

## 研究报告

## 2015—2022年河南省食品和临床鼠伤寒沙门菌及单相鼠伤寒沙门菌的耐药特征比较分析

吴玲玲, 邱正勇, 李永利, 廖兴广, 韩志伟, 张秀丽  
(河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州 450016)

**摘要:**目的 了解2015—2022年河南省临床和食品来源的鼠伤寒沙门菌和单相鼠伤寒沙门菌的流行情况和耐药特征。方法 对2015—2022年河南省食品和临床分离的399株鼠伤寒沙门菌疑似菌株进行血清复核和药敏实验,采用血清凝集法和多重荧光PCR方法进行血清分型,采用微量肉汤稀释法进行抗生素药物的敏感试验,耐药性比较采用 $\chi^2$ 检验。结果 399株鼠伤寒沙门菌疑似菌株中包含单相鼠伤寒沙门菌225株(56.39%),鼠伤寒沙门菌174株。两种沙门菌对氨苄西林、氯霉素和四环素的耐药率较高,均达到50%以上。2017年开始出现对亚胺培南和甲氧苄啉/磺胺甲噁唑的耐药菌株,单相鼠伤寒沙门菌对氨苄西林和庆大霉素的耐药率高于鼠伤寒沙门菌,差异有显著性( $P<0.05$ )。鼠伤寒沙门菌对头孢唑啉的耐药率高于单相鼠伤寒沙门菌,差异有显著性( $P<0.05$ ),两种沙门菌对3类及以上抗生素耐药率达到60%以上,共同多重优势耐药谱为耐氨苄西林-氯霉素-甲氧苄啉/磺胺甲噁唑-四环素。结论 单相鼠伤寒沙门菌检出率略高于鼠伤寒沙门菌,成为河南省鼠伤寒沙门菌临床分离株的优势血清型,两种沙门菌均普遍耐药且多重耐药现象严重,应加强监测单相鼠伤寒沙门菌的耐药情况和食品来源鼠伤寒沙门菌的检出情况,防止菌株进一步扩散。

**关键词:**鼠伤寒沙门菌;单相鼠伤寒沙门菌;多重荧光PCR;耐药性;多重耐药;河南

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)06-0646-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.06.002

**Comparative analysis of antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and its monophasic variant in food and clinical patients in He'nan Province from 2015 to 2022**

WU Lingling, QIU Zhengyong, LI Yongli, LIAO Xingguang, HAN Zhiwei, ZHANG Xiuli

(He'nan Provincial Center for Disease Control and Prevention, He'nan Zhengzhou 450016, China)

**Abstract: Objective** To study the prevalence and antimicrobial resistance characteristics of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*) and monophasic *S. typhimurium* from clinical patients and food in Henan Province from 2015 to 2022. **Methods** Three hundred and ninety-nine strains of *Salmonella* from food and clinical patients in Henan Province were serotyped according to the Kauffmann White scheme by slide agglutination and multiplex real-time PCR method. Microbroth dilution method was used to test antimicrobial resistance of *S. typhimurium*. Statistical analysis was carried out using Chi-square test. **Results** Three hundred and ninety-nine strain were composed of two hundred twenty-five monophasic *S. typhimurium* (56.39%) and one hundred seventy-four *S. typhimurium*. The imipenem and trimethoprim/ sulfamethoxazole resistant isolates were found since 2017. The antimicrobial resistance rate of two *Salmonella* strains to ampicillin, chloramphenicol and tetracycline was higher, reaching more than 50%. The antimicrobial resistance rate of monophasic *S. typhimurium* to ampicillin and gentamicin was significantly higher than that of *S. typhimurium* ( $P<0.05$ ). The resistance rate of *S. typhimurium* to cefazolin was significantly higher than that of monophasic *S. typhimurium* ( $P<0.05$ ). Two serotypes of *S. typhimurium* were resistant to over 60% of three classes or more antimicrobial agents. The common multiple dominant antimicrobial resistance spectrum was ampicillin-chloramphenicol-trimethoprim/sulfamethoxazole-tetracycline pattern. **Conclusion** Monophasic *S. typhimurium* had replaced *S. typhimurium* as predominant serotype in clinical patients in Henan Province. Two serotypes of *S.*

收稿日期:2023-08-02

基金项目:河南省医学科技攻关省部共建青年项目(SBGJ202103030);河南省青年人才托举工程(2024HYTP045)

作者简介:吴玲玲 女 副主任技师 研究方向为微生物检验 E-mail:695490715@qq.com

通信作者:张秀丽 女 主任技师 研究方向为食源性致病菌 E-mail:13526803771@163.com

*typhimurium* strains are generally antimicrobial resistant and the multi-antimicrobial resistance patterns serious. In order to make effective interventions and reduce the spread of *S. typhimurium*. The study results suggest that the detection rate of foodborn *S. typhimurium* should be strengthened as well as the antimicrobial resistance of monophasic *S. typhimurium*.

