

侵袭性非伤寒沙门菌血清型和耐药性分析

胡豫杰¹ 许学斌² 王艳³ 王伟¹ 崔鑫楠⁴ 何琼玉⁵ 李孟寒¹ 徐进¹ 李凤琴¹

¹国家食品安全风险评估中心国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室,北京 100021; ²上海市疾病预防控制中心病原微生物所 200336; ³北京积水潭医院检验科 100035; ⁴北京农学院食品科学与工程学院 102206; ⁵都柏林大学学院食品安全中心,都柏林 D04 N2E5

通信作者:李凤琴, Email: lifengqin@cfsa.net.cn

【摘要】 目的 分析 7 株侵袭性非伤寒沙门菌(iNTS)的血清型和耐药性。方法 针对收集的 7 株 iNTS 菌株,开展血清学鉴定、药物敏感性实验以及全基因组测序,并对血清型、MLST 型和耐药基因进行鉴定、注释和分析。结果 7 株 iNTS 菌株中,包含 1 株鼠伤寒血清型和 2 株 I 4, [5], 12: i:-(ST34 型)、2 株肠炎血清型、1 株科瓦利斯血清型和 1 株未知血清型 I 4, [5], 12: d:-(ST279 型),其中 6 株为单相菌,沙门菌二相鞭毛基因缺失或假基因化可能有助于增强沙门菌侵袭性。未发现替加环素、氨曲南、阿米卡星及头孢类、碳青霉烯类抗生素耐药株,存在 1 株八重耐药鼠伤寒沙门菌。耐药基因与耐药表型基本相符。结论 本研究中的 iNTS 菌株存在八重耐药株,整体耐药水平尚低但不可忽视。

【关键词】 侵袭性非伤寒沙门菌; 血清型; 耐药性

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1603904); 国家科技重大专项(2016ZX08011005)

Analysis on serotype and antimicrobial resistance of invasive non-typhoidal *Salmonella*

Hu Yujie¹, Xu Xuebin², Wang Yan³, Wang Wei¹, Cui Xinnan⁴, He Qiongyu⁵, Li Menghan¹, Xu Jin¹, Li Fengqin¹

¹Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Health, National Health Commission of China, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; ²Institute of Pathogen Microbiology, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; ³Department of Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China; ⁴Food Science and Engineering College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; ⁵Centre for Food Safety, University College Dublin, Dublin D04 N2E5, Ireland

Corresponding author: Li Fengqin, Email: lifengqin@cfsa.net.cn

【Abstract】 Objective To investigate the serotypes and antimicrobial resistance of seven invasive non-typhoidal *Salmonella* (iNTS) isolates. **Methods** For 7 iNTS strains collected, serotype identification, antimicrobial susceptibility testing and whole genome sequencing were performed. We identified, annotated and analyzed the serotypes, MLST types, and antimicrobial resistance genes. **Results** Among the 7 tested iNTS isolates, we found one *Salmonella* Typhimurium strain and two *Salmonella* I 4, [5], 12: i:- strains whose MLST types were ST34, two *Salmonella* Enteritidis strains, one *Salmonella* Corvallis strain and one strain of unknown serotype with the antigenic formulae of I 4, [5], 12: d:-(ST279 type). Six of seven strains were monophasic and the deletion or pseudogenization of *Salmonella* Flagellum gene might contribute to the enhancement of *Salmonella* invasiveness. None was found to be resistant to tigarcycline, aztreonam, amikacin, cephalosporins and carbapenem and one *Salmonella* Typhimurium strain was found to be co-resistant to eight classes of antimicrobials at the same time. Resistance genes were generally in accord with relative

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200316-00361

收稿日期 2020-03-16 本文编辑 万玉立

引用本文:胡豫杰,许学斌,王艳,等.侵袭性非伤寒沙门菌血清型和耐药性分析[J].中华流行病学杂志,2021,42(3):549-554. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200316-00361.



resistant phenotypes. **Conclusion** The iNTS strains could show high level multi-drug resistance, indicating that close attention should be paid to the resistance of iNTS though the overall resistance might be relatively not high.

