

2014—2020年宁夏沙门菌分子分型与耐药性研究

郭邦成,李 娜,张燕飞,魏 琼,刘 翔,郝 琼

摘要:目的 分析2014—2020年宁夏食品及病例来源沙门菌耐药情况、流行优势血清型及PFGE型别。**方法** 对2014—2020年各类食品及临床病例中分离培养的188株沙门菌进行血清分型、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型和肉汤稀释法药物敏感性实验。**结果** 肠炎沙门菌在食品及病例中均为优势血清型,病例来源分离76株,占49.35%(76/154),食品来源分离18株,占52.94%(18/34),总构成比为50%(94/188)。188株不同来源沙门菌有182株出现不同程度的耐药,176株为多重耐药菌株。其中耐2~4种抗生素101株(55.49%),耐5~8种抗生素52株(28.57%),耐9~12种抗生素23株(6.59%)。将所有分离株经XbaI酶切,脉冲场凝胶电泳后,共获得93条PFGE带型,相似度为42.1%~97.1%,优势带型为NXSM0065型,其次为NXSM0074和NXSM0069,共41株,占所有分离株的21.81%。**结论** 宁夏地区沙门菌流行优势血清型为肠炎沙门菌,病例及食品来源分离株耐药状况普遍较为严重,不同来源,同一血清型PFGE带型同源性较高,且与耐药谱未体现出明显的关联性。

关键词:沙门氏菌;脉冲场凝胶电泳;耐药性

中图分类号:R378.2⁺ 2 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2022)02-0145-05

Molecular typing and drug resistance of *Salmonella* in Ningxia from 2014 to 2020

GUO Bang-cheng, LI Na, ZHANG Yan-fei, WEI Qiong, LIU Xiang, HAO Qiong

(Ningxia Hui Autonomous Region Centre for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750004, China)

Abstract: This study aimed to analyze the drug resistance, prevalent serotypes and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) types of *Salmonella* from food and case sources in Ningxia from 2014 to 2020. Serum typing, PFGE typing and broth dilution drug sensitivity tests were performed on 188 strains of *Salmonella* isolated from various foods and clinical cases from 2014 to 2020. *Salmonella enteritidis* was the predominant serotype in foods and clinical cases. A total of 76 strains (49.35%) and 18 strains (52.94%) were isolated from food, accounting for 50% (94/188). Among 188 *Salmonella* strains from various sources, 182 strains showed different levels of drug resistance, and 176 strains were multi-drug resistant. Among them, 101 strains (55.49%) were resistant to two to four antibiotics, 52 strains (28.57%) were resistant to five to eight antibiotics, and 23 strains (6.59%) were resistant to 9—12 antibiotics. After XbaI restriction enzyme digestion, 93 PFGE bands were obtained, and the similarity was 42.1%—97.1%. The dominant bands were NXSM0065, NXSM0074 and NXSM0069, representing 41 strains accounting for 21.81% of all isolates. The predominant serotype of *Salmonella* in Ningxia was *Salmonella enteritis*, and the drug resistance of clinical cases and food-derived isolates was generally severe. The same serotype of PFGE from different sources showed high homology and did not show an obvious correlation with the drug resistance spectrum.

Keywords: *Salmonella*; pulsed-field gel electrophoresis; drug resistance

National "13th Five Year" Infectious Disease Science and Technology Major Special Laboratory Monitoring Technology Platform Project (No. 2018ZX10713-003-002)

Corresponding author: Hao-Qiong, Email: haoq@163.com; ORCID: 0000-0003-3994-8483

国家“十三五”传染病科技重大专项实验室监测技术平台项目(No. 2018ZX10713-003-002)

通讯作者:郝 琼,Email:haoq@163.com;

ORCID: 0000-0003-3994-8483

作者单位:宁夏回族自治区疾病预防控制中心,银川 750004

沙门菌是一种人兽共患病病原菌,亦为食源性疾病暴发的主要病原菌,目前已发现血清型别多达2 700多种^[1],由沙门菌感染引起的患者人数呈快速上升趋势,WHO对沙门菌感染十分重视,早在

2000 年就成立世界范围的全球沙门菌监测系统^[2], 宁夏疾病预防控制中心从 2011 年起加入食品安全风险监测项目, 全面监测本地区食品及临床沙门菌的分布与传播, 及对常用抗菌药物的耐药程度。本研究对 2014—2020 年分离自食品和病例中的 188 株沙门菌进行血清型、耐药性及 PFGE 分子分型, 为深入了解宁夏地区不同来源沙门菌的耐药性及分子分型特点, 用于指导临床合理用药和肠道传染病的防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集宁夏 2014—2020 年 5 个市级食品安全风险监测点和 15 家食源性疾病哨点医院 188 株沙门菌, 生化鉴定、血清凝集复核后, 进行 PFGE 分子分型和药物敏感性实验。

