

大理地区志贺菌的血清型分布及多重 PCR 检测技术的应用*

王国富, 薛士鹏, 吴利先(大理学院基础医学院微生物学教研室, 云南 671000)

【摘要】 目的 探讨大理地区志贺菌的血清型分布以及多重 PCR 技术在志贺菌检测中的应用。**方法** 用常规分离培养、生化鉴定和血清学分型法对腹泻患者粪便标本进行检测, 分离到的标本再用多重 PCR 法对志贺菌的毒力基因 *shetA*、*shetB*、*ial* 和 *ipaH* 进行扩增检测。**结果** 通过常规培养和生化反应鉴定, 得到 68 株志贺菌。血清学鉴定显示福氏志贺菌 41 株, 宋内志贺菌 25 株, 鲍氏志贺菌 2 株。通过多重 PCR 扩增后 68 株志贺菌均在 423 bp (*ipaH*) 处出现了条带, 检出率为 100%, 其余在 147 bp (*shetB*)、309 bp (*shetA*) 处以及 320 bp (*ial*) 处均出现了至少一个条带, 与常规鉴定法的符合率达 100%。5 份直接用阳性粪便标本提取 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增后, 也得到了同样的结果。**结论** 大理地区细菌性痢疾患者感染以福氏志贺菌为主, 多重 PCR 技术可用于志贺菌的快速检测和流行病学调查。

【关键词】 志贺菌; 血清型; 多重 PCR; 快速检测
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 15. 013 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)15-1850-02

Study on serotype distribution in Dali and application of multiplex PCR assay for shigella detection* WANG Guo-fu, XUE Shi-peng, WU Li-xian (Department of Medical Microbiology of Dali College, Yunnan 671000, China)

【Abstract】 Objective To study serotype distribution in Dali and application of multiplex PCR assay for shigella detection. **Methods** 68 shigella were tested by traditional culture, biochemical identification and serological typing first. Then all samples were detected by multiplex PCR assay including four virulence genes which were *shetA*, *shetB*, *ial* and *ipaH*. **Results** There were 68 isolated from acute diarrhea faeces after identified by traditional culture. Sero-logical assay classified as follows: 41 strains were *Shigella flexneri*, 25 strains were *Shigella sonnei*, 2 stains were *Shigella bogdii*. All the 68 stains shigellosis appeared line in 423 bp (*ipaH*), and at least appeared another line in 147 bp (*shetB*) or 309 bp (*shetA*) or 320 bp (*ial*) by multiplex PCR assay. The coincidence rate was 100% comparing traditional culture. It was the same result with the method of the DNA plate extracted directly from feces by multiplex PCR assay. **Conclusion** The main serotypes of shigella isolates in Dali are *Shigella flexneri*. The multiplex PCR assay can rapidly detect shigella.

【Key words】 shigella; serotype; multiplex PCR; rapid detection

志贺菌(shigellosis)又称痢疾杆菌,能侵袭结肠黏膜上皮细胞,引起人类细菌性痢疾。按抗原结构和生化反应的不同可分为痢疾、福氏、鲍氏和宋内志贺菌。传统的检测方法必须经过分离培养和生化实验,甚至于全自动细菌鉴定仪等,其检测周期长、步骤繁琐、许多因素难以控制,有时存在误诊和漏诊,已经显现出很大的局限性。因此,需要用快速、敏感、特异的检测方法诊断菌病,以采取有效防治措施。

随着微生物基因组学的发展,对志贺菌的基因结构已经清楚,分子生物学检测技术应用于志贺菌快速诊断已经成为可能,本研究在传统检测方法的基础上引入了多重 PCR 技术,将为临床快速诊断志贺菌提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 68 株志贺菌来源于 2010~2011 年从大理学院附属医院、大理州人民医院、大理市人民医院以及周边几所县级医院收集的腹泻患者的粪便标本。按卫生部颁布《全国临床检验操作规程》进行培养及生化反应、血清型鉴定。分离鉴定所用培养基、生化反应试剂购于北京天坛生物制品股份有限公司。志贺菌诊断血清购于兰州生物制品研究所。QIAamp DNA Stool Mini Kit 为美国 QIA-GEN 公司产品。全自动细菌

鉴定及药敏分析仪 VITEK-2 为法国生物梅里埃公司产品,PCR 扩增仪为 PE 公司产品。PCR 所用引物:参照参考文献[1-2],针对 4 个毒力基因设计 4 对引物,由北京晨绿生物公司合成见表 1。

