



一株牛源福氏志贺菌的分离鉴定及全基因组测序分析

张 晶,王亚平,樊曦雯,王 真*

(北京农学院动物科学技术学院,兽医学(中兽医)北京市重点实验室,北京 102206)

摘 要:近年来,牛易患腹泻病在牛场中进行传播,并有着较高的致死率,造成经济损失。本试验旨在对引起北京某牛场牛腹泻的福氏志贺菌进行分离鉴定,明确病原菌的血清型、耐药性和致病性等生物学特性及基因组特征。本研究采集腹泻牛粪便样本,进行细菌分离纯化、16S rRNA扩增子测序分析、毒力基因检测和分离株全基因组测序。结果显示,经细菌分离纯化、PCR鉴定发现一株福氏志贺菌Fc;基因组测序获得福氏志贺菌株Fc株全基因组大小为4.98 Mp,GC含量为50.76%;含有91个tRNA基因,7个23S rRNA,7个16S rRNA,8个5S rRNA,283个misc_RNA,97个碳水化合物活性酶基因;TVBD注释分析发现1 363个转运蛋白基因;CARD注释分析发现80个抗性基因;VFDB和PHI-base注释分析发现1 410个潜在的毒力因子相关基因及2 052个表型突变基因等。系统进化树分析发现福氏志贺菌与福氏志贺菌29903属于同一分支,进化关系最近。本研究完成了一株牛源福氏志贺菌的分离鉴定和全基因组测序分析,为志贺氏菌病的防控研究提供了理论依据。

关键词: 福氏志贺菌;全基因组测序;耐药性;毒力

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0378-14

Isolation, Identification and Whole Genome Sequencing Analysis of a Bovine-derived *Shigella flexneri* Strain

ZHANG Jing, WANG Yaping, FAN Xiwen, WANG Zhen*

(Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: In recent years, diarrhea in cattle has been spreading in cattle farms with a high mortality rate, causing economic losses. This experiment aims to isolate and identify *Shigella flexneri*, which causes diarrhea in a Beijing cattle farm, and to clarify the biological characteristics and genomic features of the pathogen's serotype, drug resistance, and pathogenicity. In this study, fecal samples from diarrheal cattle were collected for bacterial isolation and purification, 16S rRNA amplicon sequencing analysis, virulence gene detection, and whole-genome sequencing of isolated strains. The results showed that one strain of *Shigella flexneri* Fc was identified through bacterial isolation and purification, and PCR identification. Whole-genome sequencing revealed that the *Shigella flexneri* Fc strain has a genome size of 4.98 Mb and a GC content of 50.76%. It contains 91 tRNA genes, 7 23S rRNA, 7 16S rRNA, 8 5S rRNA, 283 misc_RNA, and 97 carbohydrate-active enzyme genes. TVBD annotation analysis identified 1 363 transporter genes; CARD annotation analysis identified 80

收稿日期:2025-01-09

作者简介:张 晶,硕士,主要从事预防兽医学研究,E-mail:wangzhen3355@163.com

* 通信作者:王 真,主要从事动物疫病防控技术、细菌致病及耐药机制研究,E-mail:wangzhen3355@163.com

resistance genes; VFDB and PHI-base annotation analysis identified 1 410 potential virulence factor-related genes and 2 052 phenotypic mutation genes. Phylogenetic tree analysis revealed that *Shigella flexneri* is closely related to *Shigella flexneri* 29903, belonging to the same branch. This study completed the isolation and identification of a bovine-origin *Shigella flexneri* strain and whole-genome sequencing analysis, providing a theoretical basis for the prevention and control research of shigellosis.

Keywords: *Shigella flexneri*; whole-genome sequencing; drug resistance; virulence

*** Corresponding author:** WANG Zhen, E-mail: wangzhen3355@163.com

志贺菌是临床上最常见的肠道病原体之一,主要分为4种血清群:痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌和宋内志贺菌。其中福氏志贺菌(*Shigella flexneri*, *S. flexneri*)是发展中国家的主要血清群,是一种兼性厌氧菌的革兰阴性杆菌和重要的人类适应性病原体,也是导致人类细菌性痢疾的主要流行菌型,根据抗原不同分为13个血清型^[1],其中常见的有1b型、2a型、3a型和4型。志贺菌感染力强,由于抗生素的滥用导致耐药性严重,出现多重耐药菌株^[2],且没有有效的疫苗^[3],可引起腹泻和发热性痢疾,包括人类溶血性结肠炎和出血性尿毒症综合征,严重者可出现神经症状和伴发败血症。志贺菌自然宿主通常是人类和其他灵长类动物,每年导致约21.6万人死亡^[4]。近年来,牛、猴、兔、犊牛、鱼、鸡和仔猪均有感染志贺菌的报道^[5]。

*S. flexneri*属于侵袭性细菌,*S. flexneri*引起的细菌性痢疾为志贺氏菌病,是导致5岁以下儿童中患腹泻死亡的第二大原因^[6],主要通过细胞内增殖和胃肠道上皮细胞机制引起人类的轻度腹泻^[7],由效应物递送系统(T3SS和T6SS)、不同的蛋白质效应物、毒素、铁摄取基因等介导^[8]。志贺菌在侵袭宿主时,产生的多种毒力因子发挥了重要作用,如志贺毒素、志贺菌肠毒素、超氧化物歧化酶、表面膜蛋白和菌毛等。因此,对分离出的*S. flexneri*毒力基因携带情况进行分析可为致病性分析提供基本参考。PCR和ELISA是目前实验室中较常用于检测腹泻病原微生物的两种方法,不仅检测准确、迅速,而且适用范围广。

对于志贺菌感染的免疫保护作用主要是针对细菌脂多糖中的O特定多糖组分,理想的多价志贺菌疫苗应针对全球最常见的志贺菌种和多种血清型^[9]。为加强对福氏志贺菌感染后毒力基因和耐药基因的理解,全基因组测序是必不可少的手段。本

研究了解到北京地区某牛场出现发热咳嗽、呼吸困难和腹泻的病牛,试验采集了病牛的鼻咽拭子与粪便组织病料,通过分离纯化、耐药性和16S rRNA全基因组测序,分离鉴定出一株福氏志贺菌,并对其进行毒力基因检测和全基因组测序分析,以期志贺菌病防控技术研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

TSB培养基、SS琼脂培养基、MH培养基和细菌生化鉴定管购自青岛海博生物科技有限公司;2×SanTaq PCR Mix和DL5000 DNA Marker购自生工生物工程股份有限公司;AidRed(GelRed)核酸染料购自北京艾德莱生物有限公司;引物由北京擎科生物科技有限公司合成;抗生素药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 细菌分离培养

将粪便样品(北京小段奶牛合作社中出现发热咳嗽、呼吸困难和腹泻的病牛)涂布于SS平板,37℃培养24 h。挑取单菌落,接种到TSB液体培养基中,200 r·min⁻¹,37℃培养12 h,重新在SS平板上划线,24 h后观察菌落特征。

1.3 分离菌16S rRNA PCR鉴定

参照GenBank中福氏志贺菌的16S rRNA基因序列设计引物,引物序列见表1,用2×SanTaq PCR Mix体系进行PCR扩增,PCR反应体系(20 μL):模板2 μL,上、下游引物各0.5 μL,ddH₂O 7 μL,2×SanTaq PCR Mix 10 μL。PCR反应程序设置:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸1 min,共30个循环;72℃延伸10 min。取PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳(110 V电泳30 min),在凝胶成像系统成像,观察记录结果,将PCR产物送去北京擎科生物有限公司进行测序,测序结果在NCBI数据库进行BLAST比对。

