

江苏省沙门氏菌全基因组序列中外排泵 耐药基因分布及其特征研究

沈 贇¹, 秦 思¹, 侯海燕^{2*}

(1. 江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009; 2. 南京市秦淮区疾病预防控制中心, 南京 210001)

摘要: 目的 了解江苏省沙门氏菌的耐药情况及其耐药相关基因的分布状况。**方法** 根据美国实验室标准化临床协会的操作规范推荐的肉汤稀释法测定沙门氏菌的药物敏感性, 应用在线数据库分析基于多个位点的序列型、耐药基因的种类和数量。**结果** 至少一半以上的沙门氏菌对链霉素、氨苄西林、复方磺胺甲恶唑、四环素、大观霉素、利福平耐药。尤其是对大观霉素和利福平的耐药率高达 90% 以上。D 群沙门氏菌是主要的血清群。ST11 型为主要的序列型。与外排泵耐药相关的 9 种 MFS 耐药基因均可以检出, 最多的沙门氏菌携带 8 种基因。**结论** 江苏沙门氏菌的耐药问题比较严重, 在临床用药和畜牧业养殖中, 应加强抗生素合理使用。

关键词: 沙门氏菌; 外排泵; 耐药; 多基因座序列分型

Distribution and characteristics of efflux pumps drug-resistant genes in *Salmonella* spp. whole genome isolated from Jiangsu province

SHEN Yun¹, QIN Si¹, HOU Hai-Yan^{2*}

(1. Jiangsu Province Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China;
2. Qinhuai District Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210001, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the drug resistance of *Salmonella* and the distribution of drug resistance and related genes in Jiangsu province. **Methods** According to the broth dilution method recommended by the American Laboratory Standardization Clinical Association, the drug susceptibility of *Salmonella* was determined. The sequence based on multiple sites, the type and number of drug resistance genes were analyzed by the online database. **Results** More than half of *Salmonella* bacteria were resistant to streptomycin, ampicillin, cotrimoxazole, tetracycline, spectinomycin, and rifampicin. Especially, the drug resistance rate to spectinomycin and rifampicin was as high as more than 90%. *Salmonella* group D was the main serogroup, Type ST11 was the main sequence type. All 9 MFS resistance genes related to efflux pump resistance were detected, and the most common *Salmonella* bacteria carried eight genes. **Conclusion** The drug resistance of *Salmonella* in Jiangsu is relatively serious. In clinical medicine and animal husbandry, the rational use of antibiotics should be strengthened.

KEY WORDS: *Salmonella*; efflux pumps; drug resistance; multilocus sequence typing

基金项目: 江苏省科技强卫重点学科项目(ZDXKA2016008)

Fund: Supported by the Jiangsu Province Key Project of Strengthening Health through Science and Technology(ZDXKA2016008)

*通讯作者: 侯海燕, 副主任技师, 主要研究方向为微生物检验。E-mail: hyhou1205@126.com

*Corresponding author: HOU Hai-Yan, Associate Professor, Qinhuai District Center for Disease Control and Prevention, No. 2 Boguoshu, Qinhuai District, Nanjing 210001, China. E-mail: hyhou1205@126.com

1 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是引起人类肠道食源性疾病最常见的致病菌。其可通过各种食品(如蛋类、肉类等)感染宿主肠道,产生局部溃疡,引起肠道疾病;或入侵肠道黏膜,引起全身感染性疾病,甚至死亡^[1-3]。从 20 世纪约 80 年代至今,全球范围内沙门氏菌的病患人数增加显著,有些欧洲国家的患病人数是原先患病人数的 5 倍以上^[4]。在中国,由细菌引起的食物中毒事件中,70%–80%是由沙门氏菌感染引起的,远远高于其它致病微生物引起食物中毒的比例,居食源性细菌中毒第一位^[5,6]。据不完全统计,全球每年由沙门氏菌造成的感染至少有 9300 万人,其中单伤寒沙门氏菌一种每年就造成约 2100 万人感染,死亡人数为 20 万人左右^[7,8]。不仅如此,沙门氏菌的耐药问题越来越严重,全球范围内沙门氏菌的多重耐药率从 20 世纪 80 年代前后的 20%–30%陡然增加到现在的 70%以上^[9,10]。在畜牧业、社区、食物中毒案例等中,经常会发现多重耐药的超级细菌。

为了解江苏省沙门氏菌的耐药状况,明确耐药机理,本研究选取了 176 株从江苏省医院腹泻病人中分离到的沙门氏菌株,检测了其对抗生素的敏感性、测定了全基因组序列、分析了外排泵家族中主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)类外排泵耐药基因的分布,为预防耐药发生措施的制定提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

