

研究报告

全基因组测序分析 2018 年江西省临床分离非伤寒沙门菌耐药性研究

游兴勇¹, 彭思露¹, 周厚德¹, 刘洋¹, 刘道峰¹, 胡凯², 张强¹, 刘成伟¹

(1. 江西省疾病预防控制中心 江西省食源性疾病预防溯源重点实验室, 江西 南昌 330029;

2. 景德镇市第二人民医院, 江西 景德镇 333000)

摘要:目的 掌握 2018 年江西省食源性疾病病例的非伤寒沙门菌分离株的耐药特征、耐药表型与耐药基因之间的对应关系, 评价全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS) 技术在耐药监测的应用前景。方法 本研究以 2018 年江西省食源性疾病病例分离的 58 株非伤寒沙门菌为研究对象, 用微量肉汤稀释法检测菌株对 14 种抗菌药物的耐药性, 对 58 株非伤寒沙门菌进行 WGS, 拼接后的序列经过与 ResFinder 数据库比对, 注释耐药基因。结果 58 株非伤寒沙门菌对四环素耐药率最高 (77.59%, 45/58), 其次是氨苄西林 (72.41%, 42/58), 对亚胺培南全部敏感。耐 3 类及 3 类以上抗生素的多重耐药菌株占 56.90% (33/58), 最高为 6 重耐药菌株占 3.45% (2/58)。58 株非伤寒沙门菌共筛选出 47 种 11 类耐药基因, 喹诺酮耐药决定区 (quinolone resistance-determining region, QRDR) 存在 *gyrA*、*gyrB* 和 *parC* 基因突变。菌株对氨基糖苷类耐药基因携带率最高为 100.00% (58/58), 其次是四环素类耐药基因携带率为 72.41% (42/58), 大环内酯类耐药基因携带率最低为 3.45% (2/58)。携带 3 类及 3 类以上耐药基因的菌株占 77.59% (45/58), 1.72% (1/58) 菌株最高携带 9 类耐药基因。58 株非伤寒沙门菌的菌敏试验结果与检测出的已知耐药基因总体符合率达 93.43% (611/654)。除喹诺酮类外, 其他类别的抗生素耐药表型与耐药基因符合率均高于 91%, 部分种类的抗生素耐药表型与基因符合率达 100%。结论 非伤寒沙门菌耐药现象较为严重, 其耐药表型与耐药基因有很高的一致性, WGS 可作为预测沙门菌耐药性的有效手段。

关键词: 全基因组测序; 耐药基因; 耐药表型; 非伤寒沙门菌

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)05-0493-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.05.004

Analysis of nontyphoidal *Salmonella* clinical isolates antibiotic resistance based on whole genome sequencing in Jiangxi Province in 2018YOU Xingyong¹, PENG Silu¹, ZHOU Houde¹, LIU Yang¹, LIU Daofeng¹,
HU Kai², ZHANG Qiang¹, LIU Chengwei¹(1. Jiangxi Province Key Laboratory of Diagnosing and Tracing of Foodborne Disease,
Jiangxi Province Center for Disease Control and Prevention, Jiangxi Nanchang 330029, China;
2. Second People's Hospital of Jingdezhen, Jiangxi Jingdezhen 333000, China)

Abstract: Objective Understanding of bacterial antibiotic resistance is the basis for guiding clinical anti-infective therapy and monitoring antimicrobial resistance trends. The study was aimed to investigate the antibiotic resistance characteristics of nontyphoidal *Salmonella* isolates from foodborne disease cases in Jiangxi Province in 2018, study the correlations between resistance phenotypes and genotypes, and evaluate the application prospects of whole genome sequencing (WGS) in antimicrobial resistance surveillance. **Methods** In this study, 58 nontyphoidal *Salmonella* strains were isolated from foodborne disease patients in Jiangxi Province in 2018 and were tested for susceptibility to 14 antimicrobials using broth microdilution. The 58 isolates were subjected to WGS, and resistance genes were identified from assembled sequences that compared with ResFinder database. **Results** 77.59% (45/58) of isolates were resistant to tetracycline, and 72.41% (42/58) were resistant to ampicillin. 100.00% of isolates were susceptible to imipenem. 56.90% (33/58) of isolates displayed resistance to at least 3 classes of antibiotics, and 3.45% (2/58) of isolates had resistance to at least 6 of 8 classes tested. A total of 47 unique resistance genes referred to 11 classes of antibiotics, plus

