

文章编号:1002-2694(2012)03-0252-04

宁夏志贺菌病原学特征分析^{*}

郭邦成¹, 刘翔¹, 郝琼¹, 闫立群¹, 谢明英¹, 景怀琦², 王鑫², 梁俊容²

摘要:目的 探讨宁夏地区志贺菌菌群分布、药物敏感性情况,并通过同源性分析研究其分子流行病学特征,为菌痢防控提供依据。**方法** 通过系统生化条(API20E)鉴别菌株,用血清玻片凝集鉴定菌型,采用K-B法检测分离菌株对10种常用抗生素的敏感性,并应用脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)进行分子分型,所得结果用BioNumericsV4·0软件UPGMA方法进行聚类分析。**结果** 176株志贺菌中,福氏志贺菌112株,占63.64%,其中福氏2b型52株,占29.55%;宋内志贺氏菌64株,占36.36%。药敏试验显示耐药率最高的药物为氨苄西林、萘啶酸、四环素、利福平;其次为阿莫西林、复方新诺明;而敏感性最高药物依次为环丙沙星(CIP)、头孢噻肟和头孢噻吩,其中福氏志贺菌和宋内志贺菌对10种抗生素的耐药谱略有不同;112株福氏志贺菌共分为36个带型,其中,JZXN11, NX06, JZXN11, NX07, JZXN11, NX021, JZXN11, NX0025占所有分型菌株的57.14%,为我省主要的暴发型。64株宋内志贺菌分为21个带型,J16X01, NX0011和J16X01, NX0012为两个主要流行带型,分别占分型菌株的31.25%和15.63%。**结论** 本省志贺菌流行以福氏为主,其中F2b为优势菌型,F4c和宋内氏菌检出率显著增高;志贺菌对氨苄西林(AMP)、四环素(Te)、阿莫西林(AML)和萘啶酸耐药率最高,多重耐药现象严重;PFGE型别呈现多元化流行特点,流行的优势带型减弱、多种型别并存的复杂形态。

关键词:脉冲场凝胶电泳(PFGE);志贺氏菌;药敏分析**中图分类号:**R378.2 **文献标识码:**A

Pathogenic characterization of *Shigella* isolated from Ningxia

GUO Bang-cheng¹, LIU Xiang¹, HAO Qiong¹, YAN Li-qun¹, XIE Ming-ying¹
JING Huai-qi², WANG Xin², LIANG Jun-rong²(1. Ningxia Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750004, China;
2. China Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

ABSTRACT: The objective of the present study was to investigate the distribution and drug susceptibility of *Shigella* bacteria in Ningxia, and provide the basis for prevention and control of bacillary dysentery through homology analysis of molecular epidemiology. Biochemistry of API20E system was used to identify strains, and the bacteria categories were tested by slide agglutination with a serum. The sensitivity of strain to 10 commonly used antibiotics was detected with Kirby-Bauer assay, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for molecular typing. The results were analysed by BioNumerics V4.0 and UPGMA method. Among the 176 *Shigella*, there were 64 *Shigella sonnet* (36.36%) and 112 *Shigella flexneri* (63.64%) which containing 52 *Shigella flexneri* 2b (29.55%). Results showed that drugs with higher resistance rate were ampicillin, nalidixic acid, tetracycline and rifampin, following by amoxicillin and cotrimoxazole. The most sensitive drugs were ciprofloxacin (CIP), cefotaxime and cephalothin; the test also showed that *Shigella flexneri* and *Shigella sonnet* had slight difference in resistance spectrum to 10 antibiotics. The 112 *Shigella flexneri* were divided into 36 banding patterns, in which JZXN11, NX06, JZXN11, NX07, JZXN11, NX021, JZXN11 and NX0025, accounting for 57.14%, were the main outbreak types in Ningxia. The 64 *Shigella sonnet* were divided into 21 banding patterns, in which J16X01, NX0011 and J16X01, NX0012 were the 2 epidemic banding patterns, accounting for 31.25% and 15.63% respectively. It indicates that in Ningxia, the most popular *Shigella* bacteria is *Shigella flexneri*, and F2b is the dominant serotype. The detection rate of F4c and *Shigella sonnet* have decreased significantly. The drug resistance rate of *Shigella* to ampicillin (AMP), tetracycline (Te) and amoxicillin (AML) are the highest, and the situation of multi-drug resistance is serious. The PFGE have type presented a diverse epidemic pattern. The advantaged bands are less popular than before and there is coexistence for various types.

