

· 实验室研究 ·

河南省2009—2011年伤寒副伤寒沙门菌分子分型与耐药研究

赵嘉咏 谢志强 穆玉蛟 苏佳 夏胜利 黄学勇 许汴利

450016 郑州, 河南省疾病预防控制中心

通信作者: 许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.01.024

【摘要】 目的 分析2009—2011年河南省伤寒副伤寒沙门菌临床分离株耐药状况与PFGE分型特征。**方法** 根据PulseNet公布的伤寒副伤寒沙门菌PFGE分型操作规程与美国临床实验室标准协会(CLSI)沙门菌K-B法药敏测试方案,对2009—2011年分离自河南省监测哨点医院78株伤寒副伤寒沙门菌进行抗生素药敏测试与PFGE分子分型。**结果** 78株伤寒副伤寒沙门菌对8类13种抗生素均有不同程度的耐药,62株为多重耐药菌株(79.5%),其中耐2~3种4株(5.1%),耐5~8种41株(52.6%),耐9~10种14株(17.9%),耐11~12种3株(3.8%);菌株对头孢类、喹诺酮类等5类抗生素耐药率总体呈上升趋势。经*Xba*I酶切与PFGE后,获得14种带型,每种带型包含菌株数1~47株不等,相似度为66.03%~100.00%。**结论** 2009—2011年河南省临床分离的伤寒副伤寒沙门菌耐药状况普遍比较严重,PFGE带型呈现多样性的同时又具有较显著的优势带型特点,部分带型与其对应的耐药谱具有一定的关联性和聚集性。

【关键词】 伤寒副伤寒沙门菌; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型; 药敏测试

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004201; 2013ZX10004203)

Characteristics of drug resistance and molecular type of *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi* isolated in Henan province, 2009–2011 Zhao Jiayong, Xie Zhiqiang, Mu Yujiao, Su Jia, Xia Shengli, Huang Xueyong, Xu Bianli

Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

Corresponding author: Xu Bianli, Email: xubl@hncdc.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the antibiotic resistance and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns of clinical isolates of *Salmonella* (*S.*) *typhi* and *S. paratyphi* in Henan province during 2009–2011. **Methods** According to molecular typing and *Salmonella* K-B drug susceptibility test method published by international PulseNet bacterial infectious disease monitoring network and USA Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the drug susceptibility and PFGE molecule characteristics of 78 *S. typhi* and *S. paratyphi* strains isolated from sentinel hospitals in Henan were analyzed. **Results** The 78 strains of *S. typhi* and *S. paratyphi* were resistant to 13 kinds of antibiotics, in which 62 were multidrug resistant (79.5%), 4 were resistant to 2–3 kinds of antibiotics (5.1%), 41 were resistant to 5–8 kinds of antibiotics (52.6%), 14 were resistant to 9–10 kinds of antibiotics (17.9%), 3 were resistant to 11–12 kinds of antibiotics (3.8%). The resistant rate to cephalosporins, quinolones and other 3 kinds of antibiotic showed an increase trends. Seventy two strains of *S. typhi* and *S. paratyphi* could be divided 14 molecular patterns by digestion with *Xba*I and PFGE, each pattern contains 1–47 strains which shared the similarity of 66.03%–100.00%. **Conclusions** The drug resistance of clinical isolates of *S. typhi* and *S. paratyphi* was serious in Henan. The PFGE patterns showed diversity, but the predominant patterns could be still found. The PFGE patterns of some strains were associated with their drug resistance.

【Key words】 *Salmonella typhi/paratyphi*; Pulsed field gel electrophoresis; Molecular typing; Antibiotic susceptibility test

Fund programs: National Science and Technology Major Projects of China (2012ZX10004201; 2013ZX10004203)

伤寒副伤寒在我国一般呈散在发生,可出现局部暴发或流行,是我国法定报告的乙类传染病之一。本研究对2009—2011年河南省分离的78株伤

寒副伤寒沙门菌进行PFGE分子特征分析与药敏测试,为指导临床合理用药和肠道传染病防控提供科学依据。

材料与方法

1. 菌株来源: 自河南省腹泻病多病原监测系统中选取 2009—2011 年分离自患者的伤寒副伤寒沙门菌 78 株, 其中伤寒沙门菌 5 株, 甲型副伤寒沙门菌 71 株, 乙型、丙型副伤寒沙门菌各 1 株。

