

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1215-1223; 4 September 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140598

不同地区宋内志贺菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分型分析

梁蓓蓓¹, 邱少富², 崔贤艳², 王旭², 易胜杰², 王建², 杨晓霞², 任玉红^{1*}, 宋宏彬^{2*}

¹山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801

²军事医学科学院疾病预防控制中心传染病控制中心, 北京 100071

摘要:【目的】通过对不同地区的宋内志贺菌株进行药物敏感性检测、耐药基因的扩增以及基因分型, 了解不同地区宋内志贺菌的耐药情况与流行趋势。【方法】使用微量肉汤稀释法测定了 54 株宋内志贺菌对 21 种药物的敏感性, 用 PCR 方法扩增相关耐药基因, 利用脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 技术进行宋内志贺菌的基因分型, 最后采用 BioNumerics 分析软件对所有菌株进行聚类, 分析其相似度。【结果】实验菌株对于甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑、四环素、替卡西林/棒酸、氨苄西林、庆大霉素 5 种抗生素普遍耐药, 对亚胺培南、头孢吡肟、左氟沙星、诺氟沙星、阿米卡星 5 种抗生素全部表现为敏感。共检测出包括 *bla*TEM, *bla*CTX 以及整合子在内的 7 种不同的耐药基因。全部实验菌株可分为 26 个不同的 PFGE 带型, 分型后表现出较高的基因同源性。宋内志贺菌的耐药性、携带基因与带型具有一定地域相关性。【结论】目前各地区流行的宋内志贺菌株对甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑与四环素已经普遍耐药, 不同地区出现相同聚类分型的菌株表明存在跨区域流行的宋内志贺菌群。因此, 加强对不同地区宋内志贺菌的监控对减少多重耐药菌株的产生具有重要意义。

关键词: 宋内志贺菌, 耐药性, 脉冲场凝胶电泳, 基因分型

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1215-09

志贺菌属在环境中广泛存在并可引发感染性腹泻, 是造成细菌性痢疾的重要病原。据统计, 全球每年因感染志贺菌死亡的人数超过 100 万, 仅亚洲地区每年约有 9100 万人感染志贺菌, 其中约 41.4 万人死亡^[1]。发达国家的细菌性痢疾主要由宋内志贺菌引起, 在发展中国家福氏志贺菌较为流行。但近几年在一些发展中国家或地区, 宋内志贺菌正逐渐取代福氏志贺菌而成为细菌性痢疾的主要病原菌^[2-3]。我国细菌性痢疾的发生亦主要由福氏志贺菌引起, 但值得关注的是, 近年来在我国东部、北部

等一些发达地区, 宋内志贺菌的感染比例正在逐年上升, 甚至已经超过福氏志贺菌成为主要的流行菌型^[3]。由于抗生素的不合理使用, 宋内志贺菌对相关药物 (包括氨苄西林、链霉素、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑和四环素等) 的耐药性日益严重^[4]。氟喹诺酮和第三代头孢菌素往往作为治疗严重细菌性痢疾的选择, 但其耐药性也迅速增加。本研究收集四个不同地区的宋内志贺菌株进行药物敏感性检测, 并对其进行了基因分型与耐药基因检测, 旨在了解不同地区宋内志贺菌的流行趋势与耐药情况, 有助于

基金项目: 国家“十二五”科技重大专项 (2013ZX10004607); 国家自然科学基金 (81371854, 81373053)

* 通信作者。任玉红, Tel: +86-354-6288335, E-mail: renyuhong1963@163.com; 宋宏彬, E-mail: hongbinsong@263.net

作者简介: 梁蓓蓓 (1989-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生。E-mail: loungqi@sina.com

收稿日期: 2014-12-17; 修回日期: 2015-02-26

对多重耐药志贺菌采取合理的防控措施。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株:宋内志贺菌共 54 株,分别由四个不同地区社区医院就诊的腹泻患者大便中分离培养。其中北京地区 16 株,上海地区 13 株,河南地区 12 株,沈阳地区 13 株,菌株时间分布从 2004 年至 2012 年。细菌鉴定与药敏试验的质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922, PFGE 分析用分子量标准参考菌株沙门氏菌 H9812,均为本实验室保存菌株。

1.1.2 主要试剂:MH 琼脂粉(英国 OXOID),SS 培养基,双糖铁琼脂(北京陆桥),CAMHT 肉汤(美国 Sensititre),临床非苛氧药敏板(美国 Sensititre),宋内志贺菌诊断血清(日本生研),20 mg/mL 蛋白酶 K(德国 Merck),Taq DNA polymerase(日本 TaKaRa),限制性内切酶 Xba I(日本 TaKaRa),PFGE 琼脂糖 Seakem gold agarose(美国 Rockland)。