* 国家“十一五”传染病科技重大专项实验室监测技术平台项目
(2009zx10004203)

通讯作者:景怀琦,Email:jinghuaiqi@icdc.cn

作者单位:1. 宁夏疾病预防控制中心,银川 750004;

2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京
102206

KEY WORDS: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE); *Shigella*; sensitivity analysis

志贺菌是引起夏秋季急性腹泻的主要病原菌之一,它在自然界中分布广泛,对人的感染剂量甚小,致病性高,危害大且菌型复杂。据研究报道,志贺菌近年来的流行菌型不断变迁,随着临幊上抗生素的广泛使用,其耐药性也日益严重^[1]。因此,研究志贺菌群的分布趋势及耐药性,对探索其流行规律、控制发病具有重要的意义。我们对宁夏地区近年来从腹泻病人中分离到的志贺菌菌株进行血清凝集、耐药性分析和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型研究,以了解本省志贺菌的菌群分布、耐药性现状及分子分型特征和遗传变异关系,为痢疾的防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集2002—2010年银川、中卫、海原等地食物中毒病例及腹泻病例粪便中分离的176株志贺菌。

1.2 试剂和仪器 分离用的SS、MacC、克氏双糖购自路桥生物有限公司;API20E鉴定条购自梅里埃生物公司;志贺氏菌诊断血清购自上海天润有限公司;药敏纸片购自BD公司;质控菌株选用金黄色葡萄球菌ATCC25923、大肠杆菌ATCC25922由国家疾控中心提供。

限制性内切酶Xba I、Not I购自大连宝生物

工程有限公司TaKaRa产品;琼脂糖SeaKem Gold Agarose购自Cambrex Bio Science Rockland;蛋白酶K(MERCK公司产品);脉冲场凝胶电泳仪为Bio-Rad CHEF-DR III系统和Bio-Rad CHEF-Mapper系统;凝胶成像仪Bio-Rad Gel Doc 2000系统;细菌浊度仪bioMérieux Vitek colorimeter;其他仪器包括恒温水浴箱、离心机等。

1.3 细菌鉴定和药敏试验 细菌培养根据临幊检验操作规程,按常规方法进行,纯培养后再进行生化及血清学鉴定。药敏试验采用纸片扩散法(K-B法),按美国国家临幊实验室标准化委员会(NCCLS)2001操作及判断结果,并以标准菌株作为质控。

1.4 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析 参照美国CDCPulseNet USA的统一方法^[6]。

2 结果

2.1 菌型分布结果 分离的176株菌经API20E生化条鉴定为志贺氏菌,再用4种志贺氏菌诊断血清进一步确证,最后用群、型血清进行分型。经鉴定B群福氏志贺氏菌112株(63.64%),D群宋内氏志贺氏菌64株(36.36%),而志贺氏菌中的A、C群未查见(表1)。

表1 76株志贺氏菌菌群和亚型分布情况

Tab. 1 The distribution on flora and subtypes of 176 *Shigella*

A	B						C	D	Total
	1a	2a	2b	4c	II	IV			
No. of stains	0	2	12	52	32	2	5	3	2
Proportion	0	1.14	6.82	29.55	18.18	1.14	2.84	1.70	1.14

