

风险监测

市售活鸡和腹泻患者中非伤寒沙门菌分子特征和耐药性研究

张丽华,朱学海,郭主声,张丽,陈桓练,周世添,王剑文

(东莞东华医院,广东 东莞 523110)

摘要:目的 分析市售活鸡及腹泻患者中非伤寒沙门菌的分子特征的相似性及耐药性,预防沙门菌的感染流行。方法 收集2012年1月—2013年10月从1 054份腹泻患者粪便样品及440份农贸市场的活鸡肛拭子中分离出的非伤寒沙门菌株93株,进行血清分型,对常见的非伤寒沙门菌采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行分子分型、Bionumerisc v4.0进行聚类分析、纸片扩散法(K-B法)进行药物敏感性试验。结果 1 054份腹泻样品中共检出非伤寒沙门菌88株,分离率为8.35%,分为25种血清型,肠炎沙门菌居多。其中0~2岁的婴幼儿检出率较高,占52.27%(46/88)。PFGE结果:16株肠炎沙门菌分成14个PFGE型、12株斯坦利沙门菌分成11个PFGE型、14株鼠伤寒沙门菌分成14个PFGE型、6株德尔卑沙门菌分成5个PFGE型;对菌株间的相似性进行比较发现两个100%同源的肠炎沙门菌PFGE型,其他菌株的分子特征的相似性不大,鸡源菌株与人源菌株的分子特征相似性不大;对12种抗菌药物的耐药率在50%以下,不同的血清型耐药率各不相同,耐药较严重的为德尔卑沙门菌。440份活体鸡肛拭子分离出的非伤寒沙门菌5株,分离率为1.14%,共得分4种血清型,其中姆班达卡沙门菌病人中未检出。结论 该地区由非伤寒沙门菌引起腹泻的感染率高,尤以婴幼儿多见,患者与鸡未发现同一克隆株,对常用抗生素有很好的敏感性。

关键词:脉冲场凝胶电泳;非伤寒沙门菌;同源性;食源性致病菌;血清分型

中图分类号:R155;R378.2⁺2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0605-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.022

Investigation on the molecular characteristics and drug resistance of non-typhoidal *Salmonella* isolates from commercial chickens and diarrhea patients

ZHANG Li-hua, ZHU Xue-hai, GUO Zhu-sheng, ZHANG Li,

CHEN Huan-lian, ZHOU Shi-tian, WANG Jian-wen

(Donghua hospital in Dongguan, Gongdong Dongguan 523110, China)

Abstract: Objective To analyze the similarity of molecular characters and drug resistance of non-typhoidal *Salmonella* isolates from commercial chickens and patients with diarrhea, and to prevent the infection of *Salmonella*. **Methods** 93 *Salmonella* strains were isolated and serotyped from 1 054 stool specimens of diarrhea patients and 440 anal swab of live chickens from markets which were collected from January 2012 to October 2013. Common non-typhoidal *Salmonella* were molecular classified by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), clustering analysis was conducted by Bionumerisc v4.0 and drug sensitivity test was conducted by K-B method. **Results** 88 strains of non-typhoidal *Salmonella* were detected in 1 054 diarrhea specimens, with the detection rate of 8.35%. The strains were subtyped into 25 serotype, and *Salmonella enteritis* was the majority. 46 strains of non-typhoidal *Salmonella* were detected from patients under the age of 2 accounting for 52.27%. The PFGE showed that 16 strains of *Salmonella enteritidis* could be divided into 14 patterns, 12 strains of *Salmonella stanley* could be divided into 11 patterns, 14 strains of *Salmonella typhimurium* could be divided into 14 patterns and 6 strains of *Salmonella derby* could be divided into 5 patterns. The similarity between the strains were compared and two PFGE patterns of *Salmonella enteritidis* were 100% homologous, while there was little similarity in other strains. Meanwhile, there was little similarity between strains from chicken and patients. The drug resistance rate of non-typhoidal *Salmonella derby* to 12 kinds of antibiotics was below 50%. The drug resistance rate of different serotype was not identical, and *Salmonella derby* had a high resistance. 5 strains of non-typhoidal *Salmonella* were isolated from 440 anal swab in chicken with the detection rate of 1.14%. The strains were divided into 4 serotype, and *Salmonella mbandaka* was not detected in patients. **Conclusion** The rate of diarrhea caused by non-typhoidal *Salmonella* was high in this region, especially in infants and young children. Strains from patients and chickens did not have the same clone so that common antibiotics had a good sensitivity.

