

调查研究

四川省鸭和猪源鼠伤寒沙门菌脉冲场凝胶电泳分型与耐药比较分析

雷高鹏,黄玉兰,吕虹,黄伟峰,杨小蓉

(四川省疾病预防控制中心,四川 成都 610041)

摘要:目的 比较研究四川省鸭和猪源鼠伤寒沙门菌脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分型与耐药特征,为分析鼠伤寒沙门菌食品来源提供支持。方法 将鸭和猪源监测中分离的47株鼠伤寒沙门菌进行PFGE分型,并采用最小抑菌浓度法测定9种药物敏感性。结果 鸭和猪源中分离的鼠伤寒沙门菌在PFGE分型和耐药上存在差异。鸭源菌株聚集于簇I,而猪源菌株聚集于簇II。簇II菌株对氨苄西林、环丙沙星、氯霉素、庆大霉素、四环素、复方新诺明6种药物的耐药率高于簇I菌株。不同的PFGE分型鼠伤寒沙门菌在监测地区和耐药谱存在差异。SCSTm-10型菌株均分离于绵阳地区,SCSTm-11型主要分离于资阳地区。SCSTm-10型菌株对复方新诺明和环丙沙星的耐药率高于SCSTm-11型菌株。结论 PFGE分型可以获取四川省鼠伤寒沙门菌分离来源、分离地点和耐药的聚类信息,为鼠伤寒沙门菌食物中毒提供流行病学调查支持。

关键词:鼠伤寒沙门菌;脉冲场凝胶电泳分型;细菌耐药;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)05-0441-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.05.008

Comparative analysis of antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis typing of *Salmonella* Typhimurium isolated from duck and swine in Sichuan Province

LEI Gaopeng, HUANG Yulan, LYU Hong, HUANG Weifeng, YANG Xiaorong

(Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To study the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) type and antimicrobial resistance of *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) isolated from duck and swine, so as to provide support for source-tracking of *S. Typhimurium* strains in Sichuan Province. **Methods** A Total of 47 *S. Typhimurium* strains isolated from pigs and ducks were analyzed by PFGE and tested for antimicrobial resistance for 9 antibiotics by minimal inhibitory concentration (MIC) method. **Results** *S. Typhimurium* strains isolated from pigs and ducks differed in PFGE type and antimicrobial resistance. The strains isolated from ducks were clustered in cluster I and the pig source strains clustered in cluster II. The resistance rate of strains from pigs to the 6 kinds of antibiotics including ampicillin, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamycin, tetracycline and sulfamethoxazole compound trimethoprim were significantly higher than that of strains from ducks. *S. Typhimurium* with different PFGE types were different in the isolation areas and antimicrobial resistance. SCSTm-10 strains were located in MY region, and SCSTm-11 were mainly isolated in ZY region. The resistant rates of SCSTm-10 on sulfamethoxazole/trimethoprim and ciprofloxacin were higher than SCSTm-11. **Conclusion** PFGE typing could obtain the clustering information of isolated source, isolation location and antimicrobial resistance of *S. Typhimurium* in Sichuan Province, and provide support for the epidemiological investigation of *S. Typhimurium* infections.

Key words: *Salmonella* Typhimurium; pulsed field gel electrophoresis typing; antimicrobial resistance; foodborne pathogens

沙门菌是人及动物的重要肠道致病菌之一。

畜禽感染沙门菌后可引起多种病症甚至死亡,给禽畜养殖产生严重经济损失。沙门菌污染的肉蛋类产品是导致人群沙门菌食物中毒的主要食品,鼠伤寒沙门菌(*S. Typhimurium*)是引起食源性暴发最常见的沙门菌血清型之一^[1]。根据美国疾病预防控制中心估计,在美国确诊的细菌性食源性暴发事件中,沙门菌引起的暴发次数最多。在沙门菌相关的

收稿日期:2019-09-10

基金项目:四川省卫生和计划生育科研课题(16PJ395)

作者简介:雷高鹏 男 副主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail: lionleonleo@126.com

通信作者:杨小蓉 女 主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail: yangyangxr@163.com

