

福氏 2a 志贺氏菌肠毒素基因分型

白石山 李秀霞 夏桂枝 苑宏 郑文艳 王红

【摘要】 目的 对福氏 2a 志贺氏菌(*Shigella flexneri* 2a ,F2a)的志贺氏肠毒素 1(*Shigella enterotoxin 1* ,SET1)和志贺氏肠毒素 2(*Shigella enterotoxin 2* ,SET2)进行基因分型,提高菌痢暴发流行时同源性分析的水平。方法 对一起暴发 F2a 菌痢在现场流行病学调查的基础上,用聚合酶链反应(PCR)方法,检测 43 株 F2a 菌的志贺氏肠毒素 1 基因(set 1)和志贺氏肠毒素 2 基因(set 2)进行基因分型和同源性鉴定。结果 43 株 F2a 菌株分为 3 种基因型,即 1 株 set 1(-)set 2(+);3 株 set 1(+)set 2(-);39 株 set 1(+)set 2(+)。结论 本次菌痢暴发是经污染食物传播,暴发事件中夹杂着散发病例, set 1/set 2 基因分型对 F2a 菌痢暴发流行中的同源性鉴定具有重要作用。

【关键词】 福氏志贺氏菌;肠毒素;基因;聚合酶链反应

Genotypes of *Shigella enterotoxins of S. flexneri* 2a BAI Shishan*, LI Xiuxia, XIA Guizhi, et al. *Department of Infectious diseases, The 253th Hospital of PLA, Hohhot, 010051, China

【Abstract】 Objective To identify homogenous clones of *S. flexneri* 2a, using gene distribution polymorphism of *Shigella enterotoxin 1* (set 1) and *Shigella enterotoxin 2* (set 2) in a Shigellosis outbreak caused by *S. flexneri* 2a. **Methods** In addition to field epidemiological investigation, 43 strains of *S. flexneri* 2a were determined by polymerase chain reaction(PCR). **Results** The 43 strains (1 from food, 1 from a carrier, 41 from patients) were divided into 3 clones(set 1+/set 2+ for 39 strains, set 1-/set 2+ for 1, set 1+/set 2- for 3 strains). **Conclusion** This outbreak was caused by *S. flexneri* 2a. The route of transmission was contaminated-food borne. Some sporadic cases were noticed during the outbreak. The method used in this study was satisfactory to the identification of *S. flexneri* 2a.

【Key words】 *Shigella flexneri*; Enterotoxins; Gene; Polymerase chain reaction(PCR)

对细菌性痢疾暴发流行的研究,迄今仍主要依据表型来判定病例之间的关系以及传染源和传播途径。这种方法无法区别表型相同的偶合散发病例,难以确定表型相同的带菌者与暴发病例菌株间的内在联系和差异。近年来分子流行病学的飞速发展,使基因和分子水平上区别表型相同的克隆菌株成为可能。本研究采用 set 1/set 2 毒力基因分布多态性,对一起 F2a 志贺氏菌痢暴发进行基因分型和同源性鉴定。

材料与方 法

一、研究对象

1997 年 5 月 29 日至 6 月 4 日内蒙古某司机训练队发生菌痢暴发,便培养分离出 43 株 F2a 菌(定

名为 M97XX),其中 41 株来自患者,1 株来自带菌炊事员(M9705),另 1 株由食物豆腐皮中分离(M9706)。

1. 参考菌株:F2a T32、宋内氏菌(*S. sonnei*) 48025、鲍氏菌(*S. boydii*) 51150、志贺氏痢疾杆菌(*S. dysenteriae*) 51054、大肠杆菌(*E. coli*) DH5a、侵袭性大肠杆菌(EIEC) 47719 为第一军医大学流行病学教研室保存菌种。

2. 材料:Taq 酶、琼脂糖为上海复华公司产品,PCR 扩增仪及小分子量 DNA 参照标准为 Boehringer Mannheim 公司产品,dNTP 为 Serva 公司产品,其余试剂为国产分析纯。