【Key words】 Invasive non-typhoidal *Salmonella*; Serotype; Antimicrobial resistance

Fund programs: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603904); National Science and Technology Major Project of China (2016ZX08011005)

沙门菌(*Salmonella*)按照致病类型可分为伤寒沙门菌和非伤寒沙门菌(non-typhoidal *Salmonella*, NTS)。伤寒沙门菌可导致伤寒症,人为其专性宿主,血清型包含伤寒和副伤寒沙门菌,病症主要为发热,可引起全身性感染,严重时可危及生命^[1]; NTS多导致自限性胃肠道感染,是全球性公共卫生问题,可在人和动物之间传播,包含血清型众多,病症主要为腹泻、恶心、呕吐等,死亡病例相对较少^[2]。侵袭性 NTS(iNTS)所引起的肠外感染也时有报道,临床特征与伤寒相似,通常不引起腹泻,常引起血流感染(如菌血症)或继发全身性局灶感染(如脑膜炎)等,如不治疗常可致死^[3],主要报道的有鼠伤寒、肠炎、都柏林和猪霍乱等血清型,ST313型鼠伤寒沙门菌为国际上尤其是非洲地区 iNTS 的主要流行型别^[3-4]。iNTS 具有特定易感人群,包括 HIV 患者、疟疾患者、幼儿以及营养不良或贫血青少年等人群,病死率高达 20%^[4],与常见 NTS 感染不同的是,患者较少有胃肠炎病症,但均具发热症状。目前 iNTS 的流行病学调查和研究主要针对非洲、美洲等地区^[5],其他国家和地区尚缺乏完善的监测体系和疾病负担数据。本研究结合表型和基因组数据,对 7 株 iNTS 菌株的血清型和耐药性等进行综合分析,为评估 iNTS 传播风险和开展疾病监测防控提供参考数据。

对象与方法

1. 菌株来源:从 2014 年上海市 61 家社区及各级医院分离出的 1 619 株沙门菌中,筛选出 7 株肠外感染分离株作为实验菌株(iNTS1~iNTS7,分离自血液和脑脊液)。菌株均经生化确认,药敏质控菌株为本实验室保存的大肠埃希菌 ATCC25922。

2. 主要仪器与试剂:自动生化鉴定仪、比浊仪和 GN 生化鉴定卡(法国 Biomerieux 公司),液相悬浮芯片系统和沙门菌血清分型试剂盒(美国 Luminex 公司),细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],脑心浸液琼脂和脑心

浸液肉汤(英国 OXOID 公司),沙门菌抗血清试剂(丹麦国家血清研究所 SSI),抗生素药敏板(上海星佰生物技术有限公司)。

3. 研究方法:

(1) Luminex+玻片凝集法血清学鉴定:水煮法提取细菌基因组 DNA, Luminex 平台结合血清分型试剂盒检测沙门菌血清抗原,使用 SSI 抗血清按 GB 4789.4-2016 进行玻片凝集确认 O 抗原^[6],对照 WKLM (Kauffmann-Le Minor)表进行血清型判断。

(2) 微量肉汤稀释法药敏试验:用生理盐水和比浊仪将过夜培养的新鲜菌落调至 0.5 麦氏浊度的菌悬液,肉汤 200 倍稀释混匀后加至药敏板(100 μ l/孔),37 $^{\circ}$ C 孵育 18 h,以大肠埃希菌 ATCC25922 为质控菌株,测试药物包括四环素类(四环素、多西环素、替加环素)、喹诺酮类(萘啶酸、环丙沙星)、粘菌素类(多粘菌素 B、多粘菌素 E)、氯霉素类(氟苯尼考、氯霉素)、叶酸途径抑制剂类(磺胺异噁唑、甲氧苄啶、复方新诺明)、硝基呋喃类(硝基呋喃)、青霉素类(氨苄西林)、内酰胺/内酰胺酶抑制剂类(氨苄西林舒巴坦)、单环 β -内酰胺类(氨曲南)、头孢类(头孢吡肟、头孢噻吩、头孢他啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢西丁)、碳青霉烯类(美罗培南、亚胺培南、厄他培南)和氨基糖苷类(庆大霉素、阿米卡星),共 12 类 27 种药物。人工读取最低抑菌浓度值,依据美国临床和实验室标准化协会操作标准(CLSI 2018)的质控标准和肠杆菌科判定折点进行结果判读^[7]。氟苯尼考判读参照动物源性细菌 CLSI 标准^[8],多粘菌素 E 判读参照欧洲抗菌药物敏感试验委员会标准^[9]。

(3) 全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)及分析:按照试剂盒说明书提取待测菌株的基因组 DNA,送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行文库构建、WGS 测序(Illumina NovaSeq PE150 平台)和基因组拼接。将基因组数据与相应数据库比对检索,分别获得血清型(Seqsero2 和 SISTR,沙门血清分型数据库)、耐药基因(ResFinder,耐药数据库)、MLST 型(SISTR 和

