

• 论 著 •

## 鼠伤寒沙门菌分子分型及耐药性特点\*

程招敏<sup>1,2</sup>, 蓝 锴<sup>1</sup>, 柏彩英<sup>3</sup>, 邓秋莲<sup>4</sup>, 袁彩虹<sup>1</sup>, 周 强<sup>1△</sup>, 张 文<sup>1</sup>

(1. 广东省中医院检验科, 广州 510120; 2. 广东省广州中医药大学第二临床学院 510120;

3. 广东省妇幼保健院检验科, 广州 510010; 4. 广东省广州市妇女儿童中心检验科 510623)

**摘要:**目的 了解广州市鼠伤寒沙门菌的分子分型以及耐药性特点。方法 利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型技术对鼠伤寒沙门菌进行分子分型, 采用纸片扩散(K-B)法进行药敏试验, 且采用 WHONET 5.6 软件对药敏结果进行耐药分析。结果 PFGE 结果聚类分析将 44 株鼠伤寒沙门菌分为 15 型, 其中 PFGE9 型、PFGE8 型、PFGE3 型为广州市的优势菌型, 菌株比例为 54.5%(24/44)。耐药表型分型可将其分为 21 型, 多重耐药菌占 61.4%(27/44)。结论 广州市鼠伤寒沙门菌分子分型呈多样性, 分离株的多重耐药较为严重。

**关键词:**鼠伤寒沙门菌; 脉冲场凝胶电泳; 耐药表型; 多重耐药

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.004

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2016)12-1601-03

Characteristics of molecular typing and drug-resistance for *Salmonella typhimurium*\*CHENG Zhaomin<sup>1,2</sup>, LAN Kai<sup>1</sup>, BO Caiying<sup>3</sup>, DENG Qiulian<sup>4</sup>, YUAN Caihong<sup>1</sup>, ZHOU Qiang<sup>1△</sup>, ZHANG Wen<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of T. C. M, Guangzhou, Guangdong

510120, China; 2. The Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong

510120, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Maternal and Child Health Institute,

Guangzhou, Guangdong 510010, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou

Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

**Abstract: Objective** To realize the characteristics of molecular typing and drug-resistant for *Salmonella typhimurium* isolated from Guangzhou City. **Methods** Pulse-field gel electrophoresis(PFGE) was used to type *Salmonella typhimurium*, and Kirby-Bauer method was used for antimicrobial susceptibility test, then used WHONET5.6 software analyzed antimicrobial susceptibility test.

**Results** A total of 44 *Salmonella typhimurium* typed into 15 PFGE patterns by PFGE, containing three dominating patterns, PFGE9, PFGE8 and PFGE3. Drug resistance phenol-typing could be divided into 21 types, multi-drug resistant bacteria accounted for 61.4%(27/44). **Conclusion** Molecular typing of *Salmonella typhimurium* isolated from Guangzhou City is diversity, which showed multi-drug resistant.

**Key words:** *Salmonella typhimurium*; pulse-field gel electrophoresis; drug-resistant phenol-typing; multi drug resistance

在广州市引起食物中毒的病原菌中, 沙门菌一直占前三位, 鼠伤寒沙门菌是临床较常见的沙门菌致病血清型<sup>[1]</sup>。目前该菌引起的食物中毒事件已由先前的点源性集中暴发转变为跨地区的散在暴发, 而追踪污染源及传播途径依赖于菌株分子分型手段<sup>[2]</sup>。脉冲场凝胶电泳(PFGE)是一种研究细菌分子分型同源性分析的有效方法, 该技术是对整个细菌染色体进行分析, 具有重复性好, 结果稳定可靠, 区分能力强等优点, 现已用于多种病原体暴发流行的检测分析中, 是国际公认的区分暴发菌株和溯源的金标准<sup>[3-4]</sup>。因此, 本研究利用 PFGE 分型技术对广州市 44 株鼠伤寒沙门菌进行分子分型, 同时对其进行耐药性分析, 为指导临床合理使用抗菌药物和传染病的防控提供科学依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 菌株来源** 鼠伤寒沙门菌为 2014~2015 年广东省中医院、广东省妇幼保健院、广州市妇女儿童中心门诊就诊患者的大便标本分离株, 共 44 株。标准菌株为大肠埃希菌 ATCC25922, 来自原卫生部临检中心; 沙门菌 H9812, 由中国