表1 福氏志贺菌PCR鉴定引物表

Table 1 Primers for PCR identification of *Shigella flexneri*

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences	片段大小/bp Fragment length/bp
16S rRNA	TGGCTCAGATTGAACGCTGG TACCTTGTTACGACTTCAC	1 488

1.4 分离菌的药敏试验

选取福氏志贺菌为研究对象,进行耐药性分析。参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的操作,采用K-B(Kirby-Bauer)药敏纸片扩散法^[10],用27种临床常用广谱抗生素药敏片对福氏志贺菌进行药物敏感试验。依据CLSI中抑菌直径解释标准进行敏感、中度敏感和耐药的结果判读。抗菌药物包括β-内酰胺类(青霉素G、阿莫西林、氨苄西林、羧苄西林、头孢噻肟、头孢克肟、头孢噻吩和亚胺培南)、大环内酯类(红霉素和阿奇霉素)、氨基糖苷类(链霉素、卡那霉素、新霉素和阿米卡星)、四环素类(四环素、强力霉素和米诺环素)、喹诺酮类(诺氟沙星、左氧氟沙星和环丙沙星)、多肽类(万古霉素和多黏菌素B)、酰胺醇类(氯霉素和氟苯尼考)、磺胺类(复方新诺明)、利福霉素类(利福平)和林可霉素类(克林霉素)抗生素。

培养福氏志贺菌病原菌菌液,将其浓度调整为0.5麦氏浊度,在生物安全柜中进行操作,取各组菌液100 μL滴于MH固体培养基上,用灭菌的玻璃棒在平皿上均匀涂抹整个琼脂表面,置室温3~5 min,用无菌镊子取药敏纸片,贴于平板表面,置于37℃温箱培养16~18 h量取抑菌圈直径,记录药敏结果。

1.5 分离菌的全基因组测序

取-80℃保存的分离菌甘油管,使用涂布棒将分离菌用平板划线法连续在SS培养基纯化培养3代后,挑取单菌落在TSB中培养到对数期,8 000 r·min⁻¹离心10 min收集菌体,由北京奥维森基因科技有限公司提取细菌基因组DNA并进行全基因组测序,采用三代Nanopore进行建库测序,样品检测和纯化后使用SQK-LSK110试剂盒并按照说明书构建1D文库,同时使用VAHTS® Universal Plus DNA Library Prep Kit for MGI V2/for illumina V2试剂构建小片段文库,文库质检合格后使用Nanopore PromethION和Illumina NovaSeq 6000平台进行测序。

1.6 分离菌的全基因组分析

利用PlasFlow软件对细菌基因组组装结果进行质粒的鉴定,对获得的质粒序列利用BLAST软件和PLSDB数据库进行质粒注释;使用BWA(Ver 0.7.17-r1188)软件将illumina短序列与拼接完成的基因组进行比对完成二代测序深度统计,三代测序深度统计使用Minimap2(Ver 2.24-r1122)^[11]将长序列与拼接完成的基因组进行比对;然后使用Samtools(Ver 1.15.1)depth^[12]工具,统计二、三代测序数据的平均测序深度,反应不同区域的reads覆盖情况。

使用mlst(Version:2.23.0)进行多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST),使用Prokka(Version:1.14.6)^[13]对组装后的基因组进行编码基因预测。为全面分析福氏志贺菌的基因功能信息,对八大数据库的基因功能进行注释,包括:UniProt^[14]、Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG)^[15]及KEGG Pathway、gene ontology(GO)^[16]、Pfam^[17]、cluster of orthologous groups of proteins(COG)^[18]、RefSeq、non-redundant protein database(NR)。将预测得到的基因序列与COG、KEGG、Uniprot、Refseq等功能数据库做BLAST比对,得到基因功能注释结果,使用hmmer基于Pfam和TIGERFAM数据库进行功能注释。

使用diamond基于抗性基因数据库(Antibiotic Resistance Genes Database, ARDB)^[19]对福氏志贺菌的蛋白质序列进行注释;使用hmmer对碳水化合物活性酶数据库(Carbohydrate-active enzymes database, CAZy)的蛋白质序列进行注释分析化合物酶的基因组、结构和生物化学信息;使用blastp对综合抗生素耐药性数据库(The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)^[20]注释耐药基因和抗性机制以及对毒力因子数据库(Virulence Factors Database, VFDB)的福氏志贺菌毒力基因进行注释;使用diamond blastp对膜转运蛋白分类数据库(Transporter Classification Database, TCBD)对

膜转运蛋白进行注释;使用 EffectiveT3 (Version: 2.0.2) 预测Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system, T3SS)对 T3SS 蛋白进行注释。

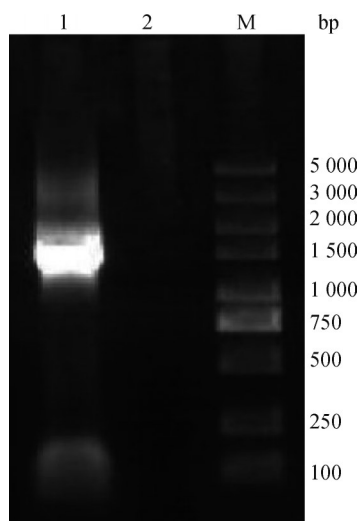
1.7 系统进化树分析

将福氏志贺菌的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对,从中挑选 20 条不同地区的高同源性序列,利用 MEGA 11 中 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

2 结 果

2.1 细菌分离纯化和 PCR 鉴定结果

从组织病料分离出疑似福氏志贺菌,菌落形态在 SS 固体培养基上形成圆形和边缘光滑整齐的小菌落。分离菌株经福氏志贺菌的 16S rRNA 引物扩增,琼脂糖凝胶电泳后扩增结果如图 1 所示,分离菌扩增出了与预期片段大小一致 1 488 bp 的目的基因。通过 BLAST 比对分析,其与福氏志贺菌的相似度>99.8%,确定分离菌株并命名为福氏志贺菌 Fc 株。



M. DL5000 DNA 相对分子质量标准;1. 16S rRNA PCR 扩增;2. 空白对照

M. DL5000 DNA standard; 1. 16S rRNA PCR amplification; 2. Blank control

图 1 分离菌 16S rRNA 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of 16S rRNA gene of isolate

2.2 福氏志贺菌的耐药表型分析

对福氏志贺菌 Fc 株进行药敏试验,福氏志贺菌对 20 种抗生素耐药,包括 9 类抗生素:β-内酰胺类

(青霉素 G、阿莫西林、氨苄西林、羧苄西林、头孢噻肟、头孢克肟、头孢噻吩和亚胺培南)、大环内酯类(红霉素)、氨基糖苷类(链霉素、卡那霉素、新霉素)、四环素类(四环素和强力霉素)、多肽类(万古霉素)、酰胺醇类(氯霉素和氟苯尼考)、磺胺类(复方新诺明)、利福霉素类(利福平)和林可霉素类(克林霉素)抗生素。结果表明,福氏志贺菌 Fc 株是多重耐药病原菌。