收稿日期: 2020-06-01

基金项目: 江西省重点实验室计划项目 (20171BCD40021); 江西省卫生健康委科技计划 (20204834, 20204846); 江西省重点研发计划 (20202BAB206066); 江西省医学领先学科建设计划项目卫生检验 (微生物) 科; 江西省医学学科省市共建计划项目

作者简介: 游兴勇 男 副主任技师 研究方向为食品安全风险监测 E-mail: cdc_ps@163.com

通信作者: 刘道峰 男 工程师 研究方向为食品安全风险监测 E-mail: defoelau@163.com

mutations in *gyrA*, *gyrB* and *parC* structural of quinolone resistance-determining region (QRDR), were identified. 100.00% (58/58) of isolates had aminoglycoside resistance genes, and 72.41% (42/58) of isolates harboured tetracycline resistance genes. Macrolide resistance genes were presented in 3.45% (2/58) of isolates. 77.59% (45/58) of isolates were contained at least 3 classes of antibiotics resistance genes, and 1.72% (1/58) of isolates harboured at least 9 classes of resistance genes. The overall resistance genotypes and phenotypes were consistent in 93.43% (611/654) of cases. Except quinolones, the correlations were above 91% for tested antibiotics. Correlations were 100% for some classes of antibiotics. **Conclusion** The antibiotic resistance phenomenon of these isolates was serious. The resistance phenotypes were in good accordance with genotypes, and WGS can be used as an effective tool to predict the antibiotic resistance of nontyphoidal *Salmonella*. As more new antibiotic resistance genes were discovered, the consistency of resistance genotypes and phenotypes will be further improved.

Key words: Whole genome sequencing; antibiotic resistance gene; antibiotic resistance phenotype; nontyphoidal *Salmonella*

非伤寒沙门菌(nontyphoidal *Salmonella*),是一种重要的人兽共患病原菌,被非伤寒沙门菌污染的食物可引起人类感染^[1],全球每年约有9380万由非伤寒沙门菌引起的肠胃炎病例,其中食源性病例占85%,死亡约15.5万人^[2]。非伤寒沙门菌的致病性与其耐药性密切相关^[3]。随着抗生素在养殖业和临床上的大量使用,耐药菌株甚至是多重耐药菌株日益增多^[4-5],更为严重的是耐药基因还会随着食物链在物种间转移^[6]。目前,常用的体外药敏测试方法有微量肉汤稀释法和琼脂稀释法,这些方法可能会由于折点值的标准不同导致不同实验室间的结果无法进行比对,且对测试抗生素的数量有限制。检测细菌耐药基因的常用方法是聚合酶链式反应(PCR)法,而PCR法只能检测特定的几种基因,灵活性差,操作繁琐。基于全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)能一次性全面检测出细菌的所有已知耐药基因,具有高效性、准确性、全面性等优点。本研究基于WGS分析2018年江西省食源性疾病病例中分离出的非伤寒沙门菌的血清型,了解江西省人源非伤寒沙门菌中各种类耐药基因的分布情况,探索耐药表型与耐药基因型的对应关系,评估WGS鉴定非伤寒沙门菌耐药性的能力。

1 材料与方法

1.1 材料

2018年江西省食源性疾病主动监测中,从患者的粪便或者肛拭子中分离得到的58株非伤寒沙门菌,对所有菌株均进行了生化鉴定和质谱鉴定。大肠埃希菌(ATCC 25922)为质控菌株,由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验

