

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.14.021

## 沙门菌血清型多态性与 PFGE 分型及其相关性研究\*

施怡茹<sup>1</sup>, 赵锦江<sup>1</sup>, 卢晓芸<sup>1</sup>, 姚正原<sup>1</sup>, 陈洪友<sup>2</sup>, 徐秋芳<sup>1△</sup>上海市青浦区疾病预防控制中心, 上海 201700; 2. 上海市疾病预防控制中心  
病原所检定所, 上海 200336

**摘要:**目的 分析上海青浦区沙门菌血清型的分布情况和分子分型多态性, 以及血清型与分子分型的相关性。方法 从 2015—2018 年的人源性样品中分离并收集 384 株沙门菌, 采用玻片凝集法进行血清学分型, 脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行基因分型, BioNumerics 软件进行聚类分析。结果 384 株沙门菌可分为 10 个血清群、34 个血清型别; 以鼠伤寒和肠炎沙门菌为优势血清型, 分别占 24.7% 和 21.9%; 常见血清型有伦敦、德尔卑、罗森、婴儿沙门菌等。341 株菌株完成 PFGE 分型, 以肠炎沙门菌的优势簇为主。结论 2015—2018 年上海市青浦区沙门菌的血清型别和基因型表现出多态性的特征, 各年份优势血清型稳定。同一血清型的沙门菌分子分型基本位于同一聚类簇中, 但有部分血清型沙门菌表现出高度的遗传变异性。

**关键词:**血清型; 沙门菌; 脉冲场凝胶电泳; 多态性

中图法分类号: R378.13

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)14-2017-03

**Serotype polymorphism and PFGE typing of Salmonella and the study on their correlation\***SHI Yiru<sup>1</sup>, ZHAO Jinjiang<sup>1</sup>, LU Xiaoyun<sup>1</sup>, YAO Zhengyuan<sup>1</sup>, CHEN Hongyou<sup>2</sup>, XU Qiufang<sup>1△</sup>

1. The Center for Disease Control and Prevention of Qingpu District, Shanghai 201700, China;

2. the Center for Disease Control and Prevention of ShangHai, Shanghai 200336, China

**Abstract: Objective** To analyze serotypes' distribution and molecular typing polymorphism of Salmonella in Qinpu district, and studied their correlation. **Methods** A total of 384 strains of Salmonella were isolated and collected from human samples from 2015 to 2018, serological typing was performed by using slide agglutination method, genotyping was by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and clustering analyse by using BioNumerics software. **Results** The 384 strains of Salmonella were divided into 10 serogroups and 34 serotypes. S. Typhimurium and S. Enteritidis were predominant strains, accounting for 24.7% and 21.9% respectively. Serotype S. London, S. Derby, S. Rissen and S. Infantis were common. A total of 341 strains were classified by PFGE, and the predominant group was Salmonella enteritidis. **Conclusion** From 2015 to 2018, the serotypes and genotypes of Salmonella in Qingpu District of Shanghai showed polymorphism, and the dominant serotypes were stable in each year. The molecular typing of Salmonella of the same serotype was basically located in the same cluster, but some serotypes showed high genetic variability.

**Key words:** serum type; Salmonella; pulsed field gel electrophoresis; polymorphism

沙门菌是一种常见的人兽共患病病原体<sup>[1]</sup>, 可通过污染食物和水来感染人和动物, 是引起食物中毒和食源性疾病的重要致病菌<sup>[2-3]</sup>。根据沙门菌菌体抗原(O 抗原)和鞭毛抗原(H 抗原)的不同, 血清分型成为沙门菌分型最主要的分型形式。根据 Kauffman-White 抗原标准, 到目前为止, 沙门菌属已有超过 2 700 种血清型, 而国内分离并报道的仅有 300 多种<sup>[4]</sup>, 其中流行的优势血清型有肠炎、鼠伤寒和德尔卑沙门菌等<sup>[5]</sup>。研究沙门菌的优势血清型别分布情

