

2016年江苏省沙门氏菌血清型的分布、耐药状况及相关基因研究

沈 贇, 秦 思, 唐 震*

江苏省疾病预防控制中心食品安全与评价所, 江苏 南京 210009

[摘要] 目的:研究江苏省食源性疾病监测中沙门氏菌血清型的分布状况、抗菌药物耐受性和相关基因的突变情况。更好地了解江苏省沙门氏菌耐药性的产生和特点,确保食品安全。方法:用食品安全国家标准方法对菌种进行复核鉴定和血清分型。沙门氏菌药敏性的测定使用美国临床和实验室标准协会推荐的肉汤稀释法,用PCR和基因序列测定方法确定沙门氏菌中耐喹诺酮类药物的 *gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 基因及其突变状况。结果:全省疾病监测沙门氏菌检出率为3.29%。其中主要的血清型为肠炎沙门氏菌(23.4%)、鼠伤寒沙门氏菌(15.1%)、拉古什沙门氏菌(8.3%)、布利丹沙门氏菌(5.2%)等。沙门氏菌主要耐受的抗生素包括:红霉素(100.0%)、氨苄西林(68.8%)、四环素及萘啶酸(52.6%)。沙门氏菌多重耐药率达64.7%,最多耐受8类抗菌药物。耐萘啶酸沙门氏菌 *gyrA* 基因在Ser83位或Asp87位密码子处发生突变, *gyrB*、*parC*和 *parE*未发现突变。结论:江苏省食源性疾病监测中沙门氏菌的耐药状况严重,血清型分布与其他省份存在差异,喹诺酮类耐药基因 *gyrA* 基因突变是导致沙门氏菌耐药的重要机制。

[关键词] 沙门氏菌;血清分型;耐药基因

[中图分类号] R446.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)09-1319-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20180930

沙门氏菌可以通过食物加工链传播到餐桌,也可以通过感染患者或未发病的带菌者传递给正常人群,从而引起食物中毒,导致感染性腹泻。在中国,由沙门氏菌引起的食物中毒和感染性腹泻比例远远超过其他细菌^[1]。头孢类抗菌药物是治疗沙门氏菌感染的常用药物。除此以外,四环素类、喹诺酮类、磺胺类药物也常用来治疗沙门氏菌感染^[2]。我国抗菌药物的使用量远超欧美,因管理不规范导致很多患者自行使用抗菌药物。从各个省份的耐药趋势可以看出,沙门氏菌的耐药种类不断扩大,耐药率逐年上升^[3-4]。本研究对江苏省疾病监测中检出的沙门氏菌进行了药敏检测,并对沙门氏菌的药敏特性和相关耐药基因进行了研究,阐述了江苏省沙门氏菌的耐药发展趋势。

1 材料和方法

1.1 材料

287株沙门氏菌从2016年江苏省食源性疾病监测腹泻患者中分离。所有菌株依据《GB 4789.4-

[基金项目] “十二五”科技重大专项计划(2012ZX10004-210-004);卫生部肠道病原微生物重点实验室项目;江苏省重大新发传染病综合防控科技示范工程(BE2015714)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 31805781@qq.com

2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行复核鉴定,再用沙门菌属诊断学血清确认血清型。

1.2 方法

1.2.1 抗生素敏感试验

根据 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)文件 M100-S24 推荐^[5],药敏试验抗菌药物选择15种,分别为氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、四环素、红霉素、氯霉素、头孢唑林、环丙沙星、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、头孢他啶、亚胺培南、萘啶酸、头孢西丁、头孢噻肟、庆大霉素、阿奇霉素。方法和结果判断参照 CLSI 推荐的肉汤稀释法。大肠埃希菌 ATCC25922 为质控菌株(美国菌种保存中心)。

1.2.2 耐药基因鉴定

研究喹诺酮类抗菌药物耐药相关基因,选择耐第1代喹诺酮药物萘啶酸的菌株进行基因鉴定和序列分析。用DNA提取试剂盒(大连宝生物工程有限公司)提取基因组做模板,模板浓度稀释至100 ng/μL,解旋酶基因 *gyrA* 和 *gyrB*、拓扑异构酶基因 *parC* 和 *parE* 检测引物见表1,采用 primer Premier5.0 设计,南京金斯瑞生物科技有限公司合成。PCR反应体系为: Ex-Taq 0.5 μL, 含 Mg 离子 10×Ex-Taq buffer 4.5 μL, dNTP 5 μL, 1对引物各加 1 μL, 模板 1 μL, 然后用

灭菌纯水将终体积补充至 50 μL。反应条件如下：变性温度为 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 退火温度 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 5 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司进行测

序。测序结果用 Chromas (version 2.6) 软件进行编辑处理, 然后用 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 分析比对供试菌与野生敏感株 Ty2 相对应的 DNA 序列, 确定突变点和突变种类。

