

· 实验室研究 ·

北京市 2010–2020 年多重耐药肯塔基沙门菌流行特征分析

曲梅 黄瑛 田祎 张新 贾蕾 吕冰 王全意

北京市疾病预防控制中心/北京市预防医学研究中心/食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室 100013

通信作者:吕冰, Email: lvbing2001@163.com

【摘要】 目的 了解北京市肯塔基沙门菌临床分离株的流行情况、耐药水平及分子特征。
方法 对 2010–2020 年分离的 22 株肯塔基沙门菌采用微量肉汤稀释法进行抗生素药物敏感性检测;全基因组测序进行多位点序列分型、基因组岛和耐药基因识别。采用 PFGE 分析菌株的分子流行病学特征。
结果 22 株菌对 8–22 种抗生素耐药,尤其是对环丙沙星、阿奇霉素和头孢菌素类等都表现为超高水平的多重耐药。21 株菌超广谱 β -内酰胺酶表型阳性。全基因组序列分析显示,22 株肯塔基沙门菌均为 ST198,携带 SGI1-K 基因组岛。所有菌株均有耐药基因 *tetA*、*sul1*、*qacE*,喹诺酮耐药决定区 *gyrA* 基因存在 2 个突变位点(S83F、D87 N)、*parC* 基因存在 3 个突变位点(T57S、S80I、T255S)。 β -内酰胺类相关耐药基因(*blaCTX-M-55*、*blaCTX-M-14b*、*blaTEM-141*、*blaTEM-206*、*blaTEM-209*、*blaTEM-214*、*blaTEM-1B*)、氨基糖甙类耐药相关基因[*aac(3)-Id*、*aac(3)-IId*、*aac(6')-Iaa*、*aadA7*、*aadA17*、*aph(3')-Ia*、*aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id*、*rmtB*]以及 *floR*、*dfrA14*、*mphA* 和 *qnrS1* 等基因在不同年代菌株间存在明显差异。PFGE 图谱分析显示,22 株菌株之间相似性 >85%,与全球广泛传播的 ST198-X1 流行株高度同源,在传播扩散过程中,耐药谱和 PFGE 图谱都发生了变化,分为两大聚类簇。
结论 北京市流行的肯塔基沙门菌为多重耐药的 ST198-X1-SGI-1K 国际流行株,自 2016 年以来保持低水平流行,引起散发感染病例和聚集性腹泻事件。对氟喹诺酮类、ESBL 和阿奇霉素等耐药严重,应加强多重耐药肯塔基沙门菌的监测。

【关键词】 肯塔基沙门菌; 多重耐药; 耐药基因; 全基因组测序

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10714002-003-002)

Analysis on epidemiological characteristics of multidrug-resistant *Salmonella* Kentucky in Beijing, 2010–2020

Qu Mei, Huang Ying, Tian Yi, Zhang Xin, Jia Lei, Lyu Bing, Wang Quanyi

Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China

Corresponding author: Lyu Bing, Email: lvbing2001@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the epidemiological, drug resistance and molecular characteristics of *Salmonella* (*S.*) Kentucky strains isolated from diarrheal patients in Beijing.
Methods The drug susceptibility of 22 *S.* Kentucky strains isolated in Beijing during 2010–2020 was tested by using the micro broth dilution method. The multilocus sequence typing (MLST), drug resistance genes and *Salmonella* genomic island (SGI) identifications of the strains were performed by whole-genome sequencing (WGS). The pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was performed to analyze the molecular epidemiological characteristics of the isolates. **Results** The 22 strains were

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20201206-01382

收稿日期 2020–12–06 本文编辑 斗智

引用本文:曲梅,黄瑛,田祎,等.北京市 2010–2020 年多重耐药肯塔基沙门菌流行特征分析[J].中华流行病学杂志,2021,42(7):1252–1259. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20201206-01382.