况、分子分型等可以为沙门菌感染性腹泻的预防工作提供参考。

**1 材料与方法**

**1.1 试验菌株** 沙门菌菌株收集时间为 2015 年 1 月至 2018 年 12 月, 均分离自上海青浦区内各级医院腹泻门诊中初诊为疑似细菌性腹泻患者的粪便标本和肛拭子标本。患者主诉以腹泻症状为主, 腹泻次数 > 3 次/天, 粪便性状异常, 为水样便、稀便、黏液便或脓血便等。

\* 基金项目: 上海市青浦区科委项目(QKY2017-06)。

作者简介: 施怡茹, 女, 技师, 主要从事病原微生物检测、分子分型等的研究。△ 通信作者, E-mail: 39850233@qq.com。

**1.2 仪器与试剂** 蛋白酶 K、Xba I 限制性内切酶为 Takara 生物工程有限公司产品；SeaKem Gold 琼脂糖粉为美国 Cambrex Bio Rockland 公司产品；Gel-red 染色液为美国 Biotium 公司产品；Vitek 2 GN 生化鉴定板条为法国生物梅里埃公司产品；沙门菌诊断血清为丹麦国家血清研究院 SSI、泰国 S&A 公司的产品；磺胺增菌液 (SBG)、XLD 平板、沙门菌显色平板、肠道综合生化鉴定管等相关增菌液和培养基均购自上海科玛嘉微生物技术有限公司；采用法国生物梅里埃公司 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统、美国伯乐公司 CHEF Mapper 脉冲场凝胶电泳仪、GELDocTMXR 凝胶成像仪、美国 Applied Maths 公司 BioNumerics 7.1 分析软件。

**1.3 方法**

**1.3.1 腹泻患者标本多病原菌的检测** 收集疑似细菌性腹泻患者的粪便标本和肛拭子标本，按照《上海市腹泻病监测实施方案(2014 年试行版)》中的标准操作规程对副溶血性弧菌、霍乱弧菌、志贺菌、沙门菌、致泻性大肠埃希菌、弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森菌等 7 类肠道病原菌进行细菌学分离鉴定，所有分离菌株均由上海市疾病预防控制中心病原检定所复核鉴定。

**1.3.2 沙门菌血清分型** 采用玻片凝集试验，血清型鉴定按照沙门菌血清诊断操作步骤进行，根据测得的抗原式确定沙门菌的血清型。

**1.3.3 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 基因分型** 参考美国 CDC PulseNet USA 的方法<sup>[6]</sup>。以 H9812 参考菌株作分子量标准，该菌株由上海市疾病预防控制中心提供，所有菌株均用 Xba I 酶切，PFGE 图谱用 BioNumerics 7.1 软件分析。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理，计数资料以百分率表示，组间比较采用  $\chi^2$  检验， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 血清型分布** 本研究共收集到 384 株人腹泻源性沙门菌，分为 34 个血清型、10 个血清群。主要血清群包括 B 群 (34.60%)、C1 群 (13.80%)、D 群 (21.90%) 和 E1 群 (15.60%)，见表 1。

表 1 384 株沙门菌的血清型分布情况

血清型	血清群	抗原式(O:H1:H2)	n	构成比(%)
鼠伤寒	B	1,4,[5],12:i:1,2	95	24.70
肠炎	D	1,9,12:g,m:-	84	21.90
伦敦	E1	3,10 {15};l,v:1,6	45	11.70
德尔卑	B	1,4,[5],12:f,g,-	18	4.70
罗森	C1	6,7,14:f,g,-	15	3.90
婴儿	C1	6,7,14:r:1,5	15	3.90
姆班达卡	C1	6,7,14;z10:e,n,z15	10	2.60