表1 PCR 扩增用引物

基因名	上游(5'→3')	下游(5'→3')
<i>gyrA</i>	ACGTACTAGGCAATGACTGG	AGAGTCGCCGTCGATAGAAC
<i>gyrB</i>	GCGCTGTCCGAACTGTACCT	TGATCAGCGTCGCCACTTCC
<i>parC</i>	CTATGCGATGTCAGAGCTGG	TAACAGCAGCTCGGCGTATT
<i>parE</i>	TCTCTCCGATGAAGTGCTG	ATACGGTATAGCGGCGGTAG

2 结果

2.1 沙门氏菌检出率

全省 2016 年食源性疾病预防沙门氏菌检出率为 3.29% (287/8 726, 表 2)。

表2 江苏省各地区食源性疾病预防样品中沙门氏菌的检出率

监测地区	样品数量(份)	沙门氏菌 阳性数量(份)	检出率(%)
苏南地区	4 648	209	4.50
苏中地区	1 553	33	2.12
苏北地区	2 525	45	1.80
合计	8 726	287	3.29

2.2 江苏省食源性疾病预防样品中沙门氏菌的血清型

在江苏省食源性疾病预防中, 共分出 51 种血清型的沙门氏菌, 最主要的血清型为肠炎沙门氏菌 (23.4%)。其他主要血清型以及所占比例如下: 鼠伤寒沙门氏菌 (15.1%)、拉古什沙门氏菌 (8.3%)、布利丹沙门氏菌 (5.2%)、都柏林沙门氏菌 (5.2%)、汤卜逊沙门氏菌 (3.6%)、阿贡纳沙门氏菌 (3.1%)、伤寒沙门氏菌 (3.1%)、德尔卑沙门氏菌 (3.1%)、伦敦沙门氏菌 (2.6%)、科特布斯沙门氏菌 (2.6%)、其他血清型沙门氏菌 (24.5%)。

2.3 沙门氏菌对抗菌药物的敏感性

沙门氏菌主要耐受的抗菌药物包括红霉素 (100.0%)、氨苄西林 (68.8%)、四环素及萘啶酸 (52.6%)。沙门氏菌中多重耐药率达 64.7%, 最多耐受 8 类抗菌药物 (表 3)。

2.4 耐药基因鉴定

与野生敏感株 Ty2 序列比对结果显示, 耐萘啶

表3 江苏省食源性疾病预防沙门氏菌耐药状况 (%)

抗生素	耐药	中介	敏感
头孢噻肟	16.2	1.2	82.7
头孢他啶	14.5	1.7	83.8
亚胺培南	0	0.6	99.4
四环素	52.6	0.6	46.8
头孢唑啉	32.4	28.9	38.7
头孢西丁	8.7	0.6	90.8
庆大霉素	9.8	0	90.2
氨苄西林	68.8	0	31.2
氨苄西林/舒巴坦	42.2	25.4	32.4
氯霉素	24.9	1.2	74.0
环丙沙星	6.4	2.3	91.3
复方新诺明	22.0	0	78.0
红霉素	100.0	0	0
萘啶酸	52.6	0	47.4
阿奇霉素	11.6	2.9	85.5

酸沙门氏菌 *gyrA* 基因在 Ser83 位或 Asp87 位密码子处发生突变, 比例为: Ser83→Phe (45.6%)、Asp87→Asn (32.2%)、Asp87→Gly (13.5%)、Asp87→Tyr (8.7%)。 *gyrB*、*parC* 和 *parE* 未发现突变, 结果见表 4。

表4 58 株耐萘啶酸的 *gyrA* 基因变异及耐药状况

基因变异	碱基变化	分离株数	萘啶酸 MIC 值 (μg/mL)
Ser83→Phe	TCC→TTC	15	>128
Asp87→Asn	GAC→AAC	18	>128
Asp87→Gly	GAC→GGC	5	>128
Asp87→Tyr	GAC→TAC	20	>128

3 讨论

在江苏省进行食源性疾病预防, 可为及时发现食源性疾病预防提供线索, 提高发现食源性疾病预防

发和食品安全隐患的早期识别、预警与防控能力。为研究食源性疾病的流行规律、追溯食品污染来源提供技术支持。江苏省共有13个设区市,检测了包括定型包装、生肉制品、凉拌菜等各类食品共8 726份样品,其中有287份检出沙门氏菌,检出率为3.29%。总体而言,检出率从苏南地区到苏北地区呈递减趋势。其中,苏南地区5市中有4个设区市(南京、无锡、常州、苏州)的检出率超全省平均水平。其中南京市的检出率为4.90%,苏州市则高达5.92%,苏中3市中仅泰州市检出率略高于全省水平,为4.80%。而苏北地区检出率普遍偏低,如连云港市为0.39%,宿迁市为0.55%。这可能与江苏南北地区一年四季温、湿度差异有关,也与不同地区所食用的地方特色食品的加工运输方式有一定关系。虽然近年来江苏省疾病监测中,沙门氏菌感染率高于其他致病菌。但与其他省份相比,江苏省的检出率仍较低^[6-9]。江苏属于经济发达省份,食品加工行业操作规范,市民卫生意识较强,无证食品流动摊点逐年减少,这些都可能是沙门氏菌检出率和感染率在全国范围内较低的原因。