二、方法

1. 现场流行病学调查:采集患者及炊事员粪便、剩余食物、炊具和饮用水样本,SS 琼脂平板及营养肉汤培养基培养。

2. set 1/set 2 毒力基因 PCR 分析:

(1)引物设计:针对 set 1 和 set 2 基因序列保守区设计合成,预计扩增片段分别为 306 bp 和 530

作者单位 010051 呼和浩特,解放军第二五三医院传染科(白石山、郑文艳),内蒙古医学院病理教研室(李秀霞),南京军区福州总医院儿科(夏桂枝),北京军区卫生部(苑宏),第一军医大学流行病学教研室(王红)

bp。

(2) PCR 扩增 挑取单个菌落接种于 3 ml 营养肉汤培养基, 37℃ 振荡 3~4 h, 取菌液 5 μl 加 36 μl 菌裂解液(1 × PCR 缓冲液, 0.5% NP-40, 0.5% Townen20) 2 mmol/L dNTP 5 μl, 引物各 1 μl, 无菌石蜡油 50 μl 封盖, 用 biometra PCR 仪, 97℃ 裂解 15 min。加入 Taq 酶(1 U/1 μl) 2 μl, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环后, 72℃ 延伸 5 min。

(3) 电泳: 取扩增产物 8~10 μl, 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 恒压 40~60 V, 紫外灯下观察结果。

(4) PCR 扩增敏感性试验 取 M9707 接种于营养肉汤培养基, 37℃ 振荡 2 h 至 A=0.2, 按 10 倍连续稀释法稀释至 10⁻¹⁰, 取 10⁻⁴~10⁻⁸ 作平板活菌计数, 每块平板接种 0.1 ml, 各稀释度平行 3 份, 37℃ 培养过夜。根据实际菌落数推算各稀释度的活菌浓度, 同时取各稀释度菌液 5 μl 检测。

结 果

一、现场流行病学调查结果

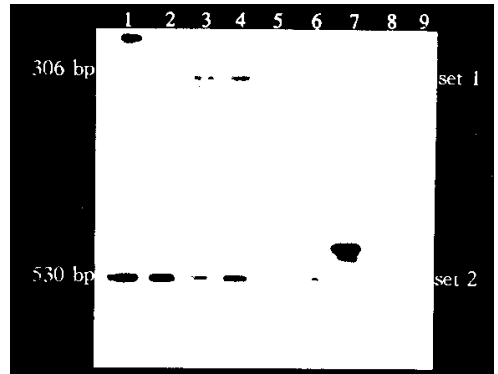
该司机训练队有学员 454 人, 食用豆腐皮后有 141 人出现腹痛、腹泻、脓血便, 临床诊断为急性细菌性痢疾, 罹患率为 31.06%。流行特征为单峰型, 5 月 29 日至 6 月 4 日每日发病人数分别为 9、26、33、31、25、12、5, 无第二代病例。共培养出 F2a 志贺氏菌 43 株, 药敏试验, 所有菌株均对妥布霉素、红霉素、庆大霉素、氯霉素、羟氨苄西林、头孢唑啉、诺氟沙星、呋喃唑酮敏感, 对青霉素和磺胺耐药。由于炊事员带菌者粪便中培养出 F2a 菌, 与食物及患者粪便中培养出的病菌表型相同, 按传统流行病学调查方法, 可以推论本次菌痢暴发流行是带菌炊事员操作中污染食物所致。

二、set 1/set 2 毒力基因 PCR 分析

1. set 1/set 2 引物 PCR 扩增的敏感性: 经直接活菌记数浓度为 3.5 × 10⁸/ml, 取 0~10⁷ 菌液经裂解后直接用于基因 PCR 扩增, 当菌液浓度为 10²/ml 时即可见 306 bp, 530 bp 的特异扩增带, 结果见图 1。

