

伤寒、副伤寒沙门菌耐药性以及 *viaB* 基因 PCR 分析

刘兴,李宁沙,陈立华,徐丹

长沙市第一医院检验科 湖南长沙 410005

摘要:目的:了解长沙地区伤寒、副伤寒沙门菌对抗生素的敏感性以及毒力基因的携带情况。

方法:纸片扩散法检测32株伤寒、副伤寒沙门菌对6种抗生素的敏感性;PCR扩增*viaB*基因

片断进行检测。**结果:**在测定的6种抗生素中,耐药性最高的为萘啶酸,耐药率达

37.5%,而敏感性较高的为头孢噻肟和环丙沙星,敏感率分别为100%和93.8%。32株伤寒和副伤寒沙门菌经PCR检测后,有19株伤寒沙门菌在约469bp处,检测到阳性条带,其余1株伤寒以及12株副伤寒沙门菌未检出*viaB*毒力基因。**结论:**第三代头孢和第三代的喹诺酮类抗生素仍可作为临床治疗伤寒副伤寒的首选药物,但应注意喹诺酮类药物的耐药趋势;*Vi*毒力基因在伤寒沙门菌中普遍存在,可广泛应用于疫苗制备和伤寒沙门菌的快速检测。

关键词:伤寒沙门菌;副伤寒沙门菌;抗生素敏感性;PCR

沙门菌属细菌在自然界分布广泛,是重要的人畜共患病原体,但伤寒沙门菌、甲型、乙型和丙型副伤寒沙门菌不同于其他血清型的沙门菌,仅感染人类和高级灵长类,在人类引起严重的侵袭性、系统性感染,即伤寒或副伤寒,也叫肠热症。本次研究收集了我院近年来分离到的伤寒和副伤寒菌株共32株,对32株均分别进行了药物敏感性实验以及毒力基因的PCR检测,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集长沙市第一医院2010—2013年的门诊或住院病人大便或血中分离的伤寒、副伤寒菌株共32株。

1.1.2 药敏纸片 抗生素共6种,氨苄西林,头孢噻肟、萘啶酸、环丙沙星,庆大霉素、复方新诺明均购自英国OXOID公司。

1.1.3 培养基及试剂 血平板、API 20E 革兰阴性菌鉴定卡均由梅里埃公司提供,沙门菌鉴定血清有宁波天润生物公司提供;引物以及PCR试剂均由大连宝生物

作者简介:刘兴(1977—),男,湖南资兴人,本科,主管技师,主要从事临床检验工作。

(Takara) Takara 技术有限责任公司提供，均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 分离培养与鉴定 将从临床病人的血或大便标本分离到的疑似菌株，接种到 API 20E 生化鉴定卡上，按试剂说明书进行操作，同时做血清学鉴定，生化和血清学均符合伤寒沙门菌和副伤寒沙门菌特征的菌株用磁珠保存备用。

1.2.2 药物敏感性测定 采用纸片扩散法，以大肠埃希菌 ATCC25922 作为药敏质控菌株，参考 2013 年 CLSI 标准判定结果。

1.2.3 viaB 基因的检测 PCR

Vi 抗原为覆盖在细菌细胞壁脂多糖外的荚膜多糖，是由 N-乙酰-D-半乳糖醛酸组成的线性多聚体，与细菌毒力有关, 参考 Hirose K^[1]等人的方法对 viaB 基因进行检测，上游引物为 5'-GTTATTTTCAGCATAAGGAG-3'，下游引物为 5'-CTTCCATACCACTTTCCG-3'。总反应体积为 50μl, 引物各 0.1μmol/L, dNTP 各 20μmol, 1U Taq DNA 聚合酶，产物长度为 469bp，退火温度为 55℃。扩增完后将 PCR 产物于 2%琼脂糖 80 伏进行电泳。

2 结果

2.1 经生化和血清学鉴定后，共分离到伤寒沙门菌20株；甲型副伤寒8株；乙型副伤寒2株。

2.2 6种抗生素对32株伤寒副伤寒菌的药敏结果（结果见附表），在测定的6种抗生素中，耐药性最高的为第一代喹诺酮类抗生素萘啶酸，耐药率达37.5%，而敏感性最高的为第三代头孢头孢噻肟，敏感率为100%。

表 1 32 株伤寒副伤寒菌对 6 种抗生素的药物敏感率结果（K-B 法）

抗生素	敏 感		中 介		耐 药	
	菌株数	率（%）	菌株数	率（%）	菌株数	率（%）
氨苄西林	29	90.6	0	0	3	9.4
头孢噻肟	32	100	0	0	0	0
萘啶酸	18	56.3	2	6.2	12	37.5
环丙沙星	30	93.8	0	0	2	6.2
庆大霉素	29	90.6	0	0	3	9.4
复方新诺明	28	87.5	0	0	4	12.5

2.3 viaB基因PCR检测结果

如图1所示，32株菌经PCR扩增后，11株菌未出现任何条带，包括了8株甲型副伤寒菌株、2株乙型副伤寒菌株以及1株伤寒沙门菌株；19株菌在约469bp处出现了明显阳性条带，19株菌均为伤寒沙门菌株，伤寒沙门菌20株；8株甲型副伤寒和2株乙型副伤寒沙门菌未出现任何条带，20株伤寒沙门菌有19株在约469bp处出现了明显阳性条带，仅1株未出现任何条带，阴阳性对照均成立。