江苏省共分出51种血清型,种类分布多样。其中,占主导地位的血清型为肠炎沙门氏菌(23.4%)。其他主要的血清型还有鼠伤寒沙门氏菌、拉古什沙门氏菌、布利丹沙门氏菌、都柏林沙门氏菌4种。与其他省份的沙门氏菌血清分布相比,有较大差异。如河北省主要为鸭沙门氏菌与山夫登堡沙门氏菌;广州主要为斯坦利沙门氏菌和肠炎沙门氏菌等^[7-10]。沙门氏菌的地域差异提示,不同地区沙门氏菌引起的感染以及食物中毒症状和程度可能不同。

由于大量使用抗菌药物,全球范围内细菌耐药率逐年上升^[11-12]。沙门氏菌整体多重耐药率从30年前的20%增加到了现在的70%^[10],成为一个世界性的公共卫生难题。在我国,不同省份沙门氏菌耐药谱存在较显著差异。在江苏省沙门氏菌耐药监测的15种抗生素中,沙门氏菌的多重耐药率达64.7%,最多耐受8类抗菌药物。其中红霉素、氨苄西林、四环素及萘啶酸的耐药率都在50%以上。沙门氏菌的耐药状况存在南北方差异,例如陕西省食源性沙门氏菌中有67%对磺胺甲恶唑耐药。北京地区主要对氨苄西林和哌拉西林耐药,耐药率为19.7%。而广州与江苏省的耐药谱接近,对四环素和萘啶酸的耐药率最高。

我国在畜牧业中长期大量使用喹诺酮类抗菌

素。同时,人的治疗用药与兽用药没有严格区分。萘啶酸是第1代喹诺酮类抗菌药物的代表。我省的监测数据当中,沙门氏菌对萘啶酸的耐药率为52.6%,低于全国监测数据中萘啶酸的耐受水平。已有研究表明:沙门氏菌对萘啶酸敏感性下降与染色体上的4处基因突变有关,包括解旋酶基因 *gyrA* 和 *gyrB* 与拓扑异构酶基因 *parC* 和 *parE*^[13]。江苏省的萘啶酸耐药沙门氏菌的基因突变发生在 *gyrA*, 突变区域是耐喹诺酮类药物的耐受决定区 83.87 两个位置。而 *gyrB*、*parC* 和 *parE* 基因未发现突变点。与其他省份不同,例如陕西省在35株沙门氏菌中检测这4种基因,共发现68个突变点^[7,10]。北京地区沙门氏菌在 *gyrA* 和 *parC* 存在突变点等。不同地区沙门氏菌对喹诺酮类药物耐受情况,不仅表现在基因突变位点的不同,也表现在耐药表型的差别上。环丙沙星是第3代喹诺酮类药物,江苏省 *gyrA* 基因突变的表型特征为突变导致细菌对萘啶酸耐药,对环丙沙星敏感。但是全国监测数据显示沙门氏菌对环丙沙星的耐药率远高于江苏省。这一方面可能是喹诺酮类药物特定的耐药机制所引起的交叉耐受现象,另一方面也可能与各个地区耐药基因突变位点的差别相关。

综上所述,研究江苏食源性沙门氏菌的药敏性特征及与耐药性产生的相关基因,有助于从食物链的源头和食品性动物生产中采取合理的干预措施,坚持合理用药,减少和防止沙门氏菌耐药性的产生,保障食品安全。同时,也对更好了解沙门氏菌的耐药机理和有效控制日趋严重的沙门氏菌耐药问题提供了依据。

[参考文献]

- [1] 张 平,张 静. 我国2014—2015年其他感染性腹泻监测现状分析[J]. 中华流行病学,2017,38(4):424-430
- [2] Medalla F, Hoekstra RM, Whichard JM, et al. Increase in resistance to ceftriaxone and nonsusceptibility to ciprofloxacin and decrease in multidrug resistance among *Salmonella* strains, United States, 1996-2009[J]. Foodborne Pathog Dis, 2013, 10(4):302-309
- [3] Das S, Samajpati S, Ray U, et al. Antimicrobial resistance and molecular subtypes of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from Kolkata, India over a 15 years period 1998-2012[J]. Int J Med Microbiol, 2017, 307(1): 28-36
- [4] 胡仁静,严子禾,韩志君,等. 感染碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌患者全因死亡的Meta分析[J]. 南京医科大