2. 主要试剂与仪器: 主要试剂包括沙门菌科玛嘉鉴定培养基(法国 CHROMAgar 公司)、脑心浸液/M-H 琼脂及药敏纸片(英国 Oxoid 公司)、API20E 肠杆菌科细菌鉴定板条(法国 bioMérieux 公司)、沙门菌诊断血清(丹麦 SSI 公司)、药敏纸片分配器(英国 Oxoid 公司)、Seakem Glod 琼脂糖(美国 Lonza 公司)、蛋白酶 K(英国 Roche 公司)、限制性内切酶 *Xba* I [宝生物工程(大连)有限公司]、Tris-HCl/EDTA/5XTBE(北京 Solarbio 公司); 主要仪器包括 VITEK 浊度仪(法国 bioMérieux 公司)、去离子水系统(美国 Milipore 公司)、SHZ-C 型水浴摇床(上海博迅仪器有限公司)、三温水浴锅(北京东方精瑞公司)、Minispin 台式离心机(德国 Eppendorf 公司)、PFGE 系统(美国 Bio-Rad 公司)、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

3. 测试方法: ①菌株的生化鉴定与血清分型: 从沙门菌科玛嘉平板上直接挑取淡紫色菌落转种脑心浸液平板, 37℃ 培养 16~18 h, 0.85% 生理盐水制备 0.5 麦氏浊度菌液, API20E 肠杆菌科系统生化鉴定, 沙门菌诊断血清进行 O 相玻片凝集分型, 再利用 0.4% 营养琼脂(参见 WHO 沙门菌鉴定手册)进行 H 相(1/2 相)鞭毛诱导与血清凝集, 生理盐水做自凝对照。根据 K-W 血清分型表确定对应血清型别^[1]。②药敏试验参照 WHO 推荐的 Kirby-Bauer 法, 将伤寒副伤寒沙门菌转种脑心浸液琼脂平板, 37℃ 培养 16 h 后 0.85% 生理盐水制成 0.5 麦氏单位悬液; 用无菌棉拭子蘸取菌液均匀涂布于 M-H 平板表面, 用分配器将药敏纸片压盖其上, 15 min 内送 37℃ 温箱培养 18 h 后测量各药敏纸片抑菌圈直径, 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2009 年标准进行耐药表型判定, 大肠埃希菌 ATCC25922 作为质控菌株^[2]。③PFGE 分型: 按照国际 PulseNet 网络实验室与美国 CDC 公布的沙门菌 PFGE 标准分型方法, 对 78 株伤寒副伤寒沙门菌菌株进行分子分型, 沙门菌标准株 H9812 作为分子质量标记。限制性内切酶 *Xba* I (50 U), 37℃ 酶切 2 h。电泳参数: 电压 6 V/cm, 脉冲时间 2.2~63.8 s, 线性转换, 电场角度 120°, 电泳时间 19 h, 电泳液温度 14℃。电泳结束后胶块用 GelRed 染料染色 20 min 后纯水清洗 30 min 后凝胶

成像仪拍照(曝光时间 3.0 s, 去过饱和成像)^[3-4]。

4. 数据分析: 用 BioNumerics 6.0 软件对电泳图谱进行数据分析, 绘制聚类分析树状图。聚类算法为非加权配对平均法(UPGMA), 电泳条带位置优化度(position tolerance)1.5%, 相似度 100% 认定为同一 PFGE 带型^[5-6]。

结 果

1. 菌株背景资料: 分离菌株的 78 例伤寒副伤寒患者中男女性别比为 1.1:1 (41:37); 以青壮年为主。其中 16~18 岁年龄组 7 例(9.0%), 19~40 岁组 52 例(66.7%), 41~60 岁组 16 例(20.5%), >60 岁组 3 例(3.9%); 分离时间多集中于每年 5—10 月, 具有较典型的夏秋季节特征。