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

稀释法对分离株进行药敏试验,受试药物包括氨苄西林(AMP)、氨苄西林/舒巴坦(AMS)、头孢唑啉(CFZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢西丁(CFX)、头孢他啶(CAZ)、亚胺培南(IPM)、庆大霉素(GEN)、阿奇霉素(AZM)、四环素(TET)、萘啶酸(NAL)、环丙沙星(CIP)、氯霉素(CHL)、甲氧苄啉/磺胺甲噁唑(SXT)共14种抗菌药物。采用BioNumeric 7.6对药敏数据进行处理分析。

1.2.2 全基因组的提取

无菌接种环刮取新鲜菌落,按照操作说明使用QiAamp DNA Mini Kit提取菌株基因组DNA,利用Nanodrop完成DNA含量测定和初步质控。

1.2.3 WGS

菌株基因组DNA的浓度、完整性及纯度经北京诺禾致源生物信息科技有限公司检测合格后,通过Illumina X-ten平台完成WGS。平均测序读长200~300 bp,采用PE150,测序深度100×。

1.2.4 序列组装及基因注释

应用的BioNumeric 7.6(内置SPAdes)对测序原始序列进行de novo组装。通过与SeqSero数据库比对,预测出非伤寒沙门菌的血清型。通过与ResFinder数据库比对筛选耐药基因。

2 结果

2.1 血清型分布

将测序序列与SeqSero数据库比对,发现58株非伤寒沙门菌共有15种血清型,其中非伤寒沙门菌4,[5],12:i:-血清型占比最多(27.59%,16/58),其余依次为鼠伤寒沙门菌(20.69%,12/58)、肠炎沙门菌(15.52%,9/58)、里森沙门菌(8.62%,5/58)、伦敦沙门菌(6.90%,4/58)、德尔卑沙门菌(5.17%,3/58)、纽波特沙门菌、利齐菲尔德沙门菌、加里玛沙门菌、吉韦沙门菌、火鸡沙门菌、阿贡纳沙门菌、鸭沙门菌、汤卜逊沙门菌、斯坦利沙门菌均为1.72%。

2.2 药敏试验结果

58 株非伤寒沙门菌对四环素耐药率 (77.59%, 45/58) 最高, 其次是氨苄西林 (72.41%, 42/58), 最低为头孢他啶 (1.72%, 1/58) 和阿奇霉素 (1.72%, 1/58), 对头孢西丁不耐药, 对亚胺培南全部敏感。耐 3 类及 3 类以上抗生素的多重耐药菌株占 56.90% (33/58), 最高为 6 重耐药菌株占 3.45% (2/58)。详见表 1 和图 1。

表 1 58 株非伤寒沙门菌药敏试验结果

抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数/株	耐药率/%	菌株数/株	中介率/%	菌株数/株	敏感率/%
环丙沙星	9	15.52	31	53.45	18	31.03
氯霉素	23	39.66	2	3.45	33	56.90
萘啶酸	20	34.48	0	0.00	38	65.52
庆大霉素	3	5.17	2	3.45	53	91.38
四环素	45	77.59	0	0.00	13	22.41
头孢噻肟	13	22.41	0	0.00	45	77.59
头孢西丁	0	0.00	3	5.17	55	94.83
氨苄西林	42	72.41	0	0.00	16	27.59
氨苄西林/舒巴坦	13	22.41	29	50.00	16	27.59
头孢他啶	1	1.72	4	6.90	53	91.38
头孢唑啉	20	34.48	17	29.31	21	36.21
亚胺培南	0	0.00	0	0.00	58	100.00
阿奇霉素	1	1.72	0	0.00	57	98.28
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	23	39.66	0	0.00	35	60.34