**Key words:** *Salmonella typhimurium*; monophasic *Salmonella typhimurium*; multiplex real-time PCR; antimicrobial resistance; multi-antimicrobial resistance; He'nan

肠道沙门菌(*Salmonella enterica*)是常见的人畜共患病原体,可在全球范围内引起细菌食源性疾病,主要通过污染食物和水等途径感染人及动物,与人类感染性腹泻发病率高度相关,给多个国家及地区造成了严重的疾病负担<sup>[1]</sup>。沙门菌目前已有2 700余种血清型,肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌是常见的可引起食源性疾病的血清型<sup>[2]</sup>,近年来,单相鼠伤寒沙门菌(Monophasic *Salmonella typhimurium*)成为人类临床感染中最常报道的血清型,占报道病例总数的4.7%<sup>[3]</sup>。单相鼠伤寒沙门菌是鼠伤寒沙门菌的单相变体,其抗原形式为1,4,[5],12:i:-,是一种缺乏第Ⅱ相鞭毛抗原(由*fliB*编码)的非典型血清型。在遗传特征上与鼠伤寒沙门菌具有相似的抗原和基因型,因此被认为是由鼠伤寒沙门菌进化而来<sup>[2]</sup>。近年来,单相鼠伤寒沙门菌在食品、动物及临床等途径的检出率急剧攀升,已成为欧美、澳大利亚和亚洲的多个国家沙门菌病中常见的血清型之一,并与多起国际食源性沙门菌病暴发疫情密切相关<sup>[2]</sup>。自2021年12月以来,欧洲多国报道了疑似因食用被ST34型单相鼠伤寒沙门菌污染的巧克力产品引发的聚集性感染病例<sup>[3]</sup>。单相鼠伤寒沙门菌高水平耐药株的出现对人类健康和公共卫生造成了严重的影响<sup>[4-5]</sup>,特别是欧洲出现了一种流行性单相鼠伤寒沙门菌多重耐药(Multiple drug resistance, MDR)克隆谱系,又被称为欧洲克隆,对氨苄西林、链霉素、磺胺类药物和四环素(R型ASSuT)耐药<sup>[6]</sup>,并与几次暴发有关<sup>[7-9]</sup>。西班牙、美国和加拿大的单相鼠伤寒沙门菌分离株,对氨苄西林、氯霉素、链霉素、磺胺类药物和四环素(R型ACSSuT)具有更高的耐药性<sup>[10-12]</sup>。本研究对2015—2022年河南省食品和临床分离的399株鼠伤寒沙门菌进行血清型鉴定确认,采用血清凝集和多重荧光PCR分析的方法区分出单相鼠伤寒沙门菌,同时对所有菌株进行抗生素药物敏感性实验,掌握单相鼠伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌的耐药特征及差异,掌握两种血清型沙门菌在河南省的流行情况,以期临床用药及兽用抗生素的规范使用和管理提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

2015—2022年自河南省腹泻病原监测和食品监测样品中分离鼠伤寒沙门菌399株,其中359株分离自腹泻患者粪便标本,39株分离自食品,1株分离自养殖场外环境。食品分离株主要来源于肉制品,其次是蛋制品、速冻水饺和凉拌菜。大肠杆菌ATCC 25922(购自中国普通微生物菌种保藏管理中心)。

#### 1.1.2 仪器和试剂

沙门菌属诊断血清和沙门菌血清诱导琼脂(丹麦SSI),TaqProbe 2× qPCR-Multiplex 预混液、引物和探针[生工生物工程(上海)股份有限公司],沙门菌抗生素试剂盒(美国Thermo),TSA斜面、营养琼脂和软琼脂(郑州博赛生物技术股份有限公司),均在有效期内使用。Thermo Sensititre™ AIM全自动菌液接种仪、Thermo Sensititre™ Vizion药敏检测仪(美国Thermo),CFX-96荧光PCR仪(美国Bio-Rad)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血清型鉴定

参照考夫曼-怀特-勒密诺(White-Kauffman-Le Minor, WKLM)沙门菌属抗原表确认血清型。血清分型初步确定单相鼠伤寒沙门菌:依次检查菌株的O抗原、H抗原第Ⅱ相和第Ⅰ相。H抗原第Ⅱ相为阴性时,对第Ⅰ相“Hi”进行鞭毛诱导,如果连续2次诱导结果显示第Ⅱ相H抗原为阴性时,确定抗原形式为1,4,[5],12:i:-,即单相鼠伤寒沙门菌疑似菌株。

#### 1.2.2 多重荧光PCR方法鉴定

##### 1.2.2.1 水煮法提取菌株DNA

用接种环刮取血平板上3~5个纯菌落至装有50 μL 无菌水的离心管内,震荡混匀后,于水浴锅100℃温浴10 min,转移至冷却板,于离心机内4℃13 000 r/min离心10 min,上清液即为菌株模板DNA。