暴发事件中,13.7%的污染食品为猪肉类、禽肉类和蛋类,1.3%的沙门菌血清型为鼠伤寒沙门菌^[2]。在我国,鼠伤寒沙门菌是食品污染的常见血清型,在多地区、多种食品 and 不同流通环节中均有检出^[1,3-4]。四川省的养殖和屠宰环节监测中,鼠伤寒沙门菌在不同样品中均有较高检出率。本研究通过对鼠伤寒沙门菌进行脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)和药物敏感性试验,以确定不同动物来源鼠伤寒沙门菌在基因型别及抗生素耐药上的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

47株鼠伤寒沙门菌为2011—2012年四川省动物沙门菌监测所得。所有菌株均经过生化鉴定为沙门菌,且经血清型分型为鼠伤寒沙门菌。分离于鸭或鸭蛋的菌株为13株,分离于猪源的菌株为34株,菌株信息具体见表1。PFGE用标准菌株沙门菌(H9812),革兰阴性菌药敏质控菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)为本实验室保存。

表1 鼠伤寒沙门菌基本信息

Table 1 Information of *S. Typhimurium*

分离来源	监测地区	采样年份	菌株数	合计
鸭	成都(CD)	2011,2012	9	13
	广元(GY)	2011,2012	2	
	内江(NJ)	2011,2012	2	
猪	绵阳(MY)	2011	16	34
	资阳(ZY)	2011	15	
	自贡(ZG)	2011	3	

1.1.2 主要仪器与试剂

CHEF MAPPER型PFGE仪、Gel DocXR+型凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad, VITEK 2 Compact全自动细菌鉴定分析系统(法国梅里埃)。

沙门菌属诊断血清(丹麦SSI)、革兰阴性药敏检测板(上海星佰生物技术有限公司)、*Xba* I限制性内切酶(美国NEB)、蛋白酶K(美国Amresco)、SeaKem Gold琼脂糖(美国Lonza)、GelRed(美国Biotium)。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感性检测

使用最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)法检测菌株的药物敏感性。试验及判定依据美国临床和实验室标准协会(CLSI)发布的药物敏感试验标准^[5]。用革兰阴性药敏检测板对氨苄西林(ampicillin, AMP)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、头孢西丁(cefotixin, CFX)、头孢噻肟(cefot-

axime, CTX)、庆大霉素(gentamicin, GEN)、萘啶酸(nalidixic acid, NAL)、复方新诺明(sulfamethoxazole/trimethoprim, SXT)、四环素(tetracycline, TET)共9种药物进行MIC值测定。

1.2.2 PFGE

依据美国疾病预防控制中心PulseNet的PFGE试验方法^[6],以H9812/*Xba* I为参考Marker。以限制性内切酶*Xba* I消化基因组DNA后经Cheff Mapper PFGE仪电泳、染色,并用Gel Doc2000进行图谱成像获得原始图像。运用BioNumerics v7.6软件进行处理和聚类分析,相似度系数设置为Dice,容许度设置1.5%,采用非加权平均(UPGMA)法进行聚类分析并且绘制树状图。

1.3 统计学分析

使用Fisher精确检验分析不同源菌株间的耐药差异,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物敏感性分析

47株鼠伤寒沙门菌对9种抗生素的耐药率见表2,除对两种头孢类抗生素(CFT和CTX)未检测到耐药,其他7种抗生素均存在不同程度的耐药。不同来源鼠伤寒沙门菌耐药存在差异。鸭源菌株对抗生素较敏感,13株中均为非多重耐药菌株。31株多重耐药菌均为猪源菌株,其中30株耐受五类以上抗生素。猪源菌株对AMP、CIP、CHL、GEN、TET、SXT 6种抗生素的耐药率高于鸭源菌株,差异具有统计学意义($F = 143.32, P < 0.01$)。