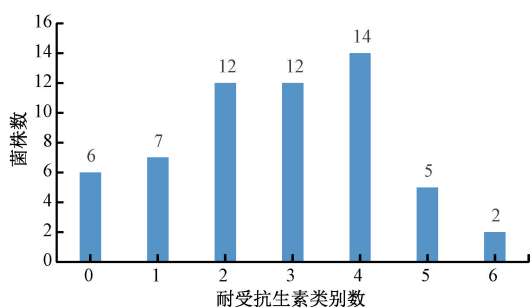


图 1 58 株非伤寒沙门菌多重耐药情况

Figure 1 Multidrug resistance of 58 *Salmonella* isolates

58 株非伤寒沙门菌共识别出 32 种耐药谱, 其中最高耐 9 种抗生素 (3.45%, 2/58), 耐药谱为环丙沙星-氯霉素-萘啶酸-四环素-头孢噻肟-氨苄西林-氨苄西林/舒巴坦-头孢唑啉-甲氧苄啶/磺胺甲噁唑, 最常见的耐药谱为氯霉素-四环素-氨苄西林-甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 (8.62%, 5/58) 和四环素-氨苄西林 (8.62%, 5/58)。

2.3 基于 WGS 注释耐药基因

通过与 ResFinder 数据库比对, 58 株非伤寒沙门菌共筛选出 47 种 11 类耐药基因。菌株对氨基糖苷类耐药基因携带率最高为 100.00% [所有菌株均携带氨基糖苷类耐药基因 *aac*(6')-*Iaa*], 其次是四环素类耐药基因携带率为 72.41% (42/58),

大环内酯类耐药基因携带率最低为 3.45% (2/58), 见表 2。

表 2 58 株沙门菌携带耐药基因情况

药物类别	耐药基因名称	携带基因菌株数/株	携带率/%
氨基糖苷类	<i>aac</i> (3)- <i>Ild</i> , <i>aac</i> (3)- <i>IV</i> , <i>aac</i> (6')- <i>Iaa</i> , <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA16</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadA22</i> , <i>aadA24</i> , <i>aadA2b</i> , <i>aadA3</i> , <i>ant</i> (3'')- <i>Ia</i> , <i>aph</i> (3'')- <i>Ib</i> , <i>aph</i> (3')- <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3')- <i>Ia</i> , <i>aph</i> (4)- <i>Ia</i> , <i>aph</i> (6)- <i>Id</i>	58	100.00
四环素类	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (M)	42	72.41
叶酸途径抑制剂类	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA14</i>	41	70.69
β -内酰胺类	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{CTX-M-65} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM-1B}	40	68.97
喹诺酮类	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB6</i> , <i>qnrS1</i> , <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	26	44.83
苯丙醇类	<i>catA2</i> , <i>catB3</i> , <i>cml</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i>	24	41.38
利福平类	<i>ARR-2</i> , <i>ARR-3</i>	12	20.69
氟喹诺酮类	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	8	13.79
磷霉素类	<i>fosA7</i>	5	8.62
林可酰胺类	<i>lnu</i> (F)	3	5.17
大环内酯类	<i>mph</i> (A)	2	3.45

携带 3 类及 3 类以上耐药基因的菌株占 77.59% (45/58), 最高携带 9 类耐药基因 (为氨基糖苷类-氟喹诺酮类-利福平- β -内酰胺类-苯丙醇类-叶酸途径抑制剂类-喹诺酮类-四环素类-大环内酯类) 的菌株占 1.72% (1/58), 最低携带 1 类耐药基因 (为氨基糖苷类) 的菌株占 13.79% (8/58), 见图 2。

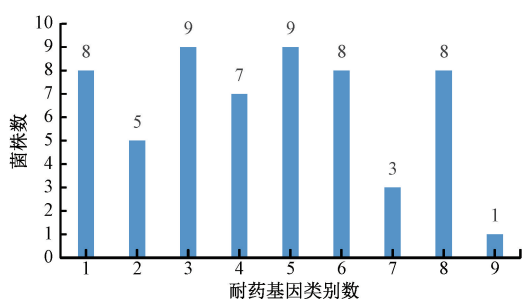


图 2 58 株非伤寒沙门菌多重耐药基因携带情况

Figure 2 Multidrug resistance genes of 58 *Salmonella* isolates

2.4 非伤寒沙门菌耐药基因与耐药表型的关联

基于 WGS 检测出的大部分耐药基因与药敏试验中 14 种抗生素的临床耐药性或降低对抗生素的敏感性有关。此外, 有些耐药基因还预测出了对 14 种抗生素以外的抗生素的耐药性。

