

江苏省伤寒/副伤寒流行现况、菌株耐药及其分子分型

庄菱 张永杰 唐震 董晨 周璐 钱慧敏 汤奋扬 甄世祺

【摘要】 目的 掌握江苏省伤寒/副伤寒流行现况、病原菌耐药性以及分子分型特征,以确定监测重点。方法 对2007—2011年江苏省伤寒/副伤寒疫情采用描述流行病学回顾性分析;210株伤寒/副伤寒沙门菌耐药性测定采用K-B纸片扩散法;81株伤寒沙门菌分子分型运用脉冲场凝胶电泳(PFGE)。结果 近5年江苏省伤寒/副伤寒年均报告发病率为0.47/10万,呈总体下降趋势。人群年龄别发病以0岁组(1.70/10万)高发。病原谱以伤寒沙门菌为主(66.19%),其次为甲型副伤寒沙门菌(23.81%)。伤寒/副伤寒沙门菌对萘啶酸耐药率最高(66.19%),对环丙沙星等6种抗生素耐药率低于10.00%,多重耐药率为30.00%。近3年伤寒沙门菌分属4个克隆群37个PFGE型,优势带型为JPPX01.JS0027(11.11%),JPPX01.JS0001为地区独特性菌型,JPPX01.JS0014、JPPX01.JS0018和JPPX01.JS0024为扩散性菌型。特征菌型成簇分析发现3起病例具有聚集性特征。结论 江苏省伤寒/副伤寒发病率维持在较低水平,婴儿高发。菌株对多数抗生素较敏感,但部分药物耐药性在增加。由于近年伤寒呈现高度散发状态,未出现占绝对优势的菌型,推测近期发生大规模流行的可能性较小。

【关键词】 伤寒;副伤寒;流行特征;耐药性;脉冲场凝胶电泳

Epidemiologic characteristics of typhoid and paratyphoid fever on related drug resistance and molecular types regarding *Salmonella typhi* and *S. paratyphi*, in Jiangsu province ZHUANG Ling, ZHANG Yong-jie, TANG Zhen, DONG Chen, ZHOU Lu, QIAN Hui-min, TANG Fen-yang, ZHEN Shi-qi. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China

Corresponding author: TANG Fen-yang, Email: tfyepi@163.com

This work was supported by a grant from the Jiangsu Province Health Development Project with Science and Education (No. ZX201109).

【Abstract】 **Objective** To explore the distribution of prevalence rates of typhoid and paratyphoid, with drug resistance and molecular types of *Salmonella (S.) typhi* and *S. paratyphi* in Jiangsu province. **Methods** Data, collected by the national infectious disease reporting system in Jiangsu province from 2007 to 2011, was analyzed. K-B method was used to test the sensibility to 9 kinds of antibiotics among 210 stains of *S. typhi* and *S. paratyphi*. 81 strains of *S. typhi* were classified by pulse-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** The annual average incidence of typhoid and paratyphoid was 0.47 per 100 000 in the last five years, showing a decreasing trend. Highest incidence (1.70 per 100 000) was seen in the <1 year age group, with *S. typhi* and *S. paratyphi* A accounted for 66.19% and 23.81% among the 210 stains. The rate of drug resistance to nalidixic acid appeared to be the highest as 66.19%. The drug resistant rates to 6 kinds of antibiotics were on average, lower than 10.00%. The multi-drug resistant rate of *S. typhi* and *S. paratyphi* was 30.00%. In the last 3 years, 37 types from 81 *S. typhi* strains had been classified into 4 clusters by PFGE. The predominant type was JPPX01.JS0027, accounted for 11.11%. JPPX01.JS0001 type had a specific regional distribution, but JPPX01.JS0014, JPPX01.JS0018 and JPPX01.JS0024 strains were widely spread. Results from the clustering analysis showed that cases in the 3 events tended to have a clustering nature. **Conclusion** The morbidity of typhoid and paratyphoid was in a relatively low level in Jiangsu province. Although *S. typhi* and *S. paratyphi* were sensitive to most of the commonly used antibiotics, the resistance rates to some kinds of antibiotics were increasing. The distribution of typhoid was sporadic in Jiangsu and without the dominant strain, it was unlikely that typhoid could become epidemic in the future, in Jiangsu.