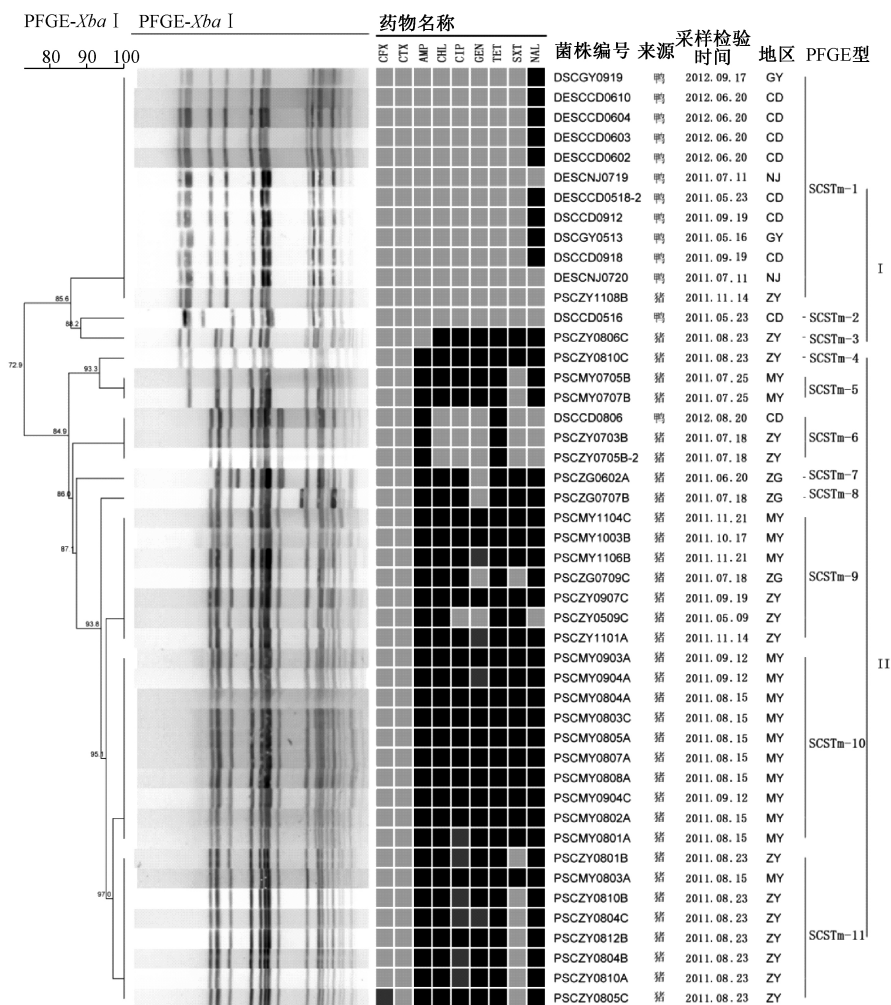
表2 不同分离来源菌株抗生素耐药差异分布

Table 2 Distribution of antimicrobial resistance in different isolated source of *S. Typhimurium*

药物	鸭源耐药率/%	猪源耐药率/%	合计	P值
SXT	0.0 (0/13)	61.8 (21/34)	44.7 (21/47)	<0.01
GEN	0.0 (0/13)	67.6 (23/34)	48.9 (23/47)	<0.01
CIP	0.0 (0/13)	70.6 (24/34)	51.1 (24/47)	<0.01
CHL	0.0 (0/13)	91.2 (31/34)	66.0 (31/47)	<0.01
AMP	7.7 (1/13)	94.1 (32/34)	70.2 (33/47)	<0.01
TET	7.7 (1/13)	97.1 (33/34)	72.3 (34/47)	<0.01
NAL	69.2 (9/13)	88.2 (30/34)	83.0 (39/47)	0.19

2.2 PFGE分型分析

通过PFGE分型47株共获得2个簇及11个PFGE分型,分别为SCSTm-1~SCSTm-11型,各型间相似度在70.0%以上(图1)。2个优势簇的分离来源差异有统计学意义($P < 0.01$)。簇I的14株菌中12株为鸭源菌株,优势带型为SCSTm-1。簇II的33株菌中有32株为猪源菌株,优势带型有SCSTm-9、SCSTm-10和SCSTm-11。三个优势带型间差异较小,三者间的差异条带数不超过三条。