58 株非伤寒沙门菌的药敏试验结果与检测出的已知耐药基因高度一致, 在 654 例药敏试验中有 611 例与耐药基因型相吻合, 总体达到了 93.43% 的符合率。在 654 例药敏试验中共有 180 例结果为耐

药,其中 159 例耐药表型与耐药基因或者耐药相关的基因突变相一致,其余 21 例不一致的药敏试验抗生素类型分别为:10 例 β -内酰胺类、5 例叶酸途径抑制剂类、3 例四环素类、2 例喹诺酮类、1 例苯丙醇类。总体灵敏度达 88.33% (159/180)。详见表 3。

在 474 例药敏试验为敏感的结果中,经过 WGS 检测有 22 例存在耐药基因,其中 16 例为喹诺酮类、2 例为 β -内酰胺类、2 例为苯丙醇类、1 例为氨基糖苷类、1 例为大环内酯类。总体特异性达 95.36% (452/474)。

表 3 沙门菌耐药基因型与耐药表型的比较

Table 3 Resistance genotype and phenotype comparison of *Salmonella* isolates

抗生素		表型耐药/株		表型敏感/株		灵敏度/%	特异度/%
		基因型 耐药	基因型 敏感	基因型 耐药	基因型 敏感		
β -内酰胺类	氨苄西林	40	2	0	16	95.24	100.00
	头孢他啶	1	0	2	51	100.00	96.23
	头孢噻肟	5	8	0	45	38.46	100.00
	头孢西丁	0	0	0	55	100.00	100.00
	亚胺培南	0	0	0	58	100.00	100.00
氨基糖苷类	庆大霉素	3	0	1	52	100.00	98.11
大环内酯类	阿奇霉素	1	0	1	56	100.00	98.25
四环素类	四环素	42	3	0	13	93.33	100.00
苯丙醇类	氯霉素	22	1	2	31	95.65	93.94
喹诺酮类	环丙沙星	8	1	0	18	88.89	100.00
	萘啶酸	19	1	16	22	95.00	57.89
叶酸途径抑制剂类	甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	18	5	0	35	78.26	100.00
合计		159	21	22	452	81.67	98.31

2.4.1 β -内酰胺类耐药基因

共检测出 6 种 β -内酰胺类耐药基因,均编码钝化酶。菌株对 *bla*_{TEM-1B} 携带率最高 (60.34%, 35/58), 其次为 *bla*_{OXA-1} (8.62%, 5/58)、*bla*_{CTX-M-55} (5.17%, 3/58), *bla*_{CTX-M-14}、*bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{OXA-10} 均为 1.72% (1/58)。这 6 种基因均与超广谱 β -内酰胺酶有关。除了头孢噻肟外,菌株对其余 4 种抗生素的耐药表型与基因型之间的符合率较高,灵敏度最高为 100.00%,最低为 95.24%,特异度最高为 100.00%,最低为 96.23%。对于头孢噻肟可能还有其他未知的耐药机制。总体上,菌株对 β -内酰胺类抗生素的基因型灵敏度和特异度分别为 82.14% 和 99.12%。

2.4.2 氨基糖苷类耐药基因

58 株非伤寒沙门菌中共检测到 17 种氨基糖苷类耐药基因,均是通过酶的修饰机制介导氨基糖苷类耐药。其中 *aac*(6')-*Iaa* 携带率最高 (100.00%, 58/58), 其次为 *aadA1* (37.93%, 22/58)、*aph*(6)-*Id* (34.48%, 20/58)、*aph*(3'')-*Ib* (31.03%, 18/58)。这 17 种耐药基因共介导对庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、链霉素的耐药,其中介导链霉素耐药的基因最多 (58.82%, 10/17)。值得注意的是, *aac*(6')-*Ib-cr* 基因既介导氨基糖苷类耐药又介导氟喹诺酮类 (环丙沙星) 耐药。菌株对庆大霉素的耐药表型与基因型之间的符合率较高,灵敏度和特异度分别为 100.00% 和 98.11%。

