

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2014.10.005

· 论 著 ·

## 长沙地区宋内志贺菌的耐药性及毒力基因分析

刘 兴, 李宁沙, 陈立华, 徐 丹

(长沙市第一医院, 湖南 长沙 410005)

**[摘要]** 目的 了解长沙地区宋内志贺菌对抗菌药物的敏感性以及毒力基因的携带情况。方法 采用纸片扩散法检测 30 株宋内志贺菌对氨苄西林、头孢噻肟、萘啶酸、环丙沙星、庆大霉素、复方磺胺甲噁唑 6 种抗菌药物的敏感性; 聚合酶链反应(PCR)扩增 4 种毒力基因(与志贺菌肠毒素相关的 *set1*、*sen* 基因, 以及与细菌侵袭性质粒有关的 *ial* 基因和 *ipaH* 基因)片段。结果 在测定的 6 种抗菌药物中, 耐药性最高的为氨苄西林、萘啶酸、复方磺胺甲噁唑, 耐药率均高达 100%; 而敏感性较高的为环丙沙星和庆大霉素, 敏感率分别为 93.33% 和 83.33%。30 株宋内志贺菌经 PCR 检测后, *set1*、*sen*、*ial*、*ipaH* 4 种毒力基因的携带率分别为 0、13.33%、13.33% 及 53.33%。结论 宋内志贺菌对第三代头孢菌素和磺胺类药物的耐药性已相当严重, 第三代喹诺酮类药物可作为临床治疗宋内志贺菌的首选药物。长沙地区宋内志贺菌毒力基因携带率低。

**[关键词]** 宋内志贺菌; 细菌性痢疾; 腹泻; 毒力基因; 耐药性; 抗菌药物; 抗药性; 微生物

**[中图分类号]** R516.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)10-0596-05

Antimicrobial resistance and virulence genes of *Shigella sonnei* in Changsha area

LIU Xing, LI Ning-sha, CHEN Li-hua, XU Dan (The First Hospital of Changsha, Changsha 410005, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the antimicrobial susceptibility and the carrying of virulence genes of *Shigella sonnei* (*S. sonnei*) in Changsha area. **Methods** Susceptibilities of 30 *S. sonnei* strains to 6 kinds of antimicrobial agents (ampicillin, cefotaxime, nalidixic acid, ciprofloxacin, gentamicin, compound sulfamethoxazole) were detected by disc diffusion method; 4 virulence genes (*set1*, *sen*, *ial*, *ipaH*) were amplified by polymerase chain reaction (PCR). **Results** Of all detected antimicrobial agents, ampicillin, nalidixic acid and compound sulfamethoxazole had the highest resistance rate(100%); while ciprofloxacin and gentamicin had higher susceptibility rate (93.33% and 83.33% respectively). PCR revealed that the carrying rate of *set1*, *sen*, *ial* and *ipaH* in 30 *S. sonnei* strains was 0, 13.33%, 13.33% and 53.33% respectively. **Conclusion** Resistance of *S. sonnei* to the third-generation cephalosporins and sulfonamides are quite serious, third-generation quinolones can still be used as the first choice of drug treatment for *S. sonnei* infection. Carrying rate of virulence genes are low among *S. sonnei* in Changsha area.

**[Key words]** *Shigella sonnei*; bacillary dysentery; diarrhea; virulence gene; drug resistance; antimicrobial agent; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2014, 13(10):596-600]

细菌性痢疾是由志贺菌属引起的一种急性肠道传染病, 属于我国法定的乙类传染病, 在发展中国家流行广泛, 发病率和死亡率均居感染性腹泻的首

位。伯杰手册中将志贺菌属分为 4 个血清群(种): 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

[收稿日期] 2014-06-10

[作者简介] 刘兴(1977-), 男(汉族), 湖南省资兴市人, 主管技师, 主要从事临床检验研究。

[通信作者] 刘兴 E-mail: liuxingcs@126.com

内志贺菌(*S. sonnei*)。志贺菌属的类型不断变迁,欧美地区的优势菌群为 D 群,我国多数为 B 群,其中以 1b、2a 及 3 型较多,其次为 D 群,近年来,D 群有上升趋势。本研究收集了该院近年来分离到的 D 群宋内志贺菌 30 株,对其进行了药物敏感性试验,同时还选取了与志贺菌毒力相关的 4 种毒力基因,即与志贺菌肠毒素相关的 *set1* 基因、*sen* 基因,以及与细菌侵袭性质粒有关的 *ial* 基因和 *ipaH* 基因进行聚合酶链反应(PCR)检测,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集长沙市第一医院 2012—2013 年门诊或住院患者大便中分离的宋内志贺菌,共 30 株。毒力基因 PCR 阳性对照菌株宋内志贺菌、阴性对照菌株大肠埃希菌 ATCC 25922,均由湖南省疾病预防控制中心微生物实验室友情提供。