1.2 试剂与设备

1.2.1 试剂 选择性平板(麦康凯、XLD)等购自环凯生物公司; 科玛嘉鉴定培养基购自法国 CHROMAgar 公司; 药敏平板购自上海星佰科技生物有限公司; 沙门氏菌诊断血清购自丹麦 SSI 公司; 限制性内切酶 *Xba* I 购自 NEB 公司; Seakem Glod 琼脂糖购自美国 LONZA 公司; Tris-HCl、SDS、ED-TA 等购自 Souarbio Life scienses 公司;

1.2.2 仪器 飞行质谱仪购自 Bruker 公司。凝胶成像仪及脉冲场凝胶电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司。全自动药敏判读仪、加样仪购自上海星佰科技生物有限公司。

1.3 菌株复核 将监测点上送可疑沙门菌分离株划线接种 MAC、XLD 及科玛嘉显色培养基 36 ℃ 培养 18 h, 挑取可疑菌落经飞行质谱仪鉴定, 沙门氏菌血清分型。

1.4 药敏试验 采用微量肉汤稀释法测定抗生素的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 具体按照上海星佰科技生物有限公司提供的操作步骤进行。

1.5 脉冲场凝胶电泳分型 按照国家致病菌识别网分型方案进行^[3-5]。沙门菌经过包埋固定、裂解、洗涤后, 采用 *Xba* I 酶切 2.5 h, 使用 Chef Mapper 脉冲场凝胶电泳分型, 电泳时间为 18 h, 电泳温度为 14 ℃, 脉冲时间为 2.16~63.8 s。凝胶使用 Gel-Red 染色后成像。

1.6 统计分析 使用 BioNumerics 软件处理 PFGE 成像谱图, 采用基于条带比较的 Dice 系数衡量 PFGE 带型之间的相似度, 相似度为 100% 被视为同一 PFGE 型。

2 结 果

2.1 血清型分布 2014—2020 年共分离沙门菌 188 株, 其中病人来源 154 株, 占所有分离株的 81.91%, 经血清鉴定, 共分属 19 个血清型, 以肠炎沙门菌为主, 占分离菌株的 49.35%, 其次为鼠伤寒沙氏菌, 占 22.08%; 食品来源 34 株, 分属 7 个血清型, 肠炎沙门菌亦为主要型别, 占 52.94%, 其次为沙门菌 II, 占 26.47%。无论是病例来源还是食品来源, 血清型均表现为多样性, 优势型别明显, 具体结果见表 1。

表 1 不同来源沙门菌血清学分型结果

Tab.1 Serotype results of *Salmonella* from various sources

分离菌株名称	病例来源		食品来源		总构成比/%
	菌株数	构成比/%	菌株数	构成比/%	
巴雷利沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
病牛沙菌	1	0.65	—	—	0.53
布利丹沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
肠炎沙门菌	76	49.35	18	52.94	50.00
都柏林沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
吉韦沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
喀普斯坦德沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
科瓦利斯沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
肯塔基沙门菌	8	5.19	—	—	4.26
伦敦沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
曼哈顿沙门菌	—	—	1	2.94	0.53
沙门菌 II	18	11.69	9	26.47	14.36
山夫登堡沙门菌	—	—	1	2.94	0.53
鼠伤寒沙门菌	34	22.08	3	8.82	19.68
汤卜逊沙门菌	3	1.95	—	—	1.60
休斯敦沙门菌	1	0.65	1	2.94	1.06
伊迪坎沙门菌	—	—	1	2.94	0.53
伊斯特本沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
易普逊沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
因切帕克沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
印第安纳沙门菌	2	1.30	—	—	1.06
婴儿沙门菌	1	0.65	—	—	0.53
合 计	154		34		100

2.2 药物敏感性试验结果 188 株沙门菌采用肉汤稀释法进行 14 种抗生素的药物敏感性试验, 182 株菌均出现不同程度的耐药和多重耐药。分离株对氨苄西林(AMP)、四环素(TET)、萘啶酸(NAL)、