highly resistant to 8-22 kinds of antibiotics, especially to ciprofloxacin, cephalosporins and azithromycin, etc., showing a super high level of multidrug resistance and 21 strains were positive for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL). The WGS analysis revealed that all the isolates belonged to ST198, carrying SGI1-K. The drug resistance genes *tetA*, *sul1* and *qacE* were identified in all strains and Quinolone resistance-determining regions (QRDRs) showed 2 mutations in *gyrA* (S83F, D87 N) and 3 mutations in the *parC* gene (T57S, S80I, T255S). The resistance genes associated with β -lactam antibiotics (*blaCTX-M-55*, *blaCTX-M-14b*, *blaTEM-141*, *blaTEM-206*, *blaTEM-209*, *blaTEM-214*, *blaTEM-1B*), resistance genes associated with aminoglycosides [*aac(3)-IId*, *aac(3)-IId*, *aac(6')-Iaa*, *aadA7*, *aadA17*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *rmtB*] as well as *floR*, *dfrA14*, *mphA* and *qnrS1* had significant differences in the strains of different years, which were highly consistent with the drug-resistant phenotype. Furthermore, phylogenetic analysis showed that the similarity of the 22 strains was more than 85%, and the strains were highly homologous to CIP-resistant ST198-X1 circulating in the world. In the process of spread, the drug resistance and PFGE spectrums had changed, two clusters had formed. **Conclusions** The *S. Kentucky* strains isolated in Beijing shared high homology with the multidrug-resistant strain ST198-X1-SGI-1K isolated in the world, which has maintained a low level of spread since 2016, causing sporadic infections and clusters of diarrhea, and has serious resistances to fluoroquinolones, ESBLs and azithromycin. The surveillance for multidrug-resistant *S. Kentucky* should be strengthened.

【Key words】 *Salmonella Kentucky*; Multidrug resistance; Resistance genes; Whole-genome sequencing

Fund program: National Science and Technology Major Project of China (2018ZX10714002-003-002)

沙门菌属是一种重要的人兽共患病病原菌,也是引起感染性腹泻和食物中毒最常见的病原菌之一。每年全球因沙门菌感染引起的肠胃炎有 9 400 万例,死亡人数高达 15 万,导致不同程度的暴发和流行^[1]。WHO 最近将产生抗氟喹诺酮类药物的沙门菌优先列为对人类健康构成最大威胁的病原体^[2],因此沙门菌感染及日趋严重的耐药问题已成为全世界关注的公共卫生问题。

肯塔基沙门菌是一种肠道沙门菌血清型。自 1937 年报道以来一直与家禽密切相关,之后相继在各种食源性动物家禽与腹泻患者体内检出。环丙沙星耐药的 ST198 肯塔基沙门菌,自 2000 年以来在全球范围内广泛流行,在食物链传播及进化过程中,产生多重耐药菌株,尤其是对喹诺酮类药物和三代头孢菌素产生的抗性引起高度关注^[3-4]。在我国近年来也有人感染病例及污染食物的报道^[5-7]。北京市自 2010 年以来开展肠道门诊腹泻病例沙门菌的监测,为了解肯塔基沙门菌在北京市的流行情况,本研究通过 10 年来沙门菌的回顾性调查,对腹泻患者中分离到的 22 株肯塔基沙门菌进行抗生素耐药和 PFGE 和全基因组测序分析,以掌握肯塔基沙门菌的分子流行病学特征和耐药特性,为北京市的非伤寒沙门菌监测、临床治疗用药以及风险预测提供依据。

材料与方法

1. 菌株来源:肯塔基沙门菌共 22 株。其中 13 株来自 2010-2020 年北京市肠道门诊腹泻病例-沙门菌监测项目;另外 9 株来自 2020 年 7 月的一起腹泻聚集性疫情分离到的菌株。

2. 实验方法:

(1) 粪便沙门菌的分离培养:参照卫生部行业标准 WS 271-2008 附录 B 进行,生化反应符合并且血清抗原式符合 [8, 20:i:z6] 菌株,鉴定为肯塔基沙门菌。

(2) 药敏试验:采用最小抑菌浓度 (minimal inhibition concentration, MIC) 法,选择 28 种抗生素:氨苄西林 (AMP)、氨苄西林-舒巴坦 (AMS)、四环素 (TET)、氯霉素 (CHL)、复方新诺明 (SXT)、头孢唑林 (CFZ)、头孢西丁 (FOX)、头孢他啶 (CAZ)、头孢噻肟 (CTX)、头孢吡肟 (FEP)、庆大霉素 (GEN)、阿奇霉素 (AZI)、环丙沙星 (CIP)、链霉素 (STR)、磺胺异噁唑 (Sul)、萘啶酸 (NAL)、阿莫西林-克拉维酸 (AMC)、强力霉素 (DOX)、氨曲南 (AZM)、亚胺培南 (IMI)、美罗培南 (MEM)、卡那霉素 (KAN)、阿米卡星 (AMI)、左氧氟沙星 (LEV)、吉米沙星 (GMI)、米诺环素 (MIN)、多粘菌素 E (CT) 以及多粘菌素 B (PB) 进行沙门菌耐药性检测。结果与美国临床实