(下转第1330页)

- meta-analysis [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143 (14): 2975–2984
- [13] Varga ZT, Grant A, Manicassamy B, et al. Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane potential [J]. *J Virol*, 2012, 86(16): 8359–8366
- [14] Belisle SE, Hamer DH, Leka LS, et al. IL-2 and IL-10 gene polymorphisms are associated with respiratory tract infection and may modulate the effect of vitamin E on lower respiratory tract infections in elderly nursing home residents [J]. *Am J Clin Nutr*, 2010, 92(1): 106–114
- [15] Antonopoulou A, Baziaka F, Tsaganos T, et al. Role of tumor necrosis factor gene single nucleotide polymorphisms in the natural course of 2009 influenza A H1N1 virus infection [J]. *Int J Infect Dis*, 2012, 16(3): e204–e208
- [16] García-Ramírez RA, Ramírez-Venegas A, Quintana-Carrillo R, et al. TNF, IL6, and IL1B polymorphisms are associated with severe influenza a (H1N1) virus infection in the Mexican population [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12): e0144832
- [17] Cabral MG, Piteira AR, Silva Z, et al. Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity [J]. *Immunol Lett*, 2010, 131(1): 89–96
- [18] Mitzner D, Dudek SE, Studtrucker N, et al. Phosphorylation of the influenza A virus protein PB1-F2 by PKC is crucial for apoptosis promoting functions in monocytes [J]. *Cell Microbiol*, 2009, 11(10): 1502–1516
- [19] Childs RA, Palma AS, Wharton S, et al. Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1)2009 virus determined by carbohydrate microarray [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(9): 797–799
- [20] Maestri A, Sortica VA, Tovo-Rodrigues L, et al. Sia α 2-3Gal β 1-receptor genetic variants are associated with influenza a (H1N1) pdm09 severity [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (10): e0139681
- [21] Dahmer MK, O'cain P, Patwari PP, et al. The influence of genetic variation in surfactant protein B on severe lung injury in African American children [J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(5): 1138–1144
- [22] Karlas A, Machuy N, Shin Y, et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication [J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 818–822
- [23] To KKW, Zhou J, Song YQ, et al. Surfactant protein B gene polymorphism is associated with severe influenza [J]. *Chest*, 2014, 145(6): 1237–1243
- [24] Zúñiga J, Buendía-Roldán I, Zhao Y, et al. Genetic variants associated with severe pneumonia in A/H1N1 influenza infection [J]. *Eur Respir J*, 2012, 39(3): 604–610
- [25] Trammell RA, Toth LA. Genetic susceptibility and resistance to influenza infection and disease in humans and mice [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008, 8(4): 515–529
- [收稿日期] 2017-07-09

(上接第1321页)

- 学报(自然科学版), 2016, 36(12): 1567–1572
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution and antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, (M07 - A9) [S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- [6] 李 佳, 刘国焯, 胡露露, 等. 2011—2015年临床分离粪肠球菌和屎肠球菌分布情况及耐药性分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(10): 1353–1356
- [7] 葛 琨, 武 运, 杨保伟, 等. 乌鲁木齐牛羊肉源沙门氏菌对喹诺酮类药物的耐药状况及相关基因分析 [J]. *生物工程*, 2017, 38(4): 107–112
- [8] 任 真, 文 怡, 梅亚宁, 等. 2012年3812株革兰阴性菌分布及耐药性监测 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(12): 1780–1783
- [9] 吕素玲, 韦程媛, 姚雪婷, 等. 2010年广西食品中沙门氏菌污染状况和血清型分布及耐药谱的研究 [J]. *应用预防医学*, 2012, 18(3): 137–141, 170
- [10] 沈玄艺, 宋启发, 高 红, 等. 宁波市河水环境中沙门菌分布特征和耐药性 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 128 (6): 709–713
- [11] Leangapichart T, Rolain JM, Memish ZA, et al. Emergence of drug resistant bacteria at the Hajj: A systematic review [J]. *Travel Med Infect Dis*, 2017, 18(17): 3–17
- [12] Behl P, Gupta V, Sachdev A, et al. Patterns in antimicrobial susceptibility of *Salmonellae* isolated at a tertiary care hospital in northern India [J]. *Indian J Med Res*, 2017, 145(1): 124–128
- [13] Kwambana-Adams B, Darboe S, Nabwera H, et al. *Salmonella* infections in the Gambia, 2005–2015 [J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 61(Suppl 4): S354–S362
- [收稿日期] 2017-07-28