

2010–2016 年湖南省食源性 C 群沙门菌 耐药性及 PFGE 分型

陈帅, 贾华云, 王岚, 湛志飞, 张红, 蔡亮

湖南省疾病预防控制中心, 湖南省微生物分子生物学重点实验室, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 了解湖南省食源性 C 群沙门菌的耐药情况和分子分型特征。 **方法** 对湖南省 2010–2016 年分离自食品中 80 株 C 群沙门菌采用微量肉汤稀释法进行 7 种抗菌药物的敏感试验, 并且运用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对其进行分子分型。 **结果** 80 株食源性 C 群沙门菌对所有抗菌药物均敏感的有 24 株(占 30.00%), 其余 56 株(占 70.00%) 菌对至少 1 种抗菌药物耐药, 对三类或三类以上抗菌药物同时耐药的有多重耐药株有 27 株(占 33.75%); 80 株沙门菌 PFGE 聚类图谱分为 61 个型别, 相似度在 55.3%~100% 之间, 每个型别 1~7 株菌。 **结论** 2010–2016 年湖南省食源性 C 群沙门菌耐药情况严峻; 建立完善的病原菌分子分型本底数据库, 将提高对食源性疾病暴发的预警能力。

关键词: C 群沙门菌; 耐药性; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

中图分类号: R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006–3110(2017)11–1281–04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006–3110.2017.11.001

Antibiotic resistance and PFGE subtyping of foodborne Salmonella C-group in Hunan Province, 2010–2016

CHEN Shuai, JIA Hua-yun, WANG Lan, ZHAN Zhi-fei, ZHANG Hong, CAI Liang

Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Hunan Provincial Center
for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: WANG Lan, E-mail: 576792514@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the drug resistance and molecular typing characteristics of foodborne Salmonella C-group in Hunan Province. **Methods** A sensitive test of 7 antimicrobial agents was carried out by using micro-broth dilution method in 80 strains of C-group Salmonella isolated from food in Hunan Province during 2010–2016, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for the molecular typing. **Results** Among 80 strains of Salmonella C-group, 30.00% (24/80) strains were sensitive to all antimicrobial agents, and the remaining 70.00% (56/80) strains were resistant to at least 1 antimicrobial agent. There were 33.75% (27/80) strains simultaneously multiple resistant to three or more antimicrobial agents. Analysis of PFGE pattern cluster atlas in 80 strains of Salmonella obtained 61 types, and the genetic similarity coefficient was in the range of 55.3%–100%, with 1–7 strains per type. **Conclusions** The drug resistance of Salmonella C-group in Hunan Province during 2010–2016 is severe. To establish a perfect background database concerning molecular classification of pathogens will improve the ability of early warning of foodborne disease outbreaks.

Key words: Salmonella C-group; drug resistance; pulsed-field gel electrophoresis; molecular typing

沙门菌在自然界分布广泛, 既可寄生于人和动物的体内, 又可存在于水、肉类、蛋奶制品等食物中, 是最常见的引起食源性疾病的病原菌。近年来, 国内由于 C 群沙门菌引起的食物中毒报道屡见不鲜, 为了解湖南省 C 群沙门菌的耐药情况和分子型别分布特征, 对

基金项目: 湖南省卫生厅科研项目 (B2014–130); 湖南省卫生计生委科研项目 (C2016–030)

作者简介: 陈帅 (1984–), 女, 湖南人, 主管技师, 研究方向: 食品微生物检测。

通信作者: 王岚, E-mail: 576792514@qq.com。

湖南省 2010–2016 年食品安全风险监测系统中收集的分离自食品中的 80 株 C 群沙门菌进行耐药性分析和 PFGE 分子分型研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 本次研究菌株来源于 2010–2016 年湖南食品安全风险监测系统中收集的分离自食品中的 80 株 C 群沙门菌, 质控菌株大肠埃希菌 (ATCC25922)、布伦登卢普沙门菌 (H9812) 均由国家食品安全风险评估中心提供。

1.1.2 培养基试剂 XLD、营养琼脂购自广东环凯微生物科技有限公司;肠杆菌科和其它非苛养革兰阴性杆菌鉴定试剂盒 API 20E、VITEK2 GN 鉴定卡购自法国生物梅里埃公司;沙门菌属诊断血清(192 种因子)购自泰国 S&A 公司;微量细菌定量(MIC)药敏试剂盒购自天津金章科技发展有限公司;Sea Kem Gold 琼脂糖购自美国 LONZA 公司、5×TBE 缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司;EDTA、Tris-HCl、SDS、蛋白酶 K 购自美国 Sigma 公司;限制性内切酶 Xba I 购自大连宝生物公司,以上均在有效期内使用。