共收集 176 株沙门氏菌菌株,均从江苏省食源性疾病预防哨点医院腹泻病人中分离获得。收集时间:2018 年 1 月至 2019 年 12 月。

大肠杆菌 ATCC 25922 质控标准菌株(微生物菌种保藏中心);缓冲蛋白胨水增菌培养基(buffered peptone water, BPW)、四硫磺酸钠亮绿培养基(tetrathionate medium, TTB)、亚硒酸盐胱氨酸增菌培养基(selenite cystine enrichment medium, SC)、改良亚硒酸盐磺绿增菌肉汤(sulfonate selenite broth, SBG)、Cary-Blair 运送培养基(北京陆桥生物科技有限公司);细菌 DNA 基因组快速提取试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit, 凯杰企业管理上海有限公司);PCR 检测用试剂盒 Taq PCR Mix Master(上海生物工程股份有限公司);沙门氏菌血清(丹麦 SSI 公司);沙门氏菌显色培养基(法国科马嘉公司生产);所有试剂均在保质期内。

VITEC2 Compact 全自动生化鉴定仪(法国生物梅里埃公司);Sensititre AIM 药敏重量加样仪、Vizion 全自动药敏判读仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

2.2 方法

2.2.1 药物敏感性检测

根据美国实验室标准化临床协会的操作规范^[11](Clinical and laboratory standards institute, CLSI)推荐肉汤稀释法。

2.2.2 生化鉴定和血清分型

细菌的生化鉴定和血清分型根据《江苏省食源性疾病预防工作手册》粪便样本检验标准操作程序部分及 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 沙门氏菌》进行检验^[12]。

2.2.3 核酸提取和全基因组测序

用 QIAamp DNA Mini Kit 快速提取试剂盒提取沙门氏菌的核酸。送上海生工有限公司进行全基因组测序。

2.2.4 全基因组测序和生物信息学分析

利用在线数据库(<http://pubmlst.org/>)进行 MLST 分型。全基因组序列中的耐药基因使用在线 Resfinder 数据库进行分析。BLAST 比对用的参考序列使用 ISfinder 中 Tn2。BLAST 结果可视化采用 BRIG 软件。构建 SNP 全基因组系统进化树采用 mega7 软件和 mummer 软件,参考基因为 *Salmonella enterica* 沙门氏菌(Genbank number: NC 003198.1)。

3 结果与分析

3.1 沙门氏菌的耐药状况

药敏实验结果显示沙门氏菌对哌拉西林、加替沙星、除诺氟沙星以外的喹诺酮类药物、阿米卡星、亚胺培南和大部分的头孢类药物均敏感或耐药率较低都不耐药,但对链霉素、氨苄西林、复方磺胺甲恶唑、四环素、大观霉素、利福平普遍耐药,耐药率分别为 51.1%、54.6%、58.5%、60.8%、91.5%、92.1%(见表 1)。在耐药的沙门氏菌中,都对 2 种及以上的抗生素耐药。最严重的耐药株对 13 种抗生素耐药。

3.2 沙门氏菌血清型和多位点序列分型结果

江苏沙门氏菌血清型分布以 C 群沙门氏菌和 D 群沙门氏菌最多,分别占到总体的 22.06%和 61.76%。而 D 群沙门氏菌中又以肠炎沙门氏菌比重最大,占到了 52.94%。对其中的 68 株沙门氏菌进行了多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分型,结果发现,江苏省以 ST11 型为主要型别,主要分布在肠炎沙门氏菌。见表 2。

表 1 176 株沙门氏菌对 21 种抗生素的敏感性
Table 1 Sensitivity of 176 isolates of *Salmonella* to 21 antibiotics

抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数/株	百分率/%	菌株数/株	百分率/%	菌株数/株	百分率/%
哌拉西林/他唑巴坦	2	1.1	3	1.7	171	97.2
阿莫西林/克拉维酸	32	18.2	50	28.4	94	53.4
氨苄西林	96	54.6	2	1.1	78	44.3
头孢吡肟	3	1.7	0	0.0	173	98.3
头孢噻肟	7	4.0	3	1.7	166	94.3
头孢曲松	17	9.7	0	0.0	159	90.3
头孢唑林	20	11.4	8	4.5	148	84.1
加替沙星	0	0.0	0	0.0	176	100.0
诺氟沙星	60	34.1	28	15.9	88	50
洛美沙星	2	1.1	0	0.0	174	98.9
环丙沙星	0	0.0	2	1.1	174	98.9
左氧氟沙星	0	0.0	0	0.0	176	100.0
庆大霉素	16	9.1	8	4.5	152	86.4
氯霉素	41	23.3	3	1.7	132	75.0
大观霉素	161	91.5	12	6.8	3	1.7
链霉素	90	51.1	63	35.8	23	13.1
四环素	107	60.8	5	2.8	64	36.4
阿米卡星	0	0.0	0	0.0	176	100.0
复方磺胺甲恶唑	103	58.5	16	9.1	57	32.4
亚胺培南	0	0.0	0	0.0	176	100.0
利福平	162	92.1	2	1.1	12	6.8