2. 药敏测试: 78 株伤寒副伤寒沙门菌中 41 株对广谱合成类青霉素苄苄西林(AMP)耐药, 耐药率为 52.6%; 14 株对三代头孢类头孢他啶(CAZ)耐药, 耐药率为 17.9%, 9 株对头孢噻肟(CTX)耐药, 耐药率为 11.5%; 8 株对四代头孢类头孢吡肟(FEP)耐药, 耐药率为 10.3%; 50 株对一代喹诺酮类萘啶酸(NAL)耐药, 耐药率为 64.1%; 6 株对三代氟喹诺酮类环丙沙星(CIP)耐药, 耐药率为 7.7%, 8 株对诺氟沙星(NOR)耐药, 耐药率为 10.3%; 30 株对氨基糖苷类庆大霉素(GEN)耐药, 耐药率为 38.5%, 24 株对链霉素(STR)耐药, 耐药率为 30.8%; 14 株对氯霉素类(CHL)耐药, 耐药率为 17.9%; 27 株对增效磺胺类甲氧苄氨嘧啶(TMP)耐药, 耐药率为 34.6%, 56 株对复方新诺明(SXT)耐药, 耐药率为 71.8%; 33 株对四环素(TET)耐药, 耐药率为 42.3%。78 株伤寒副伤寒沙门菌中耐 >2 种抗生素的多重耐药菌株为 62 株(79.5%), 其中耐 2~3 种为 4 株(5.2%), 耐 5~8 种为 41 株(52.6%), 耐 9~10 种为 14 株(17.9%), 耐 11~12 种为 3 株(3.8%)。三代头孢类 CAZ、CTX, 一代与三代喹诺酮类 NAL、CIP, 氨基糖苷类 STR 耐药率总体呈年份上升趋势(表 1, 2 和图 1)。

表 1 78 株伤寒副伤寒沙门菌对 13 种抗生素耐药情况

抗菌药物	菌株数		敏感(S)	耐药率 (%)
	耐药(R)	中介(I)		
CIP	6	1	71	7.7
FEP	8	2	68	10.3
NOR	8	1	69	10.3
CAZ	14	1	63	17.9
CHL	14	8	56	17.9
STR	24	7	47	30.8
TMP	27	2	49	34.6
GEN	30	1	47	38.5
TET	33	9	36	42.3
NAL	50	2	26	64.1
SXT	56	2	20	71.8
CTX	9	0	69	11.5
AMP	41	5	32	52.6

表 2 78 株伤寒副伤寒沙门菌多重耐药谱

耐药 种数	耐药谱	菌株数	耐药率 (%)
2	AMP-NAL	2	2.6
3	AMP-NAL-CHL	2	2.6
5	AMP-TMP-NAL-CHL-SXT	7	9.0
6	AMP-CTX-TMP-NAL-CHL-SXT	7	9.0
7	AMP-GEN-TMP-TET-STR-NAL-SXT	16	20.5
	AMP-TMP-TET-STR-NAL-CHL-SXT		
	AMP-GEN-TMP-TET-NAL-CHL-SXT		
	AMP-CIP-TET-NAL-CHL-NOR-SXT		
	AMP-CTX-CIP-TET-NAL-CHL-NOR		
8	AMP-GEN-TMP-TET-STR-NAL-CHL-SXT	11	14.1
	AMP-TMP-TET-STR-NAL-CHL-NOR-SXT		
9	AMP-TMP-CIP-TET-STR-NAL-CHL-NOR-SXT	9	11.5
10	AMP-GEN-TMP-CIP-TET-STR-NAL-CHL-NOR-SXT	5	6.4
11	AMP-GEN-TMP-CIP-TET-STR-NAL-CHL-NOR-SXT-CAZ	2	2.6
12	AMP-GEN-TMP-CIP-TET-STR-NAL-CHL-NOR-SXT-CAZ-CTX	1	1.3

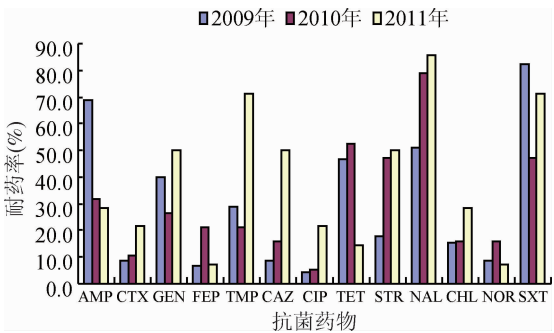


图 1 2009—2011 年河南省伤寒副伤寒沙门菌耐药率变化趋势

3. PFGE 分子分型：78 株伤寒副伤寒沙门菌经 *Xba* I 酶切后共分为 14 种带型 (图 2)。各带型包含菌株数 1~47 株，带型相似度为 66.03%~100.00%，其中 4 株伤寒沙门菌分为 2 种带型 (TY1/TY2)，以 TY1 为主；72 株甲型副伤寒沙门菌分为 10 种