表 1 用于志贺菌毒力基因 PCR 鉴定的引物

引物	毒力基因	引物序列,从 5'~3'	基因大小(bp)
P1	<i>setlA</i>	TCA CGC TAC CAT CAA AGA	309
P2		TAT CCC CCT TTG GTG GTA	
P3	<i>setlB</i>	GTG AAC CTG CTG CCG ATA TC	147
P4		ATT TGT GGA TAA AAA TGA CG	
P5	<i>ial</i>	CTG GAT GGT ATG GTG AGG	320
P6		GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC	
P7	<i>ipaH</i>	TGG AAA AAC TCA GTG CCT CT	423

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离培养与鉴定 将收集至上述医院的粪便标本,按卫生部颁布《全国临床检验操作规程》进行培养和生化反

* 基金项目:云南省教育厅基金重点项目(No. 09Z0078)。

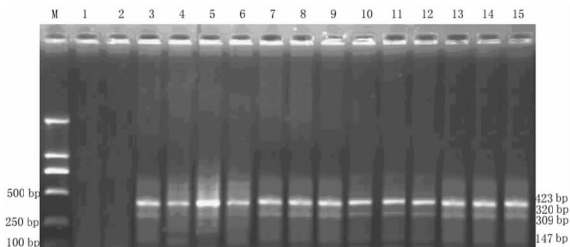
应鉴定,可疑标本再用全自动细菌鉴定仪进行鉴定,最后通过玻片凝集进行血清型鉴定。

1.2.2 多重 PCR 检测 将鉴定过的志贺菌培养过夜,分别取 100 μL 培养过夜菌,离心弃上清后加 50 μL 去离子水,沸水煮 10 min 后离心,取菌裂解液的上清 2 μL 为 PCR 模板,浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 P1~P8 各 1 μL 为引物进行 PCR。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min 后,按下列参数循环 35 次,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。同时设大肠埃希菌为阴性对照。凡除了 423 bp 处(*ipaH* 基因)出现条带外,其他 309 bp(*setIA* 基因)、147 bp(*setIB* 基因)以及 320 bp(*ial* 基因)任意一处出现条带均为阳性。凝胶成像仪拍照记录结果。为了确定多重 PCR 在志贺菌快速诊断中应用,本研究选取了 5 份志贺菌阳性的黏液脓血便标本,直接用多重 PCR 进行扩增。具体方法是:取粪标本 0.2 g,用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒提取 DNA,然后取 2 μL 作为模板,按上述参数进行扩增。

2 结 果

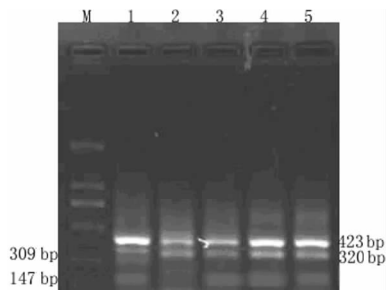
2.1 常规分离培养和鉴定 通过常规培养和生化反应鉴定,可疑标本再用全自动细菌鉴定仪进行鉴定,得到 68 株志贺菌。通过玻片凝集进行血清型鉴定,其中福氏志贺菌 41 株,宋内志贺菌 25 株,鲍氏志贺菌 2 株,本次未分离到痢疾志贺菌。

2.2 多重 PCR 检测结果 通过多重 PCR 扩增后,大肠埃希菌(*Enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)和伤寒沙门菌(均为临床分离株)未出现条带,68 株志贺菌均在 423 bp 处出现了条带,其余的在 147、309、320 bp 处均出现了至少一个条带,与常规鉴定法的符合率达 100%,结果见图 1。5 份直接用粪便标本提取的 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增后,也得到了同样的结果,见图 2。



注:M 为 DNA 标记;1 为大肠埃希菌 EPEC;2 为伤寒沙门菌;3~15 为志贺菌。

图 1 多重 PCR 检测分离鉴定后的志贺菌毒力基因



注:M 为 DNA 标记;1~5 为志贺菌。

图 2 多重 PCR 直接检测粪便中的志贺菌毒力基因

3 讨 论

志贺菌是引起细菌性痢疾的主要病原菌,其菌群变化与各地区卫生状况、饮食习惯有关。福氏志贺菌为中国大部分地区

主要流行菌群,本研究显示大理地区流行的也主要是福氏志贺菌,与国内其他地区的报道相同^[3]。

鉴于传统的分离培养步骤繁琐,显现出很大的局限性。多重 PCR 具有快速、高特异性和高敏感性的特点,已被国外学者用于追踪和检测细菌性腹泻^[4-5],特别是对菌量较少标本或经药物治疗标本中活菌量不多的标本,还有血清学标记不能鉴定的腹泻菌种。全部检验过程包括 DNA 提取、PCR 扩增、电泳仅需 3~4 h,是一种较为理想的检验方法。由于志贺菌有 4 个种群,具有不同的抗原基因,只针对一种抗原基因的单一 PCR,虽然快速有时会漏检。多重 PCR 是在同一个反应管中用多对引物同时扩增几条 DNA 片段的方法,其反应原理、反应试剂和操作过程与一般 PCR 相同,但更能全方位高效率地检测志贺菌。