2.2 药物敏感性试验结果 176株分离菌株进行药物敏感性试验,结果显示,福氏志贺菌对氨苄西林(AMP)、四环素(Te)、阿莫西林(AML)、复方新诺明(SXT)耐药率较高,分别为100%、100%、100%、85.38%,对头孢噻吩(KF)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(CN)和头孢噻肟(CTX)较为敏感;宋内志贺菌对四环素(Te)、奈啶酸(NA)、复方新诺明(SXT)、利福平(RD)耐药性均为100%,对头孢噻吩(KF)、环丙沙星(CIP)和头孢噻肟(CTX)最为敏感(表2);所有菌株都具有较高的多重耐药现象,均出现4种及4种以上的耐药(表3)。

2.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE)结果

2.3.1 福氏志贺菌PFGE结果 分离的112株福

表2 不同菌型志贺菌的耐药率

Tab. 2 Resistance rates of different types of *Shigella*

Drug name	<i>Shigella</i>		<i>Shigella sonnei</i>	
	F2b	F4c	others	
AMP	100	100	100	55.56
KF	53.84	15.79	0	3.70
Te	100	100	100	100
NA	100	0	0	100
CIP	0	42.11	33.33	0
AML	100	100	100	59.26
CN	3.85	0	0	59.26
SXT	100	89.47	66.67	100
CTX	46.15	0	0	0
RD	100	84.21	0	100

表 3 福氏与宋内志贺菌多重耐药性的比较

Tab. 3 Comparison on multi-drug resistance of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei*

Resistance type	<i>Shigella</i>		<i>Shigella sonnei</i>	
	No. of strain	Proportion	No. of strain	Proportion
3	0	0	0	0
4	0	0	25	39.06
5	22	19.64	0	0
6	45	40.91	2	3.08
7	26	23.64	35	53.85
8	17	15.45	2	3.08
9	2	1.82	0	0
Total	112	100	64	100

氏志贺菌及 H9812 经 *Not I* 内切酶酶切后进行 PFGE 分型，并将 PFGE 条带采用 BioNumerics4.0 软件进行聚类分析，见图 1。结果显示，所有试验菌株 PFGE 带型相似系数在 60.19%~96.18% 之间，带型之间存在任何差异的分为不同型别，共分成 36 种带型，JZGN11.NX06、JZGN11.NX07、JZGN11.NX021、JZGN11.NX025 为主要型别，占所有分型菌株的 (64/112) 57.14%，这 4 个克隆系遗传距离亲缘关系较近，带型的聚类相似性为 80%，除这 4 个克隆系的菌株以外，其他带型的菌株分布比较散在，而且数量较少。

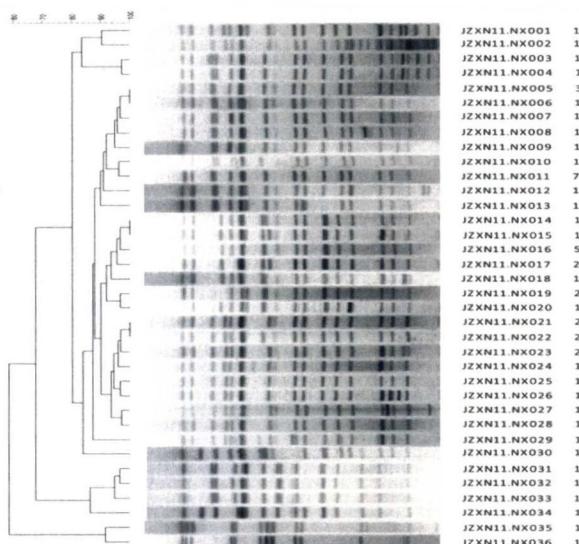


图 1 福氏志贺菌 PFGE 分型图谱

Fig. 1 Cluster analysis map of the *Shigella*'s PFGE pattern

2.3.2 宋内志贺菌 PFGE 分型结果 64 株宋内志贺菌经 *Xba*I 内切酶酶切后进行 PFGE 分型，并将 PFGE 条带采用 BioNumerics 4.0 软件进行聚类分析，见图 2。结果显示，所有试验菌株 PFGE 带型相

