

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.06.014

遵义市食源性沙门菌分子分型及耐药研究*

韦德琴,朱琳[△]

贵州省遵义市疾病预防控制中心检验科,贵州遵义 563000

摘要:目的 了解遵义市食源性沙门菌分型及耐药特征。方法 收集遵义市 2020—2022 年食源性沙门菌,采用玻片凝集法对沙门菌进行血清分型,利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对沙门菌进行分子分型,采用肉汤稀释法对沙门菌进行耐药监测,应用 BioNumerics 软件进行数据分析。结果 收集的 21 株沙门菌分为 16 种血清型,其中肯塔基沙门菌 3 株、德尔卑沙门菌 2 株、肠炎沙门菌 2 株、希林登沙门菌 2 株,其余均为 1 株。PFGE 结果显示带型呈现多态性,同源性最高为 62.96%。药敏试验结果显示食源性沙门菌对氨苄西林耐药率最高,为 71.43%,其次对四环素耐药率达 61.90%,多重耐药率为 76.19%。结论 遵义市食源性沙门菌血清型和遗传性多样,对抗菌药物的耐药率高,多重耐药严重。

关键词:食品; 沙门菌; 血清型; 脉冲场凝胶电泳; 耐药性

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)06-0789-05

Study on molecular typing and drug resistance of foodborne Salmonella in Zunyi City*

WEI Deqin, ZHU Lin[△]

Department of Laboratory, Zunyi Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zunyi, Guizhou 563000, China

Abstract: **Objective** To understand the typing and drug resistance characteristics of foodborne Salmonella in Zunyi City. **Methods** The foodborne Salmonella from 2020 to 2022 in Zunyi City were collected, and the slide agglutination method was used for serotyping of Salmonella, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was used for molecular typing of Salmonella, broth dilution method was used for drug resistance monitoring of Salmonella, and BioNumerics software was used for data analysis. **Results** The collected 21 strains of Salmonella were divided into 16 serotypes, including 3 strains of Salmonella Kentucky, 2 strains of Salmonella Delphi, 2 strains of Salmonella Enteritidis, 2 strains of Salmonella Hillington and the rest were 1 strain; the PFGE results showed that the banding pattern was polymorphic with a highest homology of 62.96%; the drug sensitivity test results showed that the resistance rate of Salmonella from food sources to ampicillin was the highest (71.43%), followed by the resistance rate to tetracycline (61.90%), and the multiple drug resistance rate was 76.19%. **Conclusion** The Salmonella from food sources in Zunyi City present the serotype and genetic diversity with high resistant rate to antibiotics. The multi-drug resistance is serious.

Key words: food; Salmonella; serotype; pulsed field gel electrophoresis; drug resistance

沙门菌广泛存在于自然界,是全球食源性腹泻病最常见的病原菌之一,可引起胃肠炎、类伤寒、败血症、局部化脓性感染等疾病。据世界卫生组织报告,沙门菌造成的食物污染给世界各国带来了巨大经济损失,并且严重威胁着人们的身体健康和生命安全。由于沙门菌种类多达 2 600 多种型别^[1],传统分型鉴定技术需要实验室保存 250 多种不同的高质量分型血清和 350 种不同的抗原^[2],并且要求实验人员经验丰富,技术水平高,除此之外该试验周期长、精确度差,加大了社会各检疫部门对食品中沙门菌的防治及

监控的难度。脉冲场凝胶电泳(PFGE)是基于分子的快速分型方法,可提供更快、差异性更明显和更准确的沙门菌分型,克服了传统血清分型的局限性,目前被认为是细菌分型的“金标准”,已被公共卫生部门和食品监管机构用于疫情调查和溯源分析。目前,抗菌药物联合应用是临床治疗沙门菌病的主要措施,由于抗菌药物的滥用出现了许多多重耐药细菌、泛耐药细菌以及全耐药超级细菌,沙门菌作为重要的致病菌,其耐药性不容忽视^[3]。本研究对遵义市食品来源的 21 株沙门菌进行血清分型、PFGE 分子分型和药敏试

* 基金项目:贵州省遵义市三代全基因组测序创新人才团队(遵市科人才[2022]9 号)。

作者简介:韦德琴,女,主管技师,主要从事沙门菌分型和耐药研究。 [△] 通信作者, E-mail:343816757@qq.com。网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1167.R.20240205.1617.002\(2024-02-07\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1167.R.20240205.1617.002(2024-02-07))