1.1.3 主要仪器和分析软件:全自动微生物鉴定及药敏分析系统 Sensititre Autoreader(美国 Sensititre),脉冲场电泳仪 CHEFMapper PFGE system 及其配套设备,Bio-Rad Quantity One 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad),台式高速离心机(德国 Eppendorf),Vitek Sincchek 浊度仪(意大利 BioMerieux),BioNumerics 6.01 分析软件(比利时 AppliedMaths)。

1.2 菌株分离与鉴定

通过粪便培养接种于 SS 琼脂培养基,筛选出可

疑菌落。将分离得到的单菌落菌株接种到营养琼脂培养基上,37 °C 恒温孵箱培养 18-24 h,挑取 37 °C 环境下在营养琼脂培养基上生长的志贺菌与宋内志贺菌血清在载玻片上混匀,通过宋内志贺菌血清凝集试验进行最终确认。

1.3 药敏试验

采用 Sensititre 药敏分析系统对菌株进行抗生素敏感性分析,结果判读按照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)制定的标准进行。从新鲜的琼脂平皿中取出 3-5 个菌落,稀释加入到 CAMHT 肉汤中,得到浓度为 1×10^5 CFU/mL 的菌悬液,将肉汤接种到板条的每个孔内,用粘性封膜密封所有孔。在 37 °C 的孵育箱中孵育 18-24 h 后用 Autoreader 读板。选用的 21 种抗生素包括头孢他啶、头孢曲松、亚胺培南、呋喃妥因、哌拉西林、四环素、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢唑啉、头孢西丁、妥布霉素、左氟沙星、庆大霉素、替卡西林、替卡西林/棒酸、氨曲南、氨苄西林、氯霉素、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑、诺氟沙星、阿米卡星。

1.4 耐药基因的 PCR 检测

采用水煮法提取 20 株对头孢类药物耐药菌株的 DNA,参照 GenBank 中耐药基因的序列设计引物,PCR 引物见表 1。分别扩增 β 内酰胺类耐药基因与整合酶基因及整合子内耐药基因盒。PCR 扩增条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,55-59 °C 30 s,72 °C 90 s,30 个循环;72 °C 10 min。不同引物的退火温度不同。PCR 产物送北京华大基因进行测序。

表 1 耐药基因 PCR 扩增引物

Table 1. Primers used in PCR amplification of antibiotic resistance genes

Primer	Forward primer sequence (5'→3')	Reward primer sequence (5'→3')	Reference	Size /bp
<i>bla</i> CTX-M-1 group	GGTAAAAAATCACTGCGTC	TTACAAACCGTCGGTGACGA	[5]	873
<i>bla</i> CTX-M-9 group	AGAGTGCAACGGATGATG	CCAGTTACAGCCCTTCGG	[5]	868
<i>bla</i> CTX-M-2 /8 /25 group	ACCGAGCCSACGCTCAA	CCGCTGCCGTTTTATC	This study	221
<i>bla</i> TEM	ATGAGTATTCAACATTTCCG	CCAATGCTTAATCAGTGAGG	[6]	1080
<i>bla</i> OXA	ATTAAGCCCTTTACCAAACCA	AAGGTTGGGCGATTTTGCCA	[7]	890
<i>bla</i> VIM	AGTGGTGAGTATCCGACAG	ATGAAAGTGCCTGGAGAC	[8]	509
<i>bla</i> NDM	GTCTGGCAGCACACTTCCTA	TAGTGCTCAGTGTCCGGCATC	This study	515
<i>Int1</i>	ACATGTGATGGCGACGACGA	ATTTCTGTCTGGCTGGCCA	[9]	569
<i>Int2</i>	CACGGATATGCCACAAAAAGGT	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	[9]	789
Class 1 integron variable region	TCATGGCTTGTATGACTGT	GTAGGGCTTATTATGCACGC	This study	variable
Class 2 integron variable region	CGGGATCCCGACGGCATGCACGATTTGTA	GATGCCATCGCAAGTACGAG	This study	variable

1.5 PFGE 分型

采用美国疾病预防控制中心推荐的 PulseNet 标准方法^[10]进行。实验操作包括胶块制备,胶块内 DNA 的酶切,加样及电泳,获取电泳图像。其中 DNA 的酶切使用 *Xba* I 酶切 2 h 以上,电泳条件为:电压 6 V/cm,脉冲参数 2.16 s - 54.17 s,电泳温度 14 °C,电泳时间 18 h。沙门菌 H9812 作为参照菌株 (Marker)。PFGE 结果数据采用 BioNumerics 分析软件进行聚类分析,条带位置差异容许度选择 1.2%,优化值选择 0.5%,使用 Band based/Dice 方法计算不同菌株电泳条带的相似性系数。