续表 1 384 株沙门菌的血清型分布情况

血清型	血清群	抗原式(O:H1:H2)	n	构成比(%)
火鸡	E1	3,10{15}{15,34}:e,h,l,w	10	2.60
山夫登堡	E4	1,3,19:g,s,t:-	9	2.30
黄金海岸	C2	6,8:r:l,w	7	1.80
科瓦利斯	C3	8,20:Z4,Z23:z6	7	1.80
阿伯丁	F	11:i:1,2	7	1.80
阿贡纳	B	1,4,[5],12:f,g,s:-	6	1.60
乙型副伤寒	B	1,4,[5],12:b:1,2	6	1.60
斯坦利	B	1,4,[5],12:d:1,2	6	1.60
汤卜逊	C1	6,7,14:k:1,5	6	1.60
病牛	C2	6,8:r:1,5	6	1.60
纽波特	C2	6,8:e,h:1,2	5	1.30
利奇菲尔德	C2	6,8:l,v:1,2	4	1.00
旺兹沃思	Q	39:b:1,2	4	1.00
波茨坦	C1	6,7,14:l,v:e,n,z15	2	0.50
新加坡	C1	6,7:k:e,n,x	2	0.50
慕尼黑	C2	6,8:d:1,2	2	0.50
吉韦	E1	3,10 {15}{15,34}:l,v:1,7	2	0.50
明斯特	E1	3,15 {10}{15,34}:e,h:1,5	2	0.50
圣保罗	B	1,4,[5],12:e,h:1,2	1	0.25
胥伐成格隆	B	1,4,12,27:d:1,7	1	0.25
奥雷宁堡	C1	6,7:m,t:-	1	0.25
蒙得维的亚II	C1	6,7:g,m,s,t:1,5	1	0.25
维尔肖	C1	6,7,14:r:1,2	1	0.25
曼哈顿	C2	6,8:d:1,5	1	0.25
列克星敦	E1	3,10 {15}{15,34}:z10:1,5	1	0.25
非丁伏斯	I	16:b:e,n,x	1	0.25
考拉克	X	47:z:1,6	1	0.25

**2.2 各年份间的比较** 2015 年有 20 个血清型别，2016 年 29 个，2017 年 19 个，2018 年 17 个。2015—2018 年，各年份间鼠伤寒沙门菌构成比比较，仅 2016 年和 2017 年间差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 5.06, P < 0.05$ )，其余各年份之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。各年份间肠炎沙门菌构成比比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，见表 2。

表 2 2015—2018 年鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌的构成比

年份	鼠伤寒沙门菌		肠炎沙门菌	
	n	构成比(%)	n	构成比(%)
2015 年	39	34.8	13	11.6
2016 年	36	23.5	27	17.6
2017 年	14	38.2*	29	18.4
2018 年	7	32.0	16	14.0

注：与 2016 年比较，\*  $P < 0.05$ 。

**2.3 PFGE 聚类分型结果** 收集的菌株中 341 株沙门菌完成了 PFGE 并运用 Bio Numerics 7.1 软件进行聚类分析,以 Dice 系数计算相似度,UPGMA 法建树。基因组 DNA 片段得到较好分离,按 1.0 的相似系数,341 株沙门菌产生了 203 种 PFGE 带型,按相似系数 0.75 分为 73 个聚类大簇。相同血清型的菌株基本具有相同的图谱型别或聚集在一起;存在部分沙门菌的血清型不同,但分型后仍表现出较高的基因同源性。

80 株肠炎沙门菌产生 28 种带型,最优势的 PFGE 型有 14 株,与该带型相似性大于 90% 的有 50 株,该优势聚类共 64 株,占 80.0%;77 株鼠伤寒沙门菌产生 54 种带型;41 株伦敦沙门菌产生 17 种带型,相似度大于 85% 的优势聚类有 30 株,占 73.2%;17 株德尔卑沙门菌产生 13 种带型;14 株罗森沙门菌产生 9 种带型;12 株婴儿沙门菌产生 9 种带型;5 株纽波特沙门菌产生 5 种带型。

### 3 讨 论

2015—2018 年上海市青浦区的沙门菌血清型别呈现多态性的特征,各年份优势血清型基本稳定,均以鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌为优势血清型,常见血清型为伦敦沙门菌、德尔卑沙门菌、罗森沙门菌、婴儿沙门菌等。同国内其他省市比较,虽然均以肠炎和鼠伤寒沙门菌最为常见,但青浦区亦发生了一定的血清型流行变迁<sup>[4]</sup>。