Buysse 等^[6]发现志贺菌 *ipaH* 存在于各型志贺菌,同时多拷贝存在于染色体上,不随传代而丢失,可被认为是志贺菌的管家基因。但据 Phantouamath 等^[1]研究结果表明,单用 *ipaH* 基因 PCR 结果阳性并不一定发病,多是痢疾杆菌携带者。侵袭相关基因 *ial* 存在于侵袭性大质粒上一个 2.5 kb 侵袭相关区段中,是志贺菌的毒力基因^[7]。后来 Fasano 等^[8]又报道 2 种志贺菌肠毒素 *SHETA*、*SHETB* 编码基因。菌病患者除了 *ipaH* 基因阳性外,*ial* 或 *shetA* 或 *shetB* 基因检测同时阳性,才能证明是痢疾杆菌感染,且具有致病性^[1]。因此,本研究根据志贺菌的这 4 个特异性基因片段中的开放框架部分序列设计引物,进行多重 PCR 检测。

本研究选择了常规分离培养和生化鉴定方法分离出的志贺菌 68 例。而伤寒沙门菌和大肠埃希菌的结果阴性,表明 PCR 法有很高的特异性。直接用粪便标本通过层析柱提取 DNA 后扩增结果同样为阳性,虽然粪标本中存在着已知和未知的抑制或干扰 PCR 检测的成分,使得这一技术在粪标本检测的应用上受到一定程度的限制。但本试验模板 DNA 的提取使用的是 QIAamp 层析法,直接从粪中提取 DNA。QIAamp 是一种硅胶,能选择性结合 DNA 而分离糖类和蛋白质。将经过离心、溶菌酶和蛋白酶 K 处理的粪标本,用乙醇沉淀后,过 QIAamp 柱,再经 Centriscp 柱处理,可消除 PCR 抑制物,使检测的灵敏度和特异性都大大提高^[9-10]。因此,多重 PCR 技术检测志贺菌,具有快速、敏感、特异等优点,尽管不能区分菌种,但在临床诊断、治疗监测及流行病学调查方面显示出良好的实用性。

参考文献

- [1] Phantouamath B, Sithivong N, Insisiengmay S, et al. Pathogenicity of shigella in healthy carriers; a study in Vientiane, Lao people's democratic republic[J]. Jpn J Infect Dis, 2005, 58(4): 232-234.
- [2] Thong KL, Hoe1 SLL, Puthuchear SD, et al. Detection of virulence genes in Malaysian Shigella species by multiplex PCR assay[J]. BMC Infect Dis, 2005, 5: 8.
- [3] 李颐, 罗蓓, 胡雪明, 等. 上海市静安区 2005~2008 年分离到的志贺菌血清型分布及耐药性分析[J]. 现代预防医学, 2011, 38(15): 3089-3090.
- [4] von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, et al. Utility of a commercially available multiplex(下转第 1853 页)

2.2 两组病死率 研究组死亡 9 例,占 16.1%,对照组死亡 29 例,占 51.8%,研究组病死率显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组肺部感染情况

组别	<i>n</i>	肺部感染的发生率 [<i>n</i> (%)]	感染的控制率 [<i>n</i> (%)]	控制感染的时间 ($\bar{x}\pm s, d$)
研究组	56	12(21.4)▲	10(83.3)▲	6.3±2.2▲
对照组	56	30(53.6)	9(26.7)	16.2±3.3

注:与对照组相比,▲ $P<0.05$ 。

3 讨 论

随着经济的快速发展,重型颅脑损伤发病率逐年升高,因其发病迅速、病情险恶、病情变化快、并发症多、致残率和病死率很高,因此成为临床上治疗颅脑损伤的重点和难点。本病早期死亡常常取决于脑部损伤的严重程度,但是在原发病基础上继发的二次脑损伤或者并发症常常是导致死亡的重要原因,而继发性呼吸功能障碍是本病的常见并发症之一,以呼吸道梗阻多见,它可以引起低氧血症,加重脑组织原有的损害,也可以引起脑组织继发性的损害,延长患者清醒和恢复的时间^[2-3]。而长时间的昏迷,会进一步导致呼吸道分泌物的增多,并且难以排出,从而加剧了缺氧的状态,并引起肺部感染的发生,严重的肺部感染会导致病死率的大幅度升高^[4-5]。因此,在早期对重型颅脑损伤患者给予气管切开治疗,纠正低氧血症,预防肺部感染的发生,保证心、脑供氧就显得至关重要,对于神经功能的恢复也非常有意义。