2 结果

2.1 药敏结果分析

54 株宋内志贺菌的药物敏感性实验结果如表 2 所示。药敏结果显示,51 株宋内志贺菌对 2 种或 2 种以上抗生素耐药,其余 3 株菌对全部测试抗生

素敏感。对 5 种或 5 种以上抗生素耐药的分离株有 37 株 (68.51%),其中对第三代头孢菌素类药物头孢曲松或头孢他啶耐药的菌株有 20 株 (沈阳 2 株,河南 2 株,上海 8 株,北京 8 株)。实验菌株对于甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑 (92.59%)、四环素 (87.04%)、替卡西林/棒酸 (66.67%)、氨苄西林 (62.96%)、庆大霉素 (51.85%) 这 5 种抗生素的耐药性非常普遍,对亚胺培南、头孢吡肟、左氟沙星、诺氟沙星、阿米卡星这 5 种抗生素表现出全部敏感。在本次实验的菌株中,不同地区的宋内志贺菌对相同抗生素的敏感性表现出较为明显的差异。如图 1 所示,对哌拉西林、头孢哌酮、妥布霉素、氨曲南耐药的菌株都来源于北京、上海、沈阳 3 个地区,对呋喃妥因、氯霉素耐药的菌株来源于北京和沈阳地区,对头孢他啶耐药的菌株来源于上海和沈阳地区、对替卡西林/棒酸耐药的菌株来源于河南和上海地区,对头孢西丁耐药的菌株来源于河南、北京和沈阳地区。

表 2. 宋内志贺菌药敏结果

Table 2. The antibiotic susceptibility results of *Shigella sonnei* strains

Antibiotics	R (No. of strains)	I (No. of strains)	S (No. of strains)
CAZ	5.56% (3)	16.67% (9)	77.78% (42)
CRO	37.04% (20)	0% (0)	62.96% (34)
IPM	0% (0)	0% (0)	100.00% (54)
NIT	7.41% (4)	0% (0)	92.59% (50)
PIP	29.63% (16)	27.78% (15)	42.59% (23)
TE	87.04% (47)	0% (0)	12.96% (7)
FEP	0% (0)	5.56% (3)	94.44% (51)
CFP	25.93% (14)	1.85% (1)	72.22% (39)
CFZ	37.04% (20)	0% (0)	62.96% (34)
FOX	11.11% (6)	0% (0)	88.89% (48)
TO	14.81% (8)	33.33% (18)	51.85% (28)
LEV	0% (0)	0% (0)	100.00% (54)
GEN	51.85% (28)	0% (0)	48.15% (26)
TIC	66.67% (36)	1.85% (1)	31.48% (17)
TIM	1.85% (1)	18.52% (10)	79.63% (43)
ATM	20.37% (11)	3.70% (2)	75.93% (41)
AMP	62.96% (34)	3.70% (2)	33.33% (18)
C	7.41% (4)	0% (0)	92.59% (50)
SXT	92.59% (50)	0% (0)	7.41% (4)
NOR	0% (0)	0% (0)	100% (54)
AK	0% (0)	0% (0)	100.00% (54)

CAZ: Ceftazidime, CRO: Ceftriaxone, FEP: Cefepime, CFP: Cefoperazone, CFZ: Cefazolin, FOX: Cefoxitin, IPM: Imipenem, NIT: Nitrofurantoin, PIP: Piperacillin, AMP: Ampicillin, TIC: Ticarcillin, TE: Tetracycline, TO: Tobramycin, GEN: Gentamicin, AK: Amikacin, ATM: Aztreonam, C: Chloramphenicol, TIM: Timentin, SXT: Trimethoprim/ sulfamethoxazole, LEV: Levofloxacin, NOR: Norfloxacin.