2.4.3 大环内酯类耐药基因

58 株非伤寒沙门菌中只检测到一种大环内酯类耐药基因即 *mph*(A), 携带率为 3.45% (2/58), 该基因编码大环内酯磷酸转移酶^[7], 介导阿奇霉素、红霉素、螺旋霉素、泰利霉素耐药性。本研究只检测了阿奇霉素的耐药表型,菌株对阿奇霉素耐药表型与基因型之间的相关性较高,灵敏度和特异度分别为 100.00% 和 98.25%。

2.4.4 四环素类耐药基因

据文献报道^[7]共有 46 个已知的 *tet* 基因,本研究共筛选出 4 种 *tet* 基因: 编码外排泵功能的 *tet*(A)、*tet*(B)、*tet*(C) 和编码目标蛋白保护机制的 *tet*(M), 这 4 种 *tet* 基因携带率分别为 46.55% (27/58)、27.59% (16/58)、1.72% (1/58)、17.24% (10/58)。携带 ACSSuT 五重耐药基因 (编码氨苄西林、氯霉素、链霉素、磺胺甲噁唑、四环素耐药基因) 的菌株有 23 株, 其中鼠伤寒沙门菌 9 株、鼠伤寒沙门菌变种 8 株、里森沙门菌 3 株、伦敦沙门菌 2 株、德尔卑沙门菌 1 株。有一株非伤寒沙门菌只携带了 *tet*(M) 这一种四环素抗性基因, 并且表现四环素耐药表型, 表明在非伤寒沙门菌中 *tet*(M) 可能是一个功能性耐药决定因子。在 14 种抗生素药敏试验中, 非伤寒沙门菌对四环素的耐药率最高, 耐药表型与基因型之间的符合率较高, 灵敏度和特异度分别为 93.33% 和 100.00%。

2.4.5 苯丙醇类耐药基因

本研究检测到 5 种苯丙醇类耐药基因即 *cmlA1*、*floR*、*catB3*、*cml*、*catA2*, 基因携带率分别为 31.03% (18/58)、22.41% (13/58)、8.62% (5/58)、6.90% (4/58)、3.45% (2/58), 它们均介导氯霉素耐药性。*catA2*、*catB3* 通过编码钝化酶机制, *cml*、*cmlA1*、*floR* 通过增加抗生素的外排机制介导耐药。氯霉素表型敏感, 基因型抗性的菌株均携带 *cml* 基因, 可能仅携带 *cml* 基因不足以导致对氯霉素耐药, 或者由于其他原因导致该基因不表达。菌株对氯霉素耐药表型与基因型之间的符合率较高, 灵敏度和特异度分别为 95.65% 和 93.94%。

2.4.6 喹诺酮类耐药基因

喹诺酮类耐药性主要由喹诺酮类耐药决定区 (quinolone resistance-determining region, QRDR) 的基因突变 (即编码 DNA 促旋酶的 *gyrA* 和 *gyrB*^[8-9] 以及编码 DNA 拓扑异构酶 IV 的 *parC* 和 *parE*^[10] 发生点突变而无法识别目标蛋白) 和质粒介导的喹诺酮类耐药 (plasmid mediated quinolone resistance, PMQR) 基因介导。本研究中共有 47 株非伤寒沙门菌携带 PMQR 或 QRDR 基因突变。PMQR 基因携带率最高为 *qnrS1* (29.31%, 17/58), 其通过保护 DNA 促旋酶免受喹诺酮类结合而起作用^[11], 其余依次为 *aac* (6')-*Ib-cr* (13.79%, 8/58)、*oqxA* (12.07%, 7/58)、*oqxB* (12.07%, 7/58) 增加抗生素的外排作用, 最低为 *qnrB6* (5.17%, 3/58)。QRDR 基因突变中 58 株非伤寒沙门菌检测到存在 *gyrA*、*gyrB* 和 *parC* 基因突变, 其中 *parC* 突变率最高 (31.03%, 18/58) 且全部是 Thr57-Ser, 其次是 *gyrA* (27.59%, 16/58) 有 Asp87-Gly (2 株)、Asp87-Asn (4 株)、Asp87-Tyr (8 株)、Ser83-Tyr (2 株), 最低为 *gyrB* (1.72%, 1/58) 为 Glu466Asp。