表 2 江苏省沙门氏菌血清分型和 ST 型分布
Table 2 Distribution of serotype and ST of *Salmonella* isolated from Jiangsu province

沙门氏菌群	沙门氏菌血清型	ST 型	菌株数	百分比/%
B 群	德尔卑	ST40	3	4.41
	鼠伤寒	ST11	1	1.47
	里森	ST19	1	1.47
	猪霍乱	ST40	4	5.88
	布伦登卢普	ST32	1	1.47
	纽波特	ST40	4	5.88
	阿辛纳	ST1541	1	1.47
C 群 3	阿辛纳	ST26	1	1.47
	阿拉莫沙	ST2039	1	1.47
	艾因格迪	ST26	1	1.47
	肯塔基	ST198	1	1.47
	汤卜逊	ST26	1	1.47
	贝塔沙	ST11	2	2.94
		ST11	36	52.94
D 群	肠炎	ST1	2	2.94
		ST19	2	2.94
		ST19	2	2.94
E 群	利物浦	ST1955	2	2.94
M 群	波摩那	ST451	4	5.88

3.3 沙门氏菌外排泵模式耐药基因携带结果

所检测的沙门氏菌中,这 9 种 MFS 外排泵机制的耐药基因均可以检出,而且大多数沙门氏菌中都检测到了不止一种基因。最多的检测到了 8 种基因,*floR*、*emrD3*、*emrB3* 的检出率最高,达到了 90%以上,检出率最低的是 *emrK* 基因,仅为 1.70%。这 9 种耐药基因的检出情况如表 3。这 9 种单个的外排泵基因可以在沙门氏菌中有多种多样的组合模式,携带外排泵 MFS 基因最少的沙门氏菌也携带了 2 种,最多的沙门氏菌则同时携带了 8 种所检测的外排泵基因,这样的菌株一共有 10 株,大部分的沙门氏菌携带的外排泵基因的个数是 6 到 7 种。共占 76.02% (见表 4)。

表 3 沙门氏菌 MFS 外排泵耐药基因检出情况
Table 3 MFS efflux pump resistance genes in *Salmonella*

基因名称	阳性数/株	检出率/%
<i>emrB3</i>	165	93.75
<i>emrB5</i>	128	72.73
<i>emrD1</i>	13	7.39
<i>emrD3</i>	171	97.16
<i>emrK</i>	3	1.70
<i>tetB</i>	112	63.64
<i>floR</i>	165	93.75
<i>yieO</i>	112	63.64
<i>yebQ</i>	30	17.05

表 4 沙门氏菌 9 类 MFS 外排泵耐药基因阳性组合情况
Table 4 Positive combinations of nine MFS efflux pump resistance genes in *Salmonella*

携带基因种数	菌株数	构成比/%
2	5	2.92
3	6	3.51
4	6	3.51
5	14	8.19
6	68	39.77
7	62	36.26
8	10	5.85
合计	171	100

4 结论与讨论

沙门氏菌在自然界广泛存在,常常以粪口途径造成感染。对于免疫力低下的人群,沙门氏菌极易在短时间内由肠道粘膜侵袭进入血液,引起患者全身造成感染。一般

情况下,给予抗生素治疗都具有良好的效果。但如果感染的细菌出现严重耐药,将会面临非常严重的后果。在本研究中,沙门氏菌对头孢类抗生素、喹诺酮类抗生素普遍敏感。这些抗生素也是目前我国用于治疗沙门氏菌感染的首先药物。但随着上述药物在畜牧业领域被普遍使用^[13,14],耐药株的流行也许只是时间问题,在部分地区已表现出其耐药率逐年增高的趋势^[15-17]。因此对沙门氏菌开展持续的耐药监测具有十分重要的意义。

本研究中分离到的沙门氏菌分属 5 个群,15 种血清型。所有病例均为散发,没有聚集性病例。MLST 分型结果表明:共有 11 种 ST 型,其中以 ST11 型最多,多分布于 D 群肠炎沙门氏菌、B 群德尔卑沙门氏菌以及贝塔沙门氏菌中。这与山东省动物源性沙门氏菌的血清型和 MLST 型分布相似^[18]。

通过全基因组序列的分析发现并不是所有携带耐药基因的菌株都出现表型耐药,这可能是由于耐药基因的表达受多种因素的调控。如许多细菌可以通过外排泵系统将进入胞内的抗菌药物泵出胞外,从而使菌体内药物浓度降低而导致耐药^[19]。在本研究中,共检测到 9 种 MFS 基因,有些菌株携带 8 种 MFS 基因。MFS 基因的检出率高于对任何一种抗生素的耐药率。是否沙门氏菌的耐药性与其携带的 MFS 基因种类数相关还有待更加深入的研究。但从不同角度分析沙门氏菌的耐药状况,更加有助于了解当地细菌耐药发展趋势。