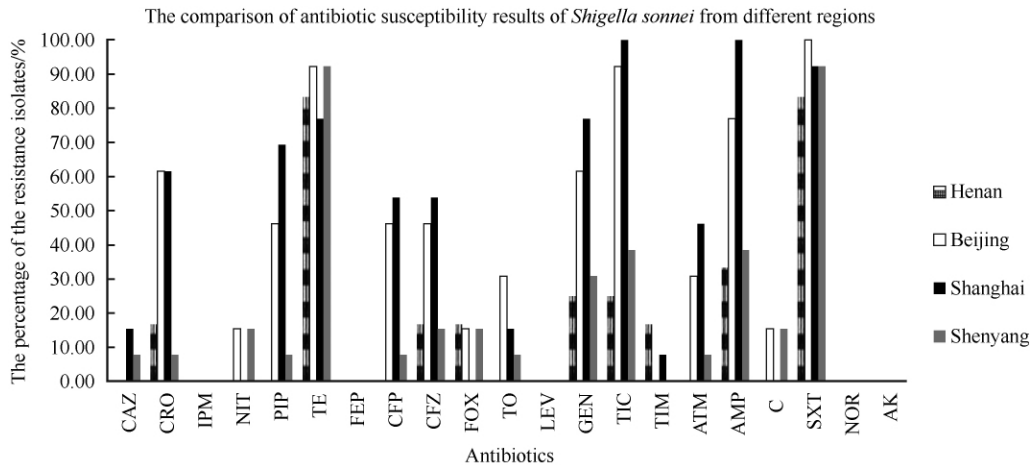


图 1. 不同地区宋内志贺菌耐药性比较

Figure 1. The comparison of antibiotic susceptibility results of *Shigella sonnei* from different regions. CAZ: Ceftazidime, CRO: Ceftriaxone, FEP: Cefepime, CFP: Cefoperazone, CFZ: Cefazolin, FOX: Cefoxitin, IPM: Imipenem, NIT: Nitrofurantoin, PIP: Piperacillin, AMP: Ampicillin, TIC: Ticarcillin, TE: Tetracycline, TO: Tobramycin, GEN: Gentamicin, AK: Amikacin, ATM: Aztreonam, C: Chloramphenicol, TIM: Timentin, SXT: Trimethoprim/ sulfamethoxazole, LEV: Levofloxacin, NOR: Norfloxacin.

2.2 耐药基因扩增结果分析

在 20 株对头孢类药物耐药的多重耐药(对 5 种以上抗生素耐药)宋内志贺菌中,检测出 *bla*TEM、*bla*CTX、*Int1*、*Int2*、*dfrA1*、*sat1* 和 *aadA1* 共 7 种耐药基因,没有检测到 *bla*VIM, *bla*OXA, *bla*NDM-1, *bla*CTX-M-2 群、*bla*CTX-M-8 群、*bla*CTX-M-25 群的基因。PCR 结果如表 3 所示。*bla*TEM 与 *bla*CTX 基因在这些菌株中分布广泛,各有 14 株和 13 株菌携带这两类基因,同时携带这两类基因的有 9 株菌。其中共检测出了 3 种 *bla*CTX 基因类型,分别为 *bla*CTX-M-14、*bla*CTX-M-15 和 *bla*CTX-M-79。在整合子的检测结果中 2 类整合酶基因的存在率(95%, 19 株菌)高于 1 类整合酶基因的存在率(40%, 8 株菌)。在携带二类整合酶的菌株中,有 18 株菌序列比对显示携带甲氧苄啶耐药基因 *dfrA1*、链丝菌素耐药基因 *sat1* 和链霉素耐药基因 *aadA1*。甲氧苄啶耐药的主要耐药机制是因为存在整合子相关的二氢叶酸还原酶基因(*dihydrofolatereductase*, *dfr*),结果表明在这些宋内志贺菌中 90% 存在 *dfrA1* 基因。8 株菌的 1 类整合酶阳性,但 1 类整合子可变区扩增呈阴性,表明在这

些菌株中,1 类整合子 3' CS 可能缺失或存在变异。

2.3 PFGE 结果分析

通过 BioNumerics 软件分析可将 54 株宋内志贺菌分为 26 种不同的 PFGE 带型。所有带型的相似程度都在 90% 以上。按照 94% 的相似度,这些 PFGE 带型可以分为 4 个大小不一的聚类群。其中聚类 I 包含来自上海、北京、河南 3 个地区的 14 株宋内志贺菌,聚类 II 包含来自沈阳地区的 7 株宋内志贺菌,聚类 III 包含来自 4 个地区的 32 株宋内志贺菌,聚类 IV 只有一株来自沈阳的菌株,见图 2。在 54 株菌株组成的聚类分析图中,其中 E 带型为优势带型,占总菌株数的 25.92%,共包含 14 株宋内志贺菌,其中 4 株沈阳菌株,2 株北京菌株,4 株上海菌株,4 株河南菌株。其余有 6 个带型相同且菌株来源地相同的聚类。分别为 A 和 G 带型来源于北京地区;B 和 F 带型来源于上海地区;C 和 D 带型来源于沈阳地区。有 2 个带型相同且菌株的药物敏感性相同的聚类,分别为 A 带型和 C 带型。其中 A 带型的菌株均对氨苄西林、替卡西林、四环素、庆大霉素和甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑耐药。C 带型的菌株均只对四环素和甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑耐药。

