论著

中国食源性鼠伤寒沙门菌株耐药谱及 PFGE 分型研究

周　正　刘秀梅
(中国疾病预防与控制中心营养与食品安全所,北京　100050)

摘　要:**目的**　了解掌握中国食品中鼠伤寒沙门菌的耐药状况,并对 2002 - 2005 年国家食源性疾病监测网分离的 23 株鼠伤寒沙门菌进行耐药性监测及 PFGE 分型研究。**方法**　利用血清学方法对 2002 - 2005 年食源性疾病监测网分离的沙门菌进行分型,并运用 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) 推荐的纸片法对鼠伤寒沙门菌株进行耐药性检测,采用脉冲场凝胶电泳法(PFGE)进行 PFGE 分型。**结果**　发现 15 株多重耐药鼠伤寒沙门菌,其中耐 4～5 种抗生素的 6 株(40 %),耐 6～9 种抗生素的 5 株(33.3 %),耐 10 种抗生素的 4 株(26.7 %);可分为 16 个 PFGE 型,其中 5 个 PFGE 型的菌株数超过 1 株。**结论**　我国食源性鼠伤寒沙门菌分离株的多重耐药性严重,PFGE 分型方法对鼠伤寒沙门菌的分型能力较好,同一 PFGE 型菌株的耐药谱非常接近。

关键词:沙门菌,鼠伤寒;抗药性,微生物;电泳,凝胶,脉冲场

Antimicrobial Resistance Patterning and Molecular Typing for Isolates of Foodborne *Salmonella typhimurium* in China

ZHOU Zheng, LIU Xiu-mei
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective**　To investigate the antimicrobial resistance of *S. typhimurium* isolates from food in China, the twenty-three strains of *S. typhimurium* isolated from 2002 to 2005 within the areas of Chinese National Foodborne Dieases Surveillance Network were tested for the antimicrobial resistance and molecular types. **Methods**　All the strains were detected the antimicrobial resistance by the disk diffusion method and molecular typed by PFGE. **Results**　Fifteen out of 23 strains were multiple antimicrobiol resistant. Six strains (40 %) were resisted to four to five kinds of antibiotics, five strains (33.3 %) to six to nine kinds, four strains (26.7 %) to ten. All the tested strains were typed into sixteen genotype, with the five genotypes have more than one strains. **Conclusion**　The multiple microbial resistance of foodborne *S. typhimurium* strains has showing the prevalent problem. PFGE is one of the good typing methods for *S. typhimurium* isolates. It is also indicated that the results of the antimicrobial resistance patterns are quite closed to the PFGE typing in this study.

Key word: Salmonella typhimurium; Drug Resistance, Microbial; Electrophoresis, Gel, Pulsed-Field

partial cDNA sequence of precursor [J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5449-5452.

[5] 金万浩. 食品物性学[M]. 北京:中国科学技术出版社, 1991.

[6] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社. 2001.

[7] 徐叔云,药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1985.

[8] CHIA B C, CARVER J A, MULHERN T D, et al Maculatin-an antimicrobial peptides from the Australian tree frog, litoria genimaculata solution structure and biological activity [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267: 1894-1908.

[9] CLARKE B T. The natural history of an amphibian skin secretions, their normal fanction and potential medical applications[J]. Biol Rew, 1997, 72 (3): 365-379.

[10] SHERMAN R A, HALL M J, THOMAL S. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions [J]. Annu Rev Entomol, 2000, 45: 55-81.

[11] BRAHMACHARY M, KRISHNAN S P, KOH J L Y, et al. ANTIMIC: a database of anti- microbial sequences[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(1): D586-D589.

[12] Prates M V, SFORCA M L, REGIS W C. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran hyla punctata[J]. J Biol Chem, 2004, 279(13): 13018-13022.

