

长沙市某医院 2015 年夏季粪便分离的肠炎沙门菌的耐药性及聚集性分型分析

刘兴¹, 李宁沙¹, 陈立华¹, 徐丹¹, 夏昕²

1. 长沙市第一医院, 湖南 长沙 410005; 2. 湖南省疾病预防控制中心

摘要: **目的** 了解长沙市某医院 2015 年夏季从腹泻病人粪便中分离到的肠炎沙门菌的耐药性特征及其流行关系。**方法** 经生化和血清学鉴定后, 对分离自腹泻病人大便的 9 株肠炎沙门菌菌株进行药物敏感性试验; 脉冲场凝胶电泳对菌株进行 PFGE 分型分析。**结果** 通过生化和血清学实验共鉴定到 9 株肠炎沙门菌, 药敏试验中所有菌株对呋喃妥英耐药, 对亚胺培南、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明敏感, 对氨苄西林、氨基糖苷类及头孢类抗生素部分耐药。PFGE 结果显示 9 株菌株共分为四个带型, 相似度达到了 87.34%~96.30%, 分离时间接近的菌株, PFGE 带型一致。**结论** 肠炎沙门菌对抗菌药物的敏感性仍然较高, 但需注意产 β -内酰胺酶趋势。相同时期分离到的肠炎沙门菌菌株在流行病学上高度相关, 在长沙地区可能具有优势带型, 并且可能造成一定程度的传播。

关键词: 肠炎沙门菌; 抗菌药物敏感性; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R378 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2018)04-0499-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.04.032

在自然界中, 沙门菌属细菌分布广泛, 常引起人畜共病, 肠炎沙门菌属于无宿主特异性而有侵害性的病原菌之一, 近年来由肠炎沙门菌引起人的急性胃肠

作者简介: 刘兴 (1977-), 男, 湖南资兴人, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断工作。

通信作者: 夏昕, E-mail: xiaxincs@126.com。

炎 (食物中毒), 已严重侵害人类的健康, 2015 年夏季以来, 长沙市第一医院收治的急性胃肠炎的病人分离标本中, 发现肠炎沙门菌的检出率较往年亦有增多趋势, 故将 2015 年 6-9 月间腹泻病人大便标本中分离到的 9 株肠炎沙门菌进行了生化血清以及药敏学检验以及 PFGE 分子分型, 看是否有流行病学相关性, 现将结

陕西地区乙肝感染抵御能力较强, 但感染风险较高人群占比仍较大, 需加强疫苗免疫意识; (3) 乙肝免费强制接种效果显著, 需坚定不移的推行下去, 对于非强制注射人群, 需加强接种乙肝疫苗预防的宣传, 提高人群的保护意识; (4) 含有模式“12”占比较其他地区高, 说明陕西地区乙肝亚型感染及变异突出, 需引起重视, 仍需进行下一步的研究。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会. 慢性乙型肝炎防治指南 (2015 更新版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(12): 888-905.
- [2] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China-declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination [J]. Vaccine, 2009, 27(47): 6550-6557.
- [3] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Evaluation of the impact of hepatitis B vaccination among children born during 1992-2005 in China [J]. Infect Dis, 2009, 200(1): 39-47.
- [4] 苗伶俐. 榆林市城区居民 HBV 感染模式感染率及乙肝“两对半”感染模式的调查研究 [J]. 实用医技杂志, 2005, 12(5): 1344-1345.
- [5] 王菁, 邢瑞青, 张小宁, 等. 西安市灞桥区某村成人乙型和丙型肝炎感染流行病学调查 [J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(2): 121-123.