PubMLST, 多位点序列分型数据库) 等信息。

结 果

1. 血清型及 MLST 分型: 基于核心基因组多位点序列分型 (core genome multilocus sequence typing, cgMLST) 聚类分析的 SISTR 平台和基于血清因子检测的 Seqsero2 平台对待测菌株所预测的血清型结果和 Luminex 平台鉴定结果一致, 7 株 iNTS 菌株中包含 1 株鼠伤寒沙门菌、2 株肠炎沙门菌、1 株科瓦利斯沙门菌、2 株 I 4, [5], 12:i:-沙门菌和 1 株 I 4, [5], 12:d:-沙门菌 (其中 iNTS3 基因组数据未检测到 *fljB* 基因)。有 4 株 O 抗原为 B 群, 2 株 O 抗原为 D1 群, 1 株 O 抗原为 C3 群。仅 iNTS2 具有鞭毛二相抗原, 其他均为单相菌。SISTR 和 PubMLST 预测的 MLST 型结果一致, I 4, [5], 12:i:-和鼠伤寒血清型沙门菌均为 ST34 型 (I 4, [5], 12:i:- 可视为鼠伤寒沙门菌单相变种), 2 株肠炎沙门菌均为 ST11 型, 科瓦利斯沙门菌为 ST1541 型, I 4, [5], 12:d:-沙门菌为 ST279 型。见表 1。

2. 药敏试验及耐药基因: 7 株 iNTS 菌株对 27 种药物中的 12 种敏感, 包括四环素类的替加环素、氨基糖苷类的阿米卡星、单环 β 内酰胺类的氨曲南、碳青霉烯类的 3 种药物和头孢类的 6 种药物。7 株 iNTS 菌株对其他 15 种药物存在不同程度的耐药 (1~4 株耐药株)。发现 4 株多重耐药 (MDR) 菌株 (同时耐受 ≥3 类抗生素), 包含 1 株八重耐药的鼠伤寒沙门菌, I 4, [5], 12:d:-沙门菌 iNTS3 对全部测试药物敏感。见表 2。

通过与 ResFinder 数据库比对, 耐药基因注释结果 (Identity ≥ 90) 见表 3。四环素类耐药的 4 株菌均含有 *tet* 基因 (含 3 个 *tetB* 和 1 个 *tetA*); 喹诺酮类

耐药的 4 株菌均含有 *aac* (6')-*Ib-cr*、*oqxAB* 或 *GyrA* 第 87 位氨基酸存在有义突变, iNTS3 和 iNTS7 虽未表现出喹诺酮类耐药, 但也检出 *qnrS1* 或 *ParC* 第 57 位氨基酸发生有义突变; 2 株多粘菌素耐药肠炎沙门菌未检出粘菌素耐药基因; 氯霉素耐药的 iNTS2 和 iNTS6 均携带 *catB3* 和 *floR*, 后者还携带 *cmlA1*; 对磺胺异噁唑耐药的 4 株菌均携带 *sul* 基因, 其中同时对甲氧苄啶和复方新诺明耐药的 iNTS2 还携带 *dfpA12*, 但对叶酸途径抑制剂类抗生素不耐药的 iNTS6 也检出 *sul* 和 *dfpA12* 基因; 对氨苄西林或氨苄西林舒巴坦耐药的 3 株菌均检测到 *bla_{TEM-1B}* 基因, 其中 iNTS2 还携带 *bla_{OXA-1}* 基因, 而敏感株 iNTS6 也检出 *bla_{OXA-1}* 基因; 所有菌株均携带至少 1 种氨基糖苷类抗生素耐药基因, 但只有携带该类耐药基因最多的 iNTS2 对庆大霉素耐药; 2 株菌携带 *arr-3* 耐药基因。

讨 论

1. iNTS 流行、血清型及 MLST 型别特征: Ao 等^[4]在 2010 年全球 iNTS 疾病负担报道中指出每年约有 340 万 iNTS 感染病例, 非洲地区占半数以上, 2/3 为 5 岁以下儿童, 每年致死人数达 68 万 (20%), 全球平均年发病率为 49/10 万, 约为伤寒的 1/8, 非洲和欧洲地区发病率较高 (>100/10 万), 其他国家和地区发病率较低, 部分地区低发病率原因主要为缺乏全面监测报告体系和系统统计^[4-5]。iNTS 感染的病死率远高于伤寒^[5], 尤其是 HIV 病例, 其致死率是伤寒的 3~4 倍 (>50%)。疟疾患者、婴儿、老年人、严重贫血或营养不良青少年和镰状细胞病例等均为易感人群^[3,10]。