[收稿日期:2006 - 10 - 29]

中图分类号:R15;TS202.3;S966.35　**文献标识码**:A　**文章编号**:1004 - 8456(2007)03 - 0217 - 05

基金项目:公共卫生突发应急反应机制运行专项(食源性疾病监测)

作者简介:周正　男　博士生
通讯作者:刘秀梅　女　研究员

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

近年来,细菌的耐药性已经成为一个非常普遍的现象,引起各国食品安全和医药工作人员的高度关注。由多重耐药株所引起的疾病,临床上治疗困难,成本很高[1],造成人力物力的大量浪费。鼠伤寒沙门菌是我国临床较常见的沙门菌致病血清型,其感染率和死亡率都很高,诺酮类药物萘啶酮酸(nalidixic acid)和喹诺酮类药物环丙沙星(ciprofloxacin)为目前临床治疗鼠伤寒沙门菌病的一线药物[2,3],但是由于喹诺酮类药物在我国临床治疗和畜牧养殖业中的滥用,已经有大量耐喹诺酮的鼠伤寒沙门菌菌株出现,使治疗的难度和成本大大增加[4]。为掌握鼠伤寒沙门菌的分布及流行状况,传统的血清分型方法已经不能满足要求,需要采用分型能力更强的分子分型方法进一步分析不同来源的鼠伤寒沙门菌之间的联系。脉冲场凝胶电泳分型方法(PFGE)为目前国际上分子分型的通用方法,其结果重复性好[5,6],美国 Pulse-Net 即采用此方法对沙门菌进行监测及溯源研究。

本研究用 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)推荐的纸片扩散法对国家食源性疾病监测网 2002-2005 年分离的 23 株鼠伤寒沙门菌进行药敏检测,对多重耐药谱进行分析,并采用 PFGE 方法对分离菌株进行分子分型研究。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　菌株　耐药(纸片)质控菌株　大肠埃希菌(ATCC 25922);实验菌株 国家食源性疾病监测网 2002 - 2005 年分离得到的 23 株鼠伤寒沙门菌,菌株编号及分离年份见表 1。

表 1　菌株编号及分离年份对照表

菌株编号	分离年份
01～08	2002
09～13	2003
14～22	2004
23	2005

1.1.2　试剂　HE 琼脂(北京陆桥公司)、营养琼脂(北京陆桥公司)、Oxoid 耐药纸片(OXOID 公司)、Seakem Gold 琼脂糖(CAMBREX 公司)、蛋白酶 K(MERCK 公司)、限制性内切酶 XbaI(NEB 公司)。

1.1.3　主要实验仪器　温箱(36 ±1)℃、CHEF-mapper 型脉冲场凝胶电泳仪及配套设备(Bio-Rad 公司)、凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)、恒温水浴摇床(哈东联公司)。

1.2　方法

1.2.1　耐药性测定　按照耐药纸片操作说明进行药敏检测。共使用 23 种抗生素,中英文名称及浓度见表 2。

表 2　纸片扩散法用抗生素中英文名称及浓度

中文名称	英文名称	纸片含量(μg/片)
阿米卡星	Amikacin(AK)	30
阿莫西林+克拉维酸	Amoxicillin Pclavuianic acid (AMC)	20/10
氨苄西林	Ampicillin (AMP)	10
氨曲南	Aztreonam(ATM)	30
氯霉素	Chloramphenicol(C)	30
头孢西丁	Cefoxitin (FOX)	30
头孢曲松	Ceftriaxone (CRO)	30
环丙沙星	Ciprofloxacin Hydrochloride (CIP)	5
多西环素	Doxycycline(DOX)	30
呋喃妥因	Furadantin(F)	300
头孢吡肟	Cefepime (FEP)	30
卡那霉素	Kanamycin (K)	30
头孢噻吩	Cefalotin (KF)	30
头孢唑啉	Cefazolin (KZ)	30
头孢孟多	Cefamandole (MA)	30
美洛培南	Meropenem (MEM)	10
美洛西林	Mezlocillin (MEZ)	75
萘啶酮酸	Nalidixic acid (NAL)	30
诺氟沙星	Norfloxacin (NOR)	10
磺胺异噁唑	Sulfafurazole(SF)	300
四环素	Tetracycline(TE)	30
妥布霉素	Tobramycin(TOB)	10
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	Trimethoprim Psulfamethoxazole (SXT)	1.25/23.75