表 3. 宋内志贺菌耐药基因扩增结果

Table 3. The drug-resistance genes amplification in *Shigella sonnei* strains

Strain no.	Area	<i>intI-1</i>	<i>hep58- hep59</i>	<i>intI-2</i>	<i>hep51- hep74</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaOXA</i>	<i>blaNDM-1</i>	<i>blaVIM</i>	<i>blaCTX- M-1 Group</i>	<i>blaCTX- M-9 group</i>	<i>blaCTX- M-2/8/ 25 group</i>
SH12sh043	Henan	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SH12sh046	Henan	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2008 2H - 070	Beijing	-	-	+	+	-	-	-	-	CTX-M - 79	-	-
2011 2H - 061	Beijing	+	-	+	+	-	-	-	-	-	CTX-M - 14	-
2011 2H - 147	Beijing	+	-	+	+	-	-	-	-	-	CTX-M - 14	-
2012 2H - 050	Beijing	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
1913	Beijing	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1935	Beijing	-	-	+	+	+	-	-	-	-	CTX-M - 14	-
1984	Beijing	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XiangTong	Beijing	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SH11Sh214	Shanghai	+	-	+	+	+	-	-	-	CTX-M - 15	-	-
SH11Sh285	Shanghai	+	-	+	+	-	-	-	-	CTX-M - 15	-	-
SH11Sh290	Shanghai	-	-	+	+	+	-	-	-	-	CTX-M - 14	-
SH11Sh090	Shanghai	+	-	+	+	+	-	-	-	CTX-M - 15	-	-
SH11Sh128	Shanghai	-	-	+	+	+	-	-	-	CTX-M - 15	-	-
SH12sh270	Shanghai	-	-	+	+	+	-	-	-	-	CTX-M - 14	-
SH12sh199	Shanghai	+	-	+	+	+	-	-	-	CTX-M - 79	-	-
SH12sh164	Shanghai	+	-	+	+	+	-	-	-	-	CTX-M - 14	-
230714	Shenyang	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
231101	Shenyang	-	-	+	+	+	-	-	-	CTX-M - 15	-	-

3 讨论

由于近年来由宋内志贺菌引起的细菌性痢疾病例在各地有逐渐增加的趋势^[11], 检测不同地区宋内志贺菌的药物敏感性, 研究不同地区宋内志贺菌的流行类型, 对于治疗细菌性痢疾十分重要。

通过比较不同地区宋内志贺菌株的药敏结果, 可以发现 4 个地区的宋内志贺菌对四环素、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、氨苄西林均存在很高的耐药率。此结果与国内的有些报道相似^[12], 但较韩国报道的氨苄西林 41% 耐药率^[13] 有所不同。同时发现, 不同地区的菌株对相同抗生素的耐药情况有着地域性的差异。北京与上海地区均有 61.54% 的菌株对头孢曲松耐药, 沈阳与河南相对北京与上海两地区的菌株来讲对头孢类药物的耐药率较低。对于哌拉西林、头孢哌酮、妥布霉素、氨曲南这 3 类抗生素, 北京、上海、沈阳

地区均有不同数量的耐药菌株, 但河南菌株对以上 3 类药物均敏感。不同地区菌株对相同抗生素耐药率的差异可能与各地区社区医院与门诊用药差异有关。北京、上海地区人口相对较多, 医院内就诊病人数量较大, 容易出现交叉感染与医院内多重耐药菌的传播, 而第三代头孢菌素作为治疗严重细菌感染的选择, 其使用也相对其他地区频繁, 于是菌株对相应种类抗生素的耐药性也随之产生。

从整体的抗生素敏感性检测情况看, 所有检测菌株对氟喹诺酮类药物都高度敏感。这可能是由于在志贺菌引起的细菌性痢疾病例中, 1-5 岁的幼儿所占比例较高^[14], 而喹诺酮类药物由于其软骨毒性限制了其在儿童患者中的使用, 在很多国家的儿科病房中它只能作为二线用药^[15], 进而增加了第三代头孢菌素类药物的使用率, 减少了菌株与喹诺酮类药物的接触机会, 降低了耐药性的产生机率。因此, 在治疗成人腹泻患者由宋内志贺氏菌引起的感染过程中, 可