鼠伤寒和肠炎是非洲地区 iNTS 的优势血清

表 1 7 株 iNTS 菌株的血清学和 MLST 型鉴定

| 菌株编号 | 血清型 (SISTR 和 Seqsero2) ^a | 血清型 (Luminex 和玻片凝集) ^b | O 抗原 | H1 相抗原 | H2 相抗原 | MLST 型 (SISTR 和 PubMLST) |
|-------|--|-------------------------------------|-----------------|---------|--------|--------------------------|
| iNTS1 | I 4, [5], 12:i:- | 4, [5], 12:i:- | B | i | - | 34 |
| iNTS2 | 鼠伤寒 | 鼠伤寒 | B | i | 1, 2 | 34 |
| iNTS3 | I 4, [5], 12:d:- | 4, [5], 12:d:- | B | d | - | 279 |
| iNTS4 | 肠炎 | 肠炎 | D1 ^c | g, m | - | 11 |
| iNTS5 | 肠炎 | 肠炎 | D1 ^c | g, m | - | 11 |
| iNTS6 | I 4, [5], 12:i:- ^c | 4, [5], 12:i:- | B | i | - | 34 |
| iNTS7 | 科瓦利斯 | 科瓦利斯 | C3 ^d | z4, z23 | - | 1541 |

注: ^aSISTR 和 Seqsero2 平台可预测沙门菌亚种信息, 故结果中未知血清型结果中包含亚种信息; ^bLuminex 方法不能确定沙门菌的亚种信息, 故结果中未知血清型只有血清型; ^cSeqsero2 检测发现一个导致该鼠伤寒血清型产生 O5 抗原变异的缺失突变; ^d使用玻片凝集法对 Luminex 平台进行 O 抗原鉴定结果进行确证

表 2 7 株 iNTS 菌株对 12 类 27 种抗生素耐药性

| 抗生素类别和名称 | iNTS1 | iNTS2 | iNTS3 | iNTS4 | iNTS5 | iNTS6 | iNTS7 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 四环素类 | | | | | | | |
| 四环素 | R | R | S | S | S | R | R |
| 多西环素 | R | R | S | S | S | R | R |
| 替加环素 | S | S | S | S | S | S | S |
| 喹诺酮类 | | | | | | | |
| 萘啶酸 | S | R | S | R | R | R | S |
| 环丙沙星 | S | R | S | I | S | I | I |
| 粘菌素类 | | | | | | | |
| 多粘菌素 B | S | S | S | R | R | S | S |
| 多粘菌素 E | S | S | S | R | R | S | S |
| 氯霉素类 | | | | | | | |
| 氟苯尼考 | S | R | S | S | S | I | S |
| 氯霉素 | S | R | S | S | S | R | S |
| 叶酸途径抑制剂类 | | | | | | | |
| 磺胺异噁唑 | R | R | S | S | R | S | R |
| 甲氧苄啶 | S | R | S | S | S | S | S |
| 复方新诺明 | S | R | S | S | S | S | S |
| 硝基咪唑类 | | | | | | | |
| 硝基咪唑 | I | R | S | I | I | R | S |
| 青霉素类 | | | | | | | |
| 氨苄西林 | R | R | S | S | R | S | S |
| 内酰胺/内酰胺酶抑制剂类 | | | | | | | |
| 氨苄西林舒巴坦 | R | R | S | S | I | S | S |
| 单环 β-内酰胺类 | | | | | | | |
| 头孢类 | S | S | S | S | S | S | S |
| 碳青霉烯类 | | | | | | | |
| 碳青霉烯类 | S | S | S | S | S | S | S |
| 氨基糖苷类 | | | | | | | |
| 庆大霉素 | S | R | S | S | S | S | S |
| 阿米卡星 | S | S | S | S | S | S | S |