##### 1.2.2.2 多重荧光PCR检测

采用表1的引物进行多重荧光PCR检测,引物和TaqMan探针的设计基于鼠伤寒沙门菌*fliB*/*IS200*、*fliC*和*fliB*. 1,2三个特异性靶标基因。*fliB*/*IS200*在沙门菌的鞭毛蛋白基因簇内,位于*fliB*-*fliA*基因区域片段之间,鼠伤寒沙门菌携带一个保守的

*IS200* 插入序列, *fliC* 检测编码 I 相鞭毛的 i 抗原, *fljB. 1, 2* 检测编码 II 相鞭毛的 *fljB. 1, 2* 抗原。荧光 PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 包含 Taq Probe 2 $\times$  qPCR-Multiplex 聚合酶、每个引物 0.4  $\mu$ mol/L、每个探针 0.2  $\mu$ mol/L 和 2  $\mu$ L 模板 DNA。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后为两步循环条件, 即 95  $^{\circ}$ C 变性 20 s 和 60  $^{\circ}$ C 退火 90 s, 总共 30 个循环。设置 FAM(*fliB*/

*IS200*)、CY5(*fliC*)、JOE(*fljB. 1, 2*) 和 ROX(参考染料) 为荧光通道。当 Ct 值  $\leq 30$  时, 反应为阳性。*fliB/IS200*、*fliC* 和 *fljB. 1, 2* 三个基因同时检测阳性为鼠伤寒沙门菌, *fliB/IS200* 和 *fliC* 基因检测阳性且 *fljB. 1, 2* 基因检测阴性, 则为单相鼠伤寒沙门菌, 3 个基因全部检测阴性则鉴定为非鼠伤寒沙门菌。相关引物探针序列见表 1。

表1 鼠伤寒沙门菌多重荧光 PCR 反应引物和探针序列

目的基因	引物名称	序列(5'→3')	参考文献
<i>fliB/IS200</i>	上游引物	gat ctg teg atg att cat ctt ctg ac	PRENDERGAST 等 <sup>[13]</sup>
	上游引物	aac gct tgt ctt cgg tat ttg g	
	探针	FAM-tcg ggt gtg cgc taa gct ctt tt-BHQ1	
<i>fliC</i>	上游引物	ccc cgc tta cag gtg gac tac	O'REGAN 等 <sup>[14]</sup>
	上游引物	agc ggg ttt teg gtg gtt gt	
	探针	CY5-taa age cgc att gac age agc agg tg-BHQ2	
<i>fljB.1,2</i>	上游引物	tgt tac tat tgg tgg ctt tac tgg	MUÑOZ 等 <sup>[15]</sup>
	上游引物	cag cag gca ttg tgg tct tag	
	探针	JOE-cgc cag ccg caa ggg tta ctg tac-BHQ1	

### 1.2.3 抗生素药物敏感试验

采用美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法, 选择 8 类 14 种抗生素进行药敏试验。以

大肠杆菌 ATCC 25922 为药敏试验质控菌株。药物种类、浓度范围及耐药折点见表 2, 参照 CLSI 标准<sup>[16]</sup>进行结果判读, 3 类或 3 类以上抗生素耐药的菌株判定为多重耐药(Multi-drug resistance, MDR)。

表2 鼠伤寒沙门菌药敏试验所用药物种类、浓度范围和耐药折点

Table 2 Drugs, concentration ranges and MIC breakpoints used in the antimicrobial resistance testing of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*

药物类别	药物名称	浓度范围/( $\mu$ g/mL)	MIC 折点/( $\mu$ g/mL)
青霉素类	氨苄西林(Ampicillin, AMP)	2~64	$\geq 32$
	头孢唑啉(Cefazolin, CFZ)	0.5~16	$\geq 8$
头孢菌素类	头孢噻肟(Cefotaxime, CTX)	0.25~8	$\geq 4$
	头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)	0.5~16	$\geq 16$
	头孢西丁(Cefoxitin, CFX)	2~64	$\geq 32$
碳青霉烯类	亚胺培南(Imipenem, IPM)	0.25~8	$\geq 4$
$\beta$ -内酰胺类	氨苄西林-舒巴坦(Ampicillin-sulbactam, AMS)	2/1~64/32	$\geq 32/16$
喹诺酮和氟喹诺酮类	萘啶酸(Nalidixic acid, NAL)	2~64	$\geq 32$
	环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)	0.03~32	$\geq 1$
大环内酯类	阿奇霉素(Azithromycin, AZM)	2~64	$\geq 32$
氨基糖苷类	庆大霉素(Gentamicin, GEN)	1~32	$\geq 16$
四环素类	四环素(Tetracycline, TET)	1~32	$\geq 16$
苯丙醇类	氯霉素(Chloramphenicol, CHL)	2~64	$\geq 32$
叶酸途径拮抗剂	甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(Sulfamethoxazole-trimethoprim, SXT)	0.25/4.75~8/152	$\geq 4/76$