2. set 1/set 2 引物 PCR 扩增特异性: 选择 F2a T32、M9703、M9707、S. sonnei 48025、S. boydii 51150、S. dysenteriae 51054、EIEC 47719, 作 set 1/set 2 引物 PCR 扩增特异性检测。结果如图 2 所示,

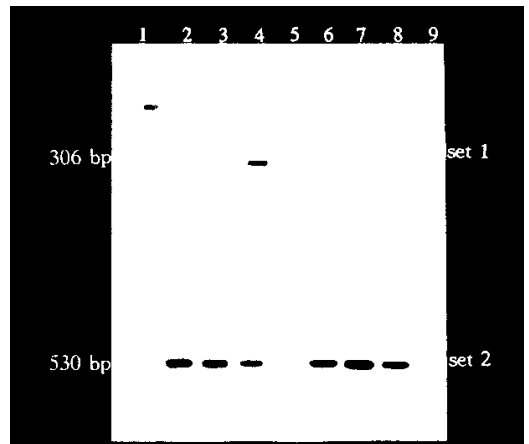
F2a T32、M9703、M9707 可检出 306 bp、530 bp 特异扩增带, S. sonnei 48025、S. boydii 51150、S. dysenteriae 51054、EIEC 47719 均可检出 530 bp 扩增带, 但未见 306 bp 扩增带, E. coli DH5a 既无 306 bp 扩增带, 也无 530 bp 扩增带, 可见 set 1/set 2 引物在 PCR 扩增中具有高度的特异性。



set 1: 1. 100 bp marker; 2~9. M9707 (10⁻²~10⁻⁹)

set 2: 1~6, 8, 9. M9707 (10⁻²~10⁻⁹); 7. 100 bp marker

图1 F2a 志贺氏菌的 set 1/set 2 引物 PCR 扩增敏感性



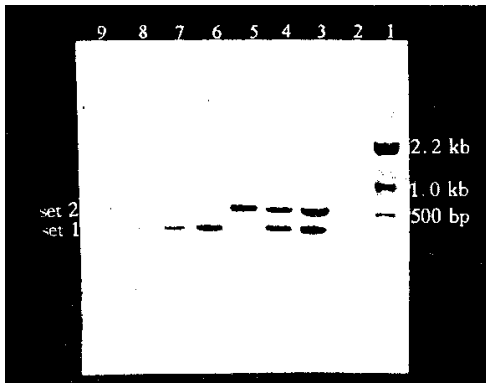
1. 100 bp marker; 2. F2a T32; 3. M9703; 4. M9707;

5. S. sonnei 48025; 6. S. boydii 51150; 7. S. dysenteriae 51054;

8. EIEC 47719; 9. E. coli DH5a

图2 F2a 志贺氏菌的 set 1/set 2 引物 PCR 扩增特异性

3. set 1/set 2 毒力基因 PCR 分析结果: 见图 3。set 1/set 2 毒力基因 PCR 将 43 株 F2a 菌分为 3 种不同的基因型: M9705 为 set 1(-) set 2(+); M9704、M9723、M9729 为 set 1(+) set 2(-); 其余 39 株为 set 1(+) set 2(+), 后者与标准 F2a T32 相同。



1. 100 bp marker ; 2. *E. coli* DH5a ; 3. M9703 ; 4. M9710 ;
5. M9705 ; 6. M9729 ; 7. M9723 ; 8. M9704 ; 9. F2a T32

图3 F2a 志贺氏菌的 set 1/set 2 基因 PCR 分析

讨 论

传统的流行病学分析在传染源的追踪及传播途径的判定中,通常以病例间联系的时序性、接触的有效方式及病原学表型特征为依据,辅以相关学科的知识加以判断。本次 F2a 菌痢暴发,7 d 内在一个集体单位出现 141 例具有类似临床表现的腹泻患者,流行呈单峰型,无第二代病例,患者均有凉拌豆腐皮食用史,从剩余食物(豆腐皮)、患者及炊事员粪便中均分离出 F2a 菌株,而且全部菌株均具有相同的抗生素特征。据此传统的流行病学可能得出如下结论:①本次事件是经食物传播的 F2a 菌痢暴发;②所有病例均应归属于暴发事件;③炊事员带菌者可能是本次事件的传染源。