Key words: Pulsed field gel electrophoresis; non-typhoidal *Salmonella*; homology; foodborne pathogen; serotype

收稿日期:2014-06-20

基金项目:广东省东莞市科技计划项目(201210515046245)

作者简介:张丽华 女 主任技师 研究方向为临床微生物和细菌耐药性监测及医院感染 E-mail:zlhys@aliyun.com

非伤寒沙门菌是一群伤寒、副伤寒以外的沙门菌。该菌所致疾病具有种系特异性,轻者为自愈性胃肠炎,能引起人畜共患病。根据食源性疾病细菌性病原所致危害的严重性,沙门菌被列为首选控制的食源性致病菌,尽管以往对沙门菌感染做了许多监控工作,但每年世界范围仍有大量由沙门菌污染食物引起的病例发生。东莞东华医院耐药监测数据显示,非伤寒沙门菌检出率在肠杆菌科细菌中排名第五位^[1]。近年来,由于抗菌药物在畜牧业中广泛应用,特别是在食源性动物中作为促生长剂广泛应用,使非伤寒沙门菌耐药性问题日益严重,其流行病学情况表现出新的特征,因而监测和控制沙门菌的流行和耐药性变异,成为关注的热点,世界卫生组织在2000年成立全球沙门菌监测网,广东省成立了食源性疾病监测网。鸡作为人类食用最多的家禽之一,也是沙门菌储存宿主,为了解非伤寒沙门菌在人源和鸡源的流行是否存在相关性和同源性,现将东莞地区市售活鸡及腹泻患者中分离的非伤寒沙门菌检测情况及耐药情况报导如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和样品来源

菌株来源:脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析用沙门菌标准菌株(H9812),来源于全国病原细菌实验室监测网络 PulseNet China。

活鸡样品来源:2012—2013年采集自东莞东城区5个农贸市场的活鸡440只,用运送培养基中的拭子直接插入活鸡的肛门直肠约2~4公分处,转动几下,取出后插入运送培养基中送检。

腹泻患者样品来源:收集东莞东华医院2012年1月—2013年10月门诊和住院腹泻患者粪便样品1054份(腹泻病患者需符合:腹泻每日排便3次或以上,粪便有性状改变,并符合以下任何一条标准为疑似感染非伤寒沙门菌病例:发热,体温>38℃,或伴有头痛、寒战、疲劳,有恶心、呕吐或腹痛等症状)。

1.1.2 主要仪器与试剂

CHEF MAPPER 脉冲场凝胶电泳仪和 GEL Doc EQ 凝胶成像分析系统均购自美国 Bio-Rad,比浊仪(美国 DADE BEHRING),VITEK-COMPET 细菌鉴定(法国梅里埃)。

MH 平板(广州市迪景生物有限公司),SBG 增菌液、XLD 平板、沙门菌显色培养基及沙门菌生化管均购自广东环凯微生物科技有限公司,沙门菌诊断血清(泰国 S&A),药敏纸片(英国 OXIOD),Xba

I 酶(美国 Promega),SeaKem Gold Agarose 琼脂糖(美国 Cambrex),蛋白酶 K(德国 Merck)。

1.2 方法

1.2.1 分离培养方法

采集到的新鲜粪便样品或肛拭子接种到 XLD 平板及 SBG 增菌液,37℃培养过夜后用沙门菌显色平板分离,37℃培养过夜挑取紫色可疑菌落做初步生化鉴定,生化结果符合者再做血清凝集试验和系统生化鉴定。

1.2.2 药物敏感试验

采用纸片扩散法(K-B法),包括下列抗菌药物:氨苄西林(AMP)、头孢他啶(CAZ)、环丙沙星(CIP)、氯霉素(CHL)、头孢噻肟(CTX)、头孢吡肟(FEP)、庆大霉素(GEN)、萘啶酸(NAL)、磺胺甲二唑(SMX)、链霉素(STR)、四环素(TCY)和甲氧苄啶(TMP),共12种。结果判定参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2010年版标准判读^[2]。