验,为食源性沙门菌监测与溯源提供理论依据,同时为沙门菌感染病例合理使用抗菌药物、规避引发耐药提供帮助。

1 材料与方法

1.1 一般材料 本试验分析的 21 株沙门菌均分离自遵义市 2020—2022 年红花岗区、务川县、凤冈县、余庆县、道真县、赤水市、绥阳县、桐梓县、湄潭县、仁怀市 10 个区县食品风险监测项目标本。PFGE 试验标准菌株为沙门菌 H9812,取自贵州省疾病预防控制中心细菌科。药敏试验质控菌株 ATCC25922、ATCC27853 均取自贵州省疾病预防控制中心细菌科。

1.2 仪器与试剂 沙门菌显色平板、营养琼脂、XLD 琼脂均购自北京陆桥技术股份有限公司;沙门菌属诊断血清购自丹麦国家食品研究所;限制性内切酶 Xba I 购自 TaKaRa 公司;蛋白酶 K、Gelred 染液购自索莱宝公司;脉冲场凝胶电泳仪、显影仪购自 Bio-Rad 公司;CHNENF 革兰阴性菌药敏板及配套试剂、Sensitire AIM 自动菌液加样系统及分析系统均购自赛默飞公司;质谱仪鉴定仪购自布鲁克公司。

1.3 方法 沙门菌血清型鉴定是根据 White-Kauffmann Le Minor 抗原表,利用玻片凝集法对 21 株沙门菌进行 O 抗原和 H 抗原血清凝集试验确定菌株的血清型别。PFGE 分子分型参照美国 Pulse Net PFGE 标准化方法进行,将 21 株分离的沙门菌株用限制性内切酶 Xba I 酶切后进行 PFGE,胶块经 Gelred 染液染色后成像。药敏试验按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)推荐的微量肉汤稀释法检测沙门菌对 17 种抗菌药物(氯霉素、复方磺胺甲噁唑、头孢噻肟、头孢他啶、四环素、环丙沙星、萘啶酸、阿奇霉素、阿米卡星、链霉素、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、多黏菌素、头孢他啶/阿维巴坦、厄他培南、美罗培南、替加环素)的药物敏感性,根据 CLSI 抗微生物药敏试验执行标准 M100^[4] 的相应标准获得敏感(S)、中度敏感(I)和耐药(R)的结果,替加环素目前在 M100 标准里无 R、S 的判断标准,其 R、S 的判断参考文献[5]。

1.4 统计学处理 采用 BioNumerics 软件进行聚类分析,构建聚类树。

2 结果

2.1 沙门菌血清分型 对 21 株沙门菌进行血清学

鉴定,共鉴定出 16 种血清型,以 C 群(8 株)、D 群(5 株)、E 群(5 株)为主,分别占 38.10%、23.81%、23.81%,其中肯塔基沙门菌 3 株、德尔卑沙门菌 2 株、肠炎沙门菌 2 株、希林登沙门菌 2 株,其余均为 1 株,见表 1。

2.2 沙门菌 PFGE 分子分型 沙门菌用限制性内切酶 Xba I 酶切后进行 PFGE 试验,结果显示 DNA 片段得到较好的分离,可见大小不一的电泳条带,见图 1。但菌株之间的相似性不高,同一血清型同源性也不高,其中 2 株肯塔基沙门菌同源性为 62.96%,2 株希林登沙门菌同源性为 53.85%。

2.3 药敏试验结果 药敏试验结果显示 80.95%沙门菌对 17 种抗菌药物存在不同程度的耐药,见图 2。多重耐药率达 76.19%,其中 1 株吉韦沙门菌对 10 种抗菌药物耐药,1 株希林登沙门菌对 10 种抗菌药物耐药,1 株肯塔基沙门菌对 11 种抗菌药物耐药。多重耐药情况见表 2。21 株沙门菌对氨苄西林的耐药率最高,为 71.43%,其次是四环素(61.90%)、复方磺胺甲噁唑(61.90%)、链霉素(57.14%)、氯霉素(52.38%),对头孢他啶/阿维巴坦、厄他培南、美罗培南、替加环素敏感率均为 100%,对头孢噻肟和头孢他啶也表现出了一定的耐药性。