【Key words】 Typhoid; Paratyphoid; Epidemiologic characteristics; Drug resistance; Pulse-field gel electrophoresis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.12.016

基金项目:江苏省“十二五”科教兴卫工程(ZX201109)

作者单位:210009 南京,江苏省疾病预防控制中心

通信作者:汤奋扬, Email: tfyepi@163.com

伤寒/副伤寒的发生和流行与居住环境、卫生状况密切相关。2000年北美地区发病率低于1/10万^[1],但在卫生状况较差的非洲、拉丁美洲及南亚等地区,仍有较高的发病率和病死率^[2]。进入21世纪以来,江苏省伤寒/副伤寒疫情常有反复,为此对2007—2011年的流行特征、病原菌耐药性以及分子分型进行分析,以确定今后的监测重点。

材料与方 法

1. 资料和菌株来源:2007—2011年江苏省伤寒/副伤寒传染病疫情资料来自中国疾病预防控制中心信息系统。210株伤寒/副伤寒沙门菌分离自2007—2011年江苏省监测收集的腹泻病例。

2. 研究方法:生化、血清学鉴定参照《伤寒副伤寒防治手册》(第2版)。药敏试验采用K-B纸片扩散法。分子分型采用脉冲场凝胶电泳(PFGE),即取适量菌,置细胞悬浊液中调整浓度至4.0~4.5麦氏单位,在400 μl 菌悬液中加入20 μl 蛋白酶K(终浓度为0.5 mg/ml)和400 μl 1% Seakem Gold:1% SDS制成胶块;每5 ml 细胞裂解液加入25 μl 蛋白酶K(20 mg/ml)裂解细菌;酶切缓冲液37℃平衡15 min后,45 U *Xba* I 限制性内切酶37℃消化4 h(电泳条件:初始脉冲2.2 s, 终末脉冲63.8 s, 120°夹角, 电泳时间16 h)。菌株分离鉴定、药敏试验培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司;API20E生化鉴定条购自法国生物梅里埃公司;诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司;药敏纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司;限制性内切酶*Xba* I 购自宝生物工程(大连)有限公司;蛋白酶K购自AMRESCO公司。脉冲场凝胶电泳仪为CHEF-DR III system(Bio-Rad)。

3. 数据分析:利用BioNumerics (Version 6.6)进行PFGE图谱聚类分析,聚类分析选择非加权配对算术平均法(UPGMA),条带位置差异容许度1.5%,优化值为0.5%,相似性系数采用Dice系数。使用SPSS 11.5统计软件对数据进行分析,率的检验使用 χ^2 检验;两两比较采用 χ^2 分割法。

结 果

1. 流行概况及特征:2007—2011年江苏省共报告伤寒/副伤寒1810例,年均报告发病率0.47/10万,发病率总体呈下降趋势,未发现死亡病例。其中伤寒1481例,年均报告发病率为0.39/10万;副伤寒发病329例,年均报告发病率0.09/10万。

(1)时间分布:全年各月份均有病例报告。每年

5月病例开始增加,6—11月为发病高峰,各高峰月病例数基本持平,6—11月累计报告1270例,占5年病例总数的72.41%。

(2)地区分布:各市均有病例报告,且分布不均。年均报告发病率居前3位的是镇江、苏州和南通市,分别为0.89/10万、0.81/10万和0.74/10万。徐州市年均报告发病率最低(0.12/10万)。

(3)人群分布:0岁组年均发病率最高(1.70/10万),35~39岁组最低(0.28/10万);成人组中以70~74岁人群年均发病率较高(0.67/10万)(图1)。男性年均发病率为0.47/10万,女性为0.46/10万,男/女性别比为1.02:1。职业分布以农民、散居儿童和学生所占比例较高,累计病例数分别占36.54%、13.96%和11.74%。不同年份各职业发病例数构成比的差异有统计学意义($\chi^2=484.72, P<0.01$),其中农民的构成比由2007年40.49%下降至2011年的31.74%,散居儿童由2007年10.72%上升至2011年16.14%。