头孢唑林(CFZ)均呈现较高的耐药性。病例和食品来源菌株绝大多数出现2~12种抗生素耐药现象。152株病例来源菌株发现17个耐药谱,30株食品来

源菌株发现6个耐药谱。不同来源菌株的优势耐药谱均为CHL-GEN-TET-CTX-AMP-CFZ-SXT(见表2、表3和表4)。

表2 不同来源沙门菌对14种抗生素耐药情况

Tab.2 Resistance of *Salmonella* from various sources to 14 antibiotics

药物名称	食品来源(n=152)				病例来源(n=30)			
	耐药数	中介数	敏感数	耐药率/%	耐药数	中介数	敏感数	耐药率/%
氨苄西林(AMP)	109	3	40	71.71	22	1	7	73.33
头孢他啶(CAZ)	15	—	137	9.87	3	—	27	10.00
亚胺培南(IMP)	0	7	145	0.00	0	3	27	0.00
四环素(TET)	114	—	38	75.00	22	—	8	73.33
萘啶酸(NAL)	99	—	53	65.13	20	—	10	66.67
多粘菌素E(CT)	19	17	116	12.50	4	4	22	13.33
头孢西丁(CFX)	10	2	140	6.58	2	—	28	6.67
氯霉素(CHL)	58	28	66	38.16	11	7	12	36.67
头孢噻肟(CTX)	53	—	99	34.87	10	—	20	33.33
头孢唑林(CFZ)	119	10	23	78.29	23	6	1	76.67
庆大霉素(GEN)	48	4	100	31.58	9	2	19	30.00
复方磺胺(SXT)	34	—	118	22.37	7	—	23	23.33
阿奇霉素(AZM)	24	—	128	15.79	5	—	25	16.67
环丙沙星(CIP)	15	—	137	9.87	3	—	27	10.00

表3 病例来源沙门菌耐药谱分布情况(n=30)

Tab.3 Distribution of the drug resistance spectrum of *Salmonella* from case source

耐药谱	菌株数	耐药率/%
NAL	2	6.67
NAL-TET-AMP	5	16.67
NAL-AMP-CFZ	6	20.00
NAL-TET-AMP-CFZ	13	43.33
CHL-GEN-TET-CTX-AMP-CFZ-SXT	2	6.67
CHL-NAL-GEN-TET-CTX-AMP-CFE-AZM-SXT	2	6.67

表4 食品来源沙门菌耐药谱分布情况(n=152)

Tab.4 Distribution of the drug resistance spectrum of *Salmonella* from food source

耐药谱	菌株数	耐药率/%
NAL	4	2.63
CHL-NAL	6	3.95
CHL-TET-CFZ	6	3.95

表4(续)

耐药谱	菌株数	耐药率/%
NAL-TET-AMP	12	7.89
NAL-AMP-CFZ	16	10.53
TET-AMP-CFZ-CT	11	7.24
NAL-GEN-AMP-CFZ	6	3.95
NAL-TET-AMP-CFZ	20	13.16
CHL-TET-AMP-CFZ-SXT	6	3.95
NAL-TET-CTX-AMP-CFZ	6	3.95
CHL-TET-CTX-AMP-CFZ-SXT	6	3.95
CHL-TET-AMP-CFZ-SXT-CT	6	3.95
CHL-GEN-TET-CTX-AMP-CFZ-SXT	20	13.16
CIP-GEN-CTX-AMP-CAZ-CFZ-AZM	6	3.95
CHL-NAL-GEN-TET-CTX-AMP-CFE-AZM-SXT	9	5.92
CIP-NAL-GEN-TET-CTX-CFX-AMP-CAZ-CFZ-AZM-SXT	6	3.95
CIP-CHL-NAL-GEN-TET-CTX-CFX-AMP-CAZ-CFZ-AZM-CT	6	3.95

2.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型结果 188 株不同来源分离株采用 *Xba*I 酶切后,共分为 93 个不同的 PFGE 带型,相似度为 42.1%~97.1%,优势带型为 NXSM0065 型为 15 株,占 7.99%;其次为 NX-SM0074 和 NXSM0069 型各 13 株,分别占 6.91% (见图 1)。

3 讨 论

近年来沙门菌在宁夏地区流行呈现以散发为主,部分地区时有小范围暴发。本研究对 2014—2020 年分离的 188 株沙门菌进行统计分析,多年来宁夏地区沙门菌流行特征未发生明显变化,分离株共分为 19 个血清型,病例和食品来源菌株血清型均表现为多样性,优势血清型明显,以肠炎沙门菌为主,其次为鼠伤寒沙门菌和沙门菌 II。与林茂锐等研究广东省以鼠伤寒沙门菌为主,其次为肠炎沙门菌不一致^[1]。