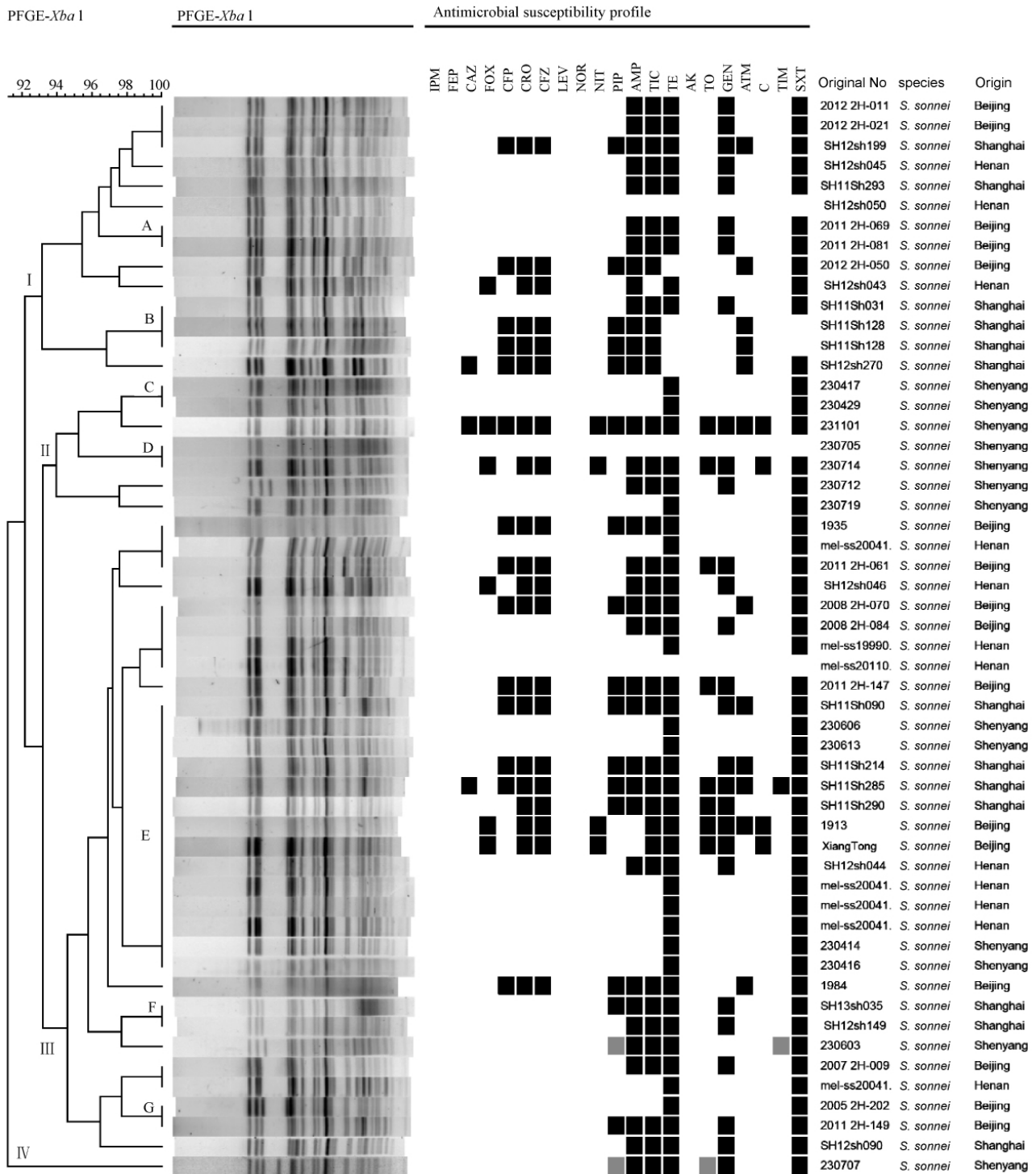


图 2. 54 株宋内志贺菌 PFGE 聚类分析与药敏结果

Figure 2. PFGE profiles and antibiotic susceptibility results of 54 *Shigella sonnei* strains.