实验室标准化协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 2018 年标准比较, 以大肠埃希菌 (ATCC25922) 为质控菌株。耐药种类 ≥ 3 种抗生素, 既为多重耐药 (multidrug resistance, MDR)。

(3) 超广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum beta-lactamase, ESBL) 表型确证试验: 参照 CLSI 推荐的 MIC 法标准进行, 在初筛实验中头孢他啶或头孢噻肟 MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$; 在 ESBL 表型确证试验中, 对两组中任何一个药物, 在加克拉维酸后 MIC 值与不加克拉维酸的 MIC 相比, 降低值 ≤ 3 个倍比稀释浓度, 确证该菌株产 ESBLs。

3. 全基因组测序: 细菌基因组 DNA 提取采用 DNA mini Kit 试剂盒, 由德国 Qiagen 凯杰企业管理 (上海) 有限公司生产, 按操作手册进行提取。核酸的浓度用 Qubit DNA-HS 进行定量, 经测定所有样品的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.0 之间, 基因组 DNA 的浓度 $>100 \text{ ng}/\mu\text{l}$, 每个样品的最终体积是 $50 \mu\text{l}$ 。委托中国北京诺禾致源生物公司基于 Illumina PE150 平台进行双末端高通量测序。对测序数据进行质量控制, 去除低质量 reads 和接头序列, 数据过滤后得到 Clean Data, 利用 SPAdes (v3.13) 软件进行 denovo 组装, 得到基因组的 contigs 序列。上传至基因组流行病学中心数据平台 (Center for Genomic Epidemiology, <http://www.genomicpidemiology.org/>) 进行多位点序列分型 (MLST) 及耐药基因鉴定。并依据文献 [8] 在全基因组序列中筛查沙门基因组岛 1 (*Salmonella* genomic island, SGI1) 及其变异体 (SGI1-K、P 和 Q)。

4. PFGE 分型: 参照 PulseNet 制定的沙门菌 PFGE 标准分型方法。内切酶 *Xba* I (40 U), 37°C 酶切 3 h。电泳条件: 电压 6 V/cm, 脉冲时间从 2.2~63.8 s, 线性转换, 转换角度 120° , 电泳时间 19 h, 电泳温度 14°C 。沙门菌标准株 H9812 作为分子量标记。采用 BioNumerics 5.0 软件对电泳图像进行处理和比对分析。聚类树状图根据非加权配对算术平均法 (unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA) 构建。聚类相似性系数采用距离法计算, 得到菌株带型相似性的聚类分析树。

结 果

1. 流行情况: 北京市自 2010 年开展肠道门诊腹泻病例的沙门菌监测, 2016 年之前从未分离到

肯塔基沙门菌, 2016 年开始在散发腹泻病例中分离到肯塔基沙门菌, 2016 年 (9 株)、2018 年 (2 株)、2019 年 (2 株)、2020 年 (1 株); 另外 2020 年 7 月某区的一起 10 人的聚集性腹泻疫情分离到 9 株菌; 共 22 株菌。这些菌株的病例年龄 26~70 岁, 平均年龄 42.2 岁, 男女性比例为 2.1:1 (15:7)。

2. 耐药特征: 药物敏感试验结果见表 1。肯塔基沙门菌对大部分 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖甙类以及四环素类药物耐药严重。22 株菌对 TET、DOX、Sul、KAN、NAL、CIP、LEV 和 GMI 全部耐药; 对 AMP、CFZ、CTX、FEP、GEN 和 STR 21 株耐药 (95.5%); 对单环内酰胺类 AZM 18 株耐药 (81.8%); 对其他各类抗生素的耐药率也均在 45.5% 以上。除菌株 2020SM018 外, 21 株菌是 ESBL 阳性。22 株菌对 IMI、MEM、CT 和 PB 完全敏感; 对 AMC 的敏感率为 72.7%, 无耐药。多重耐药分析显示, 全部菌株均对 8 种以上抗生素耐药, 最多可达对 22 种抗生素的耐药, 有多种耐药表型。其中 9 株菌 (40.9%) 表现为最长的耐药模式: AMP-AMS-TET-CHL-SXT-CFZ-CTX-CAZ-GEN-NAL-AZI-Sul-CIP-MIN-AMI-AZM-FEP-LEV-DOX-KAN-STR-GMI; 7 株菌 (31.8%) 对 16 种药物耐药, 模式: AMP-AMS-TET-CFZ-CTX-GEN-NAL-Sul-CIP-AZM-FEP-LEV-DOX-KAN-STR-GMI。