1.2.3 PFGE 方法

参照美国 PulseNet 伤寒沙门菌 PFGE 标准操作方法^[3]。

2 结果

2.1 腹泻患者检测结果

2.1.1 检出情况

1054例腹泻患者的大便样品中培养出88株沙门菌,阳性率为8.35%。

2.1.2 年龄分布

沙门菌阳性的腹泻患者52.3%为婴幼儿,成年人只占33.0%,见表1。

表1 非伤寒沙门菌腹泻患者的年龄分布情况

Table 1 Distribution of age of non typhoidal salmonella

diarrhea patients		
年龄/岁	菌株数/株	百分比/%
0~2	46	52.27
2~20	13	14.77
20~83	29	32.95
合计	88	100.00

2.1.3 血清分型结果

对检出的88株沙门菌进行血清学分型,共分25个血清型,其中肠炎沙门菌最多,占23.86%;其次是斯坦利沙门菌,占17.05%;第三位是鼠伤寒沙门菌,占15.91%;第四位是德尔卑沙门菌,占10.23%,见表2。

2.1.4 PFGE 结果

对排在前四位的沙门菌进行 PFGE 分型并用 Bionumerisc v4.0 软件对 PFGE 图谱进行聚类分析:其中16株肠炎沙门菌分出14个 PFGE 型、12株斯

表2 88株非伤寒沙门菌的血清分型结果

Table 2 Serotype result of the 88 strains of non-typhoidal *Salmonella*

血清型	菌株数/株	百分比/%	血清型	菌株数/株	百分比/%
肠炎沙门菌	21	23.86	波茨坦沙门菌	1	1.14
斯坦利沙门菌	15	17.05	菲尔摩雷沙门菌	1	1.14
鼠伤寒沙门菌	14	15.91	汤卜逊沙门菌	1	1.14
德尔卑沙门菌	9	10.23	阿尔顿沙门菌	1	1.14
利奇菲尔德沙门菌	3	3.41	阿格玛沙门菌	1	1.14
I4,5,12:i:-	2	2.27	阿贡纳沙门菌	1	1.14
韦太夫雷登沙门菌	2	2.27	阿木提夫沙门菌	1	1.14
印第安纳沙门菌	2	2.27	阿西纳沙门菌	1	1.14
布伦登卢普沙门菌	2	2.27	格罗斯出浦沙门菌	1	1.14
新加坡沙门菌	2	2.27	哈达尔沙门菌	1	1.14
维尔肖沙门菌	2	2.27	卡斯特卢普沙门菌	1	1.14
罗森沙门菌	1	1.14	科特布斯沙门菌	1	1.14
伦敦沙门菌	1	1.14			

坦利沙门菌分出11个PFGE型、14株鼠伤寒沙门菌分出14个PFGE型、6株德尔卑沙门菌分出5个PFGE型;对菌株间的相似性进行比较发现:ESS12177及ESS12185为同一PFGE图谱,13ESS0655、ESS12759和ESS12764为同一PFGE图谱,均为肠炎沙门菌,其中ESS12177及ESS12185分离自一起食物中毒的患者;13ESS0655、ESS12759

和ESS12764分离自不同年份及不同的地方的婴幼儿,提示肠炎沙门菌在不同地区的高度散发的可能,其他菌株的相似值在51.2%~96.8%之间,肠炎沙门菌的PFGE结果见图1,鸡的肠炎沙门菌菌株与患者的肠炎沙门菌菌株相似值为84.7%,鸡的德尔卑沙门菌菌株与患者的德尔卑沙门菌菌株相似值为77.5%,暂未发现关联。