注:黑色为耐药;深灰为中介;浅灰为敏感

图1 鼠伤寒沙门菌分离株 PFGE 聚类分析及耐药信息

Figure 1 PFGE analysis and antimicrobial resistance of *S. Typhimurium*

SCSTm-1 和 SCSTm-6 型既有鸭源菌株又有猪源菌株。

不同 PFGE 分型的鼠伤寒沙门菌在分离地区和耐药上差异明显。与分离来源相应的,簇 II 菌株对 6 种药物 (AMP、GEN、CHL、SXT、TET、CIP) 的耐药率高于簇 I 菌株,差异有统计学意义 ($F=105.74, P<0.01$), 见图 1。SCSTm-9 型菌株在分离地区和耐药谱上较为多样。除 SCSTm-9 型外,存在聚集的其他 PFGE 分型内的菌株有着类似的耐药谱。SCSTm-1 型大多仅对 NAL 耐药,在多个地区均有分离。SCSTm-6 型对 TET 和 AMP 耐药,分离于 CD 和 ZY 地区。SCSTm-5 和 SCSTm-10 型均分离于 MY 地区,SCSTm-10 型菌株仅对两种头孢 (CFX 和 CTX) 敏感,SCSTm-5 型菌株除对两种头孢类抗生素敏感外还对 SXT 敏感。8 株 SCSTm-11 型菌株,除 1 株对 CFX 中介外,其余均对 CTX 敏感,5 株对 CIP 为中介,分离于 ZY 地区的 7 株还对 SXT 敏感。

3 讨论

鼠伤寒沙门菌分子亚型分布和宿主有密切的关系。鼠伤寒沙门菌虽然在各种样品中均有分布^[3,7],通过对鼠伤寒沙门菌分子分型分析发现不同宿主的鼠伤寒沙门菌分子亚型存在差异。猪、牛、鸡中分离的鼠伤寒沙门菌分子型别多样,且存在共同的分子亚型。鸭中分离的鼠伤寒沙门菌与其他宿主来源的菌株不同,具有特异分子亚型^[8]。本研究中簇 II 菌株的猪源菌株具有三个优势 PFGE 分型,但型间差异不超过三条带。根据 Tenover 原则三型别间有较高的亲缘关系^[9]。簇 I 菌株中鸭源菌株只存在单一的优势型别 SCSTm-1。食品销售环节中,鸭源相关菌株的优势型为 SCSTm-1,但猪源相关菌株则未检测到相应优势型^[4]。不同分子亚型的鼠伤寒沙门菌的耐药性差异明显。沙门菌耐药性的差异不但表现出与宿主和血清型的相关性^[3-4],而且同一血清型不同分子亚型间的耐药谱

也不相同。鼠伤寒沙门菌研究中,PFGE分型可以将具有相似耐药谱的菌株聚集在一起^[10-11]。本研究中SCSTm-1型为敏感型菌株。SCSTm-9、SCSTm-10和SCSTm-11型为多重耐药菌株,且95%以上的菌株耐受5种以上药物。SCSTm-10和SCSTm-11型菌株耐药谱一致性也较高,仅有1~2种药物的差异。沙门菌耐药与整合子沙门菌基因岛1(SGI1)整合子密切相关。SGI1整合子常带有6类药物(青霉素类、氨基糖苷类、氯霉素类、叶酸途径阻断类、四环素类、喹诺酮类)中多种抗性基因^[12]。因而,不同沙门菌在这6类药物上常表现出差异^[13-14]。在鼠伤寒沙门菌中,不同分子亚型菌株在这6类药物中也存在明显差异^[10-11]。本研究中簇II菌株可能由于携带SGI1导致这6类药物的耐药率高于簇I菌株。