PFGE 分型显示,流行的人源性沙门菌是多克隆的,由肠炎沙门菌的 2 种基因带型(1 种聚类簇)和伦敦沙门菌 1 种基因带型的克隆株占主导。某些血清型的菌株具有较高的遗传同源性,基本位于同一聚类簇中,如肠炎、火鸡、阿贡纳、伦敦、姆班达卡等沙门菌,其遗传基因相对保守。某些血清型别的菌株分型后存在多种带型且同源性较低,如鼠伤寒、纽波特、乙型副伤寒、德尔卑、利奇菲尔德等沙门菌,呈现出较高的遗传多态性,与相关文献报道基本一致<sup>[5-6]</sup>。上述几种血清型别的沙门菌在多位点可变数目串联重复序列分型(MLVA)、PFGE、多位点序列分型(MLST)分析中,均呈现一致的遗传保守性或多态性<sup>[7]</sup>。有不同血清型别的菌株分型后仍表现出较高的基因同源性,在本研究的菌株中,有 1 株肠炎沙门菌与鼠伤寒沙门菌的 PFGE 带型一致,2 株汤卜逊沙门菌与婴儿沙门菌 PFGE 带型一致,该现象符合之前的文献报道<sup>[7-8]</sup>。

沙门菌的血清型别和 PFGE 分型之间存在一定的关联性,但并非完全对应。血清型别的鉴定作为沙门菌的分型分类方法已有 80 多年历史,现仍是国际

微生物检测机构认定的微生物学初筛的标准方法之一,所以准确、快速的血清型鉴定对沙门菌引起疾病的防控具有重要的意义。PFGE 被视为多种病原菌分子分型和溯源分析的“金标准”<sup>[9-10]</sup>,也可以为血清凝集试验或核实血清型别的准确性提供一定帮助。建立沙门菌的 PFGE 指纹图谱数据库,加强对流行克隆株和优势聚类的菌株,以及变异较大的菌株的实时监测和研究,有利于研究散发病例的菌株之间的基因型差异及联系,提高对传染病的预警能力,为食源性疾病暴发的追踪溯源和病原菌的确定提供有力的科学依据。

### 参考文献

- [1] 薛颖,郭荣显,钱珊珊,等.沙门菌毒力岛的研究进展[J].微生物与感染杂志,2015,10(6):381-389.
- [2] 王霄晔,任婧寰,王哲,等.2017 年全国食物中毒事件流行特征分析[J].疾病监测,2018,33(5):359-364.
- [3] BENNETT S D, LITTRELL K W, HILL T A, et al. Multistate foodborne disease outbreaks associated with raw tomatoes, United States, 1990—2010: a recurring public health problem[J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(7): 1352-1359.
- [4] 李可,方莹,张晓峰,等.沙门氏菌的血清分型及分子鉴定研究进展[J].食品安全质量检测学报,2016,7(10):3947-3951.
- [5] 刘雯静.我国部分地区沙门氏菌的分子分型及流性特征分析[D].北京:军事医学科学院疾病预防控制所,2011.
- [6] RIBOT E M, FAIR M A, GAUTOM R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet[J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3(1):59-67.
- [7] 王金艳.上海市鼠伤寒沙门氏菌的耐药性及耐药基因研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2017.
- [8] CHO S, BOXRUD D J, BARTKUS J M, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella* Enteritidis isolates from human and non-human sources using a single multiplex PCR[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 275(1):16-23.
- [9] 施怡茹,徐秋芳,陈洪友,等.一起金黄色葡萄球菌引起食物中毒的病原溯源[J].医学动物防制,2017,33(5):586-588.
- [10] KOT B, PIECHOTA M, ANTOS-BIELSKA M, et al. Antimicrobial resistance and genotypes of staphylococci from bovine milk and the cowshed environment[J]. Pol J Vet Sci, 2012, 15(4):741-749.