

# 2015~2019 云南省伤寒、副伤寒沙门菌脉冲场凝胶电泳分子分型及耐药研究

田云屏<sup>1</sup>, 邹颜秋硕<sup>1</sup>, 任翔<sup>1</sup>, 田云峰<sup>2\*</sup>

(1. 云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022; 2. 云南省新闻出版产业技术中心, 昆明 650030)

**摘要: 目的** 了解云南省伤寒、副伤寒沙门菌脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分子分型及耐药状况。**方法** 参照中国细菌性传染病分子分型实验室监测网络 PulseNet China 的沙门菌 PFGE 分子分型方法进行分子分型。分析耐药板最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值, 根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)的相应标准得出敏感、中介、耐药(S、I、R)结果。**结果** 36株伤寒、副伤寒沙门菌呈22种PFGE带型, 有5组优势带型, 组之间菌株有明显的时间、地域同源性。对萘啶酸耐药率最高, 为55.56%, 对庆大霉素最敏感, 敏感率100%。此外有16.68%菌株对3类以上抗菌素耐药。**结论** 云南省伤寒、副伤寒沙门菌分子分型结果提示5~8月存在甲型副伤寒局部爆发, 应加强甲型副伤寒疾病的监测。云南省伤寒及副伤寒对萘啶酸耐药率最高, 对庆大霉素最敏感, 菌株存在多重耐药性。

**关键词:** 伤寒沙门菌; 副伤寒沙门菌; 脉冲场凝胶电泳; 耐药

## Study on molecular typing by pulse field gel electrophoresis and drug resistance of *Salmonella typhi* and *paratyphi* in Yunnan province from 2015 to 2019

TIAN Yun-Ping<sup>1</sup>, ZOU Yan-Qiu-Shuo<sup>1</sup>, REN Xiang<sup>1</sup>, TIAN Yun-Feng<sup>2\*</sup>

(1. Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China;  
2. Yunnan Press and Publication Industry Technology Center, Kunming 650030, China)

**ABSTRACT: Objective** To understand the molecular typing and drug resistance of *Salmonella typhi* and *paratyphoid* pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in Yunnan province. **Methods** Molecular typing was carried out by referring to the PFGE molecular typing method of *Salmonella* by PulseNet China molecular typing laboratory monitoring network for bacterial infectious diseases. The minimal inhibitory concentration(MIC)was analyzed, and the results of sensitivity (S), mediator (I) and drug resistance (R) were obtained according to the relevant standards of Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). **Results** Totally 36 strains of *Salmonella typhi* and *paratyphi* showed 22 PFGE bands and 5 groups of dominant bands, with obvious temporal and regional homology among strains. The highest resistance rate was 55.56% to nalidixic acid and the most sensitive to gentamicin with 100% sensitivity. In addition, 16.68% strains were resistant to more than 3 classes of antibiotics. **Conclusion** The results of molecular typing of *Salmonella typhi* and *paratyphoid* in Yunnan province indicate that *paratyphoid* A occurs

\*通讯作者: 田云峰, 高级工程师, 主要研究方向为计算机软件。E-mail: 504820232@qq.com

\*Corresponding author: TIAN Yun-Feng, Senior Engineer, Yunnan Press and Publication Industry Technology Center, No. 609, Huancheng West Road, Kunming City, Yunnan Province 650030, China. E-mail: 504820232@qq.com

locally from May to August, so the surveillance of *paratyphoid A* should be strengthened. Yunnan *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphoid* have the highest drug resistance rate to Nalidixic Acid (NAL) and the most sensitive to gentamicin (GEN), and the strain has multiple drug resistance.