注:R 为耐药,I 为中介,S 为敏感

型^[3,10], 病例占比 >90%^[3]。国内 Zhan 等^[11]在 2019 年对我国 5 个省市 178 株 iNTS 分离株的血清型进行了回顾性报道。经查询国内期刊数据库,我国近 40 年来几乎每年都有 iNTS 感染病例报道,据不完全统计,血流感染、脑膜炎和骨科疾病相关近百篇 iNTS 报道共涉及约 30 种血清型,鼠伤寒、肠炎、猪霍乱和都柏林等血清型频率较高(数据来源于万方数据知识服务平台,文献较多未列出),与 Zhan 等^[11]的报道相符。本研究 7 株 iNTS 菌株中有 6 株单相菌,包括 2 株鼠伤寒沙门菌单相变种,推测单相菌(或双相菌的单相变种)可能更易成为侵袭性增强的 iNTS 菌株,或与二相鞭毛蛋白基因 *fljB* 和一相鞭毛阻遏蛋白基因 *fljA* 的缺失或假基因化有关,需要进一步证实。

国际上引发胃肠炎感染的鼠伤寒沙门菌多为 ST34 和 ST19 型^[12],但不同 ST 型的流行存在地理差异,如亚洲地区主要以 ST34 型为主,其他地区 ST19 型更为常见^[13]。ST313 型则是非洲地区尤其是撒哈拉以南非洲地区鼠伤寒沙门菌的主要型别,也是该地区 iNTS 引发血流感染的起源^[12,14]。英国、巴西和印度均有 ST313 分离株报道,且与非洲地区菌株存在明显遗传学差异^[15-17],中国暂无 ST313 型菌株报道^[13],但考虑到其高致病性和

表 3 7 株 iNTS 菌株中耐药基因注释

| 抗生素类别 | iNTS1 | iNTS2 | iNTS3 | iNTS4 | iNTS5 | iNTS6 | iNTS7 |
|----------|--|---|--------------------|--------------------|--|---|--|
| 四环素类 | <i>tetB</i> | <i>tetB</i> | | | | <i>tetB</i> | <i>tetA</i> |
| 喹诺酮类 | | <i>aac(6')-Ib-cr, oqxAB, GyrA D87N</i> | ParC T57S | GyrA D87N | GyrA D87Y | <i>aac(6')-Ib-cr, oqxAB, GyrA D87N</i> | <i>qnrS1, ParC T57S</i> |
| 氯霉素类 | | <i>catB3, floR</i> | | | | <i>catB3, cmlA1, floR</i> | |
| 叶酸途径抑制剂类 | <i>sul2</i> | <i>sul1, sul2, dfrA12</i> | | | <i>sul2</i> | <i>sul1, sul2, sul3, dfrA12</i> | <i>sul2</i> |
| β-内酰胺酶类 | <i>bla_{TEM-1B}</i> | <i>bla_{OXA-1}, bla_{TEM-1B}</i> | | | <i>bla_{TEM-1B}^a</i> | <i>bla_{OXA-1}</i> | |
| 氨基糖苷类 | <i>aac(6')-Iaa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i> | <i>aac(3)-IV, aac(6')-Iaa, aac(6')-Ib-cr, aadA, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id</i> | <i>aac(6')-Iaa</i> | <i>aac(6')-Iaa</i> | <i>aac(6')-Iaa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i> | <i>aac(3)-IV, aac(6')-Iaa, aac(6')-Ib-cr, aadA, aph(3')-Ia, aph(4)-Ia</i> | <i>aac(6')-Iaa^a, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i> |
| 利福平类 | | <i>arr-3</i> | | | | <i>arr-3</i> | |

注:^a该基因在基因组两个 contig 中同时检出

传播性,我国应针对不同样本来源的ST313型鼠伤寒沙门菌开展监测和研究。

本研究中有 1 株 ST279 型未知血清型 iNTS (I 4, [5], 12; d: -), 通过 2 个国际沙门血清型数据库, 分别使用 cgMLST 聚类分析和抗原因子基因比对, 认为该菌株是新血清型别的可能性较大, 存在从 O 群为 B 群且 H1 因子为 d 的若干血清型沙门菌进化而来的可能, 本研究未在基因组中检测到 *fljB* 基因, 但需结合三代 WGS 结果确认 *fljB* 基因是否缺失, 并开展 RT-PCR 或 RNA-Seq 在基因表达水平进行进一步确认。Enterobase 数据库 (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) 中搜索到 137 株该类型菌株, 血清型与 ST 型对应程度非常高, 来源分布广泛, 包括动植物、食品、环境和人源, 其生物学意义值得进一步关注。

