

# 长沙市沙门菌表型特征及PFGE分子分型研究

杨柳青<sup>1</sup>、欧新华<sup>1</sup>、贾华云<sup>2</sup>、苏良<sup>1</sup>、刘晓蕾<sup>1</sup>、王岚<sup>2</sup>

1.长沙市疾病预防控制中心（湖南 长沙 410001）;2.湖南省疾病预防控制中心（湖南 长沙 410005）

**摘要:目的** 研究长沙市沙门菌的血清型分布、耐药特点及分子流行病学特征。

**方法** 对分离自长沙地区食源性粪便标本及市售食品中的70株沙门菌，用玻片凝集试验确定血清型，微量肉汤稀释法检测14种抗生素的敏感性，脉冲场凝胶电泳（PFGE）进行分子分型。

**结果** 鼠伤寒沙门菌为优势血清型，占51.43%，其次是肠炎沙门菌，占7.15%。在抗生素敏感性测试中，对氨苄青霉素、磺胺嘧啶和氯霉素的耐药率较高，分别为68.57%、61.43%和57.14%。

62.86%（44/70）的沙门菌呈多重耐药，且鼠伤寒沙门菌的多重耐药率比其他血清型高（ $\chi^2=7.068$ ， $P\leq 0.01$ ），差别有统计学意义。PFGE分型结果显示69株沙门菌按照100%的相似度可分为57个PFGE型，36株鼠伤寒沙门菌可分为4个聚类，相似度在58.1%~100%之间。**结论** 本市的沙门菌以鼠伤寒和肠炎沙门菌为主，PFGE分型结果显示可能存在沙门菌的流行株，且菌株耐药形势严峻。

**关键词:**沙门菌；血清学；药物敏感性；脉冲场凝胶电泳

Title

Author

affil

**Abstract:Objective** To study the stereotyping, drug resistance and the molecular epidemiological characteristics of Salmonella in Changsha. **Methods** 70 Salmonella strains that isolated from stool specimens of foodborne disease and foods in Changsha were identified by stereotyping. The antimicrobial susceptibilities were determined by broth microdilution method and 14 antimicrobial agents were chosen and examined. Homology analysis was performed with PFGE according to the protocols of PulseNet. **Results** The dominant Salmonella serovars were Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis, accounting for 51.43% and 7.15% respectively. In the antimicrobial susceptibilities testing, the highest resistant rates were found in Ampicillin (68.57%), Sulfadiazine (61.43%) and chloramphenicol (57.14%). 62.86% salmonella strains were multi-drug resistant isolates. And a significant difference was observed for multidrug resistance between Salmonella typhimurium and other Salmonella serovars. All the isolates were divided into 57 PFGE type according to similarity 100%. The similarity coefficient of 36 isolates of Salmonella typhimurium

基金:湖南省卫生厅科研项目（B2014-130）

作者简介:杨柳青,女,本科学历,主管技师,主要从事食源性致病菌及病原微生物研究。邮箱:[21182518@qq.com](mailto:21182518@qq.com)

通讯作者:王岚 邮箱: [576792514@qq.com](mailto:576792514@qq.com)

that divided into four Clusters were between 58.1% and 100%. **Conclusion** Our findings indicated that *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* were the dominant *Salmonella* serovars. And PFGE result showed that there were epidemic strains in Changsha. Additionally, antibiotic resistance of *Salmonella* was in serious situation.

**Key words:** *Salmonella*; Serology; Drug resistance; PFGE

在国家卫计委关于2013年全国食物中毒事件情况的通报中,微生物性食物中毒事件中中毒人数最多,占食物中毒事件总中毒人数的60.4%,主要是由沙门菌、副溶血性弧菌等引起的细菌性食物中毒。沙门菌广泛存在于自然界,可以引起的症状有伤寒、副伤寒性、胃肠炎、败血症和局部感染等。为了掌握长沙市沙门菌的流行和耐药情况,我们对2012-2013年从食品和食源性疾病病例中分离的70株沙门菌进行了血清型研究和药敏试验,并用PFGE分型方法对流行菌株进行分子分型以揭示菌株之间的同源性。为控制沙门菌污染,指导临床合理使用抗生素和防控食源性疾病提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