1.1.3 主要仪器 VITEK 2 Compact 全自动微生物生化鉴定仪和浊度计购自法国生物梅里埃公司、水浴摇床购自江苏金坛江南仪器厂、CHEF Mapper 脉冲场电泳仪和 Gel Doc XR+凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 沙门菌分离株血清学鉴定 血清学鉴定按《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》GB 4789.4-2010 操作;血清学分型鉴定结果依据 White-Kauffmann-Le Minor 抗原表(第 9 版)^[1]判断。

1.2.2 药敏试验 采用微量肉汤稀释法,包括下列 7 种抗菌药物:氨苄青霉素(AMP)、四环素(TET)、萘啶酸(NAL)、氯霉素(Chl)、头孢噻肟(CTX)、庆大霉素(GEN)、环丙沙星(CIP),结果参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)药敏试验标准进行耐药表型判定,质控株为大肠埃希菌(ATCC25922)。

1.2.3 脉冲场凝胶电泳 参照 TraNet China PFGE 标准化分型方法进行,以布伦登卢普沙门菌(H9812)作为分子量标记,待测的沙门菌经琼脂糖包埋,蛋白酶 K 裂解后,用限制性内切酶 Xba I 进行酶切,得到有限数目的大分子量 DNA 限制性片段,使用 Chef Mapper 脉冲场凝胶电泳仪进行电泳分型,最后将经 GelRed 染色

后成像的图谱导入 Bionumerics 6.6 软件进行聚类分析,PFGE 条带的相似度用 Dice 系数衡量,百分比越大说明菌株间亲缘关系越近,反之说明亲缘关系越远。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,率的比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 C 群沙门菌血清型分布 湖南省 2010-2016 年分离自食品中的 80 株 C 群沙门菌分为 29 个血清型;其中肯塔基沙门菌 14 株,占 17.5%;汤卜逊沙门菌 12 株,占 15%;其余各型菌株数量较少,分型结果及比例见表 1。

表 1 80 株 C 群沙门菌血清型分布

血清型	菌株数	构成比(%)	血清型	菌株数	构成比(%)
肯塔基沙门菌	14	17.50	姆班达卡沙门菌	1	1.25
汤卜逊沙门菌	12	15.00	门斯顿沙门菌	1	1.25
罗森沙门菌	5	6.25	门登沙门菌	1	1.25
科瓦利斯沙门菌	5	6.25	纽波特沙门菌	1	1.25
阿尔巴尼沙门菌	5	6.25	田纳西沙门菌	1	1.25
达布沙门菌	4	5.00	维尔肯沙门菌	1	1.25
波恩沙门菌	4	5.00	婴儿沙门菌	1	1.25
蒙得维的亚沙门菌	3	3.75	马吉拉菲尔沙门菌	1	1.25
科奇菲尔德沙门菌	2	2.50	里森沙门菌	1	1.25
布索沙门菌	2	2.50	雷希伏特沙门菌	1	1.25
布伦登卢普沙门菌	2	2.50	菲尔摩雷沙门菌	1	1.25
布卢克沙门菌	2	2.50	布伦卡斯沙门菌	1	1.25
波茨坦沙门菌	2	2.50	阿拉莫沙门菌	1	1.25
病牛沙门菌	2	2.50	阿巴沙门菌	1	1.25
奥格斯堡沙门菌	2	2.50	合计	80	100.00

2.2 药敏试验

2.2.1 总体耐药情况 对 80 株 C 群沙门菌分离株进行 7 种抗菌药物的敏感试验,对所有抗菌药物均敏感的菌株有 24 株(占 30.00%),其余 56 株(占 70.00%)对至少 1 种抗菌药物耐药。四环素耐药率最高(57.50%),其次是氨苄西林(36.25%)、环丙沙星(33.75%)、氯霉素(33.75%)和萘啶酸(31.25%);头孢噻肟(11.25%)和庆大霉素(7.50%)耐药率最低。见表 2。