1.2.2　PFGE 操作　实验操作过程采用美国 PulseNet 标准操作手册(Pulse-Net protocol)5.1、5.2、5.4 规定进行[7]。

1.2.3　结果判定　耐药结果参照 NCCLS 药敏标准进行结果判定,分为敏感(susceptible)、中介度(Intermediate susceptible)和耐药(resistant)3 种,可耐 3 种以上抗生素的为多重耐药株;PFGE 结果采用 BioNumerics(Applied-maths 公司,ver4.00)进行分析处理,采用 Dice-UPGMA 法进行聚类分析,相似率为 100 %的认定为同一 PFGE 型,小于 100 %的认定为不同的 PFGE 型。

2　结果

2.1　耐药性测定结果　试验测得多重耐药株耐药谱如表 3 所示,共有 15 株多重耐药沙门菌,其中耐 4～5 种抗生素的 6 株(40 %),耐 6～9 种抗生素的 5 株(33.3 %),耐 10 种抗生素的 4 株(26.7 %)。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3　我国食源性鼠伤寒沙门菌株多重耐药谱

多重耐药谱	菌株数量
AMP-MEZ-TET-NAL	1
AMP-MEZ-TET-NAL-DOX	4
AMP-MEZ-TET-NAL-SF	1
AMP-MEZ-TET-DOX-SXT-SF	1
AMP-TET-DOX-NAL-CIP-NOR-NIT-SF	2
TET-DOX-NAL-CIP-NOR-NIT-SXT-SF	1
AMP-MEZ-TET-DOX-NAL-CIP-NOR-SXT-SF	1
AMP-MEZ-TET-DOX-NAL-CIP-NOR-NIT-SXT-SF	4

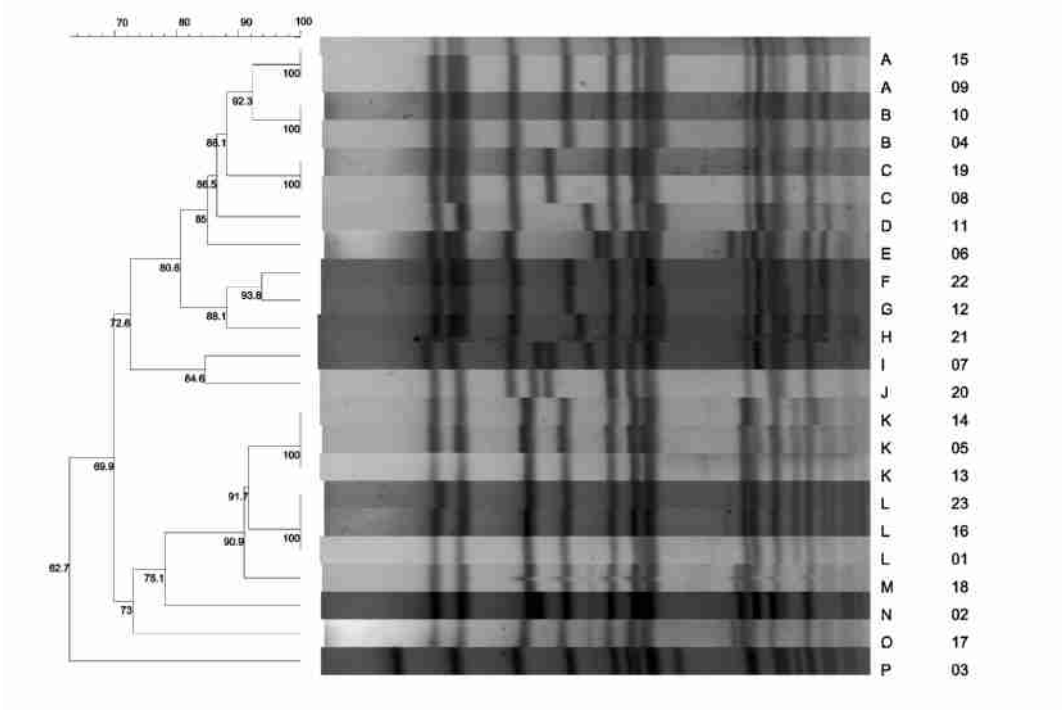
2.2　PFGE 结果　所有菌株都可得到清晰的 PFGE 图谱,PFGE 分型图谱聚类分析见图 1,经过聚类分析,23 株鼠伤寒沙门菌可分为 16 个 PFGE 型,分别命名为 A～P 型。其中 K、L 型各包括 3 株菌,A、B、C 型各包含 2 株菌,D、E、F、G、H、I、J、M、N、O、P 型均为 1 株菌。