2.3 分离菌福氏志贺菌 Fc 株的全基因组测序

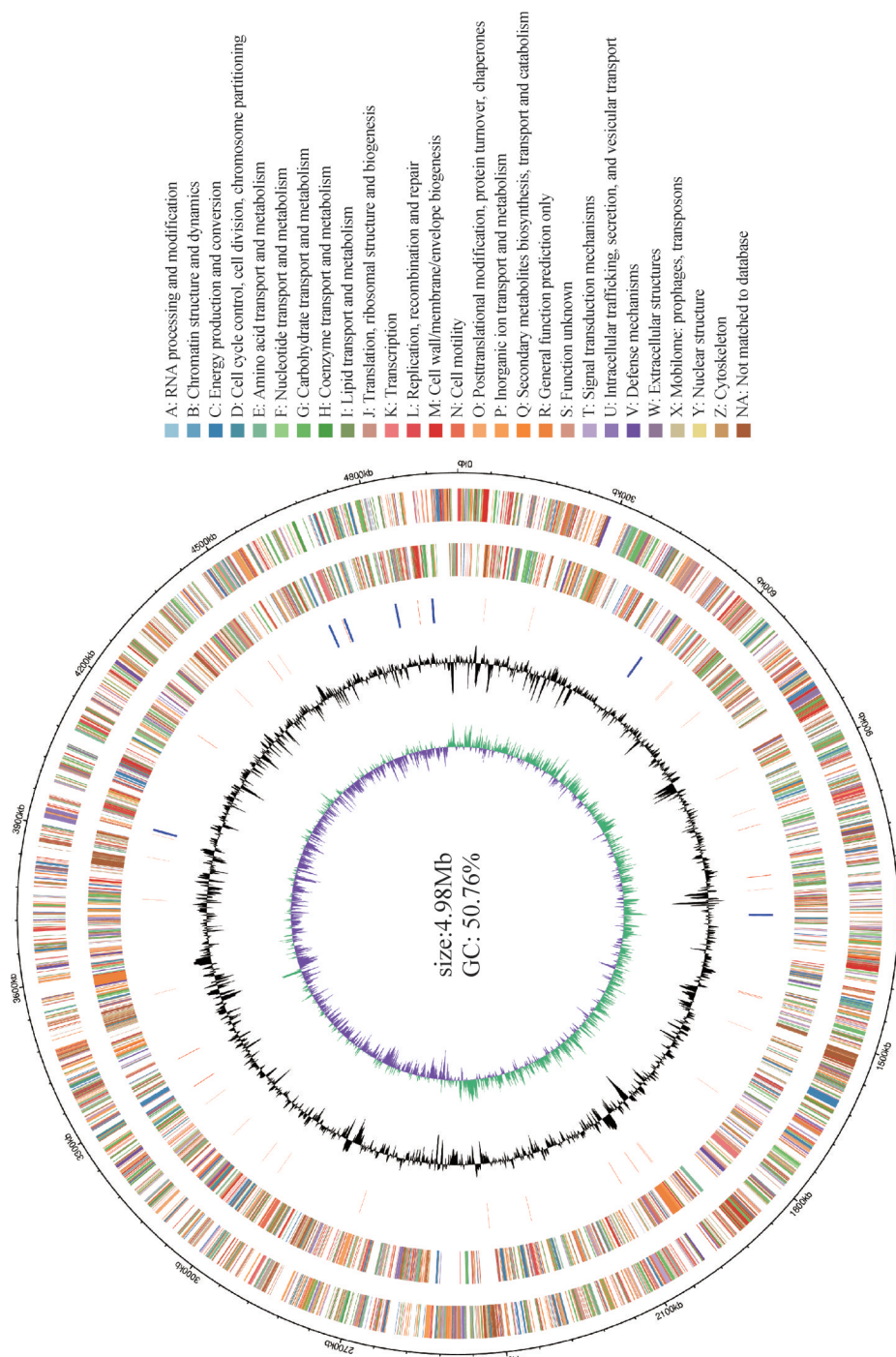
对基因组结构注释信息、GC 分布及基因组 COG 功能注释进行整合,绘制基因组圈图如图 2 所示, circlize 可视化基因组,测序得到福氏志贺菌 Fc 株全基因组大小为 4.98 Mb, GC 的平均含量为 50.76%,具体编码基因预测结果如表 1 所示,所有编码基因的总长度为 5 006 971 bp,编码的基因为 5 750 个,平均长度为 871 bp,编码基因总长度占全基因的 88.63%,含有 91 个 tRNA 基因,7 个 23S rRNA,7 个 16S rRNA,8 个 5S rRNA,283 个 misc_RNA。

2.4 蛋白编码基因与功能注释

2.4.1 蛋白编码基因的 NR 注释和 COG 注释

福氏志贺菌 Fc 株中有 5 350 个基因在 NR 数据库中得到注释,NR 数据库是非冗余蛋白质的氨基酸序列数据库,包含 SwissProt、PIR (Protein Information Resource)、PRF (Protein Research Foundation)、PDB (Protein Data Bank) 蛋白质数据库非冗余的数据以及从 GenBank 和 RefSeq 的 CDS 数据翻译来的蛋白质数据,NR 物种分布如图 3 所示,福氏志贺菌属于肠杆菌科,物质分类分别为肠杆菌科 *Enterobacteriaceae* (46.38%)、*Escherichia* (24.87%)、*Escherichia coli* (12.69%)、*Bacteria* (6.11%)、*Enterobacterales* (4.57%)、*Gammaproteobacteria* (3.06%)、*Proteobacteria* (0.93%)、*Escherichia coli* MS 198-1 (0.55%)、*Escherichia coli* FVEC1412 (0.45%) 和 *Escherichia coli* KTE228 (0.38%)。

对菌株福氏志贺菌 Fc 株基因组中编码功能性蛋白的基因进行 COG 注释,COG 是对基因产物进行直系同源分类的数据库,发现被注释到具有生物学活性的蛋白编码基因共 4 934 个,结果如图 4 所示,基因功能注释信息分为 24 类,较丰富的几个类别依次是碳水化合物运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism)共 443 个基因,氨基酸代谢及转运(amino acid transport and metabolism)共



由外到内依次:第一圈,基因组坐标;第二圈,基因组序列正链上的基因,不同颜色代表不同的COG功能分类;第三圈,基因组序列负链上的基因,不同颜色代表不同的COG功能分类;第四圈,基因组序列上的rRNA和tRNA,rRNA是蓝色,tRNA是红色;第五圈,基因组序列的GC含量曲线,以2000bp为一滑窗在基因组上滑动,统计GC skew;第六圈,基因组序列的GC skew曲线,以2000bp为一滑窗在基因组上滑动,统计GC skew;绿色表示G含量

From the outside to the inside, the circles are as follows: The first circle shows genes on the positive strand of the genome sequence, with different colors indicating different COG functional categories; the second circle shows genes on the negative strand of the genome sequence, again with different colors for different COG functional categories; the third circle marks the locations of rRNA and tRNA on the genome sequence, with rRNA in blue and tRNA in red; the fifth circle illustrates the GC content curve of the genome sequence, calculated by sliding a 2000bp window across the genome and averaging the GC content; the sixth circle depicts the GC skew curve of the genome sequence, also determined by sliding a 2000bp window across the genome and calculating the GC skew, with green representing G content

图 2 福氏志贺菌 Fc 株的全基因组图谱

Fig. 2 *Shigella flexneri* Fc strain whole genome circle map

表1 基因预测结果统计

Table 1 Statistics of gene prediction results

类型 Type	数量 Number	总长度 Total length	平均长度 Average length	基因组比例/% Percentage of genome (%)
Gene	5 750	5 006 971	871	88.63
CDS	5 353	4 934 757	922	87.36
tRNA	91	7 137	78	0.13
23S rRNA	7	20 314	2 902	0.36
16S rRNA	7	10 766	1 538	0.19
5S rRNA	8	888	111	0.02
tmRNA	1	363	363	0.01
misc_RNA	283	32 746	116	0.58