抗生素滥用是造成病原菌耐药问题日益突出的主要原因^[6-8]。从本研究结果来看,宁夏地区沙门菌耐药性十分严重,188 株分离株仅有 6 株为敏感菌株,多数来源于食品,其余菌株均出现不同程度的耐药性。尤其对氨苄西林(AMP)、四环素(TET)、萘啶酸(NAL)、头孢唑林(CFZ)均呈现较高的耐药性。其多重耐药情况也非常严重,152 株病例来源菌株发现 17 个耐药谱,耐 2~4 种抗生素 77 株(50.66%),耐 5~8 种抗生素 50 株(32.89%),耐 9~12 种抗生素 21 株(13.82%)。30 株食品来源菌株发现 6 个耐药谱,耐 2~4 种抗生素 24 株(80.00%),耐 5~8 种抗生素 2 株(6.67%),耐 9~12 种抗生素 2 株(6.67%)。不同来源菌株的优势耐药谱均为 CHL-GEN-TET-CTX-AMP-CFZ-SXT。从耐药谱来看,宁夏地区沙门菌对临幊上应用逐步减少的氨苄西林(AMP)、四环素(TET)、萘啶酸(NAL)仍然呈现高耐药性,间接表明在动物养殖方面存在该类抗生素的滥用现象。同时头孢唑林(CFZ)、头孢噻肟(CTX)等临幊一线抗生素亦呈现高耐药现象,从临幊和公共卫生角度值得我们高度关注。

PFGE 是近年来快速发展的传染性病原菌分子分型技术。依托这种技术和网络化实验室实时监测、交换和比对数据,可以及时发现、识别聚集性病例,为食源性传染病早期预测预警,暴发疫情与突发公共卫生事件的调查与现场处置提供了强有力的武器^[9-10]。本研究利用该技术分析了宁夏沙门菌 PFGE 利指纹图谱”特征与优势带型,积累了分子流行

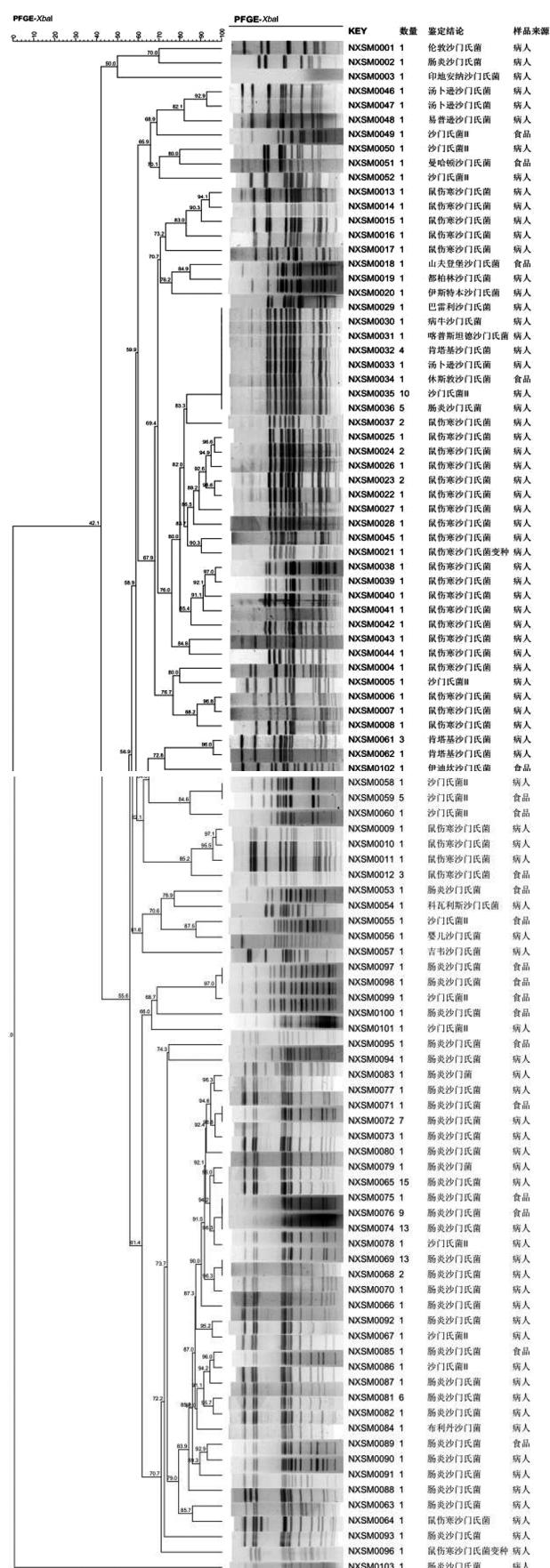


图 1 188 株沙门菌 PFGE 聚类分析图谱
Fig.1 PFGE cluster analysis of 188 *Salmonella* strains

病学基线数据;从分型结果来看,宁夏地区沙门菌无论病例来源还是食品来源,相同血清型菌株同源性较高,优势型别较为明显。耐药性和PFGE带型上没有体现出明显的关联性,同一耐药谱菌株PFGE型别呈现多样性,与林茂锐等对广东省沙门菌耐药性和分子分型研究结果相一致^[1]。