3. 全基因组测序分析 MLST、SGI-1 基因组岛和耐药基因携带情况: 22 株菌的全基因组测序数据上传至 CGE 基因组流行病学中心, 进行 MLST 分型和耐药基因筛查。22 株菌均为相同的 MLST 序列型: ST198 (*aroC*₇₆、*dnaN*₁₄、*hemD*₃、*hisD*₇₇、*purE*₆₄、*sucA*₆₄、*thrA*₆₇)。22 株菌均携带 SGI1-K 基因组岛。耐药基因鉴定显示 (表 2): 22 株均携带四环素类耐药基因 *tetA*、磺胺类耐药基因 *sul1*、消毒剂类耐药基因 *qacE*、喹诺酮耐药决定区 (quinolone resistance determining regions, QRDRs) *gyrA* 基因 2 个位点突变 (S83F、D87N)、*parC* 基因 3 个位点的突变 (T255S、T57S、S80I)。另外, β -内酰胺类相关耐药基因 7 种 (*bla*_{CTX-M-55}、*bla*_{CTX-M-14b}、*bla*_{TEM-141}、*bla*_{TEM-206}、*bla*_{TEM-209}、*bla*_{TEM-214}、*bla*_{TEM-1B})、氨基糖甙类耐药相关基因 9 种 [*aac*(3)-*Id*、*aac*(3)-*IId*、*aac*(6')-*Iaa*、*aadA7*、*aadA17*、*aph*(3')-*Ia*、*aph*(3'')-*Ib*、*aph*(6)-*Id*、*rmtB*]、氯霉素类 (*floR*)、甲氧苄氨嘧啶类 (*dhfrA14*)、大环内酯类 (*mphA*)、喹诺酮类 (*qnrS1*)、磷霉素类 (*fosA3*)、利福平类 (*ARR2*) 和林可霉素类 (*InuF*), 以上这些耐药

表 1 22 株肯塔基沙门菌抗生素耐药性

抗生素	菌株编号																						
	2016SM164	2016SM167	2016SM168	2016SM169	2016SM170	2016SM172	2016SM173	2016SM174	2018SM099	2018SM190	2019SM064	2019SM078	2020SM010	2020SM011	2020SM012	2020SM013	2020SM014	2020SM015	2020SM016	2020SM017	2020SM018	2020SM023	
氨苄西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
氨苄西林-舒巴坦	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
四环素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
氯霉素	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
复方新诺明	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
头孢唑林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
头孢噻肟	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
头孢他啶	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
头孢西丁	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	S	S	S	I	I	S	I	
庆大霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
亚胺培南	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
萘啶酸	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
阿奇霉素	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
磺胺异噁唑	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
环丙沙星	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
阿莫西林-克拉维酸	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	I	S	I	I	S	I	
多粘菌素 E	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
多粘菌素 B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
米诺环素	S	S	S	I	S	I	R	S	S	S	I	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R
阿米卡星	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
氨基糖甙类	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
头孢吡肟	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
美罗培南	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
左氧氟沙星	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
强力霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
卡那霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
链霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
吉米沙星	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
超广谱β-内酰胺酶	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y

注: Y: ESBL 菌株; N: 非 ESBL 菌株; R: 耐药; S: 敏感; I: 中介

基因,除菌株 2020SM018 外,在散发菌株和暴发菌株间存在明显差异。表现为自 2019SM078 以后的菌株获得耐药基因的数量和种类明显增多,相对应的抗生素耐药表型由敏感变成了耐药:如 CHL、SXT、CAZ、AZI 和 AMI(表 1);而且多达 10 种药物对肯塔基沙门菌的 MIC 值也成倍数显著增高(表 3):如 CHL 的 MIC 值由原来 4 μg/ml 到 64 μg/ml,提高 16 倍、SXT 提高 32 倍、CAZ 提高 4 倍、AZI 提高 8~16 倍、氨基糖甙类 GEN 和 AMI 提高 2~32 倍、四环素类 MIN 提高 4 倍、氟喹诺酮类 CIP 和 GMI 提高 2~4 倍、AZM 提高 2 倍。其中 CIP MIC 值>32 μg/ml, CTX MIC 值>8 μg/ml, SXT MIC 值>8/152 μg/ml,