疾病预防控制中心传染病预防控制所组织建立的全国病原细菌实验室监测网络(PulseNet China)提供。

**1.2 仪器与试剂** Vitek-2 全自动细菌鉴定药敏分析仪、Vitek-MS(法国梅里埃公司)、CHEF Mapper 脉冲场凝胶电泳仪和 GEL Doc EQ 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)、比浊仪(美国 DADE BEHRING 公司)。沙门菌属诊断血清(宁波天润生物药业有限公司)、哥伦比亚血琼脂平板和水解酪蛋白(M-H)琼脂平板(法国梅里埃公司)、药敏纸片(英国 Oxoid 公司)、限制性内切酶 Xba I(美国 Promega 公司)、琼脂糖 SeaKem Gold Agarose(美国 Cambrex 公司)、蛋白酶 K(德国 MERCK 公司)。

## 1.3 检测方法

**1.3.1 菌株复苏及鉴定** 将收集的 44 株菌株复苏后, 分别使用 Vitek-2 全自动细菌鉴定药敏分析仪和 Vitek-MS 进行鉴定, 再用沙门菌属诊断血清进行血清学鉴定和分型。

**1.3.2 药敏试验** 采用纸片扩散(K-B)法对 44 株鼠伤寒沙门菌进行抗菌药物敏感试验, 参照 2015 版美国临床和实验室

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271909)。

作者简介: 程招敏, 男, 检验师, 主要从事细菌耐药机制研究。△ 通讯作者, E-mail: 13631412228@163.com。

标准化协会(CLSI)抗菌药物敏感试验执行标准 M100-S25<sup>[5]</sup>, 检测 10 种抗菌药物包括: 氨苄西林(AMP)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、头孢曲松(CRO)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、氯霉素(CHL)。使用 WHONET5.6 软件对药敏结果进行统计分析, 获得 44 株鼠伤寒沙门菌的耐药相关信息。

**1.3.3 PFGE 分型** 根据美国 PulseNet 网络实验室推荐的沙门菌 PFGE 标准操作方法<sup>[6]</sup>, 通过制胶、酶切、电泳实验步骤, 获得 44 株鼠伤寒沙门菌的 PFGE 图谱。运用 BioNumerics (Version5.1) 软件处理 PFGE 图像, 并使用非加权配对算术平均法进行聚类分析。

**2 结 果**

**2.1 药敏结果**

**2.1.1 菌株鉴定结果** 44 株鼠伤寒沙门菌经 Vitek-2 全自动细菌鉴定药敏分析仪和 Vitek-MS 鉴定均为沙门菌属, 血清学鉴定和分型均符合鼠伤寒沙门菌抗原式。

**2.1.2 药敏试验结果** 44 株鼠伤寒沙门菌对 10 种抗菌药物的耐药性结果见表 1, 其中对三代头孢敏感性在 86.0% 以上, 对氟喹诺酮类代表性药物 CIP 的敏感性为 70.5%, 对 AMP、SAM、CHL 的敏感性均较低, 其中对 AMP 的耐药率高达 86.4%。

表 1 44 株鼠伤寒沙门菌对 10 种抗菌药物敏感性结果[n(%)]

抗菌药物	耐药	中介	敏感
AMK	0(0.0)	0(0.0)	44(100.0)
AMP	38(86.4)	1(2.2)	5(11.4)
SAM	16(36.4)	11(25.0)	17(38.6)
SXT	15(34.1)	0(0.0)	29(65.9)
CIP	0(0.0)	13(29.5)	31(70.5)
CHL	23(52.3)	1(2.2)	20(45.5)
GEN	13(29.5)	0(0.0)	31(70.5)
FEP	8(18.2)	1(2.3)	35(79.5)
CRO	6(13.6)	0(0.0)	38(86.4)
CAZ	4(9.1)	0(0.0)	40(90.9)

**2.1.3 耐药表型分型** 由于鼠伤寒沙门菌对 CRO 和 CAZ 的耐药性类似, 故合并统计, 用 CEPH3 表示。所得耐药表型分型采用 NY“A”~“B”进行分类命名, 其中 A 代表耐药种类数, B 表示耐药种类亚型(如 NY2-3 表示对两种抗菌药物耐药的第 3 种亚型), 得到沙门菌耐药表型分型表, 见表 2。44 株鼠伤寒沙门菌通过耐药表型分型最终可分为 21 型, 多重耐药菌 27 株(61.4%), 其中对 3 种抗菌药物耐药 6 株(13.6%), 对 4 种抗菌药物耐药 8 株(18.2%), 对 5 种抗菌药物耐药 4 株(9.1%), 对 6 种抗菌药物耐药 8 株(18.2%), 对 7 种抗菌药物耐药 1 株(2.3%)。