### 1.2.4 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析, 耐药性比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 多重荧光 PCR 方法确证单相鼠伤寒沙门菌

399 株鼠伤寒沙门菌的血清凝集结果显示, 199 株血清凝集结果为 1, 4, [5], 12:i:-, 即单相鼠伤寒沙门菌疑似菌。多重荧光 PCR 鉴定结果显示单相鼠伤寒沙门菌为 225 株, 占比 56.39%(225/399), 剩余 174 株为鼠伤寒沙门菌。36 株血清分型

为 1, 4, [5], 12:i:1, 2 的菌株, 经荧光 PCR 鉴定为单相鼠伤寒沙门菌, 25 株血清分型为 1, 4, [5], 12:i:- 的菌株, 经荧光 PCR 鉴定为鼠伤寒沙门菌, 综合以上, 两种方法检测结果中有 61 株分离株结果不一致, 其余 338 株血清分型结果和多重荧光 PCR 鉴定结果一致。40 株食品及外环境分离株和 359 株临床分离株中单相鼠伤寒沙门菌的检出率分别为 15.00%(6/40)和 61.00%(219/359), 鼠伤寒沙门菌的检出率分别为 85.00%(34/40)和 39.00%(140/359)。

### 2.2 2015—2022 年河南省单相鼠伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌的总体耐药情况

2015—2022 年河南省鼠伤寒沙门菌对氨苄西林

和四环素呈现持续且较高水平的耐药率,自2016年开始对氨苄西林和四环素耐药率持续达到72.97%以上,对亚胺培南和阿奇霉素的耐药率较低。2017年开始出现对亚胺培南和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑的耐

药菌株,耐药率分别为1.52%(1/66)和53.03%(35/66),对氯霉素和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑的耐药也呈明显上升趋势,分别达到了45.95%(17/37)和32.43%(12/37)以上。见表3。

表3 2015—2020年河南省分离的鼠伤寒沙门菌及单相变种的耐药情况/%

Table 3 Antimicrobial resistance of *Salmonella typhimurium* and monophasic *Salmonella typhimurium* isolates in Henan Province from 2015 to 2022/%

时间/年	头孢噻肟	头孢西丁	头孢他啶	头孢唑啉	氨苄西林	氨苄西林/舒巴坦	亚胺培南	环丙沙星	萘啶酸	甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	氯霉素	庆大霉素	四环素	阿奇霉素
2015	0.00	0.00	0.00	0.00	11.11 (1/9)	11.11 (1/9)	0.00	11.11 (1/9)	11.11 (1/9)	0.00	11.11 (1/9)	11.11 (1/9)	11.11 (1/9)	0.00
2016	22.58 (7/31)	12.90 (4/31)	9.68 (3/31)	6.45 (2/31)	74.19 (23/31)	51.61 (16/31)	0.00	45.16 (14/31)	51.61 (16/31)	0.00	48.39 (15/31)	22.58 (7/31)	77.42 (24/31)	12.9 (4/31)
2017	33.33 (22/66)	84.85 (56/66)	16.67 (11/66)	12.12 (8/66)	86.36 (57/66)	45.45 (30/66)	1.52 (1/66)	43.94 (29/66)	43.94 (29/66)	53.03 (35/66)	60.61 (40/66)	12.12 (8/66)	92.42 (61/66)	18.18 (12/66)
2018	27.12 (16/59)	10.17 (6/59)	11.86 (7/59)	50.85 (30/59)	96.61 (57/59)	66.10 (39/59)	0.00	30.51 (18/59)	42.37 (25/59)	62.71 (37/59)	66.10 (39/59)	23.73 (14/59)	96.61 (57/59)	13.56 (8/59)
2019	19.64 (11/56)	3.57 (2/56)	16.07 (9/56)	46.43 (26/56)	82.14 (46/56)	48.21 (27/56)	0.00	26.79 (15/56)	30.36 (17/56)	55.36 (31/56)	64.29 (36/56)	17.86 (10/56)	75.00 (42/56)	8.93 (5/56)
2020	18.92 (7/37)	2.70 (1/37)	10.81 (4/37)	21.62 (8/37)	81.08 (30/37)	35.14 (13/37)	0.00	29.73 (11/37)	48.65 (18/37)	32.43 (12/37)	45.95 (17/37)	16.22 (6/37)	72.97 (27/37)	8.11 (3/37)
2021	47.17 (25/53)	9.43 (5/53)	26.42 (14/53)	52.83 (28/53)	92.45 (49/53)	41.51 (22/53)	3.77 (2/53)	35.85 (19/53)	32.08 (17/53)	50.94 (27/53)	66.04 (35/53)	24.53 (13/53)	86.79 (46/53)	7.55 (4/53)
2022	20.45 (18/88)	6.82 (6/88)	10.20 (9/88)	32.95 (29/88)	88.63 (78/88)	34.09 (30/88)	2.27 (2/88)	21.59 (19/88)	22.72 (20/88)	47.73 (42/88)	60.23 (53/88)	21.60 (19/88)	81.82 (72/88)	9.09 (8/88)