AZI MIC 值 64 μg/ml,都表现为超高水平耐药。

4. PFGE 聚类及遗传进化分析:PFGE 聚类分析显示,22 株之间存在 0~4 条带的差异,相似性>85%,亲缘关系相近,属于同一克隆来源,与全球广泛传播的 CIP 耐药的 ST198-X1 克隆株比较^[8],带型高度相似,故属于该国际流行株。22 株菌分为 2 大聚类簇(图 1)。2016 年 8 株散发菌株与 2018 年 2 株散发菌株带型一致,属于 Cluster B,菌株 2019SM064 与其有 1 条带的差异,相似度为 96%,也属于 Cluster B。在 Cluster A 中,2020 年的 9 株暴发菌株中有 7 株带型完全一致,与其他 2 株菌 2020SM014 和 2020SM018 存在 1~2 条带的差异,相似度也>

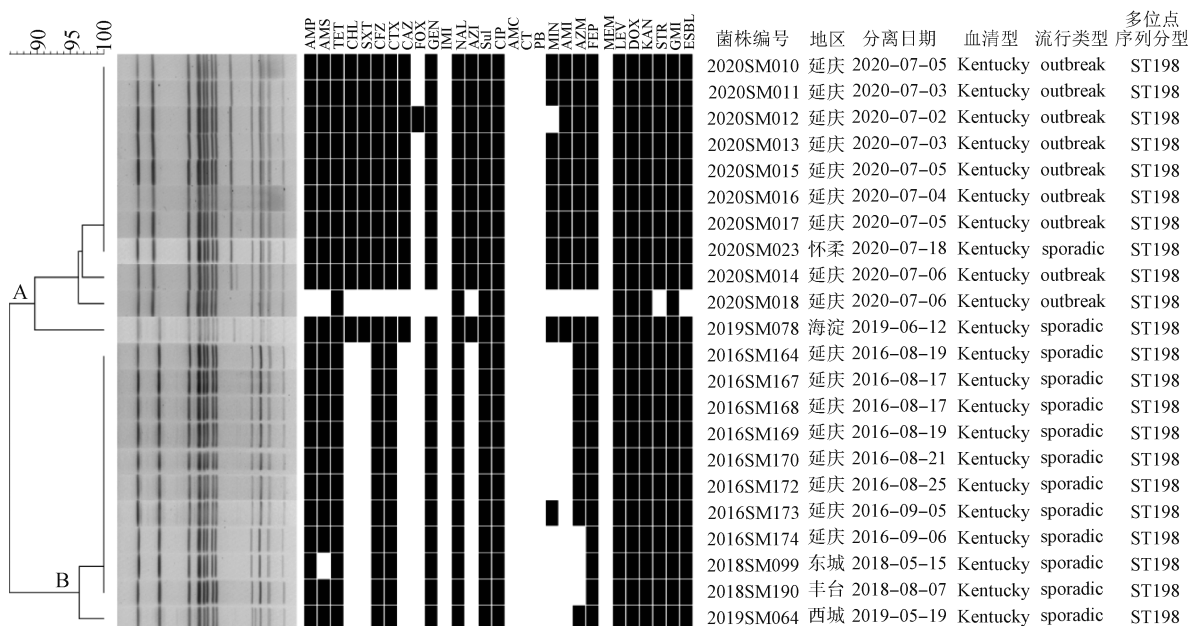
表 2 22 株肯塔基沙门菌耐药基因

抗生素基因	2016 年散发 (8 株)	2018 年散发 (2 株)	2019 年散发 (1 株)	2019 年散发 (1 株)	2020 年暴发 (8 株)	2020 年暴发 (1 株)	2020 年散发 (1 株)
四环素类							
<i>tetA</i>	+	+	+	+	+	+	+
磺胺类							
<i>sul1</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>dfrA14</i>				+	+		+
氯霉素类							
<i>floR</i>				+	+		+
氨基糖苷类							
<i>aac(3)-Id</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>aac(6')-Iaa</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>aadA7</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>aph(3')-Ia</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>aph(3'')-Ib</i>	+	+	+				
<i>aph(6)-Id</i>	+	+	+				
<i>aac(3)-IIIa</i>				+	+		+
<i>aadA17</i>				+	+		+
<i>rmtB</i>				+	+		+
β-内酰胺类							
<i>blaCTX-M-14b</i>	+	+	+				
<i>blaCTX-M-55</i>				+	+		+
<i>blaTEM-141</i>				+	+		+
<i>blaTEM-206</i>				+	+		+
<i>blaTEM-209</i>				+	+		+
<i>blaTEM-214</i>				+	+		+
<i>blaTEM-1B</i>				+	+		+
大环内酯类							
<i>mphA</i>					+		+
喹诺酮类							
<i>qnrS1</i>					+		+
QRDRs 点突变							
<i>parC</i> : T255S	+	+	+	+	+	+	+
<i>parC</i> : T57S	+	+	+	+	+	+	+
<i>parC</i> : S80I	+	+	+	+	+	+	+
<i>gyrA</i> : S83F	+	+	+	+	+	+	+
<i>gyrA</i> : D87 N	+	+	+	+	+	+	+