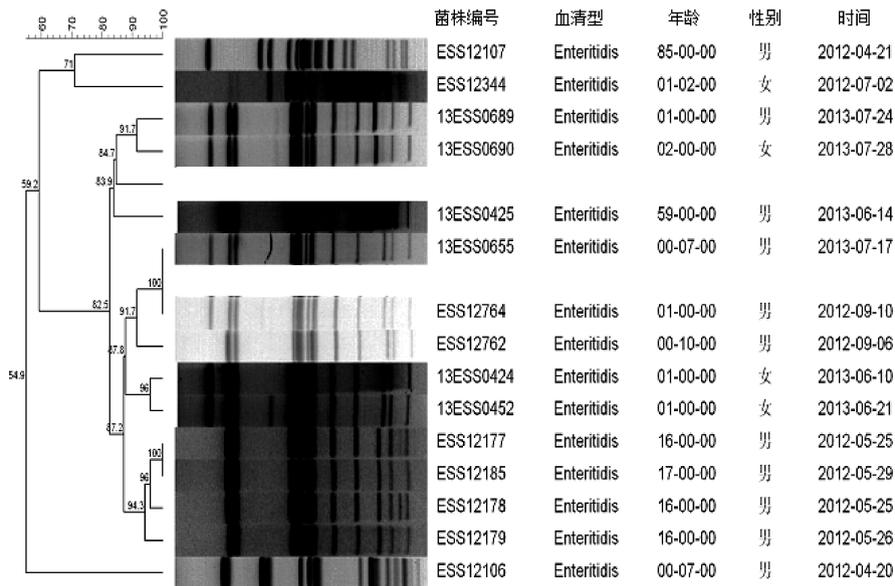


图1 肠炎沙门菌的聚类分析图

Figure 1 Diagram of clustering analysis of the common *Salmonella enteritidis*

2.1.5 药物试验结果

受检88株非伤寒沙门菌的耐药率均 $<50.0\%$,不同血清型的沙门菌耐药情况不同,肠炎沙门菌耐药率超过50%的有两种,其余均 $<50\%$;斯坦利沙门菌对12种药物的耐药率均 $<30\%$;鼠伤寒沙门菌对6种药物的耐药率 $>50\%$;德尔卑沙门菌除5种药物 $<30\%$ 外,其余均 $>50\%$ 以上,见表3。

2.2 鸡源沙门菌的检出情况

2.2.1 检出情况

从440只鸡肛门拭子中分离出5株沙门菌,检

出率只有1.14%。

2.2.2 血清分型

共分4个血清型,其中姆班达卡沙门菌2株,占40%;肠炎沙门菌、德尔卑沙门菌、阿贡纳沙门菌各1株,各占20%。

2.2.3 药敏结果

耐药率:磺胺甲二唑为100%,四环素为60%,萘啶酸和链霉素为40%,氨苄西林、氯霉素、甲氧苄啶均为20%,喹诺酮类、头孢类及庆大霉素为0。

表3 常见非伤寒沙门菌血清型对抗菌药物的耐药率

Table 3 Resistance rate of the common serotype of non-typhoidal *Salmonella*

抗菌药物名称	肠炎沙门菌 n=21		斯坦利沙门菌 n=15		鼠伤寒沙门菌 n=14		德尔卑沙门菌 n=9		全部 n=88	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
氨苄西林	61.9	33.3	2.7	60.0	57.1	42.9	22.2	66.7	46.6	46.6
头孢他啶	14.3	85.7	0.0	100.0	7.1	92.9	0.0	100.0	5.7	93.2
环丙沙星	0.0	90.5	0.0	100.0	14.3	57.1	22.2	33.3	9.1	79.5
氯霉素	0.0	100.0	0.0	93.3	35.7	57.1	88.9	0.0	21.6	75.0
头孢噻肟	23.8	71.4	0.0	86.7	7.1	92.9	0.0	88.9	9.1	85.2
头孢吡肟	19.0	71.4	0.0	100.0	7.1	92.9	0.0	100.0	8.0	89.8
萘啶酸	66.7	33.3	6.7	93.3	50.0	50.0	66.7	33.3	39.8	55.7
磺胺甲二唑	47.6	47.6	13.3	86.7	57.1	42.9	100.0	0.0	48.9	50.0
链霉素	23.8	76.2	13.3	60.0	64.3	21.4	100.0	0.0	44.3	42.0
四环素	23.8	61.9	20.0	46.7	57.1	14.3	77.8	0.0	40.9	36.4
甲氧苄啶	23.4	71.4	26.7	53.3	54.1	42.9	66.7	11.1	38.6	50.0