表 2 各血清型菌株对 7 种抗菌药物耐药情况

血清型	菌株数	耐药菌株数(耐药率,%)						
		氨苄西林	四环素	萘啶酸	氯霉素	头孢噻肟	庆大霉素	环丙沙星
肯塔基沙门菌	14	4(28.57)	10(71.43)	6(42.86)	7(50.00)	2(14.29)	2(14.29)	10(71.43)
汤卜逊沙门菌	12	9(75.00)	10(83.33)	6(50.00)	8(66.67)	5(41.67)	1(8.33)	9(75.00)
罗森沙门菌	5	3(60.00)	4(80.00)	1(20.00)	1(20.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
科瓦利斯沙门菌	5	0(0.00)	4(80.00)	1(20.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(20.00)
阿尔巴尼沙门菌	5	5(100.00)	5(100.00)	4(80.00)	4(80.00)	1(20.00)	0(0.00)	1(20.00)
达布沙门菌	4	0(0.00)	2(50.00)	0(0.00)	2(50.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
波恩沙门菌	4	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
蒙得维的亚沙门菌	3	0(0.00)	1(33.33)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
其他	28	8(28.57)	10(35.71)	7(25.00)	5(17.86)	1(3.57)	3(10.71)	6(21.43)
合计	80	29(36.25)	46(57.50)	25(31.25)	27(33.75)	9(11.25)	6(7.50)	27(33.75)

2.2.2 不同血清型沙门菌耐药情况 肯塔基沙门菌对环丙沙星的耐药率(71.43%)明显高于 80 株沙门菌对环丙沙星的总体耐药率(33.75%) ($\chi^2 = 7.087, P = 0.008$); 汤卜逊沙门菌对氨苄西林、头孢噻肟、环丙沙星的耐药率(75.00%、41.67%、75.00%)明显高于 80 株沙门菌的总体耐药率(36.25%、11.25%、33.75%) ($\chi^2 = 6.463, 7.483, 7.454, P = 0.024, 0.017, 0.010$); 阿尔巴尼沙门菌对氨苄西林的耐药率(100.00%)明显高于 80 株沙门菌的总体耐药率(36.25%) ($\chi^2 = 7.969, P = 0.008$)。

2.2.3 多重耐药结果 见表 3。对三类或三类以上抗菌药物同时耐药的多重耐药株有 27 株,其中耐 3 类抗菌药物的有 8 株、耐 4 类抗菌药物的有 4 株、耐 5 类抗菌药物的有 8 株、耐 6 类抗菌药物的有 5 株、耐 7 类抗菌药物的有 2 株;从不同血清型来看,肯塔基沙门菌有 8 株多重耐药株、汤卜逊沙门菌有 9 株、罗森沙门菌有 1 株、阿尔巴尼沙门菌有 4 株、其他沙门菌有 5 株,其中汤卜逊沙门菌多重耐药率(75.00%)明显高于 80 株 C 群沙门菌总体多重耐药率(33.75%) ($\chi^2 = 7.454, P = 0.010$)。

表 3 各血清型菌株多重耐药谱测定结果

血清型	菌株数	多重耐药谱	多重耐药株		
			株数	合计	多重耐药率(%)
肯塔基沙门菌	14	TET-CHL-CIP	4	8	57.14
		AMP-NAL-FOT-CIP	1		
		AMP-TET-NAL-FOT-CIP	1		
		AMP-TET-NAL-CHL-GEN-CIP	2		
汤卜逊沙门菌	12	AMP-TET-CIP	1	9	75.00
		AMP-TET-FOT-CIP	1		
		AMP-TET-CHL-FOT-CIP	2		
		AMP-TET-NAL-CHL-CIP	3		
		AMP-TET-NAL-CHL-FOT-CIP	1		
		AMP-TET-NAL-CHL-FOT-GEN-CIP	1		
罗森沙门菌	5	AMP-TET-CHL	1	1	20.00
科瓦利斯沙门菌	5	-	0	0	0.00
阿尔巴尼沙门菌	5	AMP-TET-NAL-CHL	2	4	80.00
		AMP-TET-NAL-CHL-FOT	1		
达布沙门菌	4	-	0	0	0.00
波恩沙门菌	4	-	0	0	0.00
蒙得维的亚沙门菌	3	-	0	0	0.00
其他	28	TET-CHL-CIP	1	5	17.86
		AMP-TET-CHL	1		
		AMP-TET-NAL-CHL-GEN-CIP	2		
		AMP-TET-NAL-CHL-FOT-GEN-CIP	1		
合计	80	-	-	27	33.75