1.1.2 药敏纸片 根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)2013 年推荐的,粪便中分离到的志贺菌药敏试验至少应选择氨苄西林、一种氟喹诺酮类、复方磺胺甲噁唑作为常规报告。故本实验共选择了包含上述 3 种药物在内的 6 种抗菌药物(氨苄西林、头孢噻肟、萘啶酸、环丙沙星、庆大霉素、复方磺胺甲噁唑)进行试验,药敏纸片均购自英国 OXOID 公司。

1.1.3 培养基及试剂 Mac 琼脂、血琼脂、API 20E 革兰阴性菌鉴定卡,均由法国生物梅里埃公司

提供;志贺菌属鉴定血清由宁波天润生物公司提供;引物以及 PCR 试剂由大连宝生物 Takara 技术有限责任公司提供;QIAxcel DAN Screening cartridge 低分辨率卡夹由 QIAGEN 公司提供,在有效期内使用。

### 1.2 方法

1.2.1 分离培养与鉴定 将临床送检的大便标本接种于选择性培养基 Mac 琼脂上,培养 1 d 后,挑选疑似菌落进一步接种至血琼脂上进行分纯培养,纯培养物最后接种至 API 20E 生化鉴定卡,按试剂说明书进行操作,同时做血清学鉴定,生化和血清学均符合宋内志贺菌的菌株用半固体琼脂保存备用。

1.2.2 药物敏感性测定 采用 K-B 纸片扩散法,参考 2013 年 CLSI 推荐的方法,以大肠埃希菌 ATCC 25922 作为药敏质控菌株,进行药敏试验。

1.2.3 志贺菌 4 种毒力基因的 PCR 本研究选取了与志贺菌毒力相关的 4 种毒力基因,分别为与志贺菌肠毒素相关的 *set1* 基因、*sen* 基因,以及与细菌侵袭性质粒有关的 *ial* 基因和 *ipaH* 基因。总反应体积为 50  $\mu$ L,0.1  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L, Premix taq 25  $\mu$ L(dNTP 各 20  $\mu$ mol,1U Taq DNA 聚合酶),模版 5  $\mu$ L;扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 50 s,56 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 结束。阳性对照为已知毒力基因阳性的志贺菌株,阴性对照为大肠埃希菌 ATCC 25922。引物序列详见表 1。

表 1 志贺菌属 4 种毒力基因的引物序列及片段大小

Table 1 Primer sequences and fragment size of 4 kinds of *Shigella* virulence genes

Genotype	Length of fragment(bp)	Forward primer(5'—3')	Reverse primer(5'—3')
<i>set1</i>	309	TCACGCTACCATCAAAGA	TATCCCCCTTTGGTGGTA
<i>sen</i>	7 990	ATGTGCCTGCTATTATTTAT	CATAATAATAAGCGGTCAGC
<i>ial</i>	3 200	CTGGATGGTATGGTGAGG	GGAGGCCAATTATTTCC
<i>ipaH</i>	4 230	TGGAAAACTCAGTGCCCTCT	CCAGTCCGTAATTCATTCT

1.2.4 PCR 产物检测 将 PCR 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,并拍照记录结果。

## 2 结果

2.1 药敏结果 经生化和血清学鉴定,共分离宋内

志贺菌 30 株。6 种抗菌药物对 30 株宋内志贺菌的药敏结果见表 2。在测定的 6 种抗菌药物中,耐药性最高的为氨苄西林、萘啶酸、复方磺胺甲噁唑,耐药率均高达 100%;而敏感性最高的为环丙沙星,敏感率为 93.33%;多重耐药情况严重。

2.2 4 种毒力基因 PCR 检测结果 30 株宋内志贺菌经 PCR 扩增后,有 14 株菌未出现任何条带,4 株菌同时含有 *sen*、*ial*、*ipaH* 3 种毒力基因,12 株菌仅含 *ipaH* 毒力基因。详见表 3~4 和图 1~4。

**表 2** 30 株宋内志贺菌对 6 种抗菌药物的药敏结果(株数,%)  
**Table 2** Antimicrobial susceptibility testing result of 30 *S. sonnei* strains to 6 kinds of antimicrobial agents (No. of isolates,%)