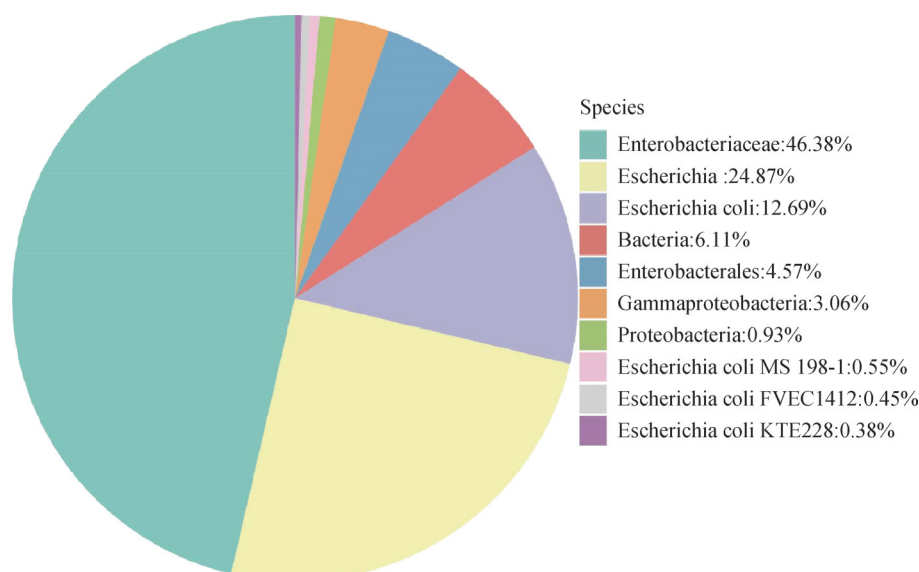


图3 福氏志贺氏菌 Fc 株基因组的 NR 物种分布图

Fig. 3 Species distribution map of the NR in *Shigella flexneri* Fc strain genome

431 个基因, 转录(transcription)共 360 个基因, 仅用于一般功能预测(general function prediction only)共 358 个基因, 细胞壁/膜/包膜生物发生(cell wall/membrane/envelope biogenesis)共 337 个基因, 而关于无机离子转运与代谢(Inorganic ion transport and metabolism)共有 312 个基因, 能量生产和转换(energy production and conversion)共 296 个基因, 翻译、核糖体结构和生物发生(translation, ribosomal structure and biogenesis)共 264 个基因, 信号传导机制(signal transduction mechanisms)共 235 个基因。此外, 还有 186 个基因尚未确定功能, 这些基因可能赋予菌株某些特殊的生物学功能, 有待今后进一步的研究。这些有大量基因富集的功能, 对于维持细菌正常生命活动必不可少。

2.4.2 福氏志贺菌 Fc 株基因序列的 KEGG 和 GO 注释 将菌株福氏志贺菌 Fc 株所获得的基因组信息与 KEGG 数据库进行比对并分析, KEGG 是通过系统分析细菌的基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物功能的主要公共数据库, 如图 5 示, 3 893 个基因对应到 KEGG 通路, 富集在 23 条代谢通路中。KEGG 富集分析显示, 全局和概述图(global and overview maps)、膜传输(membrane transport)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)和碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)通路注释基因是最多的, 分别有 1 019、363、291 和 223 个基因注释; 此外, 辅助因子和维生素的代谢(metabolism of cofactors and vitamins)、信号转导(signal transduction)、能量代谢(energy metabolism)等通路也具有较高相关度。