2. iNTS 耐药特征: 喹诺酮类耐药决定区 (QRDRs) 是沙门菌最主要的喹诺酮耐药机制, 以 *gyrA* 和 *parC* 基因发生突变为主, 其中相关蛋白 GyrA 的第 87 位密码子可出现 D87G 和 D87N 这两种类型氨基酸改变, 后者为主要突变类型; ParC 第 57 位密码子主要突变类型为 T57S, 该突变虽仅介导低水平耐药, 但有利于氟喹诺酮类耐药性出现^[18], 本研究中 4 株萘啶酸耐药株均存在 GyrA 第 87 位氨基酸改变, 且检测到 1 株少见突变型 D87Y, 该位点变化是本研究中 iNTS 产生喹诺酮耐药的主因, 而 2 株仅在 ParC 发生 T57S 改变的菌株未检测到喹诺酮耐药, 证明该位点变化无法显著提升喹诺酮类耐药性。质粒介导喹诺酮类耐药基因 (PMQR) 是沙门菌通过位于质粒上的 *qnr*、*aac* (6')-*Ib-cr*、*qepA* 或 *oqxAB* 等基因所表达的酶或外排泵蛋白介导对喹诺酮类的低水平耐药, 本研究存在 ParC T57S 的 2 株 iNTS 中, iNTS7 携带的 *qnrS* 基因可能导致对环丙沙星产生中介的原因。研究发现 *aac* (6')-*Ib-cr* 和 *oqxAB* 这 2 种沙门菌最常见的 PMQR 基因共存同一菌株对环丙沙星耐药起着重要作用^[19], 本研究中 iNTS2 和 iNTS6 印证了这一点, 而未携带 PMQR 机制、但却与 iNTS6 具有同样耐药水平的 iNTS4 则再次证明 QRDRs 和 PMQR 在介导沙门菌对喹诺酮类抗生素耐药水平上存在差别。

4 株磺胺异噁唑耐药株均检出 *sul2* 基因, 其中对甲氧苄啶和复方新诺明同时耐药的 iNTS2 还检出 *sul1* 和 *dfrA12* 基因, 呈现出对叶酸途径抑制剂抗生素高水平耐药。值得注意的是, iNTS6 同时携带 *sul1*、*sul2*、*sul3* 和 *dfrA12* 基因, 但对以上 3 种抗生素

均敏感。研究表明 *sul2* 基因位于小的非结合质粒或大的可转移多重耐药质粒^[20], 而 *dfrA12* 基因主要通过接合性质粒发生转移^[21], 因此考虑 iNTS6 的 4 个耐药基因, 在药敏实验前的传代过程中可能发生了一同缺失, 同时发生基因突变导致敏感性提高可能性较小, 而一同缺失的最大可能是在 4 个耐药基因位于同一个质粒且随质粒一同丢失。该推测将在下一步结合三代基因组测序获得基因组完成图, 或开展质粒分型、S1-PFGE 或 Southern blot 实验, 以获得质粒的真实情况进行进一步分析。

报道显示, 氨基糖苷类药物耐药表型与耐药基因符合率存在一定差异, 即使携带耐药基因但也不一定耐药, 这与耐药基因表达、药物抗菌活性、酶的稳定性以及基因型的流行有关^[22]。另外, CLSI 规定氨基糖苷类在体外对于肠杆菌科中的沙门菌属和志贺菌属可能表现有活性但临床治疗无效的情况, 本研究中全部菌株均含有相关耐药基因但药敏结果仅有 1 株耐药, 可能与上述现象有关, 而这类菌株具有潜在耐药性和传播性, 防控难度更大, 需要加以注意。

本研究中替加环素的抑菌效果优于四环素和多西环素, 侧链空间位阻可有效抵抗细菌对四环素类药物主要耐药机制可能是主要原因^[23]。MFS 家族可编码 8 种 Tet 外排泵, 其中 TetA 和 TetB 可介导四环素耐药但无法识别替加环素, 但近年来报道 TetA 也可介导沙门菌替加环素抗性^[24], 本研究中 4 株携带 *tet* 基因的 iNTS 菌株中, 有 1 株携带 *tetA* 基因, 提示 iNTS 菌株存在替加环素耐药风险。2 株肠炎沙门菌对粘菌素耐药但未发现可移动粘菌素耐药基因, 推测与染色体介导双组分调节机制如 PmrAB 和 PhoPQ 相关^[25]。