**KEY WORDS:** *Salmonella typhi*; *Salmonella paratyphi*; pulsed field gel electrophoresis; drug resistance

## 1 引言

伤寒与副伤寒(typhoid and paratyphoid fever, TPF)是由肠沙门菌肠亚种伤寒血清型或者副伤寒甲、乙、丙血清型引起的一种临床上以发热为主要症状的急性传染病,被列为我国法定报告乙类传染病<sup>[1]</sup>。据估计,在近 2000 年的时间里,伤寒导致 2 千万疾病病例,20 万例死亡,副伤寒导致 5 百万例疾病病例<sup>[2]</sup>。云南是伤寒、副伤寒高发省份,2015~2016 我国伤寒、副伤寒平均发病率分别为 0.64/10 万、0.19/10 万,云南省伤寒、副伤寒平均发病率为 4.23/10 万、1.68/10 万<sup>[3]</sup>。

人体感染沙门菌往往是摄入了沙门菌污染的食物所致,由伤寒、副伤寒沙门菌引起的食源性疾病爆发事件不断有新的报道<sup>[4-6]</sup>。脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)被广泛应用于疾病爆发的溯源,但云南省对伤寒、副伤寒的 PFGE 分子分型研究报道较少。目前沙门菌多重耐药性问题日益严重,全球都面临挑战,耐药性问题的研究也日显迫切。本研究对云南省 2015~2019 从伤寒、副伤寒感染者及食品中分离出的 36 株伤寒、副伤寒沙门菌进行 PFGE 分子分型及耐药研究,以了解云南省伤寒、副伤寒沙门菌基因分布特点及耐药特征,以期完善相关分子分型网络数据库并对云南省伤寒、副伤寒的防控及耐药情况提供本底数据。

## 2 材料与方法

### 2.1 菌株

实验菌株分离自我省 2015~2019 年食源性疾病主动监测哨点医院沙门菌感染患者及食源性致病菌监测的食品,由 VITEK2 全自动微生物鉴定系统及质谱仪复核鉴定。PFGE 标准 Marker 菌株 H9812 由国家病原体监测网络 TraNetChina 提供。耐药实验质控菌株粪肠球菌 ATCC 29212、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠杆菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853(中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心)。

### 2.2 培养基及试剂

HE(hekton enteric agar)培养基、营养琼脂培养基(北京陆桥技术股份有限公司); VITEK2 GN 鉴定卡(法国 BioMerieux 公司); 沙门菌诊断血清(丹麦 Statens Serum Institut 公司); 限制性内切酶 XbaI(日本 TaKaRa BIO INC 公司); 金胶 Seakem

Gold Agarose(美国 Lonza Rockland 公司); 蛋白酶 K(38 U/mL, 德国 MERCK 公司); Tris-HCl、乙二醇四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(分析纯, 美国 Solarbio 公司); Gelred 染料(美国 BIOTIUM 公司); 革兰氏阴性需氧菌耐药板[含 15 种抗生素: 环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、萘啶酸(nalidixic acid, NAL)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、四环素(tetracycline, TET)、庆大霉素(gentamicin, GEN)、头孢噻肟(cefotaxime, CTX)、头孢西丁(cefepime, CFX)、头孢他啶(cefazidime, CAZ)、头孢唑林(cefazolin, CFZ)、氨苄西林(ampicillin, AMP)、氨苄舒(ammonia benzyl shu, AMS)、亚胺培南(imipenem, IMP)、阿奇霉素(azithromycin, AZM)、红霉素(erythromycin, ERY)、复方磺胺(compound sulfa, SXT), 中国上海星佰生物技术有限公司]。

### 2.3 仪器设备

VITEK2 全自动微生物分析系统(法国 BioMerieux 公司); Autoflex Speed 质谱仪(美国 Bruker 公司); DSHZ-300A 水浴摇床(中国太仓市实验设备厂); CHEF-MAPPER 脉冲场凝胶电泳仪及凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

### 2.4 实验方法

#### 2.4.1 菌株及血清学鉴定

所有分离到的沙门菌菌株用 VITEK2 全自动微生物分析系统及质谱仪进行复核确认。依据沙门菌血清型属 White-Kauffmann-Le Minor 抗原表<sup>[7]</sup>, 用沙门菌血清型属诊断血清确定血清型。