2012-2013年本实验室分离的沙门菌共70株,其中55株分离自长沙地区食源性疾病的粪便标本中。15株分离于市售食品中(主要来源生禽肉、生畜肉和水产品)。所有菌株均使用API 20E进行生化鉴定。药敏试验用质控菌株大肠埃希氏菌ATCC25922, PFGE相对分子量标准用布伦登卢普沙门菌H9812,均由国家食品安全风险评估中心提供。

### 1.2 培养基和试剂

BPW、BGB、TTB、SC增菌液、BS、XLD、营养琼脂、BHA培养基购自广东环凯微生物科技有限公司; API 20E生化试剂盒购自法国生物梅里埃; 沙门菌诊断血清购自泰国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; SeaKemGold琼脂糖, 10×TBE缓冲液购自美国Bio-Rad公司; SDS、蛋白酶K购自美国Sigma公司; 限制性内切酶XbaI购自大连宝生物; 上述实验材料均在有效期内使用。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 沙门菌的检测

按照GB 4789.4—2010《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行沙门菌分离与鉴定。

#### 1.3.2 血清型测定

沙门菌的血清分型方法按照泰国S&A公司提供的沙门菌血清诊断操作步骤

进行，根据Kauffmann-White表确定沙门菌的血清型。

1.3.3 药敏试验

药敏试验采用CLSI推荐的微量肉汤稀释法，参照CLSI微生物药物敏感性试验执行标准进行结果判定，判断结果分为敏感、中介和耐药3种。

1.3.4 PFGE分型

参照美国PulseNet PFGE标准化分型方法进行。沙门菌经琼脂糖固定、裂解、洗涤后，包埋的DNA在37℃水浴中使用40U的XbaI酶切至少2h。得到的DNA片段使用Chef Mapper脉冲场凝胶电泳分型，电泳缓冲液为0.5×TBE，电泳时间为18.5 h，电泳温度为14℃，脉冲时间为2.16～63.8 s。凝胶使用GelRed染色后成像，PFGE成像结果使用BioNumerics 6.6软件采用UPGMA方法进行聚类分析，PFGE带型之间的相似度采用Dice系数来衡量，确定沙门菌的基因型和同源关系。

2 结果

2.1血清学分型 70株沙门菌分为22个血清型。其中鼠伤寒沙门菌36株，占51.43%。肠炎沙门菌5株，占7.15%。斯坦利沙门菌4株，占5.72%。阿贡纳沙门菌、德尔比沙门菌、汤卜逊沙门菌、山夫登堡沙门菌、新加坡沙门菌各2株，未定型1株，其余14个血清型各1株，见表1。

表 1 70 株沙门菌血清型分布

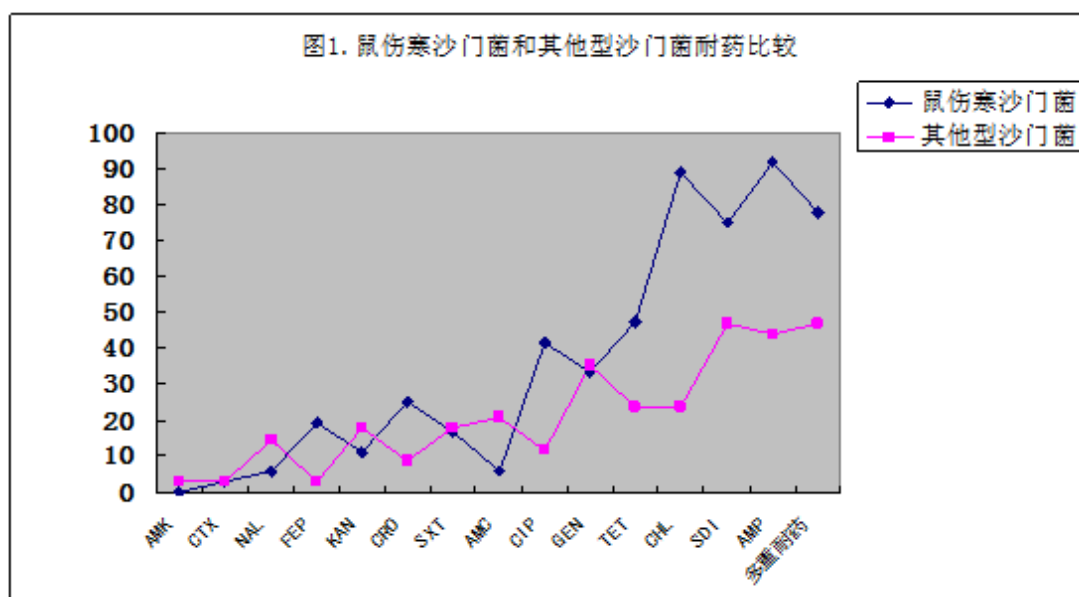
血清型	菌株数	构成比 (%)	血清型	菌株数	构成比 (%)
鼠伤寒沙门菌	36	51.43	自贡沙门菌	1	1.43
肠炎沙门菌	5	7.15	赫尔沙门菌	1	1.43
斯坦利沙门菌	4	5.72	阿富拉沙门菌	1	1.43
阿贡纳沙门菌	2	2.85	瓦伊勒沙门菌	1	1.43
德尔比沙门菌	2	2.85	病牛沙门菌	1	1.43
汤卜逊沙门菌	2	2.85	利文斯通沙门菌	1	1.43
山夫登堡沙门菌	2	2.85	印第安纳沙门菌	1	1.43
新加坡沙门菌	2	2.85	加里玛沙门菌	1	1.43
阿拉莫沙门菌	1	1.43	盖勒特匹沙门菌	1	1.43
猪伤寒沙门菌	1	1.43	纽波特沙门菌	1	1.43
舒卜拉沙门菌	1	1.43	未定型	1	1.43