注:其他血清型包括阿巴沙门菌(1株)、布索沙门菌(1株)、奥古斯登堡沙门菌(1株)、门登沙门菌(1株)、维尔肖沙门菌(1株)。

2.3 PFGE 分型结果 80 株 C 群沙门菌通过 PFGE 分型为 61 个型别,相似度在 55.3%~100%之间,每个型别包括 1~7 株菌。同一血清型沙门菌 PFGE 图谱型并非完全相同。观察优势血清型的 PFGE 聚类图谱发现,14 株肯塔基沙门菌 PFGE 分为 10 个型别,分别命名 C1~C10,其相似度在 63%~100%之间,其中优势带型 C1 包括 5 株,其他型别各 1 株,根据型别相似性大于 85%归于同一克隆系列的原则^[2],14 株肯塔基沙门菌可分为 2 组克隆系列,第一组是 C1、C2、C3,其相似度在 93.7%;第二组是 C8、C9,其相似度在 92.9%,见图 1。12 株汤卜逊沙门菌分为 11 个型别,分别命名 S1~S11,其相似度在 64%~100%之间,其中优势带型 S5 包括 2 株,其他型别各 1 株,根据原则可分为 2 组克隆系列,第一组是 S1、S2,其相似度在 88.2%;第二组是 S5~S8,其相似度在 88.7%,见图 2。

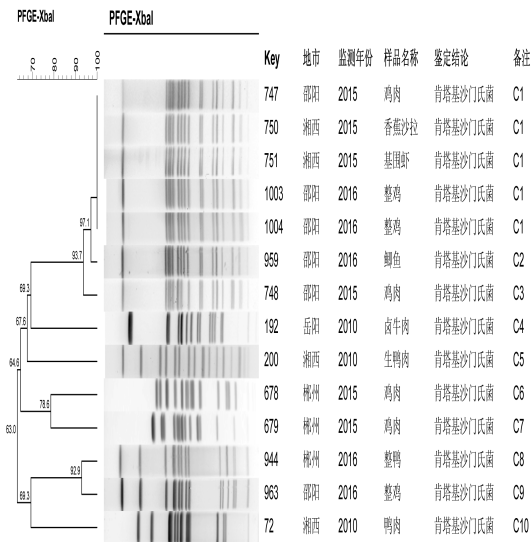


图 1 14 株肯塔基沙门菌聚类图

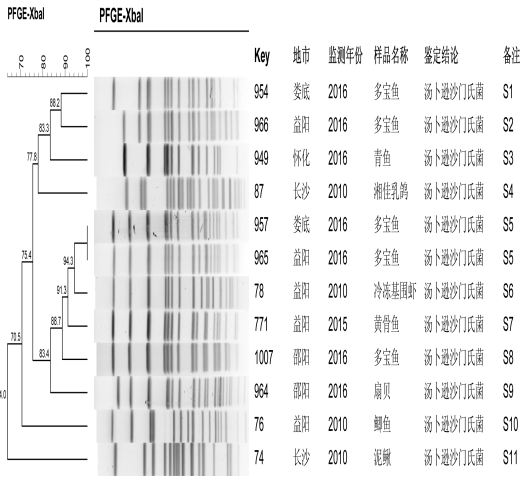


图 2 12 株汤卜逊沙门菌聚类图

3 讨论

沙门菌对于人体普遍易感,在我国大部分的细菌性食源性疾病是由沙门菌引起。抗菌药物是治疗食源性细菌感染的基本手段,而近年来由于抗菌药物的使用监管不够严格,使得细菌耐药问题日益严重。此次研究的药敏结果显示,湖南省以 C 群沙门菌为代表的肠道致病菌耐药情况十分严峻,对 6 类 7 种抗菌药物均存在不同程度的耐药,比较严重的是四环素(耐药率 57.5%)、氨苄西林(耐药率 36.25%)等临床常用的抗沙门菌感染药物,结果与国内相关研究相符^[3-5];喹诺酮类代表性药物环丙沙星一直是临床治疗沙门菌感染最有效的抗菌药物^[6],而此次研究结果显示,湖南省之前沙门菌对环丙沙星较敏感的情况^[3]正在发生改变,耐药率已达 33.75%,提示着湖南省沙门菌对喹诺酮类药物的耐药率正在逐渐上升,应加强对沙门菌的耐药监测。