#### 2.4.2 脉冲场凝胶电泳分型

参照中国细菌性传染病分子分型实验室监测网络 PulseNetChina 的沙门菌 PFGE 分子分型方法<sup>[8]</sup>, 用 SeaKem Glod Agarose 将沙门菌包埋, 用 Xba I 酶切, 把得到的 DNA 片段用 CHEF-MAPPER 进行脉冲场凝胶电泳分型, 最后将成像结果用 Bionumerics 7.6 软件聚类分析。

#### 2.4.3 耐药实验

用肉眼判读的方法对耐药板进行读数, 由说明书分析得出最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值, 并根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)的相应标准获得相应敏感(S)、中度敏感(I)、和耐药(R)的结果<sup>[8]</sup>。每次实验均采用国际标准株 ATCC 29212、ATCC 29213、ATCC 25922、ATCC 27853 作质控对照。

### 3 结果与分析

#### 3.1 PFGE 分子分型结果

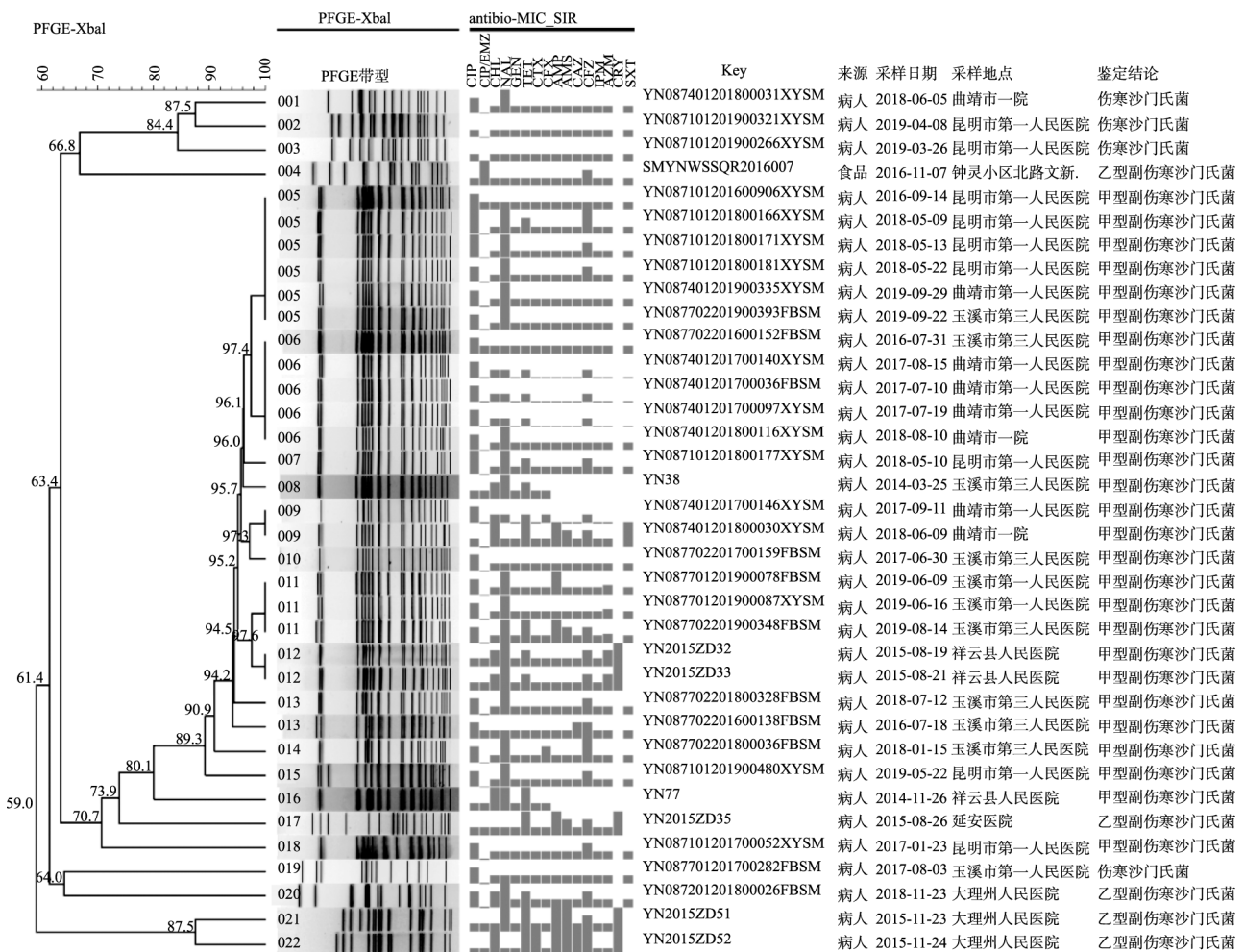
将 36 株伤寒、副伤寒沙门菌用 *Xba* I 酶切, 进行脉冲场电泳后, 进行聚类分析。按照 100% 的相似度, 36 株伤寒、副伤寒沙门菌共分成 22 种 PFGE 带型, 分别命名为 001-022。其中 5 种 PFGE 带型: 005、006、009、011、012, 分别含有 6、5、2、3、2 株菌, 每组菌株之间同源性均是 100%。同源性为 100% 的 5 组菌所包含的菌株都是甲型副伤寒沙门菌, 按照 Tenover 等<sup>[9]</sup> 的分类原则, 这些菌株分属 5 个克隆系, 占全部菌株的 50%(18/36)。聚类分析结果还显示 5~8 月分离的菌株数最多: 带型 005 的 6 株菌, 有 5 株分离自昆明市第一人民医院, 其中 3 株采样于 2018 年 5 月; 带型 006 的 5 株菌, 有 4 株分离自曲靖市第一人民医