QRDR 突变常导致对萘啶酸的耐药性, 对环丙沙星的耐药性通常需要多个突变。除非存在 QRDR 突变或其他的 PMQR 基因, 否则含有 PMQR 基因的菌株通常不会表现出对环丙沙星或萘啶酸的临床耐药性^[7]。本研究有 14 株菌仅携带一种 PMQR 基因即 *qnrS1*, 其中 1 株对环丙沙星的药敏试验结果为耐药, 12 株为中介, 1 株为敏感。有 12 株沙门菌同时存在 QRDR 突变和 PMQR 基因, 其中 8 株环丙沙星表型耐药, 5 株表型中介。对环丙沙星呈耐药表型的菌株基本同时存在 QRDR 突变和 PMQR 基因, 或多种 PMQR 基因。对萘啶酸耐药的菌株基本存在 QRDR 突变和/或携带 PMQR 基因, 但有 1 株非伤寒沙门菌未检测出已知的耐药基因或突变。有 6 株非伤寒沙门菌同时对萘啶酸和环丙沙星耐药,

都携带 *oqxA*、*oqxB* 基因, 5 株菌存在 *gyrA* 突变。菌株对喹诺酮类耐药表型与基因型之间的符合率较高, 灵敏度和特异度分别为 93.10% 和 71.43%。

2.4.7 叶酸途径抑制剂类基因

本研究共检测到 3 种磺胺甲噁唑耐药基因, 菌株对 *sul2* 的携带率最高 (50.00%, 29/58), 其次是 *sul3* (36.21%, 21/58) 和 *sul1* (24.14%, 14/58)。甲氧苄啶耐药基因共检测到 3 种, 其中 *dfrA12* 携带率最高 (27.59%, 16/58), 而 *dfrA1* 和 *dfrA14* 携带率均为 1.72% (1/58)。菌株对甲氧苄啶/磺胺甲噁唑的耐药表型与基因型之间的符合率较好, 灵敏度和特异度分别为 78.26% 和 100.00%。

3 讨论

随着测序技术的快速发展, WGS 越来越便捷且用途广泛, 全基因组序列除了可用于耐药基因的预测, 还可用于物种鉴定、血清型预测、核心基因组多位点序列分型 (cgMLST) 的分型, 毒力基因的筛选, 疾病暴发的快速溯源等。在检测细菌的耐药基因方面, WGS 逐步成为广泛应用的方法之一。WGS 不需要针对目的序列设计特异性引物, 不但减少了传统 PCR 方法检测耐药基因的工作量, 而且还可一次性获得菌株携带的所有已知耐药基因^[12], 不仅仅局限于 PCR 和药敏试验法测试的特定种类的抗生素, 因此 WGS 方法比药敏试验法、PCR 法更高效更全面。

目前我国利用 WGS 检测非伤寒沙门菌耐药基因的研究较少, 本研究通过 WGS 确切了解江西省人源性非伤寒沙门菌中各种类耐药基因的分布情况, 同时通过分析耐药基因和耐药表型的对应性比对分析, 发现两者达到 93.43% 的一致, 该研究结果与国内外研究相一致: ZANKARI 等^[13] 发现 50 株猪源沙门菌的耐药表型与 WGS 预测耐药基因组完全一致。MCDERMOTT 等^[7] 发现 640 株人源和零售肉源的沙门菌的耐药表型与 WGS 预测的耐药基因型达到 99% 的对应。田雅楠^[12] 通过对 63 株肠炎沙门菌进行 WGS 发现其耐药表型与耐药基因型总体达到 85% 的对应率。王伟等^[3] 通过 WGS 研究发现 3 株人源鼠伤寒沙门菌的耐药表型与耐药基因一致。除沙门菌外, 有研究指出基于 WGS 分析发现大肠埃希菌^[14] 和弯曲菌^[15] 的耐药基因与耐药表型的相关性均高于 97%。尽管基因型法与表型方法的结果高度一致, 但是仍然有少数情况两者结果不匹配。最明显的是 8 株沙门菌表现出对头孢噻肟的耐药性, 但是未检测出相关的基因。这些菌株中可能存在与头孢噻肟耐药性相关的未知基因, 有待进一步