**2.2 PFGE 分型结果** 44 株鼠伤寒沙门菌经 Xba I 酶切, 进行 PFGE 分型, 结果显示菌株间的相似度为 66.0%~100.0%。按照聚类相似度在 90.0%~100.0% 为同一亚型的分型方法, 将 44 株鼠伤寒沙门菌分为 15 个亚型。结果显示, PFGE9 型

14 株、PFGE8 型 5 株、PFGE3 型 5 株, 这三型为广州市的优势菌型, 其中以 PFGE9 型最多, 占有菌株的 31.8%。PFGE3 型中的 26、27、31 号菌株, 12、19 号菌株, PFGE6 型中的所有菌株, PFGE9 型中的 23、24 号菌株, 1、3、4、5、11、13 号菌株聚类相似度为 100.0%, 这些彼此间相似度为 100.0% 的菌株可能来自同一克隆。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 2 44 株鼠伤寒沙门菌耐药表型分型

耐药表型	耐药谱	菌株数(n)
NY0	—	4
NY1	AMP	6
NY2-1	AMP+SAM	2
NY2-2	AMP+CHL	4
NY2-3	CHL+CIP	1
NY3-1	AMP+SAM+CHL	3
NY3-2	AMP+SAM+SXT	1
NY3-3	AMP+SAM+GEN	1
NY3-4	AMP+SAM+FEP	1
NY4-1	AMP+SAM+CHL+SXT	1
NY4-2	AMP+SAM+CHL+CIP	2
NY4-3	AMP+SAM+CEPH3+FEP	1
NY4-4	AMP+CHL+SXT+GEN	1
NY4-5	AMP+CHL+SXT+FEP	3
NY5-1	AMP+SAM+CHL+SXT+FEP	1
NY5-2	AMP+SAM+CHL+SXT+GEN	2
NY5-3	AMP+CHL+SXT+CIP+GEN	1
NY6-1	AMP+SAM+CHL+SXT+GEN+CIP	6
NY6-2	AMP+SAM+CHL+CEPH3+FEP+CIP	1
NY6-3	AMP+SAM+CHL+CEPH3+FEP+GEN	1
NY7-1	AMP+SAM+CHL+SXT+CEPH3+CIP+GEN	1

注: —表示无数据。

**2.3 耐药表型分型和 PFGE 分型的比较** 大多数 PFGE 型内各菌株的耐药表型非常类似。最主要的优势菌型 PFGE9 型有 14 株菌, 若按照聚类相似度 93% 为界限, 可将这 14 株鼠伤寒沙门菌分为两个亚型, 其中 15、22、23、24、38、41 号菌株为同一亚型, 1、3、4、5、8、9、11、13 号菌株为另一亚型, 前者只对 1~2 种抗菌药物耐药或者全敏感, 后者均为多重耐药菌, 耐药谱类似且耐药表型多为 NY6-1 型, 同一 PFGE 型的菌株的耐药表型并不完全一致。对聚类相似度为 100.0% 的菌株分析发现, 26、27、31 号菌株耐药表型完全相同, 12、19 号菌株耐药表型也完全相同, 35、37、44 号菌株耐药表型不同但耐药谱类似, 表明同一克隆的鼠伤寒沙门菌耐药表型可能有差异。二者比较的具体结果见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

**3 讨 论**

鼠伤寒沙门菌广泛存在于自然界中, 人类往往是因为食入带菌状态的食品或者饮用污染的水导致感染。近年来, 由于临床不合理使用抗菌药物及过度使用抗菌药物的家禽大便随意

排放到环境中,导致沙门菌耐药率逐年升高<sup>[7-8]</sup>,其中鼠伤寒沙门菌最为最严重<sup>[9]</sup>。本研究显示,鼠伤寒沙门菌对 AMP 耐药性高达 86.4%,对 SXT、SAM、CHL 的敏感性也降低。研究结果发现,鼠伤寒沙门菌对氟喹诺酮类中 CIP 虽然没有耐药菌,但是 29.5% 呈现中度敏感,与其他研究者报道的氟喹诺酮类耐药趋势一致<sup>[10]</sup>,可能与我国畜牧业长期大量投放此类抗菌药物进行养殖有一定的关系;也可能与鼠伤寒沙门菌产生变种有关<sup>[9]</sup>,具体有何关联尚不清楚。从耐药表型分型可看出,多重耐药菌高达 61.4%,说明广州市鼠伤寒沙门菌多重耐药形势较为严峻。2010 年广东省监测结果显示,鼠伤寒沙门菌是耐药率最高的血清型<sup>[9]</sup>,因此定期进行鼠伤寒沙门菌耐药性监测,掌握耐药菌变迁趋势,选择敏感药物指导临床用药是控制鼠伤寒沙门菌感染暴发流行的重要环节。