似系数在 64%~99% 之间，带型之间存在任何差异的分为不同型别，共分成 21 种带型，J16X01.NX001 和 J16X01.NX002 聚类相似性为 94%，属于同一个克隆系，涵盖菌株占实验菌株的 46.88%，为两个主要流行带型。

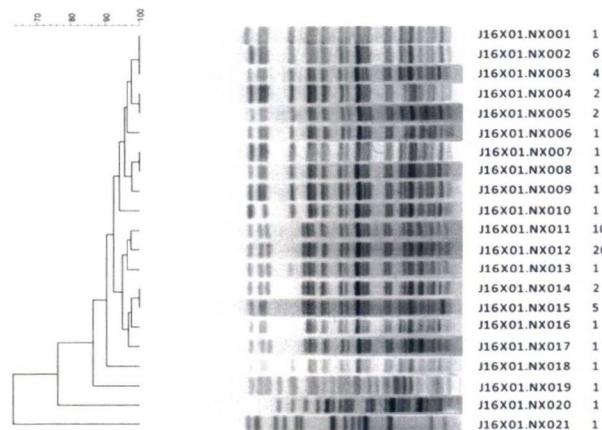


图 2 宋内氏志贺菌 PFGE 分型图谱

Fig. 2 Cluster analysis map of the *Shigella sonnei* PFGE pattern

3 讨 论

据国内外研究报道，志贺菌流行趋势在发达国家主要以宋内志贺菌为主，发展中国家以福氏志贺菌为主^[2]。2005 年全国志贺菌监测数据显示，我国各省市分离到的志贺菌大部分属于 B 群，即福氏志贺菌，但宋内氏志贺菌的分离率呈现迅速上升态势^[3]。我们对本省 2002—2010 年 176 株志贺氏菌的菌型分布情况进行分析，菌型以福氏志贺菌为主，占 63.64%，其次为宋内志贺氏菌，占 36.36%，B 群福氏志贺菌以 F2b 和 F4c 亚型血清型为主，分别占 29.55% 和 18.18%，这与我国菌痢的优势菌型为福氏志贺菌 2a 不相符^[4]，A 群和 C 群未检出。上世纪 80 年代，该省志贺菌主要以 F2b 为主，F4c 和宋内志贺菌未查见。本次研究表明，目前我省菌群比例正在发生显著的变化，菌痢呈现多元化流行特点，流行菌型优势减弱、多种亚型并存的复杂形态。因此，及时分析志贺菌菌型分布，掌握流行菌型变迁，可为更好的有针对性的对志贺菌采取防控措施提供科学依据。

据报道，由于临幊上常用的氨苄西林、复方新诺明、四环素等抗生素抗性增长较快，多重耐药情况普遍存在^[5]。本研究显示：宁夏主要流行菌型 (F2b、F4c、宋内志贺菌) 之间的耐药谱存在较大的差异，福氏 F2b 和 F4c 对氨苄西林 (AMP)、四环素 (Te)、阿莫西林 (AML) 产生 100% 的耐药性，其中 F2b —

直做为该地区的主要流行菌型,对十种抗生素均具有较高的耐药性,仅对庆大霉素(CN)较为敏感(3.85%),F4c为近年来的新发菌型,对多数抗生素还较为敏感;宋内志贺菌对四环素(Te)、奈啶酸(NA)、复方新诺明(SXT)耐药性最为严重,均达到100%,对头孢噻吩(KF)、环丙沙星(CIP)、头孢噻肟(CTX)最为敏感,分别为3.70%、0.0%;所有分离菌株均存在4种或4种以上的多重耐药现象。因此,宁夏分离菌株不同血清型的耐药谱具有一定差异,同一血清型不同亚型之间的耐药性亦存在着较大的差异,而且志贺菌多重耐药现象已较为严重,应当引起我们的高度重视。对于痢疾患者的治疗,首先应进行分离培养、血清分型和药物敏感性试验,从而具有针对性的使用抗生素,不能单凭临床经验用药。