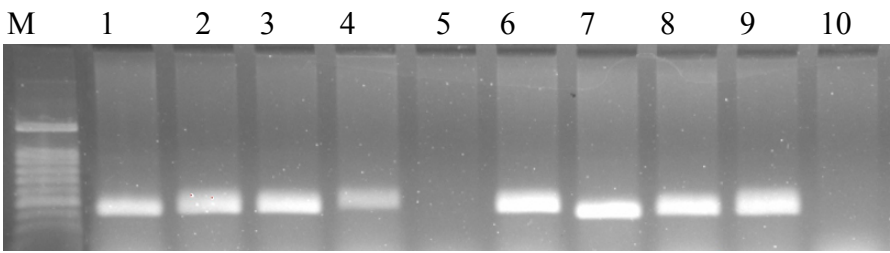


图 1： viaB 基因 PCR 产物电泳图

M 为 DNA Marker；1—8 为伤寒、副伤寒菌株；9 为阳性对照；10 为阴性对照

3 讨论

伤寒、副伤寒属于我国法定规定的乙类传染病，其传染性强、并发症多、疾病负担较重。伤寒和副伤寒通过粪一口途径传播，病人和带菌者是传染源，主要由污染的水、食物以及其他生活用品而传播，我国南方是主要的疾病流行地区。

目前针对伤寒以及副伤寒进行病原学治疗最根本最有效的措施就是积极采用针对性的抗菌药物，临床上推荐第三代喹诺酮类药物作为治疗伤寒、副伤寒的首选药物，孕妇和儿童宜用第三代头孢类药物。本次药敏实验，选取了氨苄西林和第三代头孢菌素头孢噻肟，头孢噻肟的敏感率为 100%，同时第三代喹诺酮类药物环丙沙星也有较高的敏感率 93.8%，这一结果与国内其他南方地区报道的一致^[2]，本次药敏结果中耐药率最高的是第一代喹诺酮类药物萘啶酸，敏感率仅为 37.5%，作为临床推荐的治疗伤寒和副伤寒的首选药物第三代喹诺酮类药物环丙沙星也出现了少部分的耐药菌株，这一结果应引起临床的重视，陈希莲等研究认为^[3]，对喹诺酮类药物的耐药机制有可能是因为菌株的喹诺酮类耐药基因决定区的 gyrA 基因的第 Ser83 位或 Asp87 位表现出高频突变所致，

对于伤寒和副伤寒的耐药的进一步监控和研机制究，应作为后续工作的重点。

Vi 抗原与细菌毒力相关，具有 Vi 抗原的菌体有抗吞噬和保护菌体抵抗相应抗体在补体参与下的溶菌作用，从而增强了菌株的毒力和致病力。Vi 抗原是沙门菌属的表面抗原，此抗原不稳定，不耐热，从机体新分离的伤寒和丙型副伤寒沙门菌副伤寒沙门菌常常具有 Vi 抗原，但经体外人工培养传代后易消失，本实验对所有伤寒和副伤寒菌株进行 viaB 基因的 PCR 扩增后，发现绝大多数伤寒沙门菌均携带本基因（仅一株未检出），而所有的甲型和乙型副伤寒却均未检出 viaB 毒力基因，这一结果也基本与研究相符。伤寒沙门菌对于 Vi 基因的高携带率，故也可应用于对伤寒沙门菌感染病人的快速检测，韦亦成^[4]等利用多重 PCR 的方法扩增 Vi 基因，对实际样本检测符合率达 100%，可作为临床确诊以及现场流行病学调查提供快速准确的实验室技术支持。Vi 抗原还被广泛用于制备 Vi 脂多糖疫苗，据观察伤寒 Vi 多糖菌苗单剂的保护效果大于 70% 以上，且在 5 岁以上人群接种后反应率低，免疫效果好^[5]。根据本次 Vi 基因 PCR 的实验结果，可以推测，Vi 疫苗在用于伤寒沙门菌的预防上应该具有良好的保护效果。

参考文献:

- [1] Hirose K, Itoh K, Nakajima H, et al. Selective Amplification of tyv(rfbE), prt(rfbS), viaB, and fliC Genes by Multiplex PCR for Identification of Salmonella of Salmonella enteric Serovars Typhi and Paratyphi A[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 633-636.
- [2] 林一曼, 邱亚群, 兰全学, 等. 深圳市 2002—2008 年分离 60 株伤寒沙门菌药物敏感性分析[J]. 实用预防医学, 2010, 1: 138—139
- [3] 陈希莲, 朱德全, 季海生. 甲型副伤寒沙门菌超广谱 β -内酰胺酶和喹诺酮类耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 18: 2749—2751

- [4] 韦亦成, 占利, 叶菊莲, 等. 多重 PCR 法鉴定伤寒沙门菌的研究[J]. 浙江预防医学, 2013, 25 (1) : 17—19.
- [5] 周伟忠, 曾明, 潘红星, 等. 伤寒 Vi 多糖疫苗的接种反应及其免疫效果[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 5: 425—427.