罗森沙门菌	1	1.43	合计	70	100.00
-------	---	------	----	----	--------

2.2 药敏结果分析 70 株沙门菌对阿米卡星、头孢噻肟和萘啶酸最敏感，敏感率达 90%以上；对氨苄青霉素、磺胺嘧啶和氯霉素的耐药性高，耐药率分别为 68.57%、61.43%及 57.14%。对比 37 株鼠伤寒沙门菌和其他血清型 33 株沙门菌，鼠伤寒沙门菌和其他型沙门菌对氨苄青霉素、磺胺嘧啶和氯霉素的耐药百分率分别为 91.67/44.12、75.00/47.06 和 88.89/23.53，鼠伤寒沙门菌对上述三种药物的耐药率更高， $\chi^2$  值分别为 18.34、5.76 及 30.5，P 值均 $\leq 0.05$ ，差别有统计学意义。（见表 2、图 1）

表 2 长沙市 70 株沙门菌对 14 种抗生素的耐药性（%）

抗生素	敏 感	中 介	耐 药
	百分率(%)	百分率(%)	百分率(%)
阿米卡星（AMK）	98.57	0.00	1.43
头孢噻肟(CTX)	95.72	1.43	2.85
萘啶酸(NAL)	90.00	—	10.00
头孢吡肟（FEP）	85.72	2.85	11.43
卡拉霉素（KAN）	84.28	1.43	14.29
头孢曲松（CRO）	82.86	0.00	17.14
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑 (SXT)	82.86	—	17.14
阿莫西林-克拉维酸 （AMC）	77.14	10.00	12.86
环丙沙星(CIP)	71.43	1.43	27.14
庆大霉素(GEN)	64.28	1.43	34.29
四环素（TET）	62.86	1.43	35.71
氯霉素(CHL)	40.00	2.85	57.14
磺胺嘧啶（SDI）	38.57	—	61.43
氨苄青霉素（AMP）	28.58	2.85	68.57



多重耐药结果显示，78.57%（55/70）的沙门菌至少对14种抗生素中的一种以上抗生素耐药，62.86%（44/70）的沙门菌对3类以上的抗生素耐药。其中耐5种抗生素的最多，多达15株，有1株舒卜拉沙门菌对14种抗生素全部耐药。对比鼠伤寒沙门菌和其他血清型沙门菌的多重耐药，结果表明耐3类以上抗生素的鼠伤寒沙门菌为77.78%(28/36)，其他血清型为47.06%（16/34），鼠伤寒沙门菌的多重耐药率比其他血清型高（ $\chi^2=7.068$ ， $P\leq 0.01$ ），差别有统计学意义。（见图1.2）

3.PFGE分型结果 除一株沙门菌DNA降解未获得图谱外，其他69株沙门菌按照100%的相似度可分为57个PFGE型，分别命名为P1-P57。其中优势型P28共5株，P20、P56型各3株，P17、P24、P26、P54型各2株，其余51个型相对独立。（见图2。）36株鼠伤寒沙门菌的相似度在58.1%~100%之间。根据带型相似度 $\geq 85\%$ 归为同一克隆系的原则（聚集）<sup>[1]</sup>，36株鼠伤寒沙门菌可分为4组大的克隆系，其中克隆系I 12株，克隆系II 5株，克隆系III 8株，克隆系IV 2株。克隆系I和克隆系III中既有病人株也有食品株。（见图3。）