以推荐使用喹诺酮类药物,但在儿童腹泻患者中慎用。

志贺菌的耐药性可以通过质粒、转座子、整合子和基因岛等可移动遗传元件的介导使其能在不同种

属细菌间水平转移^[16],本实验中检测的 *bla*TEM, *bla*VIM, *bla*OXA, *bla*NDM-1, *bla*CTX 基因均可以通过质粒或转座子的传递来增强志贺菌对相关药物的耐药性。此外,整合子-基因盒系统在革兰氏阴性菌

多重耐药性的传播发展过程中也起重要作用。在本实验的菌株中 *bla*TEM 基因的阳性率高达 70%, 它是 ESBLs 中数量最多的一种, 可以导致对 β 内酰胺类药物产生耐药性。在 *bla*CTX 基因的检测中未发现 2 群、8 群、25 群 *bla*CTX 基因的菌株, 主要流行型别为 *bla*CTX-M-14 与 *bla*CTX-M-15, 与国内外研究报道相一致^[17-18]。在整合酶以及整合子携带的耐药基因盒检测中, 分别有 40% 和 95% 的头孢耐药菌携带 1 类和 2 类整合酶基因。其中 1 类整合子可变区扩增呈阴性, 可能在这些菌株中存在非典型 1 类整合子, 其 3' CS 缺失或存在变异。2 类整合子可变区扩增显示所有携带基因盒的菌株都携带有 *dfrA1* + *sat1* + *aadA1* 基因盒, 与国内外文献报道一致^[19-20], 并未有其它新型基因盒发现。

利用 PFGE 分子分型技术对 54 株不同地区宋内志贺菌进行分型。所有菌株的聚类相似性系数大于 90%, 提示 4 地区存在遗传谱系紧密相关的宋内志贺菌流行克隆系。E 带型的菌株数有 14 株, 明显多于其他带型, 是较为优势的 PFGE 带型。这一亚聚类的菌株虽然来自不同地区, 但带型一样, 这表明 E 带型菌株可能是跨区域流行的一个宋内志贺菌群。因此, 对于优势带型的菌株应加强监测, 及时进行流行病学调查与分析, 以此对宋内志贺菌进行追踪, 以便在腹泻传染病暴发时对传播源进行及时调查与控制。在 E 带型菌株中, 沈阳的 4 株菌与河南的 3 株菌均只对四环素和甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑耐药, 北京与上海的菌株均对头孢类药物耐药。在其他亚聚类中, 有 6 个带型相同且菌株来源地相同的聚类, 其中两个带型中的菌株其耐药谱也相同。将菌株分型与药敏结果结合起来分析, 菌株来源地相同带型相似度高度的菌株其耐药谱较为相似。这似乎表明宋内志贺菌的耐药性又具有一定的地域性, 与之前相同地区病例用药相似的推论有一定的联系性。相同带型的耐药宋内志贺菌在不同地区的出现, 使细菌性痢疾的治疗形势日趋严峻。通过本实验的研究与分析, 加强不同地区宋内志贺菌的监测对研究不同地区宋内志贺菌的传播规律和变异变迁关系有着切实的现实和理论意义。

参考文献

[1] Bardhan P, Faruque AS, Naheed A, Sack DA. Decrease

in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(11): 1718-1723.

- [2] Banga Singh KK, Ojha SC, Deris ZZ, Rahman RA. A 9-year study of shigellosis in Northeast Malaysia: antimicrobial susceptibility and shifting species dominance. *Zeitschrift Fur Gesundheitswissenschaften - Journal of Public Health*, 2011, 19(3): 231-236.
- [3] Chang Z, Lu S, Chen L, Jin Q, Yang J. Causative species and serotypes of shigellosis in mainland China: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52515.
- [4] Mu YJ, Zhao JY, Luo Q, Huang LL, Xia SL. Analysis of etiological surveillance results of *Shigella* spp. between 2009 and 2010 in Henan province. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2012, 46(4): 334-337.
- [5] Matar GM, Jaafar R, Sabra A, Hart CA, Corkill JE, Dbaibo GS, Araj GF. First detection and sequence analysis of the *bla*-CTX-M-15 gene in Lebanese isolates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Shigella sonnei*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2007, 101(6): 511-517.
- [6] Tariq A, Haque A, Ali A, Bashir S, Habeeb MA, Salman M, Sarwar Y. Molecular profiling of antimicrobial resistance and integron association of multidrug-resistant clinical isolates of *Shigella* species from Faisalabad, Pakistan. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(9): 1047-1054.
- [7] Ahmed AM, Furuta K, Shimomura K, Kasama Y, Shimamoto T. Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, 55(Pt 12): 1685-1691.
- [8] Galani I, Souli M, Mitchell N, Chryssouli Z, Giamarellou H. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates possessing *bla*VIM-1 in Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 36(3): 252-254.
- [9] Pan JC, Ye R, Meng DM, Zhang W, Wang HQ, Liu KZ. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58(2): 288-296.