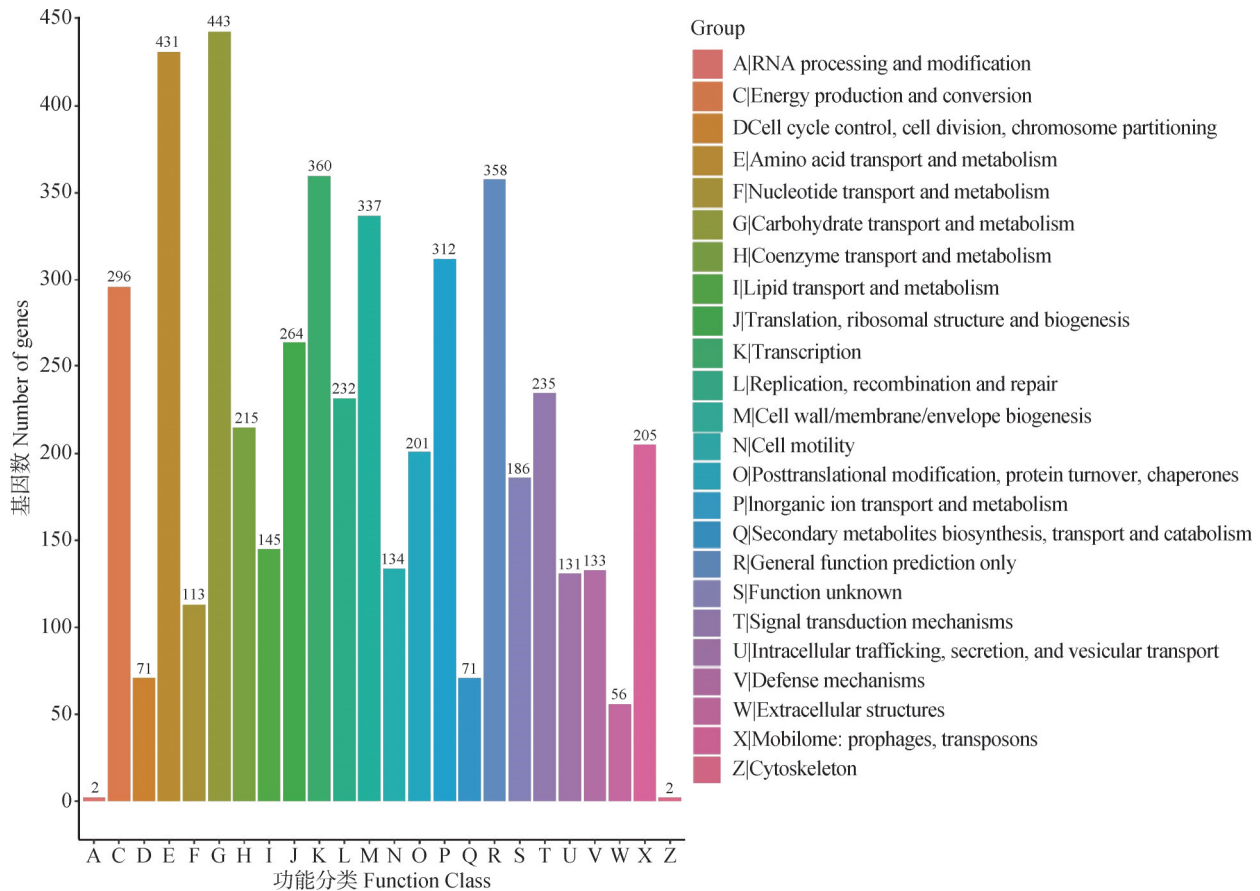


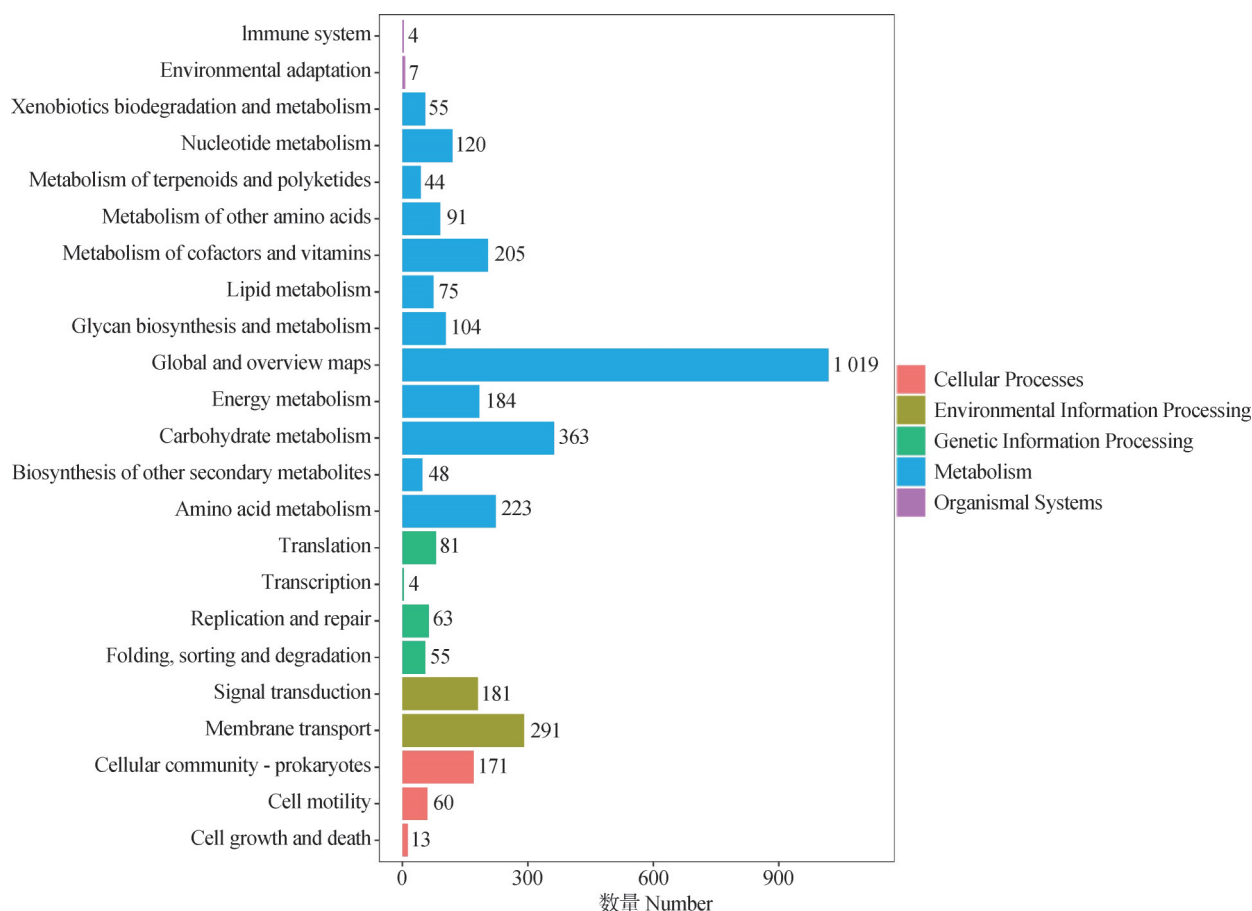
图4 福氏志贺菌基因组 COG 功能分类图

Fig. 4 COG functional categories map of the *Shigella flexneri* genome

GO是一个国际化的基因功能分类体系,包括一套动态更新的标准词汇表来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。将GO注释信息经简化后得到GOslim分类,将基因的功能从生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)对蛋白进行注释,选取每个分类下前20个注释最多的GOslim的二级分类进行绘图,共计80条目,结果如图6所示,在BP中注释的基因数为3 530,涉及最多基因的条目包括转录调控过程(regulation of transcription, DNA-templated)、跨膜转运(transmembrane transport)、磷酸烯醇式丙酮酸依赖性糖磷酸转移酶系统(phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system)、碳水化合物代谢过程(carbohydrate metabolic process),分别有130、73、63、62个;在CC中注释基因数为3 010个,其中与膜的组成部分(integral component of membrane)、质膜(plasma membrane)、细胞质

(cytoplasm)相关的基因表现出最高相关性,各有950、677、540个;MF大类中注释的基因数为5 805,其中涉及最多基因的条目为ATP结合(ATP binding)、DNA结合(DNA binding)、金属离子结合(metal ion binding),其数量分别为397、390和325个。

2.4.3 TCDB转运蛋白分类数据库注释 TCDB是对膜转运蛋白进行分类的一个数据库,包括一套转运蛋白分类系统,对目的蛋白质序列进行注释,结果如图7所示,主要注释到7个蛋白家族,共有1 363个基因在TCDB中注释到,分别为primary active transporters(475个基因)、electrochemical potential-driven transporters(321个基因)、channels/pores(211个基因)、incompletely characterized transport systems(176个基因)、group translocators(86个基因)、accessory factors involved in transport(53个基因)、transmembrane electron carriers(40个基因)。



横坐标为 Pathway 分类下注释的基因数目;纵坐标为 Pathway 分类,不同颜色代表所属的不同的大分类

The *x*-axis represents the number of annotated genes under Pathway classification; the *y*-axis represents the Pathway categories, with different colors indicating their respective major classifications

图5 福氏志贺菌基因组的KEGG代谢通路分类图

Fig. 5 Classification diagram of KEGG metabolic pathway of the *Shigella flexneri* genome

2.4.4 碳水化合物活性酶(CAZy)分析 CAZy 是分析碳水化合物酶的基因组、结构和生物化学信息的数据库,使用HMMER基于CAZy数据库对蛋白质序列进行注释,E-value临界值设置为 1×10^{-18} ,CAZy分析的结果统计如表2所示,在CAZy共注释到97个基因,其中糖苷水解酶GHs注释到的相关基因有42个,糖基转移酶GTs注释到的相关基因有36个,碳水化合物酯酶CEs注释到8个相关基因,辅助氧化还原酶AAs注释到3个相关基因,碳水化合物结合模块CBMs注释到3个相关基因。

2.4.5 PHI分析和T3SS分析结果 在福氏志贺菌Fc株中共有2 052个基因在PHI数据库中得到注释,PHI(Pathogen Host Interactions)是病原与宿主互作数据库,其中,有11个基因突变后毒力减弱,20个突变后致死,69个基因突变后丧失致病性,477个基因突变后不受影响,57个突变成效应子,3个突

变后有化学敏感性,另有111个基因突变后可能会增加毒力。

Ⅲ型分泌系统是一种多蛋白复合物,在于革兰阴性病原菌中,负责转运毒力因子到宿主细胞中。使用软件EffectiveT3预测Ⅲ型分泌系统效应蛋白,在T3SS分析中,注释得到福氏志贺菌含有495个T3SS效应蛋白。

2.5 毒力和耐药性基因注释分析

2.5.1 毒力基因注释 对VFDB最新数据库进行注释,经BLAST比对,选取E value $\leq 1 \times 10^{-5}$ 的结果如表3所示,在福氏志贺菌Fc株基因组中共检测到了1 410个潜在的毒力基因,包括介导黏附、侵入、铁摄取以及抗吞噬能力的蛋白。其中注释到的毒力因子类别主要在效应子传递系统(effector delivery system)包括182个基因、营养/代谢因素(nutritional/metabolic factor)包括385个基因、运动