2.3 单相鼠伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌的耐药结果比较

耐药结果显示,两种沙门菌对14种抗生素均有不同程度的耐药现象,225株单相鼠伤寒沙门菌对氨苄西林耐药率最高达到88.00%(198/225),其次是四环素[84.44%(190/225)]和氯霉素[58.67%(132/225)]。鼠伤寒沙门菌对以上3种抗生素也呈现相似的耐药表现,耐药率分别为82.18%(143/174)、

80.46%(140/174)和59.77%(104/174)。单相鼠伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌对亚胺培南的耐药率最低,分别为1.78%(4/225)和0.57%(1/174)。单相鼠伤寒沙门菌对氨苄西林和庆大霉素的耐药率显著高于鼠伤寒沙门菌,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。鼠伤寒沙门菌对头孢唑啉的耐药率显著高于单相鼠伤寒沙门菌,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。其余12种抗生素的耐药率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表4。

表4 鼠伤寒沙门菌及单相变种的耐药实验结果比较[n(%)]

Table 4 Comparison of antimicrobial resistance between *Salmonella typhimurium* and monophasic *S. typhimurium* [n(%)]

抗生素种类	抗生素名称	鼠伤寒沙门菌(n=174)		单相鼠伤寒沙门菌(n=225)		$\chi^2$ 值	P值
		耐药菌株数	耐药率(%)	耐药菌株数	耐药率(%)		
β-内酰胺类	头孢噻肟	45	25.86	61	27.11	46.23	0.088
	头孢西丁	14	8.05	14	6.22	12.21	0.121
	头孢他啶	24	13.79	33	14.67	24.86	0.112
	头孢唑啉	71	40.81	60	26.67	57.13	0.001
	氨苄西林	143	82.18	198	88.00	25.29	0.030
	氨苄西林/舒巴坦	77	44.25	101	44.89	77.62	0.080
碳青霉烯类	亚胺培南	1	0.57	4	1.78	2.18	0.220
喹诺酮类	环丙沙星	53	30.46	73	32.44	54.95	0.079
	萘啶酸	65	37.36	78	34.67	62.36	0.072
磺胺类	甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	84	48.28	101	44.89	80.68	0.064
氯霉素类	氯霉素	104	59.77	132	58.67	71.08	0.080
氨基糖苷类	庆大霉素	33	18.97	55	24.44	38.38	0.042
四环素类	四环素	140	80.46	190	84.44	30.09	0.061
大环内酯类	阿奇霉素	19	10.92	25	11.11	19.19	0.128

2.4 单相鼠伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌多重耐药情况的比较分析

单相鼠伤寒沙门菌中对3类及以上抗生素耐

药的多重耐药菌株占比68.00%,鼠伤寒沙门菌的多重耐药菌株占比74.14%。单相鼠伤寒沙门菌耐两种抗生素的菌株数量高于鼠伤寒沙门菌,鼠伤寒

沙门菌耐5种抗生素的菌株数量高于单相鼠伤寒沙门菌,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。其余耐药数比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表5。

表5 鼠伤寒沙门菌及单相变种多重耐药比较[n(%)]

耐药数	鼠伤寒沙门菌 (n=174)		单相鼠伤寒沙门 菌(n=225)		$\chi^2$ 值	P值 (双侧)
	耐药菌	构成比	耐药菌	构成比		
	株数	(%)	株数	(%)		
0	19	10.92	13	5.78	13.95	0.026
1	8	4.60	9	4.00	7.41	0.187
2	16	9.20	53	23.56	30.09	0.000
3	25	14.37	24	10.67	21.37	0.065
4	23	13.22	31	13.78	23.55	0.116
5	42	24.14	39	17.33	35.32	0.025
6	19	10.92	28	12.44	20.50	0.112
≥7	20	11.49	31	13.78	22.24	0.097

注:对3类及以上抗生素耐药称为多重耐药

## 2.5 单相鼠伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌耐药谱的对比分析

399株鼠伤寒沙门菌的耐药模式高度多样化,共有136种耐药表型,其中225株单相鼠伤寒沙门菌形成88种耐药表型,优势耐药谱为AMP-TET、AMP-CHL-SXT-TET和AMP-AMS-TET,分别占比15.11%(34/225)、5.78%(13/225)和4.00%(9/225)。174株鼠伤寒沙门菌形成81种耐药表型,优势耐药谱为AMP-TET、AMP-CHL-SXT-TET和AMP-NAL-TET,占比6.90%(12/174)、6.90%(12/174)和5.17%(9/174)。见表6。