- [10] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2006, 3 (1) : 59-67.
- [11] Zhang W, Luo Y, Li J, Lin L, Ma Y, Hu C, Jin S, Ran L, Cui S. Wide dissemination of multidrug-resistant *Shigella* isolates in China. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66 (11) : 2527-2535.
- [12] Zhang HH, Chen M, Chen HY, Zhang X, Zhu LY, Su JH, Fu HQ, Huang H, Zhang YQ, Lian WG, Wang WQ, Yang LF. Antibiotics resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Shigella sonnei* isolates. *Disease Surveillance*, 2012, 27 (10) : 768-771. (in Chinese)
章红红, 陈敏, 陈洪友, 张曦, 朱林英, 苏靖华, 傅慧琴, 黄红, 张勇琪, 连伟刚, 王闻卿, 杨玲凤. 宋内志贺菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分子分型分析. *疾病监测*, 2012, 27 (10) : 768-771.
- [13] Jin YH, Oh YH, Jung JH, Kim SJ, Kim JA, Han KY, Kim MY, Park SG, Lee YK. Antimicrobial resistance patterns and characterization of integrons of *Shigella sonnei* isolates in Seoul, 1999-2008. *The Journal of Microbiol*, 2010, 48 (2) : 236-242.
- [14] Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, 77 (8) : 651-666.
- [15] Niyogi SK. Shigellosis. *The Journal of Microbiol*, 2005, 43 (2) : 133-143.
- [16] Jacquier H, Zaoui C, Sanson-le Pors MJ, Mazel D, Bercot B. Translation regulation of integrons gene cassette expression by the attC sites. *Molecular Microbiology*, 2009, 72 (6) : 1475-1486.
- [17] Cho SH, Han SY, Kang YH. Possibility of CTX-M-14 Gene transfer from *Shigella sonnei* to a commensal *Escherichia coli* strain of the gastroenteritis microbiome. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 2014, 5 (3) : 156-160.
- [18] Zhu JM, Bian FZ, Sun YG, Zhang YF, Yuan GY. Detection and drug-resistance of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases producing *Shigella flexneri*. *Chinese Journal of Microecology*, 2012, 24 (10) : 907-908. (in Chinese)
朱健美, 边锋芝, 孙玉国, 张延芳, 苑广盈. 福氏志贺菌 CTX-M 型产超广谱 β -内酰胺酶的检测及耐药性. *中国微生态学杂志*, 2012, 24 (10) : 907-908.
- [19] Peirano G, Agero Y, Aarestrup FM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 55 (3) : 301-305.
- [20] Xiao GG, Fan J, Deng JJ, Chen CH, Zhou W, Li XH, He YW, Li H, Hu B, Qiao Y, Chen GH, Wan CM. A school outbreak of *Shigella sonnei* infection in China: clinical features, antibiotic susceptibility and molecular epidemiology. *Indian Pediatrics*, 2012, 49 (4) : 287-290.

Antibiotics-resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Shigella sonnei* from different regions

Beibei Liang¹, Shaofu Qiu², Xianyan Cui², Xu Wang², Shengjie Yi², Jian Wang², Xiaoxia Yang², Yuhong Ren^{1*}, Hongbin Song^{2*}

¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China

²Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] To understand the epidemic tendency and antibiotics-resistance among *Shigella sonnei* isolates collected from different regions by antibiotic susceptibility testing, PCR amplification of the resistance genes and genotyping. [Methods] The susceptibilities to 21 antibiotics of 54 *S. sonnei* strains were determined by broth microdilution using a 96-well microtiter plate. The amplification of resistance genes was performed by PCR. Pulsed field gel electrophoresis genotyping method was applied to analyze their genetic relationships, and BioNumerics software was used to analyze the PFGE patterns. [Results] All tested *S. sonnei* strains were resistant to Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Tetracycline, Ticarcillin, Ampicillin and Gentamicin, whereas sensitive to Imipenem, Cefepime, Levofloxacin, Norfloxacin and Amikacin. A total of 7 different antibiotic resistance genes including *bla*TEM, *bla*CTX and *intI* were identified in the multidrug-resistant *S. sonnei* strains. PFGE patterns of all the isolates showed a high genetic homology. [Conclusion] It is of great importance to strengthen the surveillance of *S. sonnei* from different regions in order to reduce the prevalence of multidrug-resistant strains.

Keywords: *Shigella sonnei*, antibiotic resistance, pulsed field gel electrophoresis, genotyping

(本文责编:张晓丽)

Supported by the The 12th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2013ZX10004607) and by the National Natural Science Foundation of China (81371854, 81373053)

* Corresponding author. Yuhong Ren, Tel: +86-354-6288335, E-mail: renyuhong1963@163.com; Hongbin Song, E-mail: hongbinsong@263.net

Received: 17 December 2014/Revised: 26 February 2015