

深圳市菌痢流行分子特征与对质粒介导的喹诺酮耐药机制

蔡长争¹ 舒少为¹ 陈爱平² 黄国清¹ 周美容¹

【摘要】目的 分析深圳市菌痢流行分子特征及对质粒介导的喹诺酮耐药机制。**方法** 对2010年1月至2014年2月深圳市18家医院收集的临床标本进行分离培养与血清型鉴定, 采用PCR方法检测质粒介导喹诺酮耐药基因, 采用琼脂倍比稀释法检测最低抑菌浓度(MIC), 采用接合转移实验分析接合子类型与耐药性。**结果** 血清学分布: 126株志贺菌中, 福氏志贺菌108株(87.51%), 宋氏志贺菌16株(12.70%), 福氏志贺菌优势血清型为IV C血清型42株(38.89%); 常用抗菌药物药敏情况分析: 福氏志贺菌对萘啶酸(NAL)、头孢吡肟(FEP)、庆大霉素(GM)敏感性低于宋氏志贺菌, 左氧氟沙星(LEV)、环丙沙星(GIP)、诺氟沙星(NOR)、头孢他啶(CAZ)、阿莫西林(AMC)敏感性高于宋氏志贺菌, 差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01); 扩增结果与序列分析: 126株志贺菌中检出3株qnr基因(2.38%), 4株aac6'基因(3.17%), 1株qepA基因(0.78%); 最低抑菌浓度分析: 与受体菌比较, 接合子对萘啶酸、环丙沙星、左氧氟沙星、诺氟沙星、庆大霉素5种抗菌药物最低抑菌浓度提高2~32倍。**结论** 深圳市志贺菌感染类型以福氏志贺菌与宋氏志贺菌为主, 其中福氏志贺菌优势血清型为IV C血清型株; 靶基因突变是导致喹诺酮类药物耐药的主要原因, 不同类型志贺菌对喹诺酮类药物耐药性差异性较大。

【关键词】 细菌性痢疾; 志贺菌; 质粒介导; 喹诺酮类; 耐药

The molecular characteristics of bacillary dysentery epidemic and the antibiotic resistance mechanisms of plasmid mediated quinolones in Shenzhen Cai Changzheng¹, Shu Shaowei¹, Chen Aiping², Huang Guoqing¹, Zhou Meirong¹. ¹Department of Clinical Laboratory; ²Department of Gynaecology, Shenzhen Longhua New District Central Hospital, Shenzhen 518110, China

Corresponding author: Cai Changzheng, Email: ccz_118@126.com

【Abstract】Objective To analyze the molecular characteristics of bacillary dysentery epidemic and the antibiotic resistance mechanisms of plasmid mediated quinolones in Shenzhen. **Methods** Clinical specimens were collected in 18 hospitals in Shenzhen from January 2010 to February 2014 and isolation cultivation and serotype identification were applied. The plasmid mediated main type of quinolones genes were detected by PCR. Minimal inhibitory concentration (MIC) was tested by Agar dilution method. Transconjugants genotype and drug resistance were tested by joint transfer experiment. **Results** Serological distribution: during all 126 strains of *Shigella*, there were 108 (87.51%) strains of *Shigella flexneri* and 16 (12.70%) strains of *Shigella sonnei*. The superiority serotype of shigella flexneri was serum IV-C, with 42 strains counted for 38.89%. Commonly used antimicrobial susceptibility situation analysis: the sensitivity of *Shigella flexneri* to NAL, FEP and GM were significantly lower than that of *Shigella sonnei*, while the sensitivity of *Shigella flexneri* to LEV, GIP, NOR, CAZ and AMC were significantly higher than that of *Shigella sonnei* (P all < 0.05). Amplification results and sequence analysis: 3 (2.38%) cases with qnr genes, 4 cases with aac6' genes, and 1 case with qepA genes were checked out in 126 strains *Shigella*. Minimum inhibitory concentration: compared with receptor

bacteria, the MIC of transconjugants on NAL, GIP, LEV, NOR, GM were improved by 2-32 times.

Conclusions The main types of *Shigella* infection in Shenzhen are *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei*. The superiority serotype of shigella flexneri is IV-C. Target gene mutation is the main cause of quinolones resistance. The quinolones resistance of different types of shigella varies significantly.