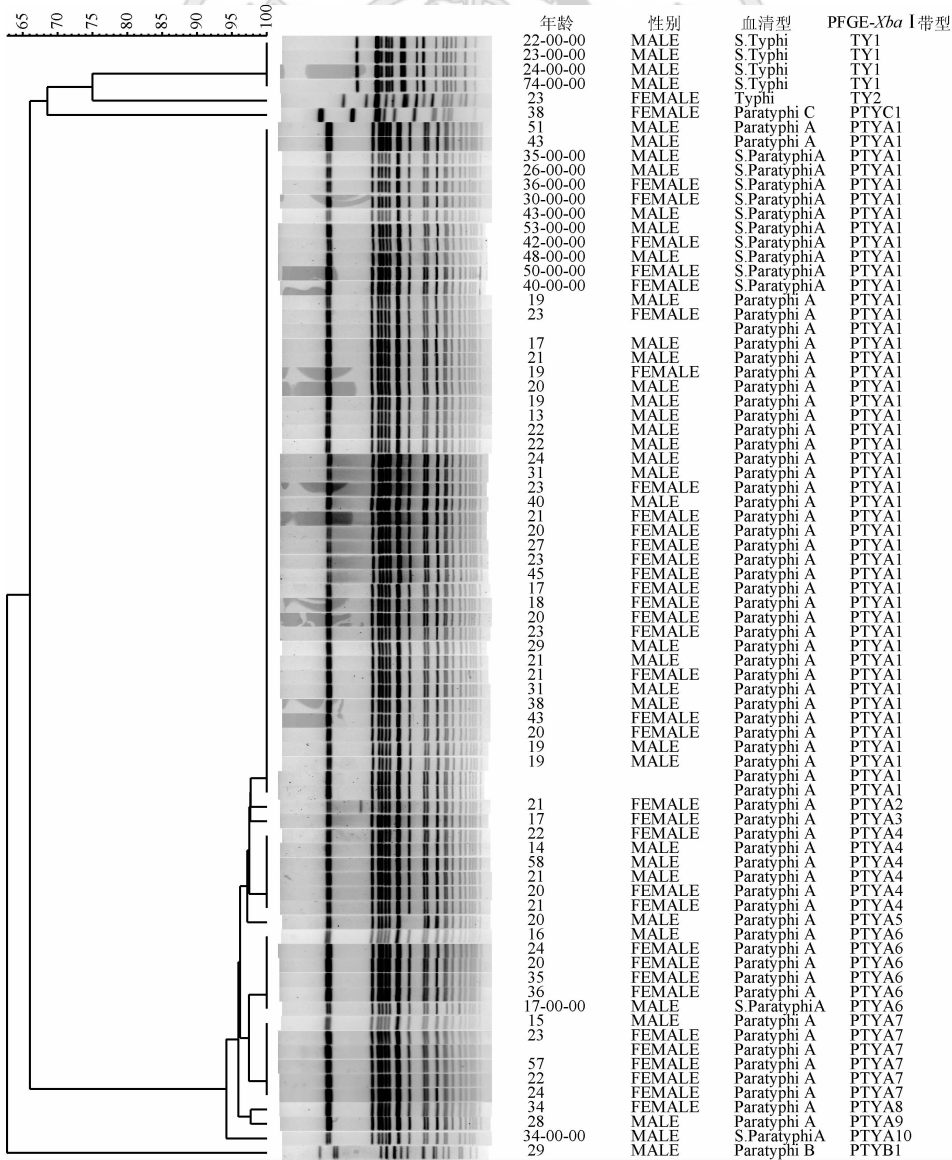


图 2 78 株伤寒副伤寒沙门菌 PFGE 聚类分析

带型(PTYA1~PTYA10),PTYA1 为主要优势带型,PTY4/6/7 三种带型均包含 7 株菌,带型相似度与 PTYA1 很高(>95%),乙型与丙型副伤寒沙门菌各 1 株菌 1 种带型。78 株伤寒副伤寒沙门菌 PFGE 带型与耐药谱之间呈现一定的对应关系,PTYA1、PTYA4、PTYA6 与 PTYA1/PTYA4 间均存在耐药表型一致的菌株聚集现象,在单菌株带型对应的耐药谱中,带型与耐药谱未发现一致性或高相似性(表 3)。