利益冲突:无

引用本文格式:郭邦成,李娜,张燕飞,等.2014—2020年宁夏沙门菌分子分型与耐药性研究[J].中国人兽共患病学报,2022,38(2):145-149. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2022.00.021

参考文献:

- [1] 林茂锐,周旋,李朋友,等.84株沙门菌耐药特征及分子分型结果分析[J].中国人兽共患病学报,2016,32(6):553-557. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2016.06.009
- [2] 赵嘉咏,张玉凯,谢志强,等.2011—2013年河南省肠炎沙门菌耐药与分子分型研究[J].2016,50(3):261-265. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.03.014
- [3] 赵嘉咏,张胜勇,张白帆,等.2013—2015年郑州67株甲型副伤寒沙门菌分子分型与耐药研究[J].中华预防医学杂志,2017,51(10):881-885. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2017.10.003
- [4] 孔筱筱,董晨,汪洋,等.江苏省2012—2015年伤寒/副伤寒沙门菌耐药及分子分型研究[J].中华流行病学杂志,2017,38(11):1546-1550. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.11.022
- [5] 白莉,李薇薇,韩海红,等.河南省4家大型屠宰场中预冷后肉鸡胴体沙门菌污染水平及耐药状况分析[J].中华预防医学杂志,2018,52(2):124-128. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2018.02.002
- [6] 柯碧霞,曾洪辉,何冬梅,等.广东省2007—2016年人源沙门菌流行现状及病原学特征[J].中华流行病学杂志,2018,39(1):63-66. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.01.013
- [7] 栗薇薇,陈晴晴,张竹慧,等.安徽省149例腹泻病例中的分离沙门菌耐药谱及耐药基因分析[J].中华预防医学杂志,2020,54(2):187-191. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2020.02.014
- [8] John AC, Maria SK, Melita AG, et al. Epidemiology, clinical Presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive salmonellainfections [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28 (4): 901-937. DOI: 10.1128/CMR.0000215
- [9] Wang J, Li Y, Xu X, et al. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in Shanghai, China [J]. Front Microbiol, 2017, 25 (5) 365-368. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00510
- [10] 龙冬玲,闫梅英,崔志刚,等.2012—2016年深圳4家医院感染性腹泻来源非伤寒沙门菌耐药研究[J].中华预防医学杂志,2017,51(12):1118-1121. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2017.12.013

收稿日期:2021-05-28 编辑:梁小洁

(上接第144页)

- [5] 李艳宇,李姗姗,高鹏.北京市东城区2017—2018监测年度H3N2亚型流感病毒HA1基因进化分析[J].中国病毒病杂志,2019,9(2):144-148. DOI:10.16505/j.2095-0136.2018.0082
- [6] Ramsay LC, Buchan SA, Stirling RG, et al. The impact of repeated vaccination on influenza vaccine effectiveness: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Med, 2019, 17 (24): 461-476. DOI:10.1186/s12916-017-0919-0
- [7] 范云燕,覃健敏,欧嵩凤,等.2019年南宁市季节性甲型H3N2流感病毒流行情况及HA和NA遗传特性分析[J].中国病原生物学杂志,2021,16(2):193-197,202. DOI:10.13350/j.cjpb.210213
- [8] 刘静. A型流感病毒通用VLPs疫苗的研究与通用抗体的评价[D].北京:北京协和医学院,2019.

- [9] Wilson I A, Cox N J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin[J]. Annu Rev Immunol, 1990, 8: 737-771. DOI:10.1146/annurev.iy.08.040190.003513
- [10] Shih AC, Hsiao TC, Shang H, et al. Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution[J]. PNAS, 2007, 104(15):6283-6288. DOI:10.1073/pnas.0701396104
- [11] 徐涛,万传君,崔海燕,等.2018—2019年度驻马店市新甲型H1N1流感病毒HA分子特征[J].河南预防医学杂志,2021,32(3):177-180. DOI:10.13515/j.cnki.hnjpm.1006-8414.2021.03.005

收稿日期:2021-08-26 编辑:梁小洁