【Key words】 Bacillary dysentery; *Shigella*; Plasmid mediated; Quinolones; Drug-resistance

细菌性痢疾为全球最严重的肠道感染性疾病之一,全球每年近1.65亿例患者,且主要为5岁以下儿童。临床主要表现为腹痛、腹泻与黏液脓血病,常伴有发热与全身中毒症状^[1]。志贺菌是细菌性痢疾病原菌,其侵袭力与毒力因子的强弱决定其致病性。宋氏志贺菌引起感染多为轻型,福氏志贺菌感染多会转为慢性。喹诺酮类药物作为治疗志贺菌感染的首选药物,也是临床使用最广泛的抗菌药物之一,随之而来的即细菌耐药性迅速增加^[2]。从质粒介导喹诺酮耐药机制分析,主要有质粒上qnr基因、外排泵基因qepA、质粒携带的氨基糖苷乙酰转移酶变异基因aac(6')^[3]。本研究对2012年5月至2014年5月深圳市不同医院收集腹泻患者粪便标本分离的126株志贺菌进行检测,采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)方法检测质粒介导喹诺酮耐药基因qnr、qepA和aac(6'),以分析深圳市志贺菌流行分子特征以及对质粒介导的喹诺酮耐药机制,报道如下。

资料与方法

一、材料

1. 菌株:收集深圳市18家医院2010年1月至2014年2月临床标本中分离的126株志贺菌属菌株。鉴定采用MicroScan Walk A Way-40全自动微生物分析仪,质控菌株大肠埃希菌ATCC25922购自深圳市临床检验中心。接合实验大肠埃希菌J53Az、aac(6')、qepA、Qnr基因阳性对照株由深圳市临床检验中心保存。

2. 仪器:电热恒温培养箱购自上海精宏公司;细胞鉴定、药敏检测和分析系统为法国生物梅时埃公司API、ATB和VITEK-2系统;药敏分析采用WHONET 5.0专用分析软件;低温离心机购自德车Hettich公司;电子天平购自上海天能科技有限公司,细菌比浊仪器购自英国Oxiod公司;脉冲场电泳仪为美国BIO-RAD公司(CHEF-Mapper);电聚焦电泳仪为美国Pharmacia公司Phastsystem型;

凝胶成像系统为上海天龙公司Tanon GIS-2000型。

3. 试剂:麦康凯琼脂、SS琼脂购自杭州天和生物试剂有限公司;哥伦比亚琼脂、MH琼脂购自美国Oxiod公司;志贺菌诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司;萘啶酸购自美国Sigma公司;左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、阿莫西林和庆大霉素均购自中国药品生物制品鉴定所。

二、方法

1. 菌株分离与鉴定:采集患者黏液脓血便标本,划线接种于SS和麦康凯(MAC)琼脂平板上,置普通孵箱,经37℃培养24 h后,挑选无色半透明可疑菌落,接转种于克氏双糖铁培养基、动力-吲哚-脲酶培养基,35℃培养24 h,符合志贺菌基本特性者进一步做生化鉴定与血清学凝集。

2. 抗菌药物敏感性试验:采用琼脂倍比稀释法检测最低抑菌浓度(MIC),根据临床实验室标准化研究所(CLSI)2009版标准^[4]进行操作与判断结果。

3. 细菌DNA模板制备:通过煮沸法提取细菌DNA,筛选麦康凯平板培养志贺菌菌落2~3个,加入无菌双蒸水200 μl,煮沸10 min后迅速冷却,3 000 r/min离心15 min,取上清液保存于-20℃。

4. 引物序列:参见刘艳艳等^[5]、Cavaco等^[6]文献资料设计引物,采用Primer Premier 5.0软件设计aac(6')、qepA、Qnr B4和Qnr A全长,由上海生工生物工程有限公司合成。

5. PCR扩增序列分析:PCR反应条件详见表1。采用琼脂糖凝胶作电泳检测:准确量取0.5% TBE、50 ml,加入0.5 g琼脂糖粉,摇匀到悬浊液,沸水浴30 min,完全溶解后冷却至60℃,加入0.1%溴化乙锭溶液至0.5 mg/ml,倒入制胶模具中,30~60 min凝胶完全凝固,放入0.5 TBE电泳槽中,吸取5 μl PCR反应产物,于100 V电泳30 min,采用凝胶成像系统(Tanon GIS-2020)观察结果。