表 1 21 株食源性沙门菌血清型分布

群	血清型	抗原式	菌株数
B 群	鼠伤寒沙门菌	1,4,12:i:1,2	1
	德尔卑沙门菌	1,4,12:f,g:1,2	2
C 群	里森沙门菌	6,7:f,g:-	1
	罗森沙门菌	6,7,14:f,g:-	1
	婴儿沙门菌	6,7,14:r:1,5	1
	肯塔基沙门菌	8,20:i:z6	3
	科特布斯沙门菌	6,8:e,h:1,5	1
D 群	沙门菌 C2 群	6,8:a:-	1
	希林登沙门菌	9,46:g,m:-	2
	肠炎沙门菌	1,9,12:g,m:-	2
E 群	鸡沙门菌	1,9,12:-:-	1
	伦敦沙门菌	3,10:1,v:1,6	1
	纽兰沙门菌	3,10:e,h:e,n,x	1
	吉韦沙门菌	3,10:1,v:1,7	1
	鲁齐齐沙门菌	3,10:1,v:e,n,z15	1
	恩昌加沙门菌	3,10:1,v:1,2	1

表 2 21 株沙门菌耐药谱

耐药种类 具体耐药情况	数量 [n(%)]	耐药种类 具体耐药情况	数量 [n(%)]
耐 0 种	4(19.05)	氯霉素+复方磺胺甲噁唑+四环素+链霉素+氨苄西林+氨苄西林/舒巴坦	1(4.76)
耐 2 种 四环素+链霉素	1(4.76)	耐 7 种 氯霉素+复方磺胺甲噁唑+头孢噻肟+头孢他啶+四环素+环丙沙星+氨苄西林	1(4.76)

沙门菌血清学分型种类繁多,达 2 600 多种血清型,在不同国家和地区的分布有差异性。在印度,鼠伤寒沙门菌、鸡沙门菌和肠炎沙门菌是最流行的血清型,占分离株的 96.2%^[8];在埃及,肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌是最常见的血清型^[9];在日本,肉鸡样本中仅存在婴儿沙门菌、曼哈顿沙门菌和胥伐成格隆沙门菌^[10];在我国福建省、济南市、聊城市、成都市等地的腹泻标本中,鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌均为优势血清型^[11-14],而国内食源性疾病中沙门菌最常见的血清型是鼠伤寒、猪霍乱、都柏林、德尔卑、肠炎等沙门菌^[15]。本研究中 21 株沙门菌来源于 10 个不同区县,共鉴定为 16 种血清型,分布于 B、C、D、E 群,种类重复率低,无地区特异性。PFGE 试验结果显示,用限制性内切酶 Xba I 酶切电泳后,DNA 片段可得到了较好的分离,分离率达 100%,但菌株之间的相似性不高,其中 2 株肯塔基沙门菌同源率为 62.96%,2 株希林登沙门菌同源率为 53.85%。结果说明沙门菌 PFGE 型别与血清型之间的关联性并不明确,这与崔可琦等^[16]报道的冰鲜鸡生产链中同种血清型沙门菌可分布在多个 PFGE 谱型内一致。以上结果提示遵义市食品中存在多种型别的沙门菌,食品中沙门菌污染源广泛、复杂多样,应加大对沙门菌的防治及监控力度。

虽然沙门菌病通常是一种自限性疾病^[17],但该疾病可以全身性传播并退化为慢性疾病,如反应性关节炎、骨髓炎、心脏炎症或神经疾病^[18]。氨苄西林、氯霉素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑是临床治疗沙门菌病的主要药物^[3,19],但多年来由于抗菌药物的不合理使用,使得沙门菌对抗菌药物耐药现象越来越严重^[20],并且存在多重耐药的问题。本研究 21 株沙门菌耐药率达 80.95%,多重耐药率达 76.19%,对青霉素类耐药率最高,对四环素和磺胺类抗菌药物耐药性强。这与我国沙门菌耐药趋势一致,现有研究数据显示其耐药机制为相关耐药基因 *tem*、*tet*、*sul* 分别通过编码 β -内酰胺酶、外排泵和氢叶酸合成酶介导氨苄西林、四环素和磺胺类抗菌药物耐药。目前,临床应用头孢菌素类抗菌药物治疗细菌性感染较为普遍,本研究中部分菌株对于头孢他啶/头孢噻肟耐药现象不容忽视。针对头孢他啶/头孢噻肟的耐药研究,21 世纪初美国科学家研究发现携带 *bla* 头孢菌素抗性基因的沙门菌在大洋洲、亚洲、非洲-中东和欧洲等地已经出现,其耐药机制还不明确,可能与 *bla* 基因突变诱导外排泵的过表达、外膜蛋白表达减少以及导致外膜蛋白丢失的基因突变有关^[21]。除此之外本研究中存在 1 株吉韦沙门菌对 10 种抗菌药物耐药,1 株希林登沙门菌对 10 种抗菌药物耐药,1 株肯塔基沙门菌对 11 种抗菌药物耐药,其广泛的耐药现象需要进行深入研究。