- [6] 张鹏, 解娟, 刘文康, 等. 2009-2014 年西安地区体检人群中肝炎病毒血清学检测回顾性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 135-140.
- [7] 屈梦, 安哲, 李丽华. 西安地区乙肝病毒和丙肝病毒的感染现状 [J]. 疾病监测与控制杂志, 2012, 6(2): 73-74.
- [8] 周丽鸿, 李筱清, 叶冬青, 等. 安徽省皖江地区自然人群乙型肝炎流行现状调查 [J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(2): 144-146.
- [9] 王景涛, 刘义庆, 张培莉, 等. 山东省立医院 2011-2013 年门诊及住院患者乙型肝炎病毒感染状况分析 [J]. 中华全科医学, 2015, 13(1): 6-8.
- [10] 张明红, 殷娟. 攀西地区人群乙肝血清标志物的表达模式检测结果分析 [J]. 医学信息, 2016, 29(17): 338-339.
- [11] 杨海, 杨月华, 王骥, 等. 西安地区不同职业人群 HBV 血清标志物常见模式 [J]. 流行病学与预防保健, 2009, 25(6): 611-613.
- [12] 高卫亚, 袁红萍, 杜忠祥, 等. 24 737 例乙型肝炎 HBsAg 阳性者的病毒血清学模式回顾性分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(19): 3371-3374.
- [13] 刘勇, 周锦勇, 潘金顺, 等. HBsAg 和抗 HBs 抗体同时阳性患者病毒学特征分析 [J]. 临床检验杂志, 2012, 30(11): 862-864.
- [14] 吴著球, 张学东. 58 331 例乙肝五项标志物定量检测不同模式分布分析 [J]. 现代预防医学, 2016, 43(9): 1691-1694.

收稿日期: 2017-10-30

果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集长沙市第一医院 2015 年夏季四个月内的门诊或住院病人大便和肛拭子中分离的肠炎沙门菌菌株共 9 株。

1.1.2 药敏纸片 抗菌药物共 10 种,氨苄西林、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明、呋喃妥英均购自英国 OXOID 公司。

1.1.3 生化及血清学试剂 API 20E 革兰阴性菌鉴定卡为生物梅里埃公司提供,沙门菌鉴定血清为宁波天润生物公司提供;均在有效期内使用。

1.1.4 PFGE 试剂 SeaKem Gold Agarose 为 Cambraex Bio Science Rockland 公司提供;限制性内切酶 Xba I 为大连宝生物工程公司提供;蛋白酶 K 为 MERCK 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 将临床病人的大便标本接种到 XLD 平板上分离到的疑似沙门菌属菌株,接种到 API 20E 生化鉴定卡上,同时用沙门菌属诊断血清学做血清学鉴定,生化和血清学均符合肠炎沙门菌特征的菌株用半固体保存备用。

1.2.2 药物敏感性测定 采用纸片扩散法,以大肠埃希菌 ATCC 25922 作为药敏质控菌株,参考 2014 年 CLSI 标准判定结果。

1.2.3 PFGE 试验 参考中国 CDC PulseNet China 网络中心实验室的沙门菌属脉冲场凝胶电泳(PFGE)标准操作方案的方法进行 PFGE 分型^[1]。纯培养菌株,经蛋白酶 K 裂解后,再用 Xba I 在 37 ℃ 进行酶切,Marker 为沙门菌 H9812 标准菌株,酶切后经脉冲场电泳 18 h,起始脉冲时间:2.16 s;终止脉冲时间:63.8 s;电压:6 V/cm;电泳温度:14 ℃,电场夹角 120°,电泳完毕用 Gelred 染色约 30 min 后,再用凝胶成像仪读取结果,tif 图像读取后用 BioNumerics 数据库软件处理,经 Marker 内校准后,识别图像条带,并标明位置;最后用聚类树形图类型选择 UPGMA(unweighted pair group method with averages)方法分析结果,不同带型的电泳条带的相似性采用 Dice 系数表示。

2 结果

2.1 生化及血清学结果 将所有生化结果复合沙门菌属的菌株收集后,进行进一步血清学分型,最后共分

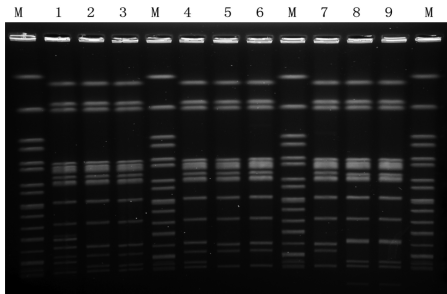
离到 9 株血清型的抗原式为 1,9,12:g,m:-的菌株,即为肠炎沙门菌菌株,根据分离菌株的时间顺序,把菌株编为 1~9 号菌株。