## 3 讨论

沙门菌是公共卫生领域一种重要的人兽共患病原菌,能够引起腹泻、胃肠炎和败血症等疾病,对公众健康构成了严重的危害。据估计,全球每年约

有9400万例肠胃炎病例,其中大约有155000人死于沙门菌病<sup>[17-18]</sup>。肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌是引起沙门菌病的主要血清型,但近年来,单相鼠伤寒沙门菌因其高检出率和多重耐药性,使得人们逐渐重视其在食品和患者中的分布规律与传播特征<sup>[19-21]</sup>。本实验收集了河南省2015—2022年399株食品和临床来源的鼠伤寒沙门菌株,经血清凝集初步分型和多重荧光PCR方法进一步确证后,明确其中174株为鼠伤寒沙门菌,225株为单相鼠伤寒沙门菌,其中39株食品分离株和359株临床分离株中分别检出6株和219株单相鼠伤寒沙门菌,1株环境分离株来自肉鸡养殖场,为鼠伤寒沙门菌。

不同血清型沙门菌致病性不同,因此沙门菌的血清分型具有重要参考意义,血清凝集法是应用较为广泛的一种传统分型方法<sup>[13]</sup>。近年来单相鼠伤寒沙门菌引起的食源性病例不断增加,国际上由该菌引起的聚集性病例时有报道。依赖传统的血清分型方法鉴定第II相鞭毛抗原丢失的单相鼠伤寒沙门菌的方式存在漏检现象,为了解决这个问题,欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)<sup>[22]</sup>推荐使用TENNANT等<sup>[23]</sup>提出的PCR方法,对鼠伤寒沙门菌*fljB-fljA*基因区间的特异性片段进行扩增,*fljB*基因缺失即鉴定为单相鼠伤寒沙门菌,并以PCR的结果为最终分型结果。本实验血清分型与多重荧光PCR结果的一致率为84.71%,存在误差的原因可能是基因缺失与抗原蛋白表达不完全对应,本实验选用*fljB*为靶标基因,但是第II相鞭毛蛋白的不表达也可能是由于*fljB*基因以外其他区域(如*fljA*、*hin*、*hixL*、*hixR*)的缺失、插入和突变,或者*fljB*基因引物结合位点以外的其他*fljB*区域的缺失和突变引起。下一步应该通过全基因组测序对鞭毛抗原基因缺失的机制进行更深入的分析,以找

表6 鼠伤寒沙门菌及单相变种共同耐药谱比较[n(%)]

耐药谱	鼠伤寒沙门菌(n=174)	单相鼠伤寒沙门菌(n=225)	总计 (n=399)
AMP-TET	12(6.90)	34(15.11)	46(11.53)
AMP-CHL-SXT-TET	9(5.17)	16(7.11)	25(6.27)
AMP-NAL-TET	9(5.17)	1(0.44)	10(2.51)
AMP-CFZ-CHL-SXT-TET	8(4.60)	7(3.11)	15(3.76)
NAL	6(3.45)	2(0.89)	8(2.01)
AMP-CHL-CIP-SXT-TET	4(2.30)	6(2.67)	10(2.51)
AMP-CFZ-NAL-TET	4(2.30)	1(0.44)	5(1.25)
AMP-AMS-CHL-SXT-TET	4(2.30)	4(1.78)	8(2.01)
AMP-AMS-CFZ-CHL-CIP-CTX-NAL-TET	4(2.30)	2(0.89)	6(1.50)
AMP-CHL-TET	3(1.72)	7(3.11)	10(2.51)
AMP-CHL-SXT	3(1.72)	3(1.33)	6(1.50)
AMP-AMS-TET	3(1.72)	9(4.00)	12(3.01)
AMP-AMS-CHL-GEN-SXT-TET	3(1.72)	1(0.44)	4(1.00)
AMP-AMS-CHL-CIP-GEN-NAL-SXT-TET	3(1.72)	6(2.67)	9(2.26)
AMP-AMS-CFZ-CHL-CTX-GEN-SXT-TET	3(1.72)	3(1.33)	6(1.50)