PFGE分型技术被认为是分子生物分型的金标准。细菌全基因组DNA应用稀有酶切位点限制性内切酶切割后,经PFGE进行分型,建立细菌菌株PFGE指纹资料库,通过Internet网络在各实验室之间进行DNA图谱的快速传递及比对、分析,以及时确定不同地区、不同来源的菌株的遗传关系,进而确定传染源、流行范围等^[6-7]。本文对分离鉴定的176株志贺菌用BioNumericsV4.0软件进行聚类分析,按照80%的相似度将福氏志贺菌株分为36个型,其中JZXN11.NX06、JZXN11.NX07、JZXN11.NX021、JZXN11.NX0025为4个主要的带型,占分型菌株的57.14%,各型之间的同源性在60.19%~96.18%之间,因此,PFGE分型结果表明,众多基因型的出现,在一定程度上说明宁夏志贺菌的变异度比较大且呈现多样性。尽管福氏志贺菌具有共同的

血清群,但同一群内不同亚型之间的同源性较低,不同地区分离菌株的同一血清亚型之间存在较高的同源性;所有宋内氏志贺菌分为21个PFGE基因型,虽然菌株不是太多,但带型较多,大部分属于来源高度相似的克隆系。

通过对宁夏志贺菌的耐药性分析及PFGE分型,初步了解该省志贺菌的耐药状况及PFGE分型的优势菌型,对宁夏痢疾的防控具有指导性作用。总之,本实验首次利用分子分型技术对宁夏志贺菌进行了系统的分析,发现宁夏省志贺菌株具有多样性和聚集性的特点,首次建立了宁夏志贺菌PFGE数据库,为本省志贺菌的日常监测和相关疫情的处理建立了良好的基础。

参考文献:

- [1]钱慧敏,庄菱,董晨,等.江苏省2008—2009年志贺菌菌型分布及耐药性分析[J].江苏预防医学,2010,21(4):16-17.
- [2]Peng J, Yang J, Jin Q. The molecular evolutionary history of *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* [J]. Infect Genet Evol, 2009,9(1):147-152.
- [3]马宏,王建丽,黄丽莉,等.伤寒沙门菌PFGE基因分型研究[J].医药论坛杂志,2006,10(27):22-23.
- [4]黄长敏,徐文杰,李艳,等.志贺菌菌型调查及耐药谱R质粒检测[J].中国卫生检验杂志,2007,7(7):28-33.
- [5]陈小丽.183株志贺菌的菌群分布及药敏分析[J].中国微生态学杂志,2006,18(4):45-48.
- [6]易旭,夏胜利,张锦,等.2007年中国四省福氏志贺菌分离菌株的毒力基因检测和PFGE分析[J].中国人兽共患病学报,2010,26(8):77-79.
- [7]苏文莉,王勇,张玲,等.弗氏志贺菌4c和2a型菌株的脉冲场凝胶电泳分型特征[J].生物技术通讯,2009,20(2):155-157.

收稿日期:2011-11-11;修回日期:2012-01-11

·本刊动态·

我刊主办的美国《Emerging Infectious Diseases》有关人兽共患病论文摘译继续刊登在改版后的美国疾病预防控制中心网站(www.cdc.gov)。

《Emerging Infectious Diseases》是一个影响比较大的国际刊物,除英文外,有三种语言的译文:中文、法文和西班牙文。该网页上都明确标明中文译文由我刊独家提供并刊登译者姓名。2000年起,本刊将每期美国原版刊物《Emerging Infectious Diseases》有关人兽共患病领域论文摘译为中文。12年来,这个栏目始终非常活跃和富有生命力,提高了《中国人兽共患病学报》的知名度和国际影响力。