Antimicrobial agents	Sensitive	Intermediate	Resistant
Ampicillin	0(0.00)	0(0.00)	30(100.00)
Cefotaxime	4(13.33)	1(3.33)	25(83.33)
Nalidixic acid	0(0.00)	0(0.00)	30(100.00)
Ciprofloxacin	28(93.33)	0(0.00)	2(6.67)
Gentamicin	25(83.33)	0(0.00)	5(16.67)
Compound sulfamethoxazole	0(0.00)	0(0.00)	30(100.00)

**表 3** 志贺菌属 4 种毒力基因的 PCR 结果

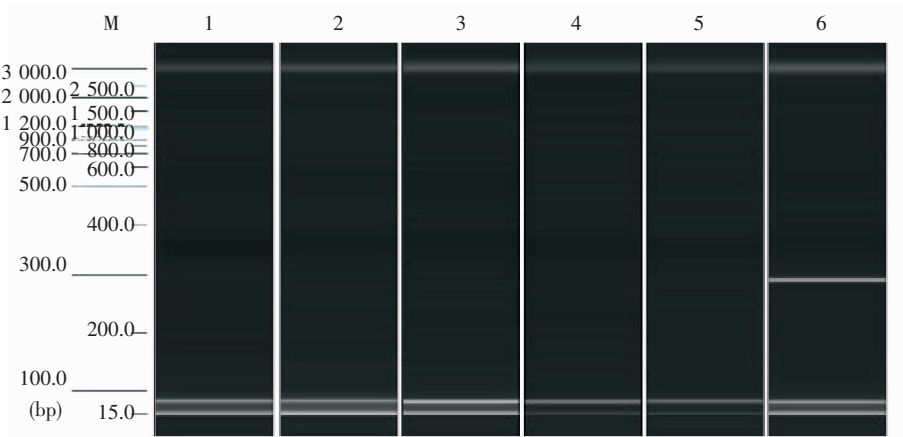
**Table 3** PCR results of 4 kinds of *Shigella* virulence genes

Genotype	Length of fragment(bp)	No. of positive band	Carriage rate(%)
<i>set1</i>	309	0	0.00
<i>sen</i>	799	4	13.33
<i>ial</i>	320	4	13.33
<i>ipaH</i>	423	16	53.33

**表 4** 30 株宋内志贺菌携带毒力基因表型

**Table 4** Phenotypes of virulence genes of 30 *S. sonnei* strains

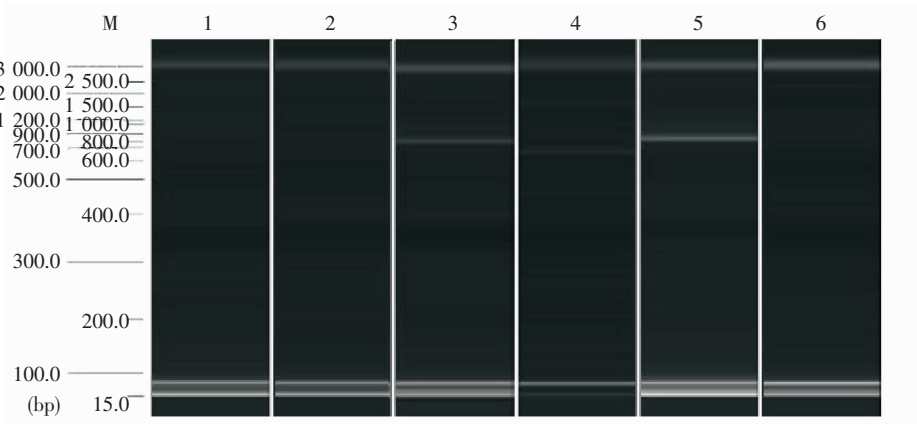
Virulence gene	No. of isolates	Constituent ratio(%)
Without carrying virulent gene	14	46.67
Carry <i>sen</i> + <i>ial</i> + <i>ipaH</i>	4	13.33
Only carry <i>ipaH</i>	12	40.00
Total	30	100.00