对比耐药性的测定结果　A 型菌株抗生素耐药谱一致,对所有测试抗生素均敏感。C 型菌株抗生素耐药谱也相同,除对磺胺异噁唑中介外,对其他抗生素均敏感。B 型两个菌株耐药谱差异较大,04 号菌株对所有测试抗生素均敏感,10 号菌株对 4 种抗生素耐药,对 2 种抗生素中介;K 型各菌株耐药谱非常相似,其中 05 号菌株和 14 号菌株只有阿莫西林+克拉维酸的测试结果有所不同,其他均一致,而 13 号菌株的氨苄西林、头孢噻吩、美洛西林 3 种抗生素耐药结果同 05 号和 14 号有差异;L 型菌株耐药谱也非常相似,只有 16 号菌株的呋喃妥因耐药结果和其他 2 个菌株有一定差异,其他种类抗生素的耐药结果均完全一致。

3　讨论

3.1　在所有 23 株测试菌中,多重耐药株达到 15 株,占所有菌株数量的 65.22 %,说明我国食品中鼠伤寒沙门菌的耐药性已经成为一个非常普遍的现象,其中 8 株鼠伤寒沙门菌株对第三代喹诺酮类环丙沙星有耐药性,占总数的 34.78 %,而目前在临床上喹诺酮类药物为治疗肠杆菌感染的首选药物。这就意味着对于感染这些菌株的患者,抗生素治疗已经不能够快速治愈,只能依靠患者自体康复,产生此结果的直接原因是我国抗生素在畜牧兽医及临床治疗上的滥用。

3.2　PFGE 分型方法直接针对整个细菌染色体 DNA 进行分析,采用稀有位点限制性内切酶将染色体切成 5～30 条大小约为 10～800 kb 的片段,再通过 2 个或多个交变电场,使得 DNA 分子的电泳方向随电场的变化而变化,在凝胶中呈蛇形向前移动,从而使大分子 DNA 得到分离,PFGE 分辨力高,重复性好,是目前最理想的分型方法,常作为评价其他分型方法的参考标准[8,9]。本研究采用美国 Pulse-Net 标准操作方法,对鼠伤寒沙门菌进行了 PFGE 分型,所有菌株都可得到 10～20 条左右的条带,23 株鼠伤寒沙门菌共分为 16 个 PFGE 型,分型结果较好。



注:A,B,C…K 为 PFGE 型别,01,02,03…23 为菌株编号。

图 1　23 株鼠伤寒沙门菌 PFGE 分型结果

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3.3　从时间分布上看,同一 PFGE 型中的菌株均来自不同年份,来自同一年的菌株均为不同的基因型,说明我国 2002 - 2005 年没有出现大面积的鼠伤寒沙门菌的暴发流行。对比 PFGE 分型和耐药谱测定结果可以看出,A 型与 C 型型内各菌株耐药谱完全一致,B、K、L 型型内菌株耐药谱不同,L 型菌株耐药谱极其相似,只有在呋喃妥因耐药结果上有所不同,16 号菌株对呋喃妥因敏感,23 号和 01 号对呋喃妥因耐药,而对其他种类的抗生素的耐药情况完全相同。K 型菌株对 7～8 种抗生素耐药,L 型对 9～10 种抗生素耐药,同种 PFGE 型有着相同或者非常相似的耐药谱。PFGE 型相同而耐药谱不同的现象可能是由于耐药基因发生突变,但是突变位点并不在 PFGE 酶切位点上,导致耐药情况不能从 PFGE 分型上体现出来[10]。