参考文献

- [1] Casey BB, Timothy FJ, Duc JV, *et al.* Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: Foodborne diseases active surveillance network (Food Net), 1996-2005 [J]. *J Infect Dis*, 2011, 204(2): 263-267.
- [2] Marcus HYW, Meiyong Y, Edward WCC, *et al.* Emergence of clinical *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolates with concurrent resistance to ciprofloxacin, ceftriaxone, and azithromycin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(7): 3752-3756.
- [3] Lisette MK, Annelies P, Marie-France P, *et al.* Invasive *Salmonella* infections at multiple surveillance sites in the democratic republic of the Congo, 2011-2014 [J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 61(S4): 346-353.
- [4] Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: A brief review [J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(2): 112-118.
- [5] Christopher RL, Susan LB, Oluwaseun BE, *et al.* *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*, England and Wales, 1945-2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(7): 1097-1104.
- [6] Reid HR, Friedman CR, Crim SM, *et al.* Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype dublin infections among humans, United States, 1968-2013 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(9): 1493-1501.
- [7] Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, *et al.* Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: An emerging and neglected tropical disease in Africa [J]. *Lancet*, 2012, 379(9835): 2489-2499.
- [8] GBD 2017 Non-typhoidal *Salmonella* invasive disease collaborators. The

- global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: A systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(12): 1312–1324.
- [9] Vincent OR, Wafaa J, Tibor P, *et al.* Emergence of multidrug-resistant *Salmonella* spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates [J]. *Diagnost Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(1): 71–77.
- [10] Felicita M, Weidong G, Mahon BE, *et al.* Estimated incidence of antimicrobial drug-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections, United States, 2004–2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(1): 29–37.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution and antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 9th ed. Approved standard M07-A9 [Z]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.
- [12] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Limit of pollutants in food [S].
- [13] 刘渠, 甘莉萍, 陈应坚, 等. 引起食物中毒和传染病疫情的沙门氏菌菌群分布及耐药性分析[J]. *现代预防医学*, 2007, 34(24): 4654–4656.
Liu Q, Gan LP, Chen YJ, *et al.* Analysis of the distribution and drug-resistance of *Salmonella* related to food-poisoning and communicable disease [J]. *Mod Prev Med*, 2007, 34(24): 4654–4656.
- [14] 李薇薇, 白莉, 张秀丽, 等. 中国四省份规模化肉鸡生产全过程沙门氏菌的污染状况和耐药特征研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(4): 352–357.
Li WW, Bai L, Zhang XL, *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from broiler whole production process in four provinces of China [J]. *Chin J Prev Med*, 2018, 52(4): 352–357.
- [15] 吴晓君, 王少辉, 杨登, 等. 华东地区沙门氏菌流行病学及耐药性分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2019, 27(1): 49–54.
Wu XJ, Wang SH, Yang D, *et al.* Epidemiology and antibiotic resistance of *Salmonella* species in eastern China [J]. *Chin J Animal Infect Dis*, 2019, 27(1): 49–54.
- [16] 张景皓, 杨峰, 方毅, 等. 急性感染性腹泻沙门氏菌分离株的耐药谱及其相关基因分析[J]. *检验医学*, 2018, 33(12): 1098–1103.
Zhang JH, Yang F, Fang Y, *et al.* Drug resistance profile and related genes of *Salmonella* isolated from patients with acute infectious diarrhea [J]. *Lab Med*, 2018, 33(12): 1098–1103.
- [17] Williamson DA, Lane CR, Easton M, *et al.* Increasing antimicrobial resistance in non-typhoidal *Salmonella* in Australia, 1979–2015 [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2017, 62(2): 02012–2017.
- [18] 赵翠, 张庆, 郭树源, 等. 山东省动物源沙门氏菌 MLST 和血清分型与分布研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(9): 793–799.
Zhao C, Zhang Q, Guo SY, *et al.* Distribution and typing of animal-derived *Salmonella* with MLST and serotype [J]. *Chin J Zoonose*, 2017, 33(9): 793–799.
- [19] 诸宏伟, 臧欢欢, 刘培培, 等. 肺炎克雷伯菌外排泵基因研究与耐药性的关系[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(5): 2133–2135.
Zhu HW, Zang HH, Liu PP, *et al.* Relationship between efflux pump gene and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Lab Med Clin*, 2020, 17(5): 2133–2135.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



沈 赟, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为微生物检验。
E-mail: 47048580@qq.com



侯海燕, 副主任技师, 主要研究方向为微生物检验。
E-mail: hyhou1205@126.com