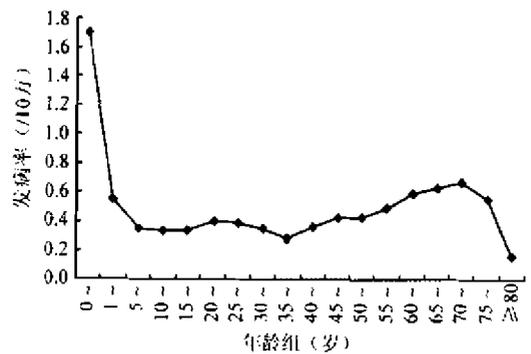


图1 2007—2011年江苏省伤寒/副伤寒年均发病率年龄组分布

2. 病原学特征:

(1)菌型分布:2007—2011年病原学监测共分离阳性菌株210株。病原谱以伤寒沙门菌为主(66.19%, 139/210),其次为甲型副伤寒沙门菌23.81%(50/210),乙型副伤寒沙门菌5.71%(12/210)和丙型副伤寒沙门菌4.29%(9/210)。

(2)耐药性:210株伤寒/副伤寒沙门菌中对萘啶酸耐药率最高(66.19%),其次是复方新诺明(24.76%)。敏感药物有氨苄西林、头孢噻吩、头孢噻肟、庆大霉素、环丙沙星和四环素,耐药率均<10.00%。副伤寒丙型菌对氨苄西林耐药率高于甲型菌和伤寒沙门菌;乙、丙型菌对庆大霉素和四环素的耐药性高于甲型菌和伤寒沙门菌;甲型菌对萘啶酸的耐药率高于乙型菌;丙型菌对复方新诺明耐药率高于甲型菌(表1)。30.00%(63/210)的伤寒/副伤寒沙门菌呈多重耐药,其中以两重耐药为主,占多重耐药的61.90%(39/63),其次为三重耐药(14.29, 9/

表1 2007—2011年江苏省伤寒/副伤寒沙门菌对9种抗菌药物耐药性分析

| 抗菌药物 | 伤寒沙门菌 | | 副伤寒沙门菌 | | | 合计 (n=210) | χ ² 值 | P值 |
|---------|-----------|-----------|--------------|-------------|-------------|---------------|--------------------|----|
| | (n=139) | (n=50) | 甲型 (n=12) | 乙型 (n=9) | 丙型 (n=9) | | | |
| 氨苄西林 | 9(6.47) | 2(4.00) | 3(25.00) | 4(44.44) | 18(8.57) | 21.03 | <0.01 ^a | |
| 阿莫西林/棒酸 | 14(10.07) | 5(10.00) | 2(16.67) | 2(22.22) | 23(10.95) | 1.73 | 0.630 | |
| 头孢噻吩 | 16(11.51) | 1(2.00) | 1(8.33) | 0(0.00) | 18(8.57) | 5.13 | 0.162 | |
| 头孢噻肟 | 3(2.16) | 3(6.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 6(2.86) | 2.64 | 0.450 | |
| 庆大霉素 | 2(1.44) | 0(0.00) | 2(16.67) | 2(22.22) | 6(2.86) | 22.88 | <0.01 ^a | |
| 萘啶酸 | 87(62.59) | 44(88.00) | 3(25.00) | 5(55.56) | 139(66.19) | 20.99 | <0.01 ^a | |
| 环丙沙星 | 5(3.60) | 2(4.00) | 1(8.33) | 0(0.00) | 8(3.81) | 1.03 | 0.794 | |
| 四环素 | 6(4.32) | 1(2.00) | 4(33.33) | 5(55.56) | 16(7.62) | 45.05 | <0.01 ^a | |
| 复方新诺明 | 38(27.34) | 6(12.00) | 3(25.00) | 5(55.56) | 52(24.76) | 9.17 | 0.027 ^a | |

注:^a差异有统计学意义(P<0.05)