判断耐药谱相似的鼠伤寒沙门菌是否来自同一克隆株,以及这些菌株是否存在暴发感染,或者是否来自同种食物或者环境,需要相对准确的分子分型手段辅助<sup>[11]</sup>,这对传染病的控制起着非常重要的作用。用限制性内切酶 Xba I 将细菌染色体 DNA 切成不同大小的 DNA 片段进行 PFGE,根据所得的图谱进行聚类分析<sup>[12]</sup>,目前被认为是细菌分子流行病学的金标准。本研究结果显示,44 株鼠伤寒沙门菌可以分为 15 个 PFGE 型,带型呈现多样性,说明本地区人感染鼠伤寒沙门菌有较广的来源,其中有 14 株(31.8%)为 PFGE9 型,为广州市的优势菌型,提示在 2014~2015 年的某段时间内可能存在共同暴露源的鼠伤寒沙门菌的暴发流行,但需要结合流行病学调查进一步证实。如聚类分析图所示,多数 PFGE 带型聚类相似度在 90% 以上,遗传距离较近,属于同系克隆,说明变异中存在相对稳定性<sup>[13]</sup>。正是因为同系克隆,所以 PFGE 带型相同的菌株,其耐药谱比较类似。对于 PFGE 带型相同而耐药谱不同的现象可能与耐药基因发生突变有关,可能突变位点不在酶切位点上,导致耐药情况不能完全从 PFGE 分型上体现出来,但这需要进一步研究。

参考文献

[1] Deng X, Ran L, Wu S, et al. Laboratory-based surveillance of non-typhoidal Salmonella typhimurium infections in Guangdong Province, China [J]. Foodborne Pathog Dis, 2012, 9(4): 305-312.

[2] 黄燕惠,柯碧霞,孙九峰,等. 广东省 2009~2011 年鼠伤寒沙门菌监测及菌株分子分型的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(8): 917-924.

[3] Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, et al. Molecular analysis of Salmonella typhimurium enteritidis by pulsed-field

gel electrophoresis and ribotyping [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(5): 1070-1074.

[4] Soyer Y, Alcaine SD, Schoonmaker-Bopp DJ, et al. Pulsed-field gel electrophoresis diversity of human and bovine clinical Salmonella typhimurium isolates [J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(6): 707-717.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.

[6] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157: H7, Salmonella, and Shigella for Pulse Net [J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3(1): 59-67.

[7] 谭蓉. 使用喹诺酮类抗菌物人畜的排泄物对环境的污染[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(12): 1125-1127.

[8] 国彬,姚丽贤,何兆桓,等. 高效液相色谱法测定畜禽废物中磺胺类、喹诺酮类抗菌药物[J]. 环境化学, 2011, 30(12): 2054-2059.

[9] 梁兆铭,柯碧霞,邓小玲,等. 2010~2011 年广东地区人源主要血清型沙门菌喹诺酮耐药特征分析[J]. 华南预防医学, 2013, 39(6): 27-32.

[10] 郭宝俊,曹小燕,何昱苇. 135 株鼠伤寒沙门菌耐药酶检测及药物敏感性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(20): 4396-4398.

[11] 陈建才,樊粉霞,王淑京,等. 2006~2010 年中国鼠伤寒沙门菌分子分型分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(12): 1161-1166.

[12] 孙康德,李洁琼,陈福祥,等. 食源性沙门菌感染的实验室诊断及鼠伤寒沙门菌同源性分析[J]. 检验医学, 2012, 27(11): 913-916.

[13] 曲梅,黄芳,张新,等. 2008~2009 年北京市沙门菌流行特征和分子分型[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(2): 113-117.

(收稿日期:2016-01-28 修回日期:2016-03-22)



(上接第 1600 页)

[3] 刘冰,李晓瑜,万礼霞. FOXP3 基因在人类变应性鼻炎中的表达[J]. 实用医学杂志, 2010, 39(22): 4065-4067.

[4] 汤月芬,王立伟,施慎逊. 产后抑郁症生物学病因及评估的研究进展[J]. 中华精神科杂志, 2005, 38(2): 126-128.

[5] 高琳. Foxp3\_Fas\_FasL\_COMT 基因多态性与汉族寻常

型银屑病相关性分析[D]. 西安:第四军医大学, 2008.

[6] Gao L, Li K, Li F, et al. Polymorphisms in the FOXP3 gene in HAN chinese psoriasis patients [J]. J Dermatol SCI, 2010, 57(1): 51-56.

(收稿日期:2016-01-10 修回日期:2016-03-18)