M:DNA marker; 1—4;*S. sonnei* strains; 5:Negative control; 6:Positive control

**图 1** *set1* 基因 PCR 产物毛细管电泳图

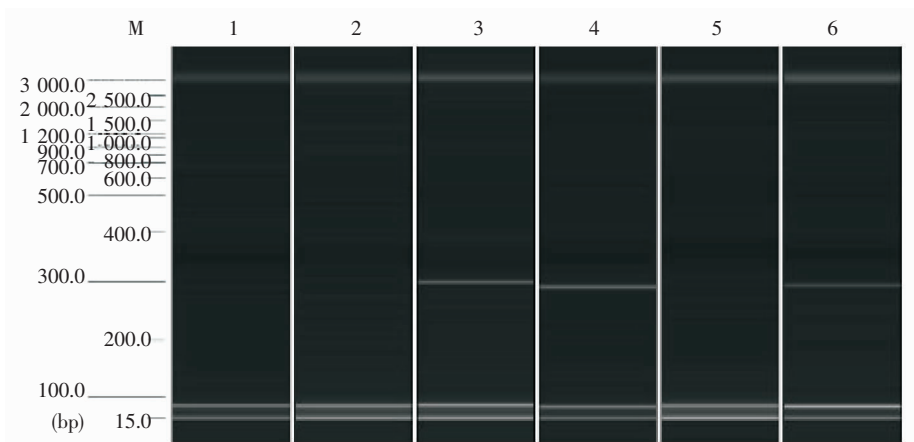
**Figure 1** PCR amplification of *set1* gene



M:DNA marker; 1—4;*S. sonnei* strains; 5:Positive control; 6:Negative control

**图 2** *sen* 基因 PCR 产物毛细管电泳图

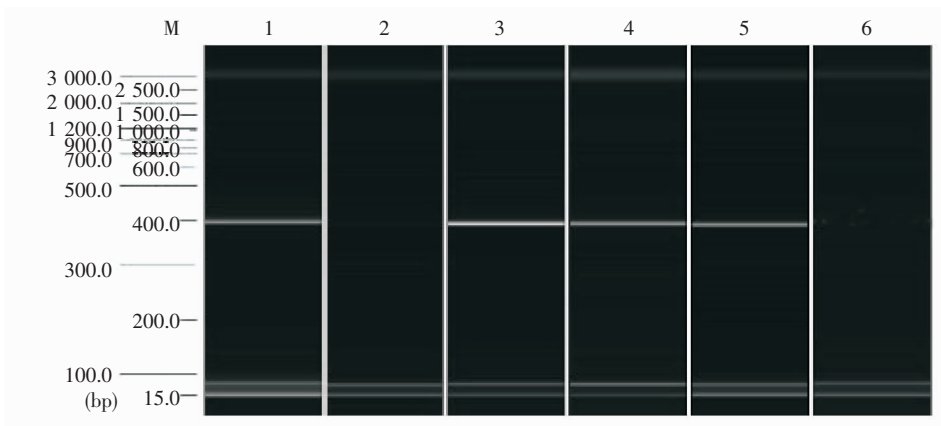
**Figure 2** PCR amplification of *sen* gene



M:DNA marker; 1—4;*S. sonnei* strains; 5:Negative control; 6:Positive control

图 3 *ial* 基因 PCR 产物电泳图

Figure 3 PCR amplification of *ial* gene



M:DNA marker; 1—4;*S. sonnei* strains; 5:Positive control; 6:Negative control

图 4 *ipaH* 基因 PCR 产物电泳图

Figure 4 PCR amplification of *ipaH* gene

### 3 讨论

细菌性痢疾发病有明显的季节性,发病高峰为夏秋季,通过粪-口途径传播,患者和带菌者均为主要传染源。A 群痢疾志贺菌引起的病情较重;B 群福氏志贺菌感染易转变为慢性;D 群宋内志贺菌多引起轻型感染,病程迁延,其抗原单一,只有 1 个血清型,是唯一具有鸟氨酸脱羧酶的一群志贺菌。在各群志贺菌中,以宋内志贺菌抵抗力最强。在污染物品及瓜果、蔬菜上,志贺菌可存活 10~20 d;在适宜的温度下,可在水及食品中繁殖,引起水源或食物型的暴发流行。

治疗细菌性痢疾,一般首选氟喹诺酮类药物。由于磺胺及其他抗菌药物的广泛应用,志贺菌属的

多重耐药性问题日趋严重,目前多数临床分离的志贺菌菌株具有多重耐药性<sup>[1]</sup>,给临床治疗带来一定困难。最近的研究<sup>[1]</sup>表明,用第三代头孢菌素治疗细菌性痢疾效果良好,本次我们也分别选取了喹诺酮类、磺胺类以及第三代头孢类抗生素对菌株进行药敏试验,结果显示,长沙地区宋内志贺菌的耐药形式及其严峻,仅有第三代喹诺酮类药物环丙沙星以及氨基糖苷类药物庆大霉素的敏感性较高,敏感率分别为 93.33% 和 83.33%;所有 30 株宋内志贺菌对青霉素类抗生素氨苄西林、第一代喹诺酮类抗生素萘啶酸以及磺胺类药物复方磺胺甲噁唑的耐药率为 100%,即使是第三代头孢类药物头孢噻肟,其耐药率也高达 83.33%。有文献报道<sup>[2-4]</sup>,对萘啶酸耐药的宋内志贺菌对氟喹诺酮类药物敏感性降低,其耐药机制主要为 *gyrA* 发生了 83 位 Ser→Leu 替