本研究分析的沙门菌分离自 2020—2022 年食品风险监测项目标本,菌株量较低,还需增加菌株数才

能得到更为准确的结论,为沙门菌病患者用药提供支持。但现有数据提示遵义市沙门菌污染源广泛,耐药现象严重,提示在各类食品生产和销售中都需要保持警惕和严格监管。

参考文献

- [1] FERRARI R G, PANZENHAGEN P H, CONTE-JUNIOR C A. Phenotypic and genotypic eligible methods for salmonella typhimurium source tracking[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2587.
- [2] TANG S L, ORSI R H, LUO H, et al. Assessment and comparison of molecular subtyping and characterization methods for salmonella[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1591.
- [3] MCDERMOTT P F, ZHAO S, TATE H. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal Salmonella [J]. *Microbiol Spectr*, 2018, 6(4): 780-790.
- [4] HUMPHRIES R, BOBENCHIK A M, HINDLER J A, et al. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition[J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(12): e0021321.
- [5] 王辉, 宁永忠. 多黏菌素类与替加环素及头孢他啶/阿维巴坦药敏方法和报告专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(10): 964-972.
- [6] EL-SAADONY M T, SALEM H M, EL-TAHAN A M, et al. The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview[J]. *Poult Sci*, 2022, 101(4): 101716.
- [7] BARROW P A, FREITAS NETO O C. Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review [J]. *Avian Pathol*, 2011, 40(1): 1-13.
- [8] KUMAR Y, SINGH V, KUMAR G, et al. Serovar diversity of Salmonella among poultry[J]. *Indian J Med Res*, 2019, 150(1): 92-95.
- [9] ABD-EIGHANY S M, FATHY T M, ZAKARIA A I, et al. Prevalence of multidrug-resistant Salmonella enterica serovars in buffalo meat in Egypt[J]. *Foods*, 2022, 11(18): 2924.
- [10] DUCV M, NAKAMORO Y, FUJIWARA A, et al. Prevalence of Salmonella in broiler chickens in Kagoshima, Japan in 2009 to 2012 and the relationship between serovars changing and antimicrobial resistance[J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 108.
- [11] 刘雪杰, 陈伟伟, 傅祎欣, 等. 2015—2018 年福建省食源性沙门菌监测情况分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2020, 36(3): 223-228.
- [12] 李娜, 刘辉, 李健, 等. 济南市腹泻患者沙门菌 PFGE 分子分型及耐药特征研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2021, 37(10): 893-897.
- [13] 杜银菊, 梁胜楠, 段瑶, 等. 2015—2017 年聊城市腹泻病例中沙门菌分子分型及耐药性研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(10): 915-921. (下转第 799 页)