到误差率存在的原因。

药敏结果显示,两种血清型沙门菌对氨苄西林、四环素、氯霉素和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑的耐药率均较高,而对亚胺培南、头孢西丁和阿奇霉素等敏感性高,与我国广东<sup>[1]</sup>、广西<sup>[19]</sup>和上海<sup>[21]</sup>等其他地区研究结果基本一致。以上监测数据均高于美国抗微生物耐药性监测系统(National Antimicrobial Resistance Monitoring System, NARMS)的耐药监测结果<sup>[24]</sup>,提示国内流行株存在高水平耐药现象,这可能与禽畜养殖业和临床抗菌药物的不规范使用相关,临床治疗细菌感染性腹泻的首选药物为头孢菌素类和喹诺酮类药物<sup>[1]</sup>,本文结果显示,两种血清型沙门菌对三代头孢菌素类药物均呈现高水平耐药。单相鼠伤寒沙门菌对氨苄西林和庆大霉素两种抗生素的耐药率显著高于鼠伤寒沙门菌( $P < 0.05$ ),与美国 NARMS 历年的监测结果一致。碳青霉烯类和多黏菌素是临床治疗多重耐药革兰氏阴性菌的最后两类抗生素,本研究发现亚胺培南耐药菌株中,单相鼠伤寒沙门菌多于鼠伤寒沙门菌,亚胺培南的耐药浓度范围值为  $0.25 \sim 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[16]</sup>,本实验亚胺培南耐药株的监测结果均为  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,因此应持续监测其耐药情况变化,防止“超级耐药”菌株的产生。鼠伤寒沙门菌对头孢唑啉的耐药率显著高于单相鼠伤寒沙门菌( $P < 0.05$ ),两种沙门菌对头孢西丁的敏感性均较高,头孢西丁是头孢霉素类的半合成抗生素,习惯性被列入第二代头孢菌素,说明头孢西丁对鼠伤寒沙门菌的抑制作用比三代头孢类更强,与国内其他文献报道一致<sup>[18]</sup>,可为临床用药提供一定的参考价值。

单相鼠伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌对3类及以上抗生素的耐药率分别为68.00%和74.14%,欧盟的数据结果显示单相鼠伤寒沙门菌(81.40%)的多重耐药问题较鼠伤寒沙门菌(39.70%)更为严重<sup>[25]</sup>,这一数据高于本文中河南单相鼠伤寒沙门菌的多重耐药率。2010—2019年,美国 NARMS<sup>[24]</sup>监测腹泻患者多重耐药单相鼠伤寒沙门菌的分离率从7%上升至26%,国际上多重耐药单相鼠伤寒沙门菌流行株主要有两大耐药克隆,分别为以质粒介导的西班牙克隆 ACSuGSTSXT 多重耐药模式(A-氨苄西林、C-氯霉素、Su-磺胺类、G-庆大霉素、S-链霉素、T-四环素、SXT-甲氧苄啶/磺胺甲噁唑),以及以染色体介导的欧洲克隆 ASSuT(A-氨苄西林、S-链霉素、Su-磺胺类、T-四环素)或 ACSSuT(A-氨苄西林、C-氯霉素、S-链霉素、Su-磺胺类、T-四环素)多重耐药模式。本研究发现的多重耐药株系表型并未与某一国际流行株系完全相同,而呈现为相似并多样

化的多重耐药类型。两种血清型沙门菌均存在一定程度的多重耐药现象,最高可对8类抗生素耐药,单相鼠伤寒沙门菌仅对2种以上抗生素的耐药率显著高于鼠伤寒沙门菌,共有的四重耐药谱 ACSuT(A-氨苄西林、C-氯霉素、Su-磺胺类、T-四环素)和五重耐药谱 ACSuT+CIP(环丙沙星)的菌株数,单相鼠伤寒沙门菌分别为16和6,略高于鼠伤寒沙门菌。除此之外,ACSuT+CFZ(头孢唑啉)耐药谱中,鼠伤寒沙门菌占比较高。说明河南省鼠伤寒沙门菌及其单相变种的多重耐药特性与其他国家或地区的耐药流行趋势一致,提示菌株的多重耐药性存在跨地域播散的可能。

综上所述,通过对2015—2022年河南省临床和食品来源鼠伤寒沙门菌及其单相变体分离株进行血清凝集、多重荧光PCR确证和抗生素药物敏感实验分析,掌握了河南省两种血清型沙门菌在临床样本和食品中的流行情况及耐药特征。单相鼠伤寒沙门菌在临床分离株中检出率较高,而鼠伤寒沙门菌多来源于食物样品。国内研究报道显示单相鼠伤寒沙门菌多分离自养殖肉猪和零售猪肉<sup>[26]</sup>中,提示应着重开展肉制品及养殖场环境的连续性监测,以期更加准确地掌握单相鼠伤寒沙门菌在食物链中的传播规律及耐药特征,同时适当扩大单相鼠伤寒沙门菌临床分离株耐药类别的监测,掌握多重抗生素选择压力下菌株的耐药性变化特征,有效预防食源性聚集疾病的暴发。

## 参考文献

- [1] 黄静敏,柯碧霞,李柏生,等.广东省多重耐药沙门菌1,4,[5],12:i:-的耐药性及分子流行特征分析[J].疾病监测,2021,36(5):501-508.  
HUANG J M, KE B X, LI B S, et al. Molecular epidemiological characteristics and antibiotic resistance of multi-drug resistant *Salmonella* 1, 4, [5], 12: i: - in Guangdong [J]. Disease Surveillance, 2021, 36(5): 501-508.
- [2] YANG X J, WU Q P, ZHANG J M, et al. Prevalence and characterization of monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- of food origin in China [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137967.
- [3] 白莉,王军,刘丽莎,等.单相鼠伤寒沙门菌污染巧克力产品所致多国暴发事件对我国食源性致病菌污染风险管理的启示[J].中华预防医学杂志,2022,56(11):1648-1656.  
BAI L, WANG J, LIU L S, et al. Implications for risk management of foodborne pathogens in China from the outbreak of monophasic *Salmonella enterica* serovar typhimurium contaminated chocolate products [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2022, 56(11): 1648-1656.
- [4] 杨小鹏,吴清平,张菊梅,等.沙门氏菌1,4,[5],12:i:-耐药性和遗传特征研究进展[J].微生物学报,2014,54(11):1248-