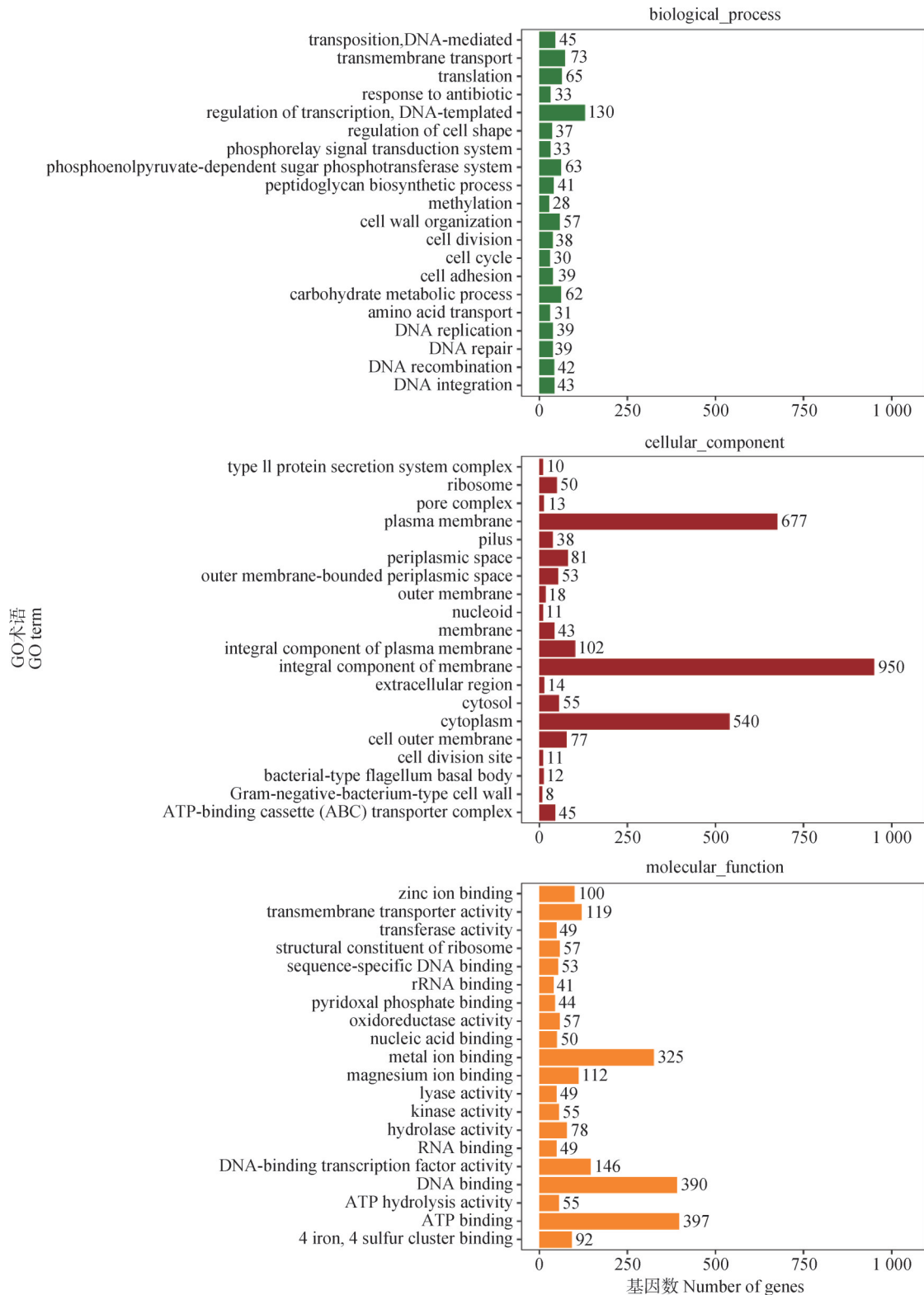


图6 福氏志贺菌基因组的GO功能分类图

Fig. 6 GO function classification map of the *Shigella flexneri* genome

性 (motility) 包括 105 个基因、免疫调节 (immune modulation) 包括 238 个基因、顺从性 (adherence) 包括 239 个基因。其中在这些类别中荚膜 (capsule) 和

周毛鞭毛 (peritrichous flagella) 相关基因最多, 分别为 68 和 59 个基因。

2.5.2 抗生素耐药性 (CARD) 分析结果

通过

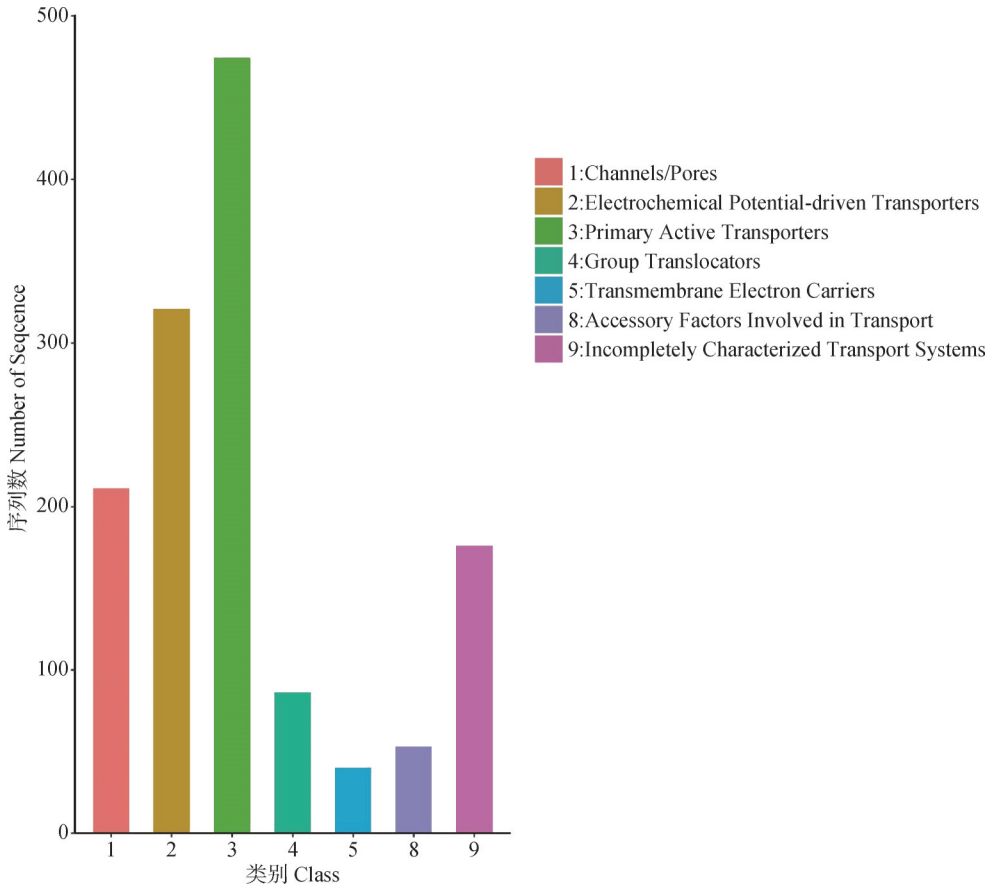


图7 福氏志贺菌 Fc 株的 TCDB 数据库注释统计图
Fig. 7 TCDB function classification diagram of *Shigella flexneri* Fc strain genome

表2 碳水化合物活性酶统计结果
Table 2 Result of CAZy

分类 Class	数量 Number	说明 Description
糖苷水解酶 GHs	42	Glycoside hydrolases
糖基转移酶 GTs	36	Glycosy transferases
多糖裂合酶 PLs	0	Polysaccharide lyases
碳水化合物酯酶 CEs	8	Carbohydrate esterases
辅助氧化还原酶 AAs	3	Auxiliary activities
碳水化合物结合模块 CBMs	3	Carbohydrate-binding modules

Class. 碳水化合物活性酶数据库功能分类名称;Number. 注释到该分类的基因数量;Description. 该分类的描述信息
Class. Functional classification name of the Carbohydrate-Active EnZymes Database; Number. Number of genes annotated to this classification; Description. Description information of the classification

综合抗生素耐药性 (Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)数据库注释分析,发现福氏志贺菌 Fc 株有 80 个耐药基因在数据库中得到注释,结果如表 4 所示。有关抗生素外排泵的耐药基因有 45 个,有关抗生素失活的耐药基因有 17 个,有关抗生素靶标改变的耐药基因有 14 个,有关