- scoring model for predicting mortality of solid tumor patients with bloodstream infection caused by *Escherichia coli*[J]. *Support Care Cancer*, 2022, 30(1):413-421.
- [7] FANG T, WANG Q, LI W, et al. Distribution and drug resistance analysis of 2287 strains of pathogenic bacteria in children's blood culture [J]. *J Microbiol Immunol*, 2023, 13(1):24-31.
- [8] 梁馨月, 孟涵, 王启, 等. 优化血培养检测流程的效果评价研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2022, 45(2):137-144.
- [9] 杨晓雯, 刘佳音, 张宇, 等. 不同方法提取血培养瓶培养的抗凝血中布鲁氏菌核酸的比较[J]. *疾病监测*, 2022, 37(7):964-966.
- [10] DESLANDES V, RAFIPOUR D, GORN I, et al. Effect of delayed entry of blood culture bottles in BACTEC automated blood culture system in the context of laboratory consolidation[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):1337.
- [11] 马艳, 周春妹, 黄声雷, 等. BacT/ALERT VIRTUO 和 BacT/ALERT 3D 两种血培养系统的性能评价[J]. *中华医院感染学杂志*, 2023, 33(11):1622-1626.
- [12] OTA K. Contamination of blood cultures from indwelling arterial catheters in critically ill patients; alternative blood culture sampling? [J]. *Chest*, 2023, 164(1):11-12.
- [13] MEGGED O, DOREMBUS S, BEN-SHALOM E, et al. Comparing blood culture contamination rates by different sampling methods in a paediatric emergency department [J]. *J Paediatr Child Health*, 2022, 58(4):669-673.
- [14] NIELSEN L E, NGUYEN K, WAHL C K, et al. Initial Specimen Diversion Device® reduces blood culture contamination and vancomycin use in academic medical centre[J]. *J Hosp Infect*, 2022, 120:127-133.
- [15] 中国医师协会检验医师分会儿科疾病检验医学专业委员会. 儿童血培养规范化标本采集的中国专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 43(7):547-552.
- [16] 王霞, 孙超, 王蕾, 等. 临床护士对《临床微生物实验室血培养操作规范》的认知现状分析[J]. *中华现代护理杂志*, 2020, 26(13):1694-1698.
- [17] ZIMMERMAN F S, ASSOUS M V, ZEVIN S, et al. Reducing blood culture contamination using an initial specimen diversion device[J]. *Am J Infect Control*, 2019, 47(7):822-826.
- [18] 孟凡超. 全自动血培养仪与全自动微生物鉴定仪在临床血液检验中的敏感性、准确性和可行性[J]. *中国医疗器械信息*, 2021, 27(15):155-156.
- [19] SIMÉON S, LE MOING V, TUBIANA S, et al. Time to blood culture positivity: an Independent predictor of infective endocarditis and mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(4):481-488.
- [20] MACBRAYNE C E, WILLIAMS M C, PRINZI A, et al. Time to blood culture positivity by pathogen and primary service[J]. *Hosp Pediatr*, 2021, 11(9):953-961.
- [21] ANTILLON M, SAAD N J, BAKER S, et al. The relationship between blood sample volume and diagnostic sensitivity of blood culture for typhoid and paratyphoid fever: a systematic review and Meta-analysis[J]. *J Infect Dis*, 2018, 218(Suppl 4):S255-S267.
- [22] SEPULVEDA J, WESTBLADE L F, WHITTIER S, et al. Bacteremia and blood culture utilization during COVID-19 surge in New York City [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(8):e00875-20.
- [23] LEUNG C H, TSENG H K, WANG W S, et al. Clinical characteristics of children and adults hospitalized for influenza virus infection [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2014, 47(6):518-525.

(收稿日期:2023-10-27 修回日期:2024-01-25)

(上接第 792 页)

- [14] 黎明, 孔喜梅, 袁齐武, 等. 成都市未成年人群腹泻沙门菌血清型、耐药及分子分型研究[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(21):3996-4000.
- [15] 李莉, 朱晓露, 马会会, 等. 某市腹泻患者中沙门菌感染状况及耐药状况的分析[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(17):2523-2525.
- [16] 崔可琦, 李静怡, 冯赛祥, 等. 冰鲜鸡生产链中沙门菌的分离鉴定及 PFGE 分型研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(12):62-66.
- [17] ANTUNES P, MOURAO J, CAMPOS J, et al. Salmonellosis: the role of poultry meat [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(2):110-121.
- [18] XU Z, WANG M, ZHOU C, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of retail-meat-borne *Salmonella* in southern China during the years 2009—2016: the diversity of contamination and the resistance evolution of multi-drug-resistant isolates [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 333:108790.
- [19] CRUMP J A, SJOLUND-KARLSSON M, GORDON M A, et al. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive salmonella infections [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(4):901-937.
- [20] MAKAL, POPOWSKA M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food [J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2016, 67(4):343-358.
- [21] XIONG L, WANG X, WANG Y, et al. Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam [J]. *WIREs Mech Dis*, 2022, 14(6):e1571.

(收稿日期:2023-07-10 修回日期:2024-01-22)