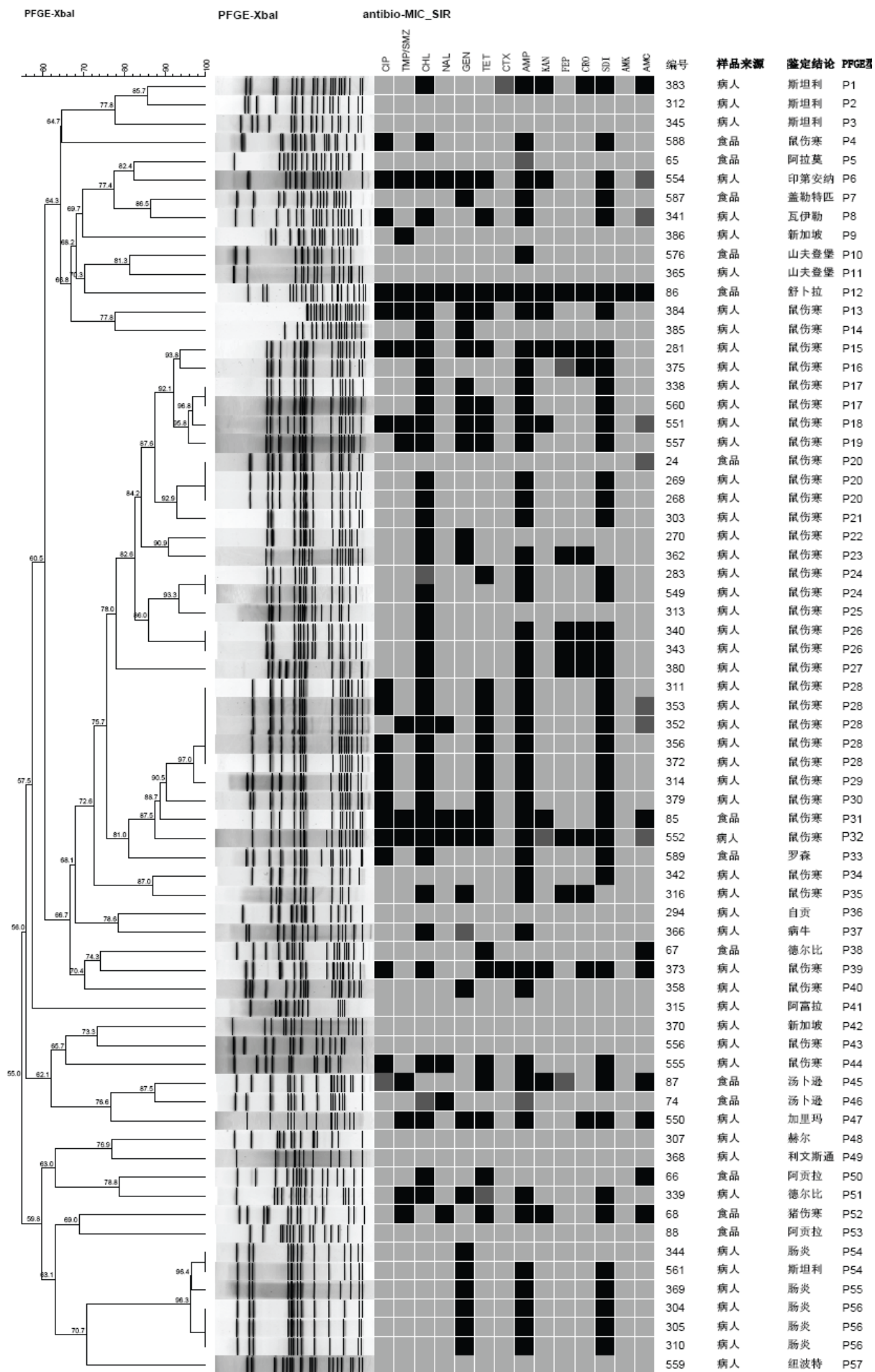


图2 长沙市70株沙门菌PFGE及抗生素耐药图谱

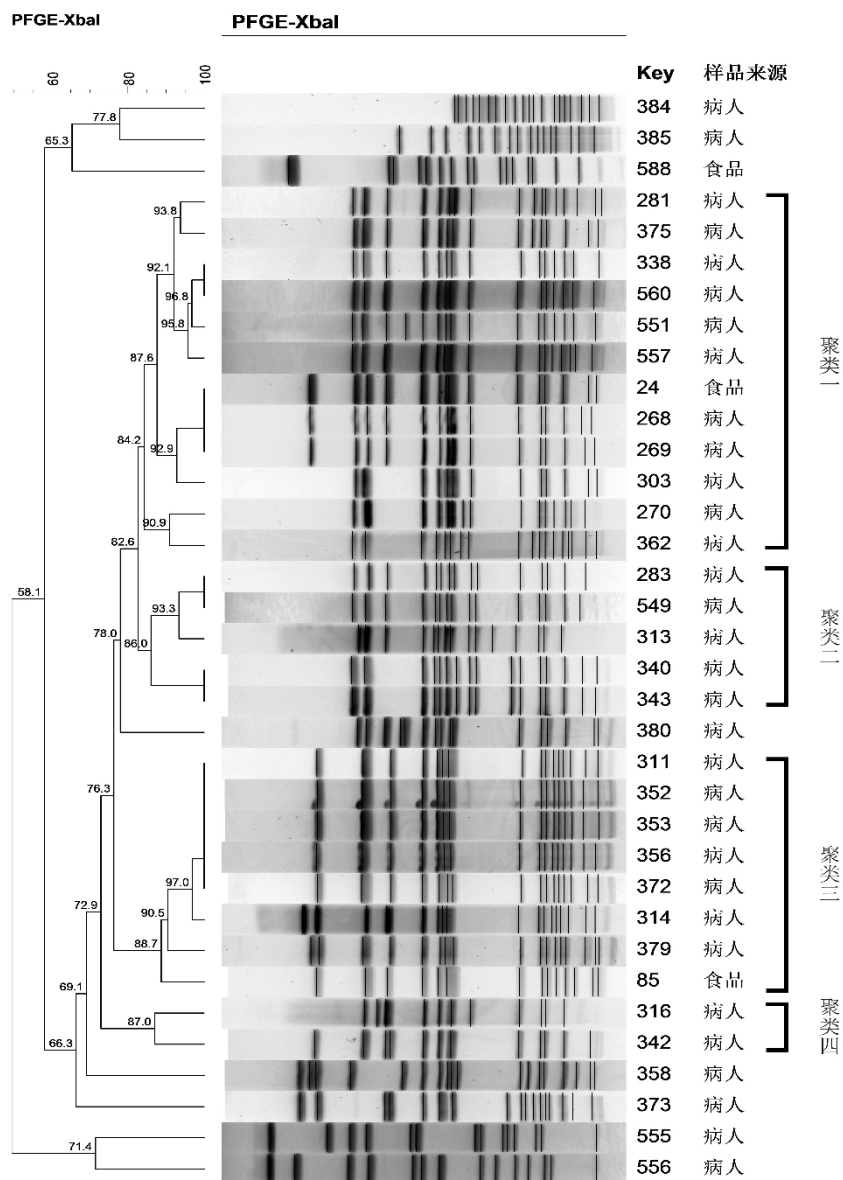


图3 长沙市37株鼠伤寒沙门菌PFGE聚类图谱

### 3.讨论

血清学分型是沙门菌的传统分型方法，到目前为止已鉴定有2500多种，血清型的正确鉴定对确定沙门菌病的感染源及控制减少发病率具有重要意义<sup>[2]</sup>。长沙地区2012-2013年分离的沙门菌优势血清型为鼠伤寒沙门菌，其次为肠炎沙门菌，该结果与广州市<sup>[3]</sup>、深圳市<sup>[4]</sup>、甘肃省<sup>[5]</sup>等从腹泻病人分离到的沙门菌型别基本一致，与湖南省<sup>[6]</sup>、江西省<sup>[7]</sup>等从食品中分离到的沙门菌型别有一定的差异。可能和本次的试验菌株来源以腹泻病人分离株占多数（78.57%）有关，也