食品中分离的鼠伤寒沙门菌同当地人群中分离的菌株会有相似的分子亚型^[10]。簇I菌株中SCSTm-1型在三个鸭监测地区和不同监测时间均有分离,在四川省腹泻患者中相应检测到优势型别SCSTm-1,表明该型别为四川省广泛分布的分子亚型,并形成了一定的疾病负担^[15-16]。簇II菌株中PFGE型别菌株在分离地点和时间上存在聚集。SCSTm-5和SCSTm-10型的菌株分离于MY地区,而SCSTm-11型则主要分离于ZY地区。各型别内菌株间分离时间相近、耐药谱相似、耐药性高,表明这些型别在各自监测点内存在交叉传播,或由于药物等原因形成区域性的耐药克隆群。簇II菌株存在多个相似的PFGE分型,表明该簇菌株为适应不同环境形成了不同的PFGE分型,难以形成稳定单一优势型别,导致在人群中虽能检测到类似菌株但难以形成聚集。

肉类中沙门菌污染是腹泻患者感染的重要来源,而鼠伤寒沙门菌是四川省沙门菌食物中毒的主要血清型。本研究通过比较分析鸭和猪源中分离的鼠伤寒沙门菌宿主来源、分离地区、监测时间、耐药性与PFGE型别间的相关性,揭示了鼠伤寒沙门菌在四川省的分布状况,为鼠伤寒沙门菌食物中毒溯源提供了参考数据。

参考文献

[1] 张濛,李艳芬,戚浩斌,等.2015—2016年河南省食源性疾病沙门氏菌监测情况分析[J].中国人兽共患病学报,2017,33(8):748-752. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2017.08.017.

[2] DANIEL D M, KARUNYA M, HALL A J, et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 2009-2015 [J]. MMWR Surveill Summ, 2018, 67(10):1-11. DOI:10.15585/mmwr.ss6710a1.

[3] 李月华,赵建梅,张青青,等.我国部分地区鸡、猪源沙门氏菌血清型与耐药性比较[J].中国动物检疫,2018,35(6):30-36. DOI:10.3969/j.issn.1005-944X.2018.06.009.

[4] 刘玥,顾其芳,刘诚,等.2016年上海市市售肉制品中沙门菌耐药谱与分型研究[J].中国食品卫生杂志,2018,30(2):132-138. DOI:10.13590/j.cjfh.2018.02.002.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S27[S]. USA:CLSI,2017.

[6] Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei*, and *Shigella flexneri* [S]. USA: PulseNet,2013.

[7] JACKSON B R, GRIFFIN P M, COLE D, et al. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998-2008[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(8):1239-1244. DOI: 10.3201/eid1908.121511.

[8] BRANCHU P, BAWN M, KINGSLEY R A. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants[J]. Infect Immun, 2018, 86(8):e00079-18. DOI: 10.1128/IAI.00079-18.

[9] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9):2233-2239. DOI: 10.1002/jetb.280640116.

[10] COOKE F J, WAIN J, FOOKES M, et al. Prophage sequences defining hot spots of genome variation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can be used to discriminate between field isolates[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8):2590-2598. DOI: 10.1128/JCM.00729-07.

[11] LI K, YE S, ALALI W Q, et al. Antimicrobial susceptibility, virulence gene and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium recovered from retail raw chickens, China[J]. Food Control, 2017, 72(2):36-42. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.07.032.

[12] DOUBLET B, BOYD D, MULVEY M R, et al. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element[J]. Mol Microbiol, 2010, 55(6):1911-1924. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04520.x.

[13] 宋雪,赵格,刘文化,等.不同来源沙门氏菌的毒力基因检测与耐药性分析[J].中国动物检疫,2017,34(5):40-46. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2017.05.011.

[14] 彭峻峰,曾杭,吴思凡,等.成都地区鸭源沙门氏菌的分离鉴定及其耐药特征、毒力基因分析[J].中国人兽共患病学报,2018,34(3):217-223. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.037.

[15] 张玲,刘祥,陈曦,等.自贡市2007—2010年鼠伤寒沙门菌感染的脉冲场凝胶电泳分析[J].实用预防医学,2018,25(1):82-84. DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.01.023.

[16] 王梓璇,王小龙,蔡媛媛,等.2017年四川省内江市鼠伤寒沙门菌监测与分子分型研究[J].疾病监测,2018,33(5):397-401. DOI:10.3784/j.issn.1003-9961.2018.05.011.