磷霉素类							
<i>fosA3</i>				+	+		+
利福平类							
<i>ARR2</i>				+	+		+
林可霉素类							
<i>lnuF</i>				+	+		+
消毒剂类							
<i>qacE</i>	+	+	+	+	+	+	+
菌株编号	2016SM164	2018SM099	2019SM064	2019SM078	2020SM010	2020SM018	2020SM023
	2016SM167	2018SM190			2020SM011		
	2016SM168				2020SM012		
	2016SM169				2020SM013		
	2016SM170				2020SM014		
	2016SM172				2020SM015		
	2016SM173				2020SM016		
	2016SM174				2020SM017		

注: + 携带该基因

96%, 由于这是一起聚集性腹泻疫情分离到的 9 株菌, 存在流行病学关联, 菌株高度同源, 认为来自同一克隆株; 另外 Cluster A 中还包括 1 株散发菌株 2019SM078, 虽然与上述菌株间亲缘关系稍远, 但

相似度也在 90% 以上。值得注意的是 2020SM018 菌株, 相较于其他暴发菌株缺少了 1 条 170 kb 左右的大片段, 造成耐药表型与耐药基因也与其他菌株存在明显差异。



注: AMP: 氨苄西林; AMS: 氨苄西林-舒巴坦; TET: 四环素; CHL: 氯霉素; SXT: 复方新诺明; CFZ: 头孢唑林; CTX: 头孢噻肟; CAZ: 头孢他啶; FOX: 头孢西丁; GEN: 庆大霉素; IMI: 亚胺培南; NAL: 萘啶酸; AZI: 阿奇霉素; Sul: 磺胺异噁唑; CIP: 环丙沙星; AMC: 阿莫西林-克拉维酸; CT: 多粘菌素 E; PB: 多粘菌素 B; MIN: 米诺环素; AMI: 阿米卡星; AZM: 氨基糖苷; FEP: 头孢吡肟; MEM: 美罗培南; LEV: 左氧氟沙星; DOX: 强力霉素; KAN: 卡那霉素; STR: 链霉素; GMI: 吉米沙星; ESBL: 超广谱β-内酰胺酶; 黑色方块表示菌株对抗生素有抗性, 无色表示中介或敏感

图 1 22 株肯塔基沙门菌聚类分析

讨论

ST198 肯塔基沙门菌是 20 世纪 90 年代中期在埃及首先被发现, 是肯塔基沙门菌多耐药流行株的共同祖先。2000 年以后, 在进化演变过程中, 获得了携带多种抗药基因的沙门菌基因组岛 (SGI1) 及其突变体 (SGI-1K) 等^[9], 其包含复杂的 I 类整合子、插入序列 (IS26) 和转座子等可移动遗传元件, 而具有了对 CIP、AMP、STR、GEN、Sul 和 TET 等多种抗生素的高水平耐药^[10], 在全球广泛传播。有流行病学证据证实, 该流行株已通过旅游者、动物性食品、外环境以及家禽、宠物、野生动物等多种感染来源, 在印度次大陆、东南亚地区和欧洲地区等快速播散^[3-4, 8, 11], 成为当地非伤寒沙门菌重点监测的国际流行株。而我国关于此血清型流行株的报道相对较少。最早的文献记录是 2009 年 7 月在四川省的一起食物中毒事件中分离到肯塔基沙门菌^[12], 但因缺乏详细的实验室数据, 无法确定是否为国际流行株。2016 年, 从浙江省^[6]和广东省^[7]的腹泻患者粪便和市售鸡肉中分离到肯塔基沙门菌, 对环丙沙星和头孢菌素等抗生素表现为高水平耐药。这意味着多重耐药肯塔基沙门菌在我国人和动物之间可能发生了一定传播, 对公共卫生造成威胁。