2.2 10 种抗菌药物对 9 株肠炎沙门菌的药敏结果见表 1。在测定的 10 种抗菌药物中,9 株肠炎沙门菌全部对呋喃妥英耐药,全部对亚胺培南、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明敏感,对氨苄西林、氨曲南及头孢类抗生素部分耐药。

表 1 9 株肠炎沙门菌对 10 种抗生素的药物敏感率结果(K-B 法)

抗生素	1	2	3	4	5	6	7	8	9
氨苄西林	R	R	R	R	S	R	R	R	R
头孢曲松	R	S	S	S	S	R	R	S	S
头孢他啶	R	S	S	S	S	R	R	S	S
头孢吡肟	R	S	S	S	S	R	R	S	S
氨曲南	R	S	S	S	S	R	R	S	S
亚胺培南	S	S	S	S	S	S	S	S	S
环丙沙星	S	S	S	S	S	S	S	S	S
左氧氟沙星	S	S	S	S	S	S	S	S	S
复方新诺明	S	S	S	S	S	S	S	S	S
呋喃妥英	R	R	R	R	R	R	R	R	R

2.3 PFGE 试验 9 株肠炎沙门菌经脉冲场凝胶电泳后,共分为 4 个 PFGE 型,四个带型之间的相似度较高,相似度达到了 87.34%~96.30%,分离时间相近的菌株中条带有一致的现象,可能为社区感染的同一克隆群;PFGE 电泳的图谱结果见图 1,PFGE 分型分析结果见图 2。



注:泳道 1、5、9、13 为 Marker H9812,其余泳道为肠炎沙门菌菌株 1~9 号。

图 1 9 株肠炎沙门菌 PFGE 电泳图谱

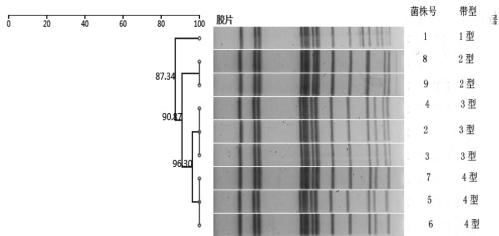


图 2 9 株肠炎沙门菌 PFGE 分型软件分析结果

3 讨论

夏季天气炎热,为细菌感染性腹泻高发期,长沙市

近年来从食品标本中分离到的沙门菌属中也发现,肠炎沙门菌所占的比例约为 7.15% 占第二位,仅次于鼠伤寒沙门菌^[2],沙门菌属中的肠炎沙门菌主要通过污染食品和水源经口感染,夏秋季高发,可出现胃肠炎症状,如果破坏肠粘膜,通过淋巴系统进入血流,也可引起全身感染,常见症状为发热、腹部痉挛性腹痛、腹泻,儿童和免疫力低下者,容易发生并发症,甚至死亡。本院于 2015 年夏季收治的疑似肠炎沙门菌感染的病人中,以儿童多见,病情个别较重,但均已得到有效控制和治理,并康复出院。

沙门菌属细菌引起的食物中毒或者感染性腹泻,一般推荐可使用的抗菌药物有氨苄西林、头孢类、喹诺酮类以及磺胺类,本次药敏实验也选择了 10 种包括以上这几类常用的抗菌药物来进行药敏实验,10 种抗菌药物中,极易产生耐药性的喹诺酮类的环丙沙星、左氧氟沙星和磺胺类的复方新诺明均达到了百分百的敏感性,仍然可作为治疗和预防的首选药物,对新型抗菌药物亚胺培南也非常敏感,仅对呋喃妥英全部耐药,对氨苄西林、氨基糖苷及头孢类抗生素部分耐药,整体来说耐药情势还比较乐观,这一特点与我国其他省份的耐药情况大体一致^[3-5]。在本院的病例中,儿童为主要感染人群,应当注意的是虽然肠炎沙门菌对喹诺酮类药物敏感,但副作用如影响儿童软骨发育需慎用,青霉素和头孢类抗生素相对于其他抗菌药物对儿童毒副作用小,但在本次药敏实验中发现了Ⅲ、Ⅳ代头孢类抗生素的耐药株,故建议医生在选择临床药物时,要重视药敏实验来指导临床用药,应全面结合病人和药敏结果,在达到治疗效果的同时尽量避免耐药菌株的产生。本次实验中,还发现有 3 株肠炎沙门菌,同时对氨苄西林、氨基糖苷及三代和四代头孢类抗生素耐药,这种多重耐药趋势应引起高度重视。