然而,表型分析不能全面反映不同来源克隆株之间的遗传差异和遗传物质结构的变化,表型相同的 F2a 志贺氏菌是群体结构多样化的克隆的集合。因此,根据表型分析认为炊事员是本次菌痢暴发的传染源,所有病例均归属于暴发事件尚缺乏直接的证据。近年来分子生物学技术的发展,为解决此类难题提供了有力的分析手段。

SET 1 和 SET 2 是两种新发现的肠毒素^[1,2]。SET 1 的编码基因 set 1 位于染色体上,有两个开放阅读框,分别编码 20 kb 的 A 亚单位和 7 kb 的 B 亚单位^[1]。set 1 主要存在于 F2a 志贺氏菌中,在其他志贺氏血清型及 EIEC 中极为少见^[3];SET 2 的编码基因 set 2 位于毒力大质粒上, set 2 在 80% 以上的所有各型志贺氏菌及 EIEC 中广泛存在。因此,不同来源的 F2a 志贺氏菌可能存在 set 1/set 2 毒力

基因分布的多态性。根据两种毒素编码基因分布的特点,理论上可将 F2a 志贺氏菌分为 4 种基因型,即 set 1(+)set 2(+)、set 1(+)set 2(-)、set 1(-)set 2(+)、set 1(-)set 2(-)。但迄今未见 set 1/set 2 毒力基因分布多态性用于 F2a 志贺氏菌基因分型和同源性分析的报道。

根据 set 1/set 2 基因编码序列保守区设计引物,并对该引物 PCR 扩增的敏感性和特异性进行了检测,证实该引物具有高度的敏感性和特异性。用该引物对 43 株 F2a 志贺氏菌的 set 1/set 2 毒力基因进行 PCR 扩增。根据各菌株 set 1/set 2 毒力基因分布的特点,对 F2a 志贺氏菌进行了基因分型及同源性鉴定,可将 43 株 F2a 菌区分为 3 种基因型,显示了良好的分辨效能。比较传统流行病学和分子流行病学研究结果,证实本次菌痢暴发是经污染食物传播所致。但炊事员粪便分离的菌株 M9705 为 set 1(-)set 2(+),与优势菌株 set 1(+)set 2(+)明显不同,说明其不是本次事件的传染源。污染食物所含菌株为优势菌株,可能有其他来源。部分菌株的 set 1(+)set 2(-)基因型与优势菌株存在明显差异,为偶合的散发病例。本研究未检出 set 1(-)set 2(-)菌株。

志贺氏肠毒素基因多态性分析用于 F2a 菌痢基因分型和同源鉴定,为 F2a 菌痢暴发的分析提供了更丰富、更可靠的遗传信息,能更准确地揭示暴发事件的特征和本质,弥补和纠正传统流行病学分析的不足,具有重要意义,将其引入 F2a 菌同源性鉴定系统,可提高 F2a 菌痢同源性鉴定的水平,值得深入研究。

参 考 文 献

- 1 Fasano A, Noriega FR, Maneval DR, et al. Shigella enterotoxin 1 and enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. *J Clin Invest*, 1995; 95:2853-2861.
- 2 Nataro JP, Seriwatana J, Fasano H, et al. Cloning and sequencing of a new plasmid-encoded enterotoxin in enteroinvasive *E. coli* and *Shigella*. In: Proceedings of the Twenty-ninth Joint conference on Cholera and Related Diarrheal Diseases. Natl Inst Health, 1993. 144-147.
- 3 Noriega FR, Liao FM, Formal SB, et al. Prevalence of Shigella enterotoxin among Shigella clinical isolates of diverse serotypes. *J Infect Dis*, 1995; 172:1408-1410.

(收稿日期:1999-11-26)