重型颅脑损伤后多在受伤后第 2~10 天发生肺部感染,但是以第 3~5 天最为常见,是导致死亡的主要原因之一。本研究显示,研究组肺部感染的发生率和病死率显著低于对照组($P<0.05$);研究组感染的控制率显著高于对照组($P<0.05$);研究组控制感染的时间显著短于对照组($P<0.05$)。很明显可以看出,肺部感染发生率以及病死率与气管切开的时间很密切的关系。分析其原因:(1)重型颅脑损伤后生理反射减弱或者完全消失,机体缺乏保护机制,大量呕吐物或者血性脑脊液误吸入肺部;(2)患者咳嗽反射减弱或者完全消失,气管内的分泌物难以咳出,细小支气管被堵塞,给病原菌繁殖提供了条件;

(3)内分泌变化造成肺淤血,肺间质水肿;(4)肺通气换气障碍造成了低氧血症和二氧化碳潴留,进一步加重了病情。因此,在早期即给予气管切开有很重要的意义,这样做可以有效避免因气道阻塞或者窒息导致的缺氧和并发症,能及时清除误吸入肺部的呕吐物和分泌物,同时可以建立人工气道,能保证肺通气换气功能正常,有效减少呼吸道死腔,很好地提高了气体交换率,从而预防了肺部感染的发生,给治疗提供了很大的帮助,对患者的预后也至关重要。需要注意的是,气管切开本身就容易导致肺部感染,但是对于重型颅脑损伤患者,早期气管切开不仅仅能降低肺部感染的发生率,同时感染的程度轻,也容易控制,但是一定要给予定期、及时的护理。重型颅脑损伤患者气管切开适应证有:昏迷程度深、时间长;年老体弱、抵抗力差;肥胖颈短、咽喉强相对狭窄;呕吐频繁;合并其他脏器病症;呼吸次数多于 28 次/分,血氧饱和度小于 90%。

总之,对重型颅脑损伤患者给予早期气管切开治疗可以很好地降低肺部感染的发生率,并且感染容易控制,同时能降低病死率。

参考文献

[1] 李志强,张印纲,邱方. 早期气管切开对长期机械通气患者影响的系统评价[J]. 实用医学杂志,2011,27(9):1579-1581.

[2] 邓元央,黄海能. 早期气管切开对老年重型颅脑损伤术后防止肺部感染的影响[J]. 中国现代医学杂志,2006,16(22):3489-3491.

[3] 张培义,杨允东. 87 例重型颅脑损伤气管切开肺部感染临床病原学分析[J]. 山东医药,2011,51(27):53-54.

[4] 王晶,索鹏,李德珍,等. 重型颅脑损伤并肥胖患者气管切开后护理体会[J]. 实用医学杂志,2010,13(19):3637-3638.

[5] 章剑剑,陈汉平,翁睿光,等. 中重型脑出血患者术后常规气管切开并行冬眠疗法的疗效分析[J]. 中国全科医学,2009,12(22):2063-2064.

(收稿日期:2012-04-25)

(上接第 1851 页)

real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia[J]. J Clin Microbiol,2009,47(8):2405-2410.

[5] 陈晶,杨春莉,裴宇蓉,等. 武汉社区腹泻患者粪便中致病菌的构成与耐药性研究[J]. 热带医学杂志,2007,7(4):326-329.

[6] Buysse JM,Stover CK,Oaks EV,et al. Molecular cloning of invasion plasmid antigen(ipa)genes from *Shigella flexneri*:analysis of ipa gene products and genetic mapping[J]. J Bacteriol,1987,169(6):2561-2569.

[7] Aranda KR,Fagundes-Neto U,Scaletskv IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp[J]. J Clin Micro-

biol,2004,42(12):5849-5853.

[8] Fasano A,Noriega FR,Maneval DR,et al. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro[J]. J Clin Invest,1995,95(6):2853-2861.

[9] 李小丽,阴赦宏,温艳,等. PCR 快速检测腹泻患者粪中痢疾杆菌致病基因[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(19):212-213.

[10] 王松梅,郝志勇,马景臣,等. PCR 检测与细菌培养方法在细菌性痢疾监测中的应用比较[J]. 复旦大学报,2006,33(6):766-769.

(收稿日期:2012-04-25)