63)。主要耐药谱型为耐萘啶酸-复方新诺明(28.57%, 18/63)和头孢噻吩-萘啶酸(12.70%, 8/63)。

趋势分析显示,伤寒沙门菌对阿莫西林/棒酸耐药率从2007年5.66%上升至2011年30.43%(χ²=13.93, P=0.007),对头孢噻吩耐药率从2007年0%上升至2011年22.64%(χ²=13.11, P=0.011)。

(3)PFGE分型:使用Xba I限制性内切酶,对2009—2011年81株伤寒沙门菌进行PFGE分型。图2显示共分为4个克隆群(A~D)37个PFGE型(JPPX01.JS0001~JS0037),相似度为52.89%~100%,主要克隆群A、B相似度>77.67%。2株以上菌株同属一种带型的型别有11种,优势带型为JPPX01.JS0027(11.11%, 9/81),其次为JPPX01.JS0018、JPPX01.JS0024、JPPX01.JS0009,分别占9.88%(8/81)、8.64%(7/81)和8.64%(7/81)。

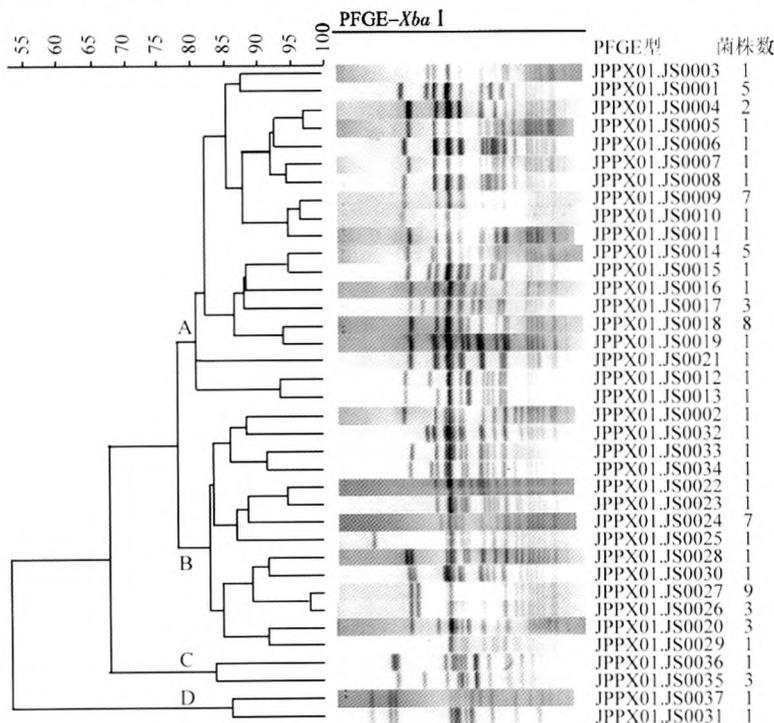


图2 2009—2011年江苏省伤寒沙门菌PFGE聚类分析

2009—2011年中JPPX01.JS0001、JPPX01.JS0018和JPPX01.JS0024均有分布,其他带型仅存在于部分年份。地区分布显示,JPPX01.JS0001和JPPX01.JS0027仅存在于苏州地区;JPPX01.JS0014、JPPX01.JS0018和JPPX01.JS0024分布较广,后2种型别覆盖13个地级市中的5个。

比对PFGE指纹图谱以分析特征菌型的成簇性,发现3起疫情的病例具有聚集性趋势(表2)。如2009年泰州地区5例的PFGE型别均为JPPX01.JS0009,

其中4例发病集中在5月24日至6月6日;JPPX01.JS0027仅出现在2011年苏州地区,其中7例分布在7月中旬至8月中旬;2009年JPPX01.JS0018尽管分布在4个城市,但淮安、泰州、盐城的5例发病时间主要集中在9月中下旬至10月初。