注:n:菌株数/株;R:耐药率/%;S:敏感率/%

2.2.4 PFGE 结果

两株姆班达卡沙门菌的相似值为 92.3%,其他

均在 58.3% ~ 74.1% 之间,对菌株间的相似性进行比较,显示未发现关联,见图 2。



图2 鸡源沙门菌的聚类分析图

Figure 2 Diagram of clustering analysis of the *Salmonella* isolated from chicken

3 讨论

食物传播是人类感染沙门菌的主要途径,肉类(尤其是畜禽肉)等很多食品都与沙门菌疾病有关。本研究腹泻患者粪便样品沙门菌分离率为 8.35%,高于广东省 2010 年的 3.58%^[4]、上海的 3.13%^[5]、北京的 3.59%^[6] 的非伤寒沙门菌的分离率。从菌株来源的人群年龄分布构成比可知,婴儿感染沙门菌的构成比明显高于成人,与广东省 2010 年的报导^[4] 相似。鸡是人类常食用的家禽之一,本研究从 440 份活鸡肛拭子中分离出沙门菌 5 株,分离率比广东省禽畜产品报导的 20.1%^[7] 低,比 2010 年河南、江苏、四川和山东四省选择 5 家规模化养殖场和 14 家屠宰加工厂活鸡酮体检出的 6.7%^[8] 低。分析此研究结果,认为可能的原因有三:一是与鸡饲料中含有抗菌素抑制沙门菌生长有关;二是说明活鸡本身带菌率并不高,在做成肉类产品时人为污染造成;三是鸡的带菌率也有地方差异。确切原因仍值得探讨。本研究腹泻患者非伤寒沙门菌血清型分为 25 种,这说明感染非伤寒沙门菌的血清型具有多样性。25 种血清型中绝大多数为常见的 A ~ F 群沙门菌,以肠炎沙门菌为主,占比为 23.86%,分别高于 2007 年、2010 年广东省的

23.39%^[9] 和 10.96%^[4]、上海的 22.45%^[5],低于北京的 45.19%^[6],其次为斯坦利沙门菌、鼠伤寒沙门菌及德尔卑沙门菌;从 2008—2009 两年的暴发监测来看,10 起食物中毒暴发事件中有 7 起是由肠炎沙门菌或鼠伤寒沙门菌引起的。提示广东省引起感染性腹泻的沙门菌中肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌是最主要和最常见的 2 种血清型,这与亚洲、欧洲、拉丁美洲地区沙门菌流行的优势血清型数据是一致的^[9]。

本研究中沙门菌对 12 种抗菌药物的耐药率在 50% 以下,6 种抗生素的耐药率低于 30%,故临床对这些药物可以经验性用药。不同的血清型耐药率各不相同,耐药比较严重的为德尔卑沙门菌,对喹诺酮类耐药率为 4 种血清型的最高,达 22.2%,对氨基糖苷类、磺胺类、链霉素的耐药率高达 100%;鼠伤寒沙门菌的耐药现象也很严重,有 6 种药物的耐药率 > 50%;斯坦利沙门菌虽分离率排位第二,但耐药现象不严重,对 12 种药物的耐药率均 < 30%;本研究显示东莞分离的沙门菌耐药率比 2010 年广东省的报导低^[4]。但值得注意的是,因氨苄西林耐药率高达 46.6%,在治疗婴幼儿感染沙门菌时可根据药敏结果指导临床用药,不能凭经验用药,否则医生可选择的药物更少了。

采用 *Xba* I 酶切,本研究对常见的非伤寒沙门菌进行 PFGE 分型,除发现相似值在 100% 的两个 PFGE 型均为肠炎沙门菌外,其余菌株的相似值在 53.9% ~ 96.8% 之间,关联性不大。与广东省 2010 年的报导^[4]提示鼠伤寒沙门菌在不同地区的婴儿中高度散发不同,本资料提示肠炎沙门菌在不同地区的婴儿高度散发的可能,提示菌群感染有所变迁。

对病人分离株与鸡源分离株进行 PFGE 分型结果显示,暂时未发现关联,但鸡的分离菌 4 个血清型中有 3 个是腹泻患者常见的,说明鸡是感染源。尤其姆班达卡沙门菌占了 40%,而从 2007 年到今年^[4,7,9-10]广东省未从腹泻患者中分离出该菌,查阅北京^[6]、上海^[5]以及河南、江苏、四川、山东四省^[8]均未见报导该菌的检出,该血清型今后会不会在人类中传播,值得关注。