PCR产物测序与分析:所有PCR扩增阳性产物均由上海鼎安生物科技有限公司测序,测序结果通过BLAST程序与GenBank志贺标准菌进行比对分析。

6. 接合转移实验与质粒提取: 参照周雪等^[7]、Arvelo等^[8]文献资料, 以大肠埃希菌J53Az为接合实验受体菌, 对PCR阳性菌株进行接合实验, S12 Aac (6')、S21 qnpA、S69 qnr为临床株, 选择性平板为LB琼脂平板(叠氮钠200 mg/L+氨苄西林32 mg/L), 接合子为LB琼脂平板上生长小菌落, 连续传代3次。采用琼脂稀释法测定6种喹诺酮类药物最低抑菌浓度(MIC)。扩增产物作DNA测序分析。

三、统计学处理

采用SPSS 16.0软件对数据进行统计学分析, 志贺菌血清学分布、宋氏志贺菌与福氏志贺菌对常用抗菌药物药敏情况等计数资料用频数(n)或率(%)表示, 采用卡方检验, 最低抑菌浓度等计量资料均用均值表示, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、126株志贺菌血清学分布分析

126株志贺菌中, 福氏志贺菌108株, 占85.71%, 其中I A血清型8株(7.41%), I B血清

型3株(2.78%), 1 8 II A血清型株(16.67%), II B血清型16株(14.81%), IV A血清型11株(10.19%), IV B血清型8株(7.41%), IVC血清型42株(38.89%), X血清型2株(1.85%)。宋氏志贺菌16株, 占12.70%, 鲍氏志贺菌2株, 占1.59%。

二、宋氏志贺菌与福氏志贺菌对常用抗菌药物药敏情况

由于本研究中仅分享1株鲍氏志贺菌, 因此仅对宋氏志贺菌与福氏志贺菌药敏情况进行比较研究。结果表明, 10种常用抗菌药物中, 福氏志贺菌对萘啶酸、头孢吡肟、庆大霉素敏感性均低于宋氏志贺菌, 左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、头孢他啶、阿莫西林敏感性均高于宋氏志贺菌, 差异具有统计学意义($P < 0.05$ 、 < 0.01); 宁氏志贺菌与福氏志贺菌对亚胺培南敏感性均为100.00%, 见表2。

三、PMQR相关基因扩增结果与序列分析

126株志贺菌中, 通过PCR扩增, 检出3株qnr基因, 检出率为2.38%, 其中1株携带qnrB4基因, 2株携带qnrS2基因, 未检出qnrA, 检出4株aac6'

表1 志贺菌质粒介导喹诺酮类耐药基因引物序列

引物名称	引物序列	退火温度(℃)	延伸时间(s)	产物长度(bp)
aac (6')	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGG R: CTCGAATGGCCTGGCGTGTTC	55	60	580
qepA	F: CGTGTGCTGGAGTTCTTC R: CTGCAGGTACTGCGTCAIG	55	60	405
Qnr B4	F: ATCACCACCCGCACCT R: TCTAAATCGCCCAGTTCC	50	60	242
Qnr A	F: TCGGCAAAGGTCAGGTCACAGC R: GCAAGAGGATTCTCACGCCAGGAT	48	60	480

表2 宋氏志贺菌与福氏志贺菌对常用抗菌药物药敏情况

抗菌药物	福氏志贺菌 (n=108)		宋氏志贺菌 (n=16)		χ^2 值	P值
	敏感株数	敏感率(%)	敏感株数	敏感率(%)		
萘啶酸	13	12.04	7	43.75	10.361	< 0.01
左氧氟沙星	108	100.00	11	68.75	35.168	< 0.01
环丙沙星	97	89.81	7	43.75	21.859	< 0.01
诺氟沙星	108	100.00	7	43.75	65.504	< 0.01
氧氟沙星	107	99.07	7	43.75	57.528	< 0.01
头孢他啶	104	96.30	6	37.50	42.409	< 0.01
头孢吡肟	13	12.04	8	50.00	11.706	< 0.01
亚胺培南	108	100.00	16	100.00	—	—
阿莫西林	108	100.00	14	87.50	6.975	< 0.05
庆大霉素	6	5.56	12	75.00	48.706	< 0.01