伤寒沙门菌耐药株PFGE型别分布特征显示,耐药株分属A~C群26个PFGE型。耐1或2种抗菌药物的菌株,各耐药谱型对应多个PFGE型别(不包括耐药谱为头孢噻吩和头孢噻吩-环丙沙星);但对耐3种以上药物菌株,每种耐药谱型具有独有的PFGE型别,同属A群。同时耐萘啶酸和环丙沙星的耐药谱型萘啶酸-环丙沙星-复方新诺明(NA-CI-SM)和头孢噻吩-庆大霉素-萘啶酸-环丙沙星(CF-GE-NA-CI)分属JPPX01.JS0006和JPPX01.JS0009,相似度为87.81%(表3)。

讨论

江苏省伤寒/副伤寒发病率从1980—1998年的年均34.34/10万^[3]下降至2007—2011年的0.47/10万,已与发达国家基本持平。Crump等^[1]研究发现伤寒/副伤寒不同流行强度地区其高发病年龄组有差异。本研究也显示,随着发病率的下降,江苏地区高发人群由过去的青壮年转为婴幼儿,而农民仍是主要发病人群,但比例有所下降,散居儿童比例有增加。提示根据新的流行特征应调整防控策略,散居婴幼儿和农村老年人群作为重点监测和干预对象。

已有研究显示伤寒/副伤寒沙门菌对传统一线药物(氨苄西林、氯霉素、复方新诺明)具有较高多重耐药率,且耐药菌株有地域差异^[2]。江苏省伤寒/副伤寒

表 2 2009—2011 年江苏省病例来源伤寒沙门菌主要菌型及发病时间(年-月-日)分布

| 地区 | 菌 型 | | | | | |
|-----|--|--|--------------------------|--------------------------|--|--|
| | JPPX01.JS0001 | JPPX01.JS0009 | JPPX01.JS0014 | JPPX01.JS0018 | JPPX01.JS0024 | JPPX01.JS0027 |
| 常州 | | | 2011-09-20 | 2009-06-16 | 2011-04-23 | |
| 淮安 | | | | 2009-09-14 | | |
| 苏州 | 2009-06-18 2009-07-25 2010-04-06 2010-08-21 2011-07-17 | 2009-04-18 2009-06-23 | 2009-06-03 2011-08-09 | 2011-03-17 2011-04-01 | 2009-06-16 | 2011-05-26 2011-07-17 2011-07-18 2011-07-22 2011-07-22 2011-07-26 2011-08-05 2011-08-16 2011-09-07 |
| 泰州 | | 2009-04-10 2009-05-25 2009-06-01 2009-06-01 2009-06-10 | | 2009-09-23 2009-09-28 | | |
| 盐城 | | | | 2009-09-18 2009-10-02 | 2009-09-25 2009-10-18 2010-08-20 | |
| 南通 | | | 2009-11-12 | | 2011-01-26 | |
| 无锡 | | | | | 2011-07-29 | |
| 连云港 | | | 2010-05-28 | | | |

程度较高,可能有相同起源,需加强监测。相对于两重及以下耐药谱的基因多态性,三重以上耐药谱 PFGE 型别单一,推测该耐药菌株出现较晚,不易与造成基因多态性的接合性耐药质粒进行基因重组^[7],耐药菌株不易扩散。

江苏省伤寒沙门菌 PFGE 分型结果显示菌株型别分散,变异度大,表明目前伤寒呈高度散发状态。以往伤寒长期流行大多由单一菌型播散引起,如 20 世纪末江苏省伤寒高发时期, D1 噬菌体型曾在数年占绝对优势,近年的菌株未出现占绝对优

表 3 2007—2011 年江苏省伤寒沙门菌耐药菌株 PFGE 型别分布

| 耐药类型 | PFGE 克隆群 | 株数(PFGE 型别数) |
|-------------|----------|-----------------------|
| CF | A | 1(3) |
| SM | B | 8(2, 24) |
| NA | A | 13(4, 15, 18, 19, 21) |
| | B | 6(23, 25, 26, 28) |
| | C | 2(36, 37) |
| CF-CI | B | 1(22) |
| NA-SM | A | 3(5, 7, 11) |
| | B | 3(29, 30, 32) |
| CF-NA | A | 1(10) |
| | B | 4(27) |
| NA-CI-SM | A | 1(6) |
| CF-GE-NA-CI | A | 7(9) |
| AP-AC-CF-NA | A | 3(17) |