非伤寒沙门菌存在于人的肠道,也存在家禽的肠道,不仅能够通过食物链、人与禽畜接触或环境散播,还能在人与人,或人与禽畜之间进行传递,引发非伤寒沙门菌导致的疾病暴发流行,给食品性动物产品的生产、沙门菌病患者的临床治疗及公共卫生安全造成了极大的危害,同时对全球人类健康的影响也是一个巨大的潜在威胁。我们除了要关注患者的非伤寒沙门菌的检出及耐药性,也要关注家禽的带菌情况及与人类的关联性,及时采取预防措施,减少食品安全事件发生。

(志谢 感谢广东省疾病预防控制中心营养与食品安全所邓小玲副所长、微生物研究所柯碧霞、何冬梅的大力帮助)

参考文献

- [1] 张小兵,张丽,张丽华,等. 5 538 株肠杆菌科细菌感染分布及其耐药性[J]. 中国感染控制杂志,2013,12(5):377-380.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty informational supplement[S]. 2010.
- [3] Rihot E M, Fair M A, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet [J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3(1):59-67.
- [4] 何冬梅,柯碧霞,邓小玲,等. 2010 年广东省沙门菌监测及其病原学特征分析[J]. 中华预防医学杂志,2012,46(5):424-429.
- [5] 顾宝柯,袁政安,金汇明,等. 上海市沙门菌病流行特征分析[J]. 环境与职业医学,2008,25(3):245-251.
- [6] 何战英,窦相峰,刘桂荣,等. 北京市 2008—2009 年沙门菌感染性腹泻现状研究[J]. 中华流行病学杂志,2010,31(12):1438-1439.
- [7] 柯碧霞,邓小玲,张丽华,等. 广东省 2007 年度非伤寒沙门菌监测及病原学特征分析[J]. 中华流行病学杂志,2008,29(12):1199-1203.
- [8] 李薇薇,白莉,张秀丽,等. 中国四省肉鸡生产加工环节沙门菌的污染及耐药谱分布状况[J]. 中华预防医学杂志,2013,47(5):435-438.
- [9] 柯碧霞,邓小玲,李柏生,等. 广东省 2008—2009 年沙门菌监测[J]. 中华流行病学杂志,2011,32(8):789-792.
- [10] 杨小鹏,吴清平,张菊梅,等. 广东部分零售畜禽产品沙门菌生化型和血清型分析[J]. 卫生研究,2013,42(4):615-618.

风险监测

福建省地产茶叶中稀土元素残留状况的研究

骆和东¹,王文伟¹,王婷婷²,洪华荣¹,周娜¹

(1. 厦门市疾病预防控制中心,福建 厦门 361021; 2. 福建医科大学公共卫生学院,福建 福州 350004)

摘要:目的 了解福建省地产茶叶中稀土元素的残留状况,为减少稀土污染,科学制定茶叶稀土限量标准提供依据。方法 2011—2012 年在福建省主要产茶地区的产地和市场随机抽取 9 个茶叶品种共 145 份样品,采用微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定样品中 15 种稀土元素含量。结果 9 个品种 145 份样品的稀土氧化物总量在 0.405 ~ 20.74 mg/kg,平均值 2.988 mg/kg,中位数 1.857 mg/kg,合格率为 53.8%。各主要茶产区茶叶的稀土残留量:闽南地区 > 闽北地区 > 闽东地区。茶叶中的稀土残留与土壤和肥料中的稀土含量密切相关。结论 福建省地产茶叶中稀土超标情况不容乐观,应引起重视,加强监管,国家现行的茶叶中稀土元素的限量标准 GB 2762—2012《食品中污染的限量》值得商榷。

关键词:茶叶; 稀土元素; 电感耦合等离子体质谱; 污染物; 限量; 食品安全标准

中图分类号:R155.5; TS201.6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0609-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.023

收稿日期:2014-05-28

基金项目:福建省卫生厅青年科研课题(2009-2-87)

作者简介:骆和东 男 主任技师 研究方向为食品安全 E-mail:luohedong@126.com