本研究通过对 2010 年以来沙门菌监测数据的回顾性分析发现, 2016-2020 年北京市腹泻患者中分离的 22 株肯塔基沙门菌, 属于国际上流行的环丙沙星耐药的 ST198-X1-SGI1-K 克隆株^[8, 10], 在 2016 年传入北京市, 当年从散发腹泻患者中分离到 8 株肯塔基沙门菌, 由于时间间隔不到 1 个月, 地点都集中在某一个区, 流行病学上存在密切关联, 而且耐药谱与 PFGE 图谱完全一致, 所以推测该流行株在北京市造成小范围的局部流行, 且与 2016 年浙江省腹泻患者和食品中分离到的肯塔基沙门菌 PFGE 图谱完全一致, 说明该克隆株在 2016 年国内其他地区也有扩散, 这一带型的克隆株在北京市 2018 年还持续存在, 保持着低水平传播, 但在扩散过程中发生累积的变异, 可以看到 2019 年分离到的 1 株菌 2019SM078 和 2020 年以后的菌株在抗生素选择压力下, 耐药谱和 PFGE 图谱都发生了一些变化, 由 Cluster B 群演变成 Cluster A 群。PFGE 图谱个别条带的变化, 展现出 ST198-X1 亚型的高度多样性, 可能与 IS26 转座活性和拷贝数变异引起的基因插入、缺失或转座, 导致菌株出现独特的基因重排形式有关^[10], 这需要后续进一步的实验和对基因组学数据的深度挖掘来验证。

细菌在药物长期的选择压力作用下, 耐药性会

不断增加,耐药表型与耐药基因之间往往存在着密切联系。喹诺酮类药物的耐药性与 QRDRs 基因的点突变有关^[13]。本研究通过全基因组序列分析,能准确鉴定出菌株所携带的全部耐药基因。所有菌株 QRDRs 的 *gyrA* 基因都发生了 2 个突变: S83F、D87 N; *parC* 基因有 3 个突变: T57S、S80I、T255S, 与环丙沙星耐药肯塔基沙门菌的相关报道一致^[8,11,14]。值得注意的是,质粒介导的喹诺酮类耐药基因 *qnrS1*, 仅在 2020 年分离的菌株中有检出, 而其他同类研究则未见报道。ESBL 也是由质粒介导的酶, 可以水解青霉素、AZM 和头孢菌素等, 对 CTX 的水解活性远高于 CAZ, 可被 β -内酰胺酶抑制剂抑制。本研究除菌株 2020SM018 外, CTX-M 型和/或 TEM 型 ESBL 耐药基因在所有菌株中均有检出, 但不同年代菌株基因亚型不同, 在聚类图上明显分为两大基因簇, 而且这些耐药基因的分布情况与菌株所表现出的对 AMP 和 CTX 高度耐药, 对 CAZ 部分耐药, 对 β -内酰胺酶抑制剂 AMC 高度敏感的表型特征一致。与 2016 年宁波市分离到的来自人源和食品菌株的耐药结果基本一致^[6]。磷酸转移酶 *mphA* 基因, 可灭活大环内酯类抗微生物药物^[8], 本研究在 2019 年以后菌株中检测到 *mphA* 基因, 并表现出对 AZI 的高耐药 (MIC 为 32~64 $\mu\text{g/ml}$), 应引起高度关注。另外, 还发现所有菌株均携带季胺类化合物消毒剂耐药基因 *qacE* 及磺胺类耐药基因 *sul1*, *qacE-sul1* 位于 I 类整合子 3' 端^[10], 这反映出北京市肯塔基沙门菌流行株对环境消毒剂和防腐剂已出现耐药, 今后对此流行株造成的院内感染和养殖业污染的防控将更为严峻。