说明不同来源的沙门菌的血清型有一定的差异。

在临床治疗和畜牧业养殖过程中, 由于抗生素的广泛使用和滥用导致很多病原菌(包括沙门菌)出现了多重耐药现象, 且全球范围内沙门菌分离株的耐药性在逐渐增强<sup>[8]</sup>。药敏实验结果表明本市的沙门菌耐药情况比较严重, 14种抗生素没有一种对实验菌株100%的敏感, 有1株舒卜拉沙门菌对14种抗生素全部耐药。氟喹诺酮类和第三代头孢类药物是目前临床治疗沙门菌感染的一线药物<sup>[9-10]</sup>, 本次实验菌株对第三代头孢类药物头孢噻肟比较敏感(95.72%), 但对头孢曲松的耐药率达到了17.14%, 对氟喹诺酮类药物环丙沙星的耐药率高达27.14%, 需引起高度重视。多重耐药结果显示, 70株沙门菌中对3种及以上抗生素的耐药率为62.86%。而且研究结果显示鼠伤寒沙门菌较其他血清型更易对抗生素耐药, 这与Meakins<sup>[11]</sup>的研究结果一致, 鼠伤寒沙门菌对临床首选药物头孢曲松和环丙沙星的耐药率分别为25.00%和41.67%, 耐3类以上抗生素的鼠伤寒沙门菌占77.78% (28/36), 鼠伤寒沙门菌的多重耐药率比其他型沙门菌高, 应关注鼠伤寒沙门菌的高耐药性。

PFGE型与血清型分析结果表明, 同一血清型可分为相同或不同的PFGE型别, 如37株鼠伤寒可分为27个PFGE型, 其中5株鼠伤寒沙门菌为同一PFGE型(P28), 且均分离自病例标本, 提示本市沙门菌可能存在着流行株。另有12株鼠伤寒沙门菌的相似度在85%左右(聚类1), 菌株既有病人株也有食品株, 提示人感染这一带型沙门菌的来源可能是食品, 有待结合流行病学资料做进一步的研究。

PFGE型和药敏结果结合分析表明, 具有相同的PFGE型的菌株可以有不同的耐药表型(如P17、P20型和P28型等), 而不同PFGE型的菌株也可拥有完全相同的耐药表型(如P23型和35型)。未发现耐药谱与PFGE型之间有直接的关联。

本研究揭示了长沙市近年来分离的沙门菌的血清型、耐药谱及PFGE 型别分布特征, 为指导临床和畜牧业中抗生素的合理使用提供了依据, 建立了长沙市食源性沙门菌分子分型数据库, 本数据库在今后将用于食源性沙门菌病暴发调查和诊断溯源, 对提高长沙市食源性沙门菌病应急处置能力提供技术支撑。

#### 参考文献:

- [1] Fakhr MK, Nolan LK, logue CM. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enteric* serovar Typhimurium[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(5):2215-9.
- [2] 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



- [3] 周勇, 张欣强, 侯水平等 广州市 76 株沙门菌的血清型分布及耐药性分析 [J]. 现代预防医学, 2014, 41(2): 349-352
- [4] 邱亚群, 林一曼, 扈庆华等 深圳市 119 株沙门菌的菌型分布及耐药情况分析[J]. 实用预防医学, 2010, 17 (8): 1644-1646
- [5] 张广业, 汪鹏, 康倩等 甘肃省沙门氏菌菌型分布及耐药性监测分析医学信息[J]. 2014, 27(2)期中: 36-37
- [6] 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): 995-997
- [7] 游兴勇, 刘成伟, 朱应飞 江西省食源性沙门菌血清分型及脉冲场凝胶电泳指纹图谱研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014 , 26(6): 528-530
- [8] Rajashekara G , Haverly E , Halvorson DA , et al. Multidrug resistant *Salmonella typhimurium* DT 104 in poultry [ J ]. J Food Protection , 2000 , 63(2):155 -161
- [ 9] 周世明, 贾杰. 耐药性伤寒的抗菌治疗新进展[ J ]. 中国热带医学, 2003, 3 (4) : 514- 515
- [ 10] 孔繁林, 储从家. 甲型副伤寒沙门菌的耐药现状与临床用药[ J ]. 中国微生态学杂志, 2007, 19( 1) : 116- 1171
- [ 11] Meakins S, Fisher IS, Berghold C, et al. Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal salmonella isolates in Europe 2000-2004: a report from the enter-net international surveillance network [ J ]. Microb Drug Resist, 2008, 14(1):31-5.