抗生素靶标保护的耐药基因有 2 个,有关抗生素靶标替换的耐药基因有 2 个。其中对氟喹诺酮类产生耐药的基因主要有 *gadX*、*gadW*、*mdtF*、*mdtE*、*AcrF*、*acrE*、*mdtH*、*tolC*、*marA* 等,对复合磺胺类产生耐药的基因有 *sul3*,对头孢菌素类抗生素产生耐药的基因的主要有 *KpnE*、*marA*、*acrB* 和 *TEM-1*

表 3 福氏志贺菌 Fc 株中的毒力因子

Table 3 Virulence factors in *Shigella flexneri* Fc strain genome

毒力因子 Virulence factors	相关基因数 Related genes number
硝酸还原酶 Nitrate reductase	27
周毛鞭毛 Peritrichous flagella	59
荚膜 Capsule	68
寡聚糖 LOS	42
O 抗原 O-antigen	23
脂多糖 LPS	27
IV 型菌毛 Type IV pili	39

表 4 福氏志贺菌 Fc 株中的耐药基因

Table 4 Prediction of antibiotic resistance genes in *Shigella flexneri* Fc strain

耐药机制 Resistance Mechanism	抗生素耐药基因数 Antibiotic resistance genes number	抗性 Resistances
抗生素外排泵 Antibiotic efflux	45	氟喹诺酮类、头孢菌素类、头霉素类、青霉素类、大环内酯类、磷霉素、硝基咪唑类、四环素类、肽类、氨基糖苷类、核苷类、磺胺类抗生素
抗生素失活 Antibiotic inactivation	17	β -内酰胺类、林可酰胺类、氟喹诺酮类、四环素类、利福霉素类抗生素
抗生素靶标改变 Antibiotic target alteration	14	肽类、氟喹诺酮类、头孢菌素类、甘氨酸环素类、青霉素类、四环素类、利福霉素类、苯酚类、三氯生、头霉素类、青霉素类抗生素
抗生素靶标保护 Antibiotic target protection	2	氟喹诺酮类抗生素
抗生素靶标替换 Antibiotic target replacement	2	复合磺胺类、磺胺二甲氧嘧啶

3 讨 论

志贺菌引起的细菌性痢疾通过消化道传播后在人群中引起普遍感染,不同菌群及血清型间无交叉保护性免疫,并且容易反复感染并出现并发症^[21],临床表现主要为血性腹泻、腹痛和发热等,近几十年时间内,细菌性痢疾死亡率出现明显下降的趋势,但每年仍有约 16.4 万人死于细菌性痢疾^[22]。目前对于志贺菌还没有许可疫苗,因此抗生素治疗是有效手段,可缓解患者病情和降低菌痢传播的风险。目前我国仍是世界上最大的抗生素使用国之一,由于志贺菌可以通过质粒、整合子等可移动元件,从其他细菌中获得耐药基因,导致志贺菌的耐药性不断增加。福氏志贺菌 Fc 株,全基因组大小为 4.98 Mb,GC 的平均含量为 50.76%,编码基因的总

等。对 β -内酰胺类耐药的基因有 *bla*_{CXT-M-55}。结果表明本研究中福氏志贺菌 Fc 株携带多种耐药基因,可能是介导其对多种药物耐药的重要原因之一。

2.6 系统进化分析

构建分离株福氏志贺菌 Fc 株的 16S rRNA 基因系统进化树,通过将测序结果在 NCBI 上比对,结果如图 8 所示,该菌与登录号为 NR 026331.1 福氏志贺菌相似性高达 99%,因此该菌为福氏志贺菌。选取 20 株与该菌相似性较高的菌构建进化树,菌株福氏志贺菌 Fc 株与福氏志贺菌 ATCC 29903 属于同一分支,进化关系最近,与 *Escherichia albertii* strain NBRC 102203 进化关系较近,同其他等菌株的进化关系较远。

长度为 5 006 971 bp,编码的基因为 5 750 个,平均长度为 871 bp,编码基因总长度占全基因的 88.63%。Fc 株有 5 350 个基因在 NR 数据库中得到注释,其中被注释到具有生物活性的蛋白质编码基因共 4 934 个。

目前基于表型对志贺菌分型的方法主要包括形态特征、血清分型、生化分型和噬菌体分型等,常用于细菌溯源的技术有 DNA 指纹图谱技术和 DNA 测序技术^[23]。在《方案(2023 年版)》报告中指出,对于细菌性痢疾的确诊,基于粪便培养或核酸检测呈阳性^[24]。对于临床细菌性痢疾的诊断,基于流行病学史、细菌性痢疾的典型表现和相应的粪便镜检结果为判断标准。

治疗菌痢常用抗生素包括喹诺酮类、复合磺胺类和头孢类药物^[25]。然而临床上抗生素的滥用会

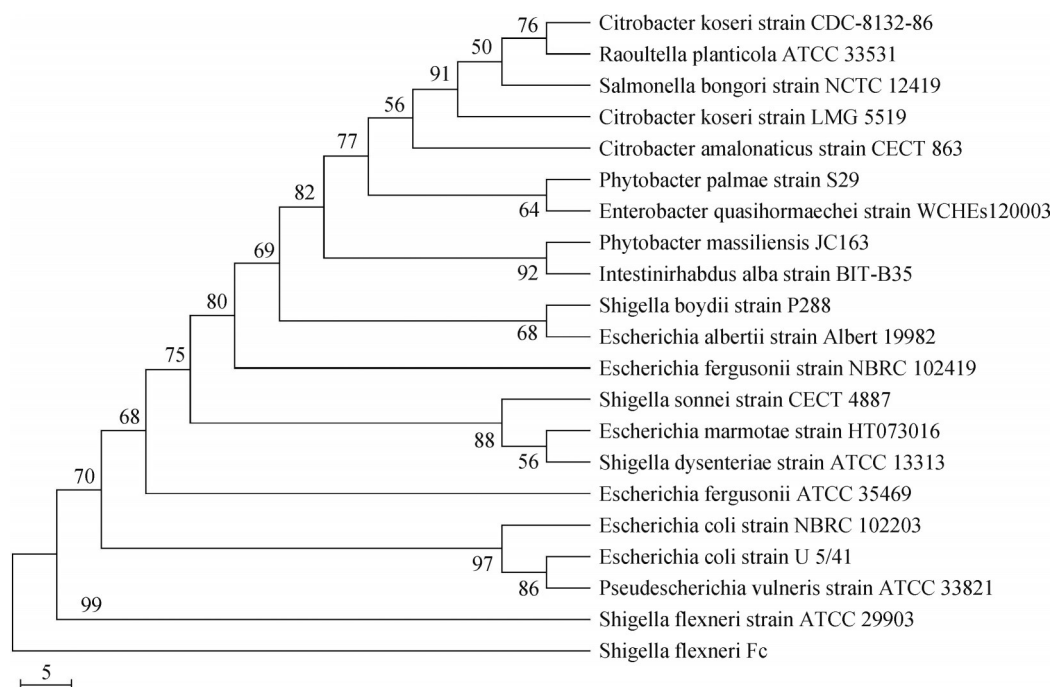


图8 福氏志贺菌株Fc株16S rRNA基因系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene in *Shigella flexneri* Fc strain

