-830.  
 Zhang QJ, Li XP. Detection and analysis of pathogen in a food poisoning case caused by *Shigella sonnei*[J]. Chin J Health Lab Tec, 2015, 25(6): 827-830.  
 [8] 胡守奎, 胡万富, 王敏, 等. 安徽省2008—2010年宋内志贺菌分子流行病学分析[J]. 安徽预防医学杂志, 2013, 17(11): 959-962.  
 Hu SK, Hu WF, Wang M, et al. The molecular epidemiological analysis on *Shigella sonnei* strains isolated from Anhui Province, 2008-2010[J]. Anhui J Prev Med, 2013, 17(11): 959-962.  
 [9] Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States-undefined agents[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 16-22. DOI: 10.3201/eid1701.P21101.  
 [10] 贾蕾, 吕冰, 田祎, 等. 北京市2008—2017年细菌性痢疾病原学监测分析[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(2): 165-169. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.02.008.  
 Jia L, Lyu B, Tian Y, et al. Pathogenic surveillance and related factors on bacillary dysentery in Beijing, 2008-2017[J]. Chin J Epidemiol, 2019, 40(2): 165-169. DOI: 10.3760/cma.j.issn. 0254-6450.2019.02.008.  
 [11] 李柏生, 陈柳军, 柯碧霞, 等. 广东省和广西壮族自治区部分地区2014—2016年宋内志贺菌病原学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(11): 1541-1545. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.11.021.  
 Li BS, Chen LJ, Ke BX, et al. Etiologic characteristics of *Shigella sonnei* strains isolated from some areas of Guangdong province and Guangxi Zhuang Autonomous Region of China, 2014-2016[J]. Chin J Epidemiol, 2017, 38(11): 1541-1545. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.11.021.  
 [12] 刘东立, 张义, 马国柱, 等. 农村寄宿制学校宋内志贺菌痢暴发及全基因组溯源分析[J]. 中国学校卫生, 2018, 39(5): 741-746. DOI: 10.16835/j.cnki.1000-9817.2018.05.030.  
 Liu DL, Zhang Y, Ma GZ, et al. Epidemiological tracing of *Shigella sonnei* bacillary dysentery outbreaks in rural boarding schools by whole-genome sequencing[J]. Chin J Sch Health, 2018, 39(5): 741-746. DOI: 10.16835/j.cnki.1000-9817.2018.05.030.  
 [13] Seribelli AA, Frazão MR, Medeiros MIC, et al. Molecular typing and occurrence of beta-lactam resistance genes of *Shigella sonnei* strains isolated from 1983 to 2014 in the São Paulo state of Brazil[J]. Microbiol Immunol, 2017, 61(12): 547-553. DOI: 10.1111/1348-0421.12550.

(收稿日期: 2019-03-03)  
(本文编辑: 万玉立)