参考文献

[1] 郭云昌,刘秀梅. 市售鸡肉中沙门菌分离株多重耐药谱测定[J]. 中国食品卫生杂志,2005,17(02):100-103.

[2] KIM S H, WEI C I. Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage type DT104 and other pathogens[J]. J Food Prot,2007,70(1):22-29.

[3] THORROLD C A, LETSOALO M E, DUSE A G, et al. Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents[J]. Int J Food Microbiol, 2007,113(3):315-320.

[4] 郭云昌,裴晓燕,刘秀梅. 鼠伤寒沙门菌耐药株拓扑异构酶基因突变分析[J]. 卫生研究,2004,33(9):591-594.

[5] 纪惠玲,陈艳,刘秀锋. 脉冲场凝胶电泳技术在鼠伤寒沙门菌分型中的应用[J]. 海峡预防医学杂志,2005,11(1):3-5.

[6] TAMADA Y, NAKAOKA Y, NISHIMORI K, et al. Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Clin Microbiol,2001,39(3): 1057-1066.

[7] Pulse-Net protocol sections 5.1, 5.2, 5.4 One-Day (24～28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE)[EB/OL]. [2007-04-16] http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm.

[8] GAUL S B, WEDEL S, ERDMAN M M, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved XbaI fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes[J]. J Clin Microbiol, 2007,45(2):472-476.

[9] FAKHR M K, SHERWOOD J S, THORSNESS J, et al. Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from retail turkey meat products[J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3(4):366-374.

[10] ONG G, WILSON I, SMYTH B, et al. Antimicrobial resistance in non-typhoidal *salmonellas* from humans in Northern Ireland, 2001-2003: standardization needed for better epidemiological monitoring [J]. Epidemiol Infect, 2006,12:1-6.

[收稿日期:2007 - 01 - 22]

论著

蛋白质生理需要量研究使用的食谱中营养素的含量分析

姬一兵[1]　朴建华[1]　张宇辉[2]　田　园[1]　李卫东[1]　孙　锐[1]　杨晓光[1]

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京　100050;
2. 中国人民解放军白求恩军医学院,河北　石家庄　050081)

摘　要:**目的**　分析蛋白质生理需要量研究使用的食谱中 5 种主要营养素的含量和分布,并根据三大宏量营养素供能系数计算食物所能提供的能量。**方法**　以白求恩军医学院学员的日常膳食制成 3 日食谱,用于研究蛋白质的生理需要量,采集食谱中的各种食物 34 种,采用国标方法对每种食物中的蛋白质、脂肪、糖类、灰分和水分的含量进行测定。**结果**　粮谷类食物的糖类的平均含量为 46.9 %,明显高于肉类的 3.2 %及蔬菜的 4.5 %,其所能提供的能量也较高,平均为1 331 kJ/100 g,肉类食物中的蛋白质含量平均为 21.4 %,其他营养素含量相对较低。不同蛋白质剂量组的受试者实际摄入的蛋白质与预设的蛋白质给予量一致,三大营养素的供能比合理。**结论**　结合学员日常膳食制定的此 3 日食谱,能够为受试者提供足够的能量和营养素,满足机体生理需要。

关键词:膳食;营养素;能量摄取;食谱制订

中图分类号:R15;R378.22　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1004 - 8456(2007)03 - 0221 - 04

基金项目:达能膳食营养研究与宣教基金(DIC2006-07)

作者简介:姬一兵　男　主管医师　博士研究生

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net