导致志贺菌出现多重耐药的情况。本研究分离出福氏志贺菌为多重耐药菌株,对头孢菌素类、喹诺酮类、四环素类和 β -内酰胺类抗生素的耐药性逐渐增高,检测出80种耐药基因,包括编码16种不同抗生素的基因,与吴自豪等^[26]从牛羊粪源中检出的志贺菌耐药情况类似,包括 β -内酰胺类、大环内酯类、氨基糖苷类、四环素类、多肽类、酰胺醇类、磺胺类、利福霉素类和林可霉素类。福氏志贺菌的药敏结果也解释了牛腹泻病对多种抗生素治疗没有治疗作用的原因,携带对氟喹诺酮类耐药的基因包括:*gadX*、*gadW*、*mdtF*、*mdtE*、*AcrF*、*acrE*、*mdtH*、*tolC*和*marA*;携带*sul3*对复合磺胺类产生耐药,携带*KpnE*、*marA*、*acrB*和*TEM-1*对头孢菌素类抗生素耐药。我国作为养牛大国存栏量位居全球第三,而在肉牛养殖中犊牛期是饲养中最重要的环节之一,犊牛腹泻是一种常见的消化道疾病,也是断奶前犊牛死亡的主要原因之一^[27],是养牛业产业中造成最大经济损失的疾病之一,其中细菌性感染通常可造成急性腹泻,且牛群中传播速度极快^[28]。

4 结 论

本研究通过细菌学分离和血清型特异性引物PCR鉴定的方法,从牛粪便中分离鉴定出一株福氏志贺菌Fc株,GO注释分析显示,转录调控过程、跨

膜转运、磷酸烯醇式丙酮酸依赖性糖磷酸转移酶系统和碳水化合物代谢过程是基因富集程度最高的途径;KEGG分析中基因富集最高的代谢途径分别为膜传输和氨基酸代谢;TCDB转运蛋白分析显示,有7个蛋白家族共1363个基因在TCDB数据库中注释到;CAZy注释分析有97个基因为碳水化合物酶,PHI分析显示有2052个基因在III型分泌系统中得到注释,部分基因的突变会影响细菌的毒力和致病性;CARD注释分析发现80个抗性基因;VFDB注释分析发现1410个潜在的毒力因子相关基因。系统进化树分析发现福氏志贺菌与福氏志贺菌29903属于同一分支,进化关系最近。本研究完成了一株牛源福氏志贺菌的分离鉴定和全基因组测序分析,对其耐药性进行研究,解析了临床上引起牛腹泻的病原菌的转运蛋白、毒力因子、抗药性以及碳水化合物酶等,推测相关的基因及蛋白家族与福氏志贺菌在临床上致病性有关,为志贺氏菌病的防控研究和用药治疗提供了理论依据。

参考文献(References):

- [1] JENNISON A V, VERMA N K. *Shigella flexneri* infection; pathogenesis and vaccine development [J]. *Fems Microbiol Rev*, 2004, 28(1): 43-58.
- [2] RANJBAR R, BEHNOOD V, MEMARIANI H,

- et al. Molecular characterisation of quinolone-resistant *Shigella* strains isolated in Tehran, Iran [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2016, 5: 26-30.
- [3] MILES L S, HOLT E K, MOSTOWY S. Recent advances in modelling *Shigella* infection [J]. *Trends Microbiol*, 2024, 32(9): 917-924.
- [4] KHALIL A I, TROEGER C, BLACKER F B, et al. Morbidity and mortality due to *Shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: The global burden of disease study 1990-2016 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(11): 1229-1240.
- [5] ZHU Z, SHI Y, ZHOU X, et al. Molecular characterization of fluoroquinolone and/or cephalosporin resistance in *Shigella sonnei* isolates from yaks [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 1-9.
- [6] MOHD A, MITESH P, SUMUKH D, et al. Effect of *Adiantum philippense* extract on biofilm formation, adhesion with its antibacterial activities against foodborne pathogens, and characterization of bioactive metabolites: An in vitro-in silico approach [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 823.
- [7] PAKBIN B, AMANI Z, ALLAHYARI S, et al. Genetic diversity and antibiotic resistance of *Shigella* spp. isolates from food products [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9: 6362-6371.
- [8] PAKBIN B, BRÜCK W M, BRÜCK T B. Molecular mechanisms of *Shigella* pathogenesis; recent advances [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2448.
- [9] KELLY M, JANARDHANAN J, WAGH C, et al. Development of a *Shigella* conjugate vaccine targeting *Shigella flexneri* 6 that is immunogenic and provides protection against virulent challenge [J]. *Vaccine*, 2024, 42(24): 126263.
- [10] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 163-175.
- [11] LI H. Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(14): 2103-2110.
- [12] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [13] TORSTEN S. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation [J]. *Bioinformatics* (Oxford, England), 2014, 30(14): 2068-2069.
- [14] APWEILER R, BAIROCH A, WU C H, et al. UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: D115- D119.
- [15] MINORU K, SUSUMU G, SHUICHI K, et al. The KEGG resource for deciphering the genome [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: D277-D280.
- [16] ASHBURNER M, BALL A C, BLAKE A J, et al. Gene Ontology: Tool for the unification of biology [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-29.
- [17] SARA E, JAINA M, ALEX B, et al. The Pfam protein families database in 2019 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D427-D432.
- [18] TATUSOV R L, GALPERIN M Y, NATALE D A, et al. The COG database: A tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 33-36.
- [19] LIU B, POP M. ARDB—Antibiotic resistance genes database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D443-D447.
- [20] ALCOCK B P, RAPHENYA A R, LAU T T Y, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D517- D525.
- [21] KOTLOFF K L, RIDDLE M S, PLATTS-MILLS J A, et al. Shigellosis [J]. *Lancet*, 2018, 391(10122): 801-812.
- [22] HOSANGADI D, SMITH P G, KASLOW D C, et al. WHO consultation on ETEC and *Shigella* burden of disease, Geneva, 6-7th April 2017: Meeting report [J]. *Vaccine*, 2019, 37(50): 7381-7390.
- [23] 廖驰真, 曾 竣. 志贺菌流行耐药现状及溯源研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2023, 33(16): 2046-2048.
- [24] LIAO C Z, ZENG J. Current status of antimicrobial resistance and traceability research on *Shigella* [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2023, 33(16): 2046-2048.
- [24] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 细菌性痢疾诊疗方案 (2023 年版) [EB/OL]. (2023-12-14). <https://www.nhc.gov.cn/cms-search/downloadFiles/58e9d15c81b945708f2afc8b64d6c698.pdf>
- National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and treatment protocol for bacillary dysentery (2023 Edition) [EB/OL]. (2023-12-14). <https://www.nhc.gov.cn/cms-search/downloadFiles/>

- 58e9d15c81b945708f2afc8b64d6c698. pdf
- [25] 彭杰夫,姜仁杰,董 晨,等. 一起耐多药福氏 1a 志贺菌感染暴发疫情的调查和分子特征[J]. 江苏预防医学,2024,35(4):464-468.
- PENG J F, JIANG R J, DONG C, et al. Investigation and molecular characteristics of an outbreak caused by multidrug resistant *Shigella flexneri* subtype 1a infection [J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2024, 35 (4):464-468.
- [26] 吴自豪,王 雪,刘 鹏,等. 新疆塔额垦区牛羊粪源志贺菌耐药性、毒力基因检测及其致病性分析[J]. 中国草食动物科学,2024,44(5):37-42.
- WU Z H, WANG X, LIU P, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility testing, virulence genes, and pathogenicity of shigella spp. isolated from cattle and sheep feces in Taer Reclamation Area, Xinjiang [J]. *China Herbivore Science*, 2024, 44(5):37-42.
- [27] GOMEZ D E, ARROYO L G, COSTA M C, et al. Characterization of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic dairy calves [J]. *J Vet Intern Med*, 2017, 31(3):928-939.
- [28] 孙睿雪,李玉铎,赵建军. 牛新发病毒性传染病及其诊断技术研究进展[J]. 动物医学进展,2024,45(5):90-96.
- SUN R X, LI Y Z, ZHAO J J. Progress on bovine emerging viral infectious diseases and relevant diagnosis technology [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2024, 45(5):90-96.

(编辑 白永平)