1255.  
YANG X J, WU Q P, ZHANG J M, et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Salmonella enterica* serotype 1, 4, [5], 12:i:-A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11):1248-1255.
- [ 5 ] INGLE D J, AMBROSE R L, BAINES S L, et al. Evolutionary dynamics of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:- in Australia[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 4786.
- [ 6 ] HOPKINS K L, KIRCHNER M, GUERRA B, et al. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:- in Europe: A new pandemic strain?[J]. Euro Surveillance, 2010, 15(22): 19580.
- [ 7 ] BARCO L, RAMON E, CORTINI E, et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:- DT193 ASSuT strains from two outbreaks in Italy[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(2): 138-144.
- [ 8 ] BONE A, NOEL H, LE HELLO S, et al. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4, 12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage[J]. Euro Surveillance, 2010, 15(24): 19592.
- [ 9 ] MOSSONG J, MARQUES P, RAGIMBEAU C, et al. Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:- in Luxembourg, 2006[J]. Euro Surveillance, 2007, 12(6): E11-E12.
- [10] ECHEITA M A, HERRERA S, USERA M A. A typical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4, 5, 12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar *typhimurium*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(8): 2981-2983.
- [11] CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): 2015 human isolates surveillance report[R]. Atlanta, Georgia; U. S. Department of Health and Human Services, 2018: 1-84.
- [12] MULVEY M R, FINLEY R, ALLEN V, et al. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4, [5], 12:i:- involving human cases in Canada: Results from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS)[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(9): 1982-1986.
- [13] PRENDERGAST D M, HAND D, NI GHALLCHOIR E, et al. A multiplex real-time PCR assay for the identification and differentiation of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and monophasic serovar 4, [5], 12:i:-[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(1): 48-53.
- [14] O' REGAN E, MCCABE E, BURGESS C, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples[J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 156.
- [15] MUÑOZ N, DIAZ-OSORIO M, MORENO J, et al. Development and evaluation of a multiplex real-time polymerase chain reaction procedure to clinically type prevalent *Salmonella enterica* serovars[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2010, 12(2): 220-225.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-Sperformance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty-Second Informational Supplement[M]. Wayne: CLSI, 2018.
- [17] MAJOWICZ S E, MUSTO J, SCALLAN E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. Clinical Infectious Diseases, 2010, 50(6): 882-889.
- [18] DENG X L, RAN L, WU S Y, et al. Laboratory-based surveillance of non-typhoidal *Salmonella* infections in Guangdong Province, China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2012, 9(4): 305-312.
- [19] 曾献莹, 瞿聪, 黎锋, 等. 2021年广西腹泻病人来源的鼠伤寒沙门菌及其单相变种比较分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(6): 1147-1152.
- ZENG X Y, QU C, LI F, et al. Comparison of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and its monophasic variant from diarrhea patients in Guangxi in 2021[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(6): 1147-1152.
- [20] 曹文婷, 沙丹, 齐倩倩, 等. 2011至2018年无锡市鼠伤寒沙门菌耐药性分析与分子分型研究[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(2): 157-163.
- CAO W T, SHA D, QI Q Q, et al. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Salmonella typhimurium* in Wuxi city, 2011-2018[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2022, 45(2): 157-163.
- [21] 吴雯, 屠丽红, 张雯霞, 等. 上海市鼠伤寒沙门菌单相变异株的鉴定和耐药谱分析[J]. 检验医学, 2018, 33(9): 798-802.
- WU W, TU L H, ZHANG W X, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of *Salmonella typhimurium* monophasic variant in Shanghai[J]. Laboratory Medicine, 2018, 33(9): 798-802.
- [22] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella typhimurium*-like” strains[J]. EFSA Journal, 2010, 8(10): 1826.
- [23] TENNANT S M, DIALLO S, LEVY H, et al. Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010, 4(3): e621.
- [24] CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data[DB/OL]. Atlanta, Georgia; U.S. Department of Health and Human Services, CDC, [2022-06-10]. <https://www.cdc.gov/narmsnow>.
- [25] European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention Control (ECDC). The European union one health 2020 zoonoses report[J]. EFSA Journal, 2021, 19(12): 6971.
- [26] HE J J, SUN F, SUN D W, et al. Multidrug resistance and prevalence of quinolone resistance genes of *Salmonella enterica* serotypes 4, [5], 12:i:- in China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 330: 108692.