这几例因大便中分离到肠炎沙门菌而确诊的患者中,居住或临时居住地均在长沙市内,并且发病时间接近,均在三个月以内,有可能有流行病学的相关性,故而将其做了 PFGE 分子分型分析,看菌株间是否存在关联,分离的肠炎沙门菌菌株按照分离时间顺序,分别编为 1~9 号,9 株肠炎沙门菌经聚类分析后,发现共分为 4 个 PFGE 带型,相似率在 87.34%~96.30% 之间,1 号菌分离的时间最早,与其余菌株间隔时间略长,带型也与其余菌株的带型差异最大,为带型 1,与其余 8 个菌株的 PFGE 带型有 4~6 个条带的变化,这些分离株可能是遗传上相关的,但并不是紧密相关的,其流行病学关系也并不太相关。其余 2~9 号菌株间总的带型相似率在 90.87% 以上,而且从图谱上看,接近时间段分

离到的菌株带型完全相同,不同带型之间比较发现,也仅有两到三个条带的略为不同,根据 Tenover 等^[6]多年的研究原则分析,这些菌株可以被认为是高度相关的。暴发流行相关的菌株如果发生点突变、插入或 DNA 缺失,典型的情况下,这种变化可导致 2~3 条带的差异,可以认为它仍然属于暴发带型的衍生株,在流行病学上具有高度相关性。其中 3 型和 4 型带型各有 3 株菌完全相同,且两型之间的相似度也高达 96.30%,从图谱上看,也仅有一个条带的不同,这些菌株认为是紧密相关的菌株,可能是仅有一次的基因事件引起的带型变化,这种情况在一些分离菌株被多次重复培养或自同一病人多次分离时可发生,但是仍然认为其在遗传角度是有高度同源性的,极有可能为同一来源的肠炎沙门菌社区感染的同一克隆群,只是在传播的过程中,个别菌株发生了单基因的极微小的变异,但流行病学关系仍然高度相关。通过 PFGE 分型也发现,PFGE 带型一致的,药敏结果基本一致,除了带型 4 的菌株 5 与同型别的菌株 6 和菌株 7 在对氨苄西林和头孢类和氨基糖苷的耐药性上有差异外,根据耐药表型,推测对其耐药的菌株可能是产生了 β -内酰胺酶,该酶的基因可位于可传递的质粒上,因此也有可能发生丢失。

综上所述,可以认为 2015 年夏季,肠炎沙门菌可能在长沙地区引起了部分的流行,从药敏实验结果来看,耐药趋势还不严峻,但应注意有些菌株可能携带有 β -内酰胺酶的质粒,从而对青霉素头孢类抗生素均耐药,从分子分型实验结果分析,肠炎沙门菌有一定的流行优势群,不同菌株间具有一定的流行相关性。

参考文献

- [1] Ribot EM, Fair MA, Gautam R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2006, 3(1): 59-67.
- [2] 杨柳青, 欧新华, 贾华云, 等. 长沙市沙门菌表型特征及 PFGE 分子分型 [J]. *实用预防医学*, 2016, 23(1): 39-42.
- [3] 杨元斌, 宋启发, 闫鹏, 等. 2003-2014 年浙江省宁波市肠炎沙门菌分子分型及耐药特征研究 [J]. *疾病监测*, 2016, 31(12): 1007-1011.
- [4] 王红梅, 王和平, 雷旻, 等. 深圳市儿童医院儿童粪便分离的 459 株沙门菌分布特征及耐药性 [J]. *中国感染控制杂志*, 2016, 15(11): 817-820.
- [5] 刘谢, 柯碧霞, 何冬梅, 等. 2007-2013 年广东省肠炎沙门菌耐药情况分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2015, 19(3): 269-272.
- [6] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-2239.