氟喹诺酮类和三代头孢类抗生素是目前治疗沙门菌感染的首选用药^[15]。AZI 是治疗重症沙门菌感染的最佳用药^[16]。本研究发现, 北京市自 2016 年以来出现多重耐药 ST198-X1 肯塔基沙门菌的流行, 该流行株不但对氟喹诺酮类中的 CIP、LEV 呈现高水平耐药, 而且对 III、IV 代头孢菌素和 AZI 也出现了严重耐药, 对 8 种以上抗生素表现为多重耐药。这种超级耐药菌给临床用药带来极大挑战, 结合本研究结果, 临床治疗时可选用碳青霉烯类抗生素以及 β -内酰胺酶抑制剂的复合剂 AMC。ST198 多重耐药肯塔基沙门菌在广泛传播过程中不断获得最新的耐药性, 被视为全球高风险克隆株, 应在加强系统监测的同时, 规范抗生素的合理使用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(3): 318-327. DOI:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- [3] Le Hello S, Hendriksen RS, Doublet B, et al. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin[J]. J Infect Dis, 2011, 204(5): 675-684. DOI: 10.1093/infdis/jir409.
- [4] Antunes P, Mourão J, Campos J, et al. Salmonellosis: the role of poultry meat[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(2): 110-121. DOI:10.1016/j.cmi.2015.12.004.
- [5] 牛惠敏, 杨玲, 王艳芬. 一起肯塔基沙门氏菌食物中毒事件调查[J]. 医学动物防制, 2017, 33(8): 888-889. DOI: 10.7629/yxdwfwz201708024.
- [6] Niu HM, Yang L, Wang YF. Investigation on food poisoning incident of *Salmonella* kentucky[J]. J Med Pest Control, 2017, 33(8):888-889. DOI:10.7629/yxdwfwz201708024.
- [7] 杨元斌, 高红, 章丹阳, 等. 浙江省宁波市多重耐药肯塔基沙门菌的检出及病原学分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(6): 510-514. DOI:10.3784/j.issn.1003-9961.2018.06.015.
- [8] Yang YB, Gao H, Zhang DY, et al. Etiology of multi-drug resistant *Salmonella* Kentucky isolates from retail chicken and a patient in Ningbo[J]. Dis Surveill, 2018, 33(6): 510-514. DOI:10.3784/j.issn.1003-9961.2018.06.015.
- [9] 王少君, 孙康泰, 熊智颖, 等. 广东省零售市场鸡肉中肯塔基沙门菌的流行情况及耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(12): 2509-2517. DOI: 10.11843/j.issn.0366-6964.2019.12.015.
- [10] Wang SJ, Sun KT, Xiong ZY, et al. Analysis of prevalence and drug resistance of *Salmonella* Kentucky in chicken from retail markets in Guangdong[J]. Acta Vet Zootech Sin, 2019, 50(12):2509-2517. DOI:10.11843/j.issn.0366-6964.2019.12.015.
- [11] Le Hello S, Bekhit A, Granier SA, et al. The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain[J]. Front Microbiol, 2013, 4:395. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00395.
- [12] Le Hello S, Weill FX, Guibert V, et al. Early strains of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky sequence type 198 from Southeast Asia harbor *Salmonella* genomic island 1-j variants with a novel insertion sequence[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(10):5096-5102. DOI:10.1128/AAC.00732-12.
- [13] Hawkey J, Le Hello S, Doublet B, et al. Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198[J]. Microb Genom, 2019, 5(7): e000269. DOI:10.1099/mgen.0.000269.
- [14] Park AK, Shin E, Kim S, et al. Traveller-associated high-level ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* Serovar Kentucky in the Republic of Korea[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 22:190-194. DOI:10.1016/j.jgar.2019.12.014.
- [15] 王清, 代彦, 张勇. 首次在四川地区食物中毒中检出肯塔基沙门菌分析[J]. 现代预防医学, 2010, 37(20):3914-3916. DOI:CNKI:SUN:XDYF.0.2010-20-043.
- [16] Wang Q, Dai Y, Zhang Y. Detection Analysis on *Salmonella* Kentucky in food poisoning on the first time in the Sichuan region[J]. Mod Prev Med, 2010, 37(20): 3914-3916. DOI:CNKI:SUN:XDYF.0.2010-20-043.
- [17] Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance[J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(5). DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013.
- [18] Shah DH, Paul NC, Guard J. Complete genome sequence of a ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar kentucky sequence type 198 strain, PU131, isolated from a Human Patient in Washington State[J]. Genome Announc, 2018, 6(9): e00125-18. DOI: 10.1128/genomeA.00125-18.
- [19] Wen SC, Best E, Nourse C. Non-typhoidal *Salmonella* infections in children: Review of literature and recommendations for management[J]. J Paediatr Child Health, 2017, 53(10):936-941. DOI:10.1111/jpc.13585.
- [20] Hill DR, Beeching NJ. Travelers' diarrhea[J]. Curr Opin Infect Dis, 2010, 23(5): 481-487. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32833dfca5.