挖掘。其次是16株萘啶酸表型敏感的菌株存在 *parC* 基因 Thr57-Ser 突变, EAVES 等^[16] 研究表明存在 *parC* 基因 Thr57-Ser 突变的菌株比野生型菌株对萘啶酸的耐药没有明显增强, 甚至该突变会导致沙门菌对环丙沙星更加敏感, 并推测 *parC* 第57位密码子的突变可能是自然发生的代偿性突变。此外, *parC* 基因 Thr57-Ser 突变与血清型密切相关, 本研究菌株中鼠伤寒沙门菌血清型均不存在 *parC* 基因 Thr57-Ser 突变, 与 LING 等^[17] 和 EAVES 等^[16] 研究结果一致。

综上所述, WGS 可成为检测非伤寒沙门菌甚至是一些常见致病菌耐药性的有效工具。但是由于一些沉默基因、多拷贝基因及基因遗传背景等复杂因素的存在, 耐药基因型难以完全与细菌临床耐药表型一致。尽管目前基于耐药基因型指导临床治疗存在一些局限性, 但是随着国内外学者们对耐药基因的深入研究, 公共耐药基因数据库将不断扩充完善, 有助于对耐药基因及其表达形成更加全面的认识。而且, WGS 可以跨越物种、生态和地理屏障, 在指导耐药基因的溯源、探索耐药基因在物种内或物种间的转移有着不可比拟的优势。此外, 基因组数据还有助于快速了解感染源, 及时识别和鉴定疾病暴发, 更好地了解抗生素使用的后果。在不同的生态系统中监测耐药基因将会更快的识别新出现的耐药危害, 帮助及时实施降低公共健康风险的控制策略。

参考文献

[1] 钟舒红, 冯世文, 李军, 等. 广西畜禽产品中沙门氏菌血清型、耐药性及耐药基因调查[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3): 770-780.

[2] 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.

[3] 王伟, 胡豫杰, 徐进, 等. 鼠伤寒沙门菌婴幼儿分离株耐药基因及毒力基因研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(5): 567-575.

[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.

[5] 李永瑞, 李艳. 河南省临床鼠伤寒沙门氏菌的耐药性分析[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2018, 36(3): 218-221.

[6] 吴云凤, 袁宝君, 乔昕, 等. 肉鸡胴体中沙门氏菌的分离鉴定及多重耐药谱研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2012, 32(1): 125-128.

[7] MCDERMOTT P F, TYSON G H, KABERA C, et al. Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* [J]. *Pubmed*, 2016, 60(9): 5515-5520.

[8] SAENZ Y, ZARAZAGA M, BRINAS L, et al. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51(4): 1001-1005.

[9] YOSHIDA H, BOGAKI M, NAKAMURA M, et al. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35(8): 1647-1650.

[10] SORLOZANO A, GUTIERREZ J, JIMENEZ A, et al. Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(8): 2740-2742.

[11] HOPKINS K L, DAY M, THRELFALL E J, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(2): 340-342.

[12] 田雅楠. 不同源肠炎沙门菌耐药表型与耐药基因型分析 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017.

[13] ZANKARI E, HASMAN H, KAAS R S, et al. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(4): 771-777.

[14] TYSON G H, MCDERMOTT P F, LI C, et al. WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(10): 2763-2769.

[15] ZHAO S, TYSON G H, CHEN Y, et al. Whole-genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter* spp. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(2): 459-466.

[16] EAVES D J, RANDALL L P, GRAY D T, et al. Prevalence of Mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(10): 4012-4015.

[17] LING J M, CHAN E W, LAM A W, et al. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant *Salmonellae* in Hong Kong [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(11): 3567-3573.