ST313 型 iNTS 被报道对多种抗菌药物耐药, 可携带含有多种 β -内酰胺酶基因、重金属抗性基因和 I 类整合子的可接合型耐药质粒^[26-27], 近期甚至报道发现了泛耐药株 (extensively drug resistance, XDR)^[14], 其多重耐药性的快速获得使患者治疗复杂化, 这对其高致死率和能在过去 40 年内蔓延整个撒哈拉以南非洲地区 (Sub-Saharan Africa) 有着重要作用^[14]。Zhan 等^[11]研究显示超半数 iNTS 菌株为 MDR 株, 耐药水平逐年上升。本研究中不同血清型 iNTS 菌株耐药水平不一, 耐药程度尚处于较低水平, 部分抗生素无耐药株, 甚至有 1 株全敏感株, 但也发现 1 株八重耐药鼠伤寒沙门菌, 虽暂未对所有测试 β -内酰胺类抗生素耐药, 但携带 2 种

β -内酰胺酶($bla_{OXA/TEM}$),因此我国 iNTS 菌株的耐药状况仍不可忽视,整体耐药性和变化趋势需要更多监测数据支持和评估。

本研究存在局限性。目前仅对 2014 年上海市临床菌株中血液和脑脊液来源的 7 株 iNTS 菌株进行了分析,需开展更大范围和长期完善的监测,纳入更多 iNTS 和非 iNTS 菌株的表型和基因组数据,为我国 iNTS 菌株的特征描述和预测提供更为准确可靠的信息和更为基础的遗传特征;后续还需结合基因组学、功能转录组学和蛋白质组学研究,从而了解 iNTS 高侵袭性致病特征的遗传基础。