注: “—”表示无相关数据

参 考 文 献

- 1 王明贵. 志贺菌属耐药性上升对临床治疗带来的挑战[J]. 中华传染病杂志,2012,30(2):65-66.
- 2 Vien Ie TM, Minh NN, Thuong TC, et al. The co-selection of fluoroquinolone resistance genes in the gut flora of Vietnamese children[J]. PLoS One,2012,7(8):e42919.
- 3 刘兴, 李宁沙, 陈立华, 等. 长沙地区宋内志贺菌的耐药性及毒力基因分析[J]. 中华感染控制杂志,2014,14(10):596-600.
- 4 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Nineteenth informational supplement (M100-S19) [S]. Wayne,PA,2009.
- 5 刘艳艳, 潘亚超, 胡立芬, 等. 临床分享志贺菌质粒介导喹诺酮类耐药基因的检测[J]. 中华传染病杂志,2011,29(9):524-528.
- 6 Cavaco LM, Hasman H, Xia S, et al. A novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar *Kentucky* and *Bovismorbificans* strains of human origin[J]. Antimicrob Agents Chemother,2009,53:603-608.
- 7 周雪, 李家斌, 胡立芬, 等. 安徽省志贺菌属菌群分布及耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(10):2432-2434, 2436.
- 8 Arvelo W, Hinkle CJ, Nguyen TA, et al. Transmission risk factors and treatment of pediatric shigellosis during a large daycare center-associated outbreak of multidrug resistant *Shigella sonnei*: implications for the management of shigellosis outbreaks among children [J]. Pediatr Infect Dis J,2009,28(11):976-980.
- 9 张雯霞, 陈敏, 张曦, 等. 2010-2014年上海市志贺菌菌群分布及耐药性分析[J]. 现代预防医学,2016,43(5):896-899.
- 10 吴海娟. 实时荧光PCR快速同时检测从业人员沙门菌和志贺菌结果分析[J]. 现代预防医学,2013,40(12):2323-2325.
- 11 顾兵, 潘世扬, 黄一灵, 等. 2011年江苏省六座城市宋内志贺菌整合子耐药基因的检测[J]. 中华传染病杂志,2014,32(10):577-581.
- 12 韦小瑜, 游旅, 田克诚, 等. 2007-2013年贵州省志贺菌分离株毒力相关基因的检测分析[J]. 现代预防医学,2015,42(21):3935-3938.
- 13 郭远瑜, 雷和月, 窦琳琳, 等. 分离自腹泻成人志贺菌的血清分群及耐药性分析[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(4):439-441.
- 14 濮小英, 潘劲草, 张蔚, 等. 杭州地区1998-2008年产ESBL的志贺菌基因型及分子流行病学研究[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(3):264-266.
- 15 郑爱华, 王琳, 李贻汉, 等. 深圳市龙华辖区食品、公共场所从业人员沙门菌和志贺菌健康带菌情况[J]. 职业与健康,2008,24(6):534-535.
- 16 Bhattacharya D, Sugunan AP, Bhattacharjee H, et al. Antimicrobial resistance in *Shigella*--rapid increase & widening of spectrum in Andaman Islands, India[J]. Indian J Med Res,2012,135:365-370.
- 17 张鞠玲, 王欢, 陈素明, 等. 喹诺酮类耐药福氏志贺菌的质粒介导耐药机制研究[J]. 中国抗生素杂志,2013,38(9):711-715.
- 18 Bhattacharya D, Bhattacharjee H, Thamizhmani R, et al. Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants among clinical isolates of *Shigella sp.* in Andaman & Nicobar Islands, India[J]. Lett Appl Microbiol,2011,53(2):247-251.
- 19 罗学辉, 张建群, 张一, 等. 2007-2011年浙江省余姚市感染性腹泻志贺菌监测结果分析[J]. 疾病监测,2013,28(1):25-27.
- 20 Dharmik PG, Gomashe AV, Wadher BJ. Surveillance of antibiotic susceptibility pattern among *shigella flexneri* strain isolated in Nagpur district during three years period, January 2009-January 2012[J]. Indian J Med Sci, 2010,64(11):493-500.
- 21 薛泽润, 王颖芳, 段广才, 等. 志贺菌成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白基因cas1和cas2研究[J]. 中华流行病学杂志,2014,(5):581-584.
- 22 高庆双, 高春燕, 张晓玲, 等. 腹泻患儿151株志贺菌分布特征与耐药性分析[J]. 现代预防医学,2016,43(1):60-61, 110.
- 23 蒋鸿超, 黄海林, 苏敏, 等. 小儿细菌性痢疾147例志贺菌菌型及耐药性分析[J]. 儿科药学杂志,2013,19(2):43-46.
- 24 陈峰, 吴尔翔, 丁锁顺, 等. 二聚体蝎型探针荧光定量PCR快速检测志贺菌方法的建立及初步应用[J]. 中国人兽共患病学报,2013,29(9):886-890.
- 25 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.

(收稿日期: 2015-07-11)

(本文编辑: 孙荣华)

蔡长争, 舒少为, 陈爱平, 等. 深圳市菌痢流行分子特征与对质粒介导的喹诺酮耐药机制[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(3):285-289.