换;而宋内志贺菌对头孢菌素的耐药性快速增长,则与其产生超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)及 AmpC 酶有关。宋内志贺菌的耐药基因主要包括 CTX、TEM、CMY 等,但其多重耐药现象普遍存在,且在我国不同地区间传播;在志贺菌中广泛存在的整合子参与了多重耐药的形成。提示我们必须提高警惕,进一步加强对耐药性的监测和耐药机制的深入研究。

志贺菌属的致病性主要为内毒素局部作用于肠壁引起通透性增加和黏膜炎症、溃疡;作用于全身,引起内毒素血症;外毒素与内毒素协同作用,加重局部和全身症状;以及内毒素和外毒素协同作用,进一步产生神经毒性、细胞毒性和肠毒性。

本次研究我们选取了 4 种毒力基因,其中 *set1* 基因编码志贺菌肠毒素 1,是由染色体编码调节的复合型蛋白;*sen* 基因位于致病性大质粒上,编码志贺菌肠毒素 2,是一种单体型蛋白;*ial* 基因位于侵袭性大质粒上,对细菌的增殖和侵袭性起调节作用;而 *ipaH* 基因则编码侵袭性质粒的 H 抗原,在质粒和染色体上存在多个拷贝。PCR 结果显示,*set1*、*sen*、*ial*、*ipaH* 4 种毒力基因的携带率分别为 0、13.33%、13.33%、53.33%,这一结果与我国其他地区的宋内志贺菌的毒力基因携带率不尽相同<sup>[5-6]</sup>,表明各地仍有各自的流行特征,毒力基因可以发生丢失和变迁。本次我们用常规 PCR 分别对 4 对毒力基因进行扩增;国外 Thong 等<sup>[7]</sup>针对志贺菌的 *set*、*ial*、*ipaH* 基因,利用多重 PCR 方法在同一反应体系内同时扩增,特异性和重复性也很好。后续我们也可以考虑针对包括 *sen* 基因在内的 4 种毒力基因设计多重 PCR 方法,这样能给临床提供更快速的诊断依据,并且在做更多基因靶点时优势也更突出。特别应引起我们注意的是,本组有 4 株宋内志贺菌

同时含有 *sen*、*ial* 和 *ipaH* 基因。有研究<sup>[8]</sup>指出,同时携带这 3 种毒力基因的志贺菌致病力强,呈多重耐药性,会引起细菌性痢疾疫情的暴发流行。30 株宋内志贺菌中,有 12 株仅含有 *ipaH* 基因,14 株不含任何以上 4 种毒力基因,表明长沙地区的宋内志贺菌毒力基因的携带率不是很高,而此类志贺菌的致病性和毒力不强,感染可能以轻型或迁延型为主。

#### [参 考 文 献]

- [1] 张娜,程玉谦,梁帆. 临床诊断成人细菌性痢疾 414 例的流行病学、临床及病原学特征[J]. 中国感染控制杂志,2012,11(1):29-31.
- [2] 曲芬,毛远丽. 宋内志贺菌流行新趋势和耐药新特点[J]. 传染病信息,2013,26(1):17-20.
- [3] 范建中,蒋琰,陈衍,等. 宋内志贺菌对氟喹诺酮类药物敏感性降低的相关耐药基因研究[J]. 中华传染病杂志,2012,30(2):67-70.
- [4] 徐婷,黄一灵,李耘,等. 六家医院整合子介导宋内志贺菌多重耐药的形成和传播机制研究[J]. 中华临床感染病杂志,2013,6(3):138-143.
- [5] 丁水军,孙永祥,傅丹青,等. 宋内志贺菌毒力基因检测与脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(18):3518-3520.
- [6] 刘桂荣,曲梅,张新,等. 北京地区宋内志贺菌分子流行病学特征分析[J]. 中国热带医学,2013,13(8):950-952.
- [7] Thong K L, Hoe S L, Puthuchery S D, et al. Detection of virulence genes in Malaysian Shigella species by multiplex PCR assay[J]. BMC Infect Dis, 2005, 5(1):8.
- [8] 贾肇一,马洪生,苏明,等. 一起宋内志贺菌暴发的病原学鉴定及其药敏和毒力基因检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15):3062-3064.

(本文编辑:任旭芝)