总之,iNTS 疾病已成为全球性公共卫生问题,尽管已开展多项研究,但人们对 iNTS 疾病负担、流行分布、遗传背景、生物学特征、发病机制、传播途径、储库来源及侵袭性差异等多方面的了解还相当不完整甚至知之甚少。我国也需要针对这一状况开展监测和研究,从主要型别入手,如针对 ST34 型鼠伤寒 iNTS 开展流行病学调查,并进一步研究其致病和进化机制,以确定其在不同人群中发生和传播的遗传基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Buckle GC, Walker CLF, Black RE. Typhoid fever and paratyphoid fever: systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010[J]. J Glob Health, 2012, 2(1):010401. DOI:10.7189/jogh.02.010401.
- [2] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(6):882-889. DOI:10.1086/650733.
- [3] Uche IV, MacLennan CA, Saul A. A systematic review of the incidence, risk factors and case fatality rates of Invasive Nontyphoidal *Salmonella* (iNTS) disease in Africa (1966 to 2014)[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(1):e0005118. DOI:10.1371/journal.pntd.0005118.
- [4] Ao TT, Feasey NA, Gordon MA, et al. Global burden of invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, 2010[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(6):941-949. DOI:10.3201/eid2106.140999.
- [5] Balasubramanian R, Im J, Lee JS, et al. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections[J]. Hum Vaccin Immunother, 2019, 15(6):1421-1426. DOI:10.1080/21645515.2018.1504717.
- [6] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [7] National Health and Family Planning Commission of China, State Food and Drug Administration. GB 4789.4-2016 National food safety standard, Food microbiological examination: *Salmonella*[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [8] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[M]. 28th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [9] CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard-third edition. CLSI document M31-A3[M]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [10] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018[EB/OL]. [2018-01-01]. http://depa.fquim.unam.mx/microbio/1515ME-04/v_8.1_Breakpoint_Tables%20EUCAST2018.pdf.
- [11] Park SE, Pak GD, Aaby P, et al. The relationship between invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, other bacterial bloodstream infections, and malaria in Sub-Saharan Africa[J]. Clin Infect Dis, 2016, 62 Suppl 1: S23-31. DOI: 10.1093/cid/civ893.
- [12] Zhan Z, Xu X, Gu Z, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of invasive non-typhoidal *Salmonella* in China, 2007-2016[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12:2885-2897. DOI:10.2147/IDR.S210961.
- [13] Branchu P, Bawn M, Kingsley RA. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathovariants[J]. Infect Immun, 2018, 86(8):e00079-18. DOI:10.1128/IAI.00079-18.
- [14] Sun JF, Ke BX, Huang YH, et al. The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella typhimurium* in Guangdong, China, 2007-2011[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e113145. DOI:10.1371/journal.pone.0113145.
- [15] van Puyvelde S, Pickard D, Vandelannoote K, et al. An African *Salmonella typhimurium* ST313 sublineage with extensive drug-resistance and signatures of host adaptation[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):4280. DOI: 10.1038/s41467-019-11844-z.
- [16] Ashton PM, Owen SV, Kaindama L, et al. Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella Typhimurium* epidemic in Africa[J]. Genome Med, 2017, 9:92. DOI:10.1186/s13073-017-0480-7.
- [17] Panzenhagen PH, Paul NC, Junior CAC, et al. Genetically distinct lineages of *Salmonella Typhimurium* ST313 and ST19 are present in Brazil[J]. Int J Med Microbiol, 2018, 308(2):306-316. DOI:10.1016/j.ijmm.2018.01.005.
- [18] Banger SR, Umakanth S, Mukhopadhyay AK, et al. Draft genome sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium sequence type 313, isolated from India[J]. Microbiol Resour Announc, 2018, 7(8):e00990-18. DOI:10.1128/MRA.00990-18.
- [19] 韦克斯 RG, 刘易斯 K, 萨利尔斯 AA, 等. 细菌抗药性[M]. 刘玉庆, 译. 北京:化学工业出版社,2012.
- [20] Wax RG, Lewis K, Salyers AA, et al. Bacterial resistance to antimicrobials[M]. Liu YQ, trans. Beijing: Chemical Industry Press, 2012.
- [21] 张文慧. *aac(6)-Ib-cr* 基因对氟喹诺酮类药物耐药的作用研究[D]. 广州:华南农业大学,2016. DOI:10.7666/d.D01036738.
- [22] Zhang WH. Characteristic of the *aac(6)-Ib-cr* gene on fluoroquinolone resistance[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016. DOI:10.7666/d.D01036738.
- [23] 赖海梅, 刘书亮, 邹立扣, 等. 肉鸡屠宰场多重耐药沙门氏菌 I 类整合子与磺胺类耐药基因(*sul1*、*sul2*和*sul3*)的检测[J]. 食品科学, 2014, 35(24):178-183. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201424034.
- [24] Lai HM, Liu SL, Zou LK, et al. Detection of integron-1 and sulphonamide resistant genes of multi-drug resistant *Salmonella* species isolated from broiler slaughterhouse[J]. Food Sci, 2014, 35(24):178-183. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201424034.
- [25] 王晓泉, 焦新安, 潘志明, 等. 鸡白痢沙门氏菌 *dfpA* 基因与 I 类整合子的特征[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版, 2007, 28(2):1-4. DOI:10.3969/j.issn.1671-4652.2007.02.001.
- [26] Wang XQ, Jiao XA, Pan ZM, et al. Characterization of trimethoprim-resistant genes and class I integron in *Salmonella enterica* Serovar pullorum[J]. J Yangzhou Univ: Agric Life Sci Ed, 2007, 28(2):1-4. DOI:10.3969/j.issn.1671-4652.2007.02.001.
- [27] 吴植, 郝福星, 刘莉, 等. 禽源沙门菌氨基糖苷类耐药表型及耐药基因研究[J]. 中国家禽, 2016, 38(17):56-58. DOI:10.16372/j.issn.1004-6364.2016.17.013.
- [28] Wu Z, Hao FX, Liu L, et al. Study on the phenotype and genes mediating aminoglycoside resistance in *Salmonella* from poultry[J]. China Poult, 2016, 38(17):56-58. DOI:10.16372/j.issn.1004-6364.2016.17.013.
- [29] Pankey GA. Tigecycline[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(3):470-480. DOI:10.1093/jac/dki248.
- [30] Akiyama T, Presedo J, Khan AA. The *tetA* gene decreases tigecycline sensitivity of *Salmonella enterica* isolates[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(2):133-140. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2013.04.017.
- [31] Breazeale SD, Ribeiro AA, Raetz CRH. Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-l-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*: an aminotransferase (ARNB) that generates udp-4-amino-4-deoxy-l-arabinose[J]. J Biol Chem, 2003, 278(27):24731-24739. DOI:10.1074/jbc.M304043200.
- [32] Feasey NA, Cain AK, Msefula CL, et al. Drug resistance in *Salmonella enterica* ser. Typhimurium bloodstream infection, Malawi[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(11):1957-1959. DOI:10.3201/eid2011.141175.
- [33] Kariuki S, Okoro C, Kiiru J, et al. Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium sequence type 313 from Kenyan patients is associated with the *bla*_{CTX-M-15} gene on a novel IncHI2 plasmid[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(6):3133-3139. DOI:10.1128/AAC.00078-15.