注:CF(头孢噻吩); SM(复方新诺明); NA(萘啶酸); CI(环丙沙星); NA(萘啶酸); GE(庆大霉素); AP(氨基西林); AC(阿莫西林/棒酸)

势的菌型,推测近期发生伤寒大规模流行的可能性较小。其中部分型别具有地域分布特征, JPPX01.JS0001 仅分布在苏州地区,各年份均有检出,属于地区独特性菌型; JPPX01.JS0014、JPPX01.JS0018 和 JPPX01.JS0024 在多个地区均有检出,属于省内扩散性菌型,对此应加强监测,防控区域性流行。本研究发现 3 起疫情的病例具有聚集性特征,分别发生在泰州(2009 年)、苏州(2011 年)、淮安/泰州/盐城市(2009 年),而后者尽管分布在不同地区,但相同菌型病例几乎同时出现,可能为呈散发特征的聚集性事件。由于本研究为回顾性分析,未进行及时的流行病学调查,病例间的关联性尚无法确认。

沙门菌多重耐药率为 30.00%,主要多重耐药谱型为耐萘啶酸-复方新诺明,尽管目前菌株对多数抗生素较为敏感,但耐药性逐年增加。在传统一线药物替代的氟喹诺酮类药物中,萘啶酸耐药率较高,如美国 1999—2006 年监测数据显示耐药率为 38.00%^[4]。本研究中甲型副伤寒沙门菌耐药率高达 88.00%,伤寒沙门菌为 62.59%;但环丙沙星效果较好,耐药率仅为 3.81%。有研究表明^[5,6], *gyrA* 耐药基因的单基因突变可导致萘啶酸耐药株中出现对环丙沙星敏感性降低的菌株,感染此类菌株会导致病程延长,甚至治疗失败。江苏省伤寒沙门菌已出现两种同时耐萘啶酸和环丙沙星的多重耐药谱 NA-CI-SM 和 CF-GE-NA-CI, PFGE 分型显示这两种谱型同属 A 群,相似

程度较高,可能有相同起源,需加强监测。相对于两重及以下耐药谱的基因多态性,三重以上耐药谱 PFGE 型别单一,推测该耐药菌株出现较晚,不易与造成基因多态性的接合性耐药质粒进行基因重组^[7],耐药菌株不易扩散。

江苏省伤寒沙门菌 PFGE 分型结果显示菌株型别分散,变异度大,表明目前伤寒呈高度散发状态。以往伤寒长期流行大多由单一菌型播散引起,如 20 世纪末江苏省伤寒高发时期, D1 噬菌体型曾在数年占绝对优势,近年的菌株未出现占绝对优

参 考 文 献

- [1] Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. Bull WHO, 2004, 82(5): 346-353.
- [2] Crump JA, Mintz ED. Global trends in typhoid and paratyphoid fever. Clin Infect Dis, 2010, 50(2): 241-246.
- [3] Bao CJ, Hu YM, Zhu YL. Analysis on epidemic characteristics of typhoid fever in Jiangsu province from 1980 to 1998. Dis Surv, 2000, 15(4): 132-133. (in Chinese)
- [4] Lynch MF, Blanton EM, Bulens S, et al. Typhoid fever in the United States, 1999-2006. JAMA, 2009, 302(8): 859-865.
- [5] Threlfall EJ, Ward LR, Skinner JA, et al. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhi* and treatment failure. Lancet, 1999, 353: 1590-1591.
- [6] Crump JA, Kretsinger K, Gay K, et al. Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States FoodNet multicenter retrospective cohort study. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52: 1278-1284.
- [7] Kubota K, Barrett TJ, Ackers ML, et al. Analysis of *Salmonella enterica* serotype typhi pulsed-field gel electrophoresis patterns associated with international travel. J Clin Microbiol, 2005, 43: 1205-1209.

(收稿日期: 2012-06-26)
(本文编辑: 张林东)