表 3 78 株伤寒副伤寒沙门菌不同 PFGE 带型与耐药谱对应情况

带型	耐药谱	菌株数
PTYA1	AMP-GEN-TMP-TET-STR-NAL-SXT	11
PTYA1	AMP-TMP-CIP-TET-STR-NAL-CHL-NOR-SXT	8
PTYA4	AMP-GEN-TMP-TET-NAL-CHL-SXT	4
PTY6	AMP-CTX-TMP-NAL-CHL-SXT	3
PTYA1/PTYA4	AMP-CTX-CIP-TET-NAL-CHL-NOR	2

讨 论

目前河南省伤寒副伤寒流行趋势以高度散发为主,暴发疫情偶然发生在卫生条件差的特殊人群中,发病率基本控制在 1.75/10 万至 0.32/10 万。由于慢性带菌者持续存在,传播途径不易彻底切断和人工免疫效果欠佳,输入性与聚集性病例仍时有出现。本研究中伤寒副伤寒病例多集中在 18~40 岁青壮年人群中,男女性别比趋于一致,发病时间集中于夏秋季,体现了河南省近年来伤寒副伤寒流行病学的基本特点和变化趋势。

临床过度治疗与抗生素滥用是造成病原菌耐药问题日益突出的主要原因。本研究中分离自病例的伤寒副伤寒沙门菌耐药问题十分严重,对 8 类 13 种抗菌药物均存在不同程度耐药,比较严重的有青霉素类、磺胺类、四环素类、氯霉素类、氨基糖苷类以及一代喹诺酮类,对临床常用药物三代喹诺酮类也存在一定程度耐药;其多重耐药情况也非常严重,临床分离菌株普遍对 2~12 种抗生素耐药,且对头孢类、喹诺酮类一线常用药及其他 3 类抗生素的耐药率呈逐年上升趋势,值得临床和公共卫生高度关注。这些多重耐药表型的出现一方面归因于病原菌的自发偶发性耐药突变,更重要的原因在于抗生素滥用产生的高选择压力和耐药基因的水平传递。

本研究利用 PFGE 分析伤寒副伤寒沙门菌全染色体“指纹图谱”特征。值得关注的是甲型副伤寒沙门菌 *Xba* I 带型的高聚集性与相似度;部分伤寒副伤寒沙门菌的耐药表型与 PFGE 带型呈现聚类一致性,提示基于共同暴露源的菌株往往也具有相同的基因和耐药表型特征,这种特征尽管存在变异性和不确定性,但在一定范围内可以成为及早发现聚集性病例的重要指征参数。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] 王鸣柳, 阚飙, 杨进, 等. 广西壮族自治区 1994—2013 年伤寒流行病学特征及菌株耐药分析[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(8): 930–934. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254–6450.2014.08.012.

Wang ML, Kan B, Yang J, et al. Epidemiological characteristics of typhoid fever and antibiotic susceptibility testing of *Salmonella typhi* isolates in Guangxi, 1994–2013[J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(8): 930–934. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254–6450.2014.08.012.

[2] Khan AA, Melvin CD, Dagdag EB. Identification and molecular characterization of *Salmonella* spp. from unpasteurized orange juices and identification of new serotype *Salmonella* strain *S. enterica* serovar tempe[J]. Food Microbiol, 2007, 24(5): 539–543. DOI: 10.1016/j.fm.2006.09.002.

[3] Rivoal K, Protais J, Quéguiner S, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* serotype enteritidis, typhimurium and infantis isolates obtained from whole liquid eggs[J]. Int J Food Microbiol, 2009, 129(2): 180–186. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.021.

[4] Petrov P, Hendriksen RS, Kantardjiev T, et al. Occurrence and characterization of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar 9, 12:1, v:–strains from Bulgaria, Denmark, and the United States [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(5): 473–479. DOI: 10.1007/s10096-008-0653-9.

[5] Harbottle H, White DG, McDermott PF, et al. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype newport isolates [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2449–2457. DOI: 10.1128/JCM.00019–06.

[6] Chiou CS, Lin JM, Chiu CH, et al. Clonal dissemination of the multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Braenderup, but not the serovar Bareilly, of prevalent serogroup c1 *Salmonella* from Taiwan [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 264. DOI: 10.1186/1471-2180-9-264.

(收稿日期: 2015-04-26)

(本文编辑: 张林东)