从不同血清型沙门菌的耐药监测结果分析,肯塔基沙门菌对环丙沙星的耐药率以及汤卜逊沙门菌对氨苄西林、头孢噻肟、环丙沙星的耐药率明显高于总体耐药率,同时多重耐药结果也显示汤卜逊沙门菌的多重耐药率高于总体的多重耐药率,提示沙门菌血清型与抗菌药物耐药性存在一定的关联性,与张晓媛等的研究一致^[4]。肯塔基沙门菌和汤卜逊沙门菌这两种血清型是此次研究的 80 株沙门菌中的优势血清型,其主要食品来源分别为禽肉类和动物水产类。有文献显示,细菌的高耐药水平与养殖过程中不科学使用抗菌药物有直接关系^[7],我国每年抗菌药物原料生产量达 21 万吨,其中的 46.1% 约 9.7 万吨是用于畜牧养殖业^[8],而且自 20 世纪 70 年代开始我国就将喹诺酮类药物应用于水产养殖中防治病害,主要就是第二、三、四代喹诺酮药物^[9]。此次研究的沙门菌对喹诺酮类药物耐药情况提示了可能与禽畜水产养殖中抗菌药物的盲目滥用现象有关,应引起高度重视。

近年来由全球一体化带来的食品贸易国际化让食品的分发途径发生了根本的转变,同时也使得食源性疾病的发病形式逐渐由暴发转为多点散发。食源性疾病的传染源、传播途径的查找越来越依赖于分子溯源技术的辅助和确认。PFGE 分子分型技术由于重复性好、敏感性强、分辨率高等特点,已成为细菌分子流行病学的“金标准”^[10]。它不同于传统的血清学分型技

术,而是从 DNA 水平对细菌进行分子分型,通过比较菌株间 DNA 指纹图谱的相似度,将菌株间的亲缘关系联系起来。从本次研究结果来看,相同的沙门菌血清型可能有不同的基因型,PFGE 图谱型也可能存在差异。观察肯塔基沙门菌和汤卜逊沙门菌的聚类分析图发现,几组克隆系列的菌株(C1~C3、C8~C9、S1~S2、S5~S8)在采样时间、地区和食品类别上都存在差异,可菌株间在遗传角度上有一定的相关性,提示这些食品分离株之间从遗传角度来看有高度的同源性,是否有流行病学关联,有待进一步调查。如果能将湖南省不同时间、不同地区、不同食品来源的菌株都实时地进行 PFGE 分型,建立全省完善的病原菌分子分型本底数据库,并与其它省份甚至其它国家的 PFGE 图谱进行对比,对高度相似或相同的同一聚类菌株进行追踪监测和研究,将提高湖南省对食源性疾病暴发的预警能力,对传染病防控产生积极影响。

参考文献

- [1] 朱超,许学斌.沙门菌属血清型诊断[M].上海:同济大学出版社,2009:145-292.
- [2] Fakhr MK, Nolan LK, Logue CM. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5):2215-2219.
- [3] 王岚,贾华云,张红,等.湖南省食源性沙门菌血清型分布及耐药性研究[J]. 实用预防医学,2011,18(6):994-997.
- [4] 张晓媛,王迪,陈倩.北京市食源性非伤寒沙门菌的分子分型和耐药性研究[J]. 中国食品卫生杂志,2015,27(3):232-237.
- [5] 陈耀能,梁景涛,陈爱贞,等.佛山市食源性和人源沙门菌血清型分布与耐药性研究[J]. 热带医学杂志,2012,12(8):955-958.
- [6] 修宁宁,孙超,庄云菁.非伤寒沙门菌对喹诺酮类及头孢菌素类抗菌药物的耐药性研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(1):114-117.
- [7] Chen S, Zhao S, White DG, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats[J]. Appl Environ Microb, 2004, 70(1):1-7.
- [8] 陈敬雄,岳建群.养殖业抗生素使用现状及其对策[J]. 中国畜牧兽医文摘,2013,29(1):15-16.
- [9] 凌育芳,官少飞,欧阳敏.喹诺酮类药物在渔业的使用现状与发展趋势[J]. 江西农业学报,2010,22(12):157-160.
- [10] Ribot EM, Fair MA, Gautam R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the sub-typing of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet[J]. Foodborn Path Dis, 2006, 3(1):59-67.

收稿日期:2017-05-19