院, 其中 3 株采样于 2017 年 7~8 月, 且耐药谱相同; 带型 011 的 3 株菌均分离自玉溪地区, 采样时间为 2019 年 6~8 月; 这些菌株间有明显的时间、地域等聚集性, 提示可能这些地区曾发生过相关基因型菌株引起的疾病流行。具体见图 1。

#### 3.2 耐药实验结果

##### 3.2.1 15 种抗生素耐药情况

将 36 株伤寒及副伤寒沙门菌同时进行 15 种抗生素的耐药实验。36 株伤寒及副伤寒沙门菌对 15 种抗生素不同程度分为耐药(R)、中介(I)、敏感(S)。有 20 株对萘啶酸耐药。分别有 22、15 株对环丙沙星、头孢唑林中介。36 株均对庆大霉素敏感, 敏感率为 100%。35 株对头孢噻肟、头孢西丁敏感, 此外 34 株则对亚胺培南敏感, 见图 2。



注: 1. 耐药谱中, 高方块为耐药, 中方块为中度敏感, 低方块为敏感。

图 1 36 株伤寒及副伤寒沙门菌聚类分析及耐药谱图

Fig.1 Cluster analysis and drug resistance profiles of 36 strains of *Salmonella typhi* and *paratyphi*

3.2.2 抗生素耐药率

通过对 15 种抗生素的耐药实验显示, 36 株伤寒及副伤寒沙门菌对萘啶酸耐药率最高, 为 55.56%。耐药率排第二、第三位的是氨苄西林、四环素, 耐药率分别为 18.75%、16.67%, 红霉素耐药率排列第四, 为 15.63%, 由此看出云南省耐药率

最高的是喹咯酮类药物, 其次是内酰胺类药物。见图 3。

3.2.3 多重耐药情况

36 株伤寒、副伤寒沙门菌中 6 株对 3 类以上抗菌素耐药, 多重耐药菌株(multidrug-resistant, MDR)占总菌株的 16.68%, 其中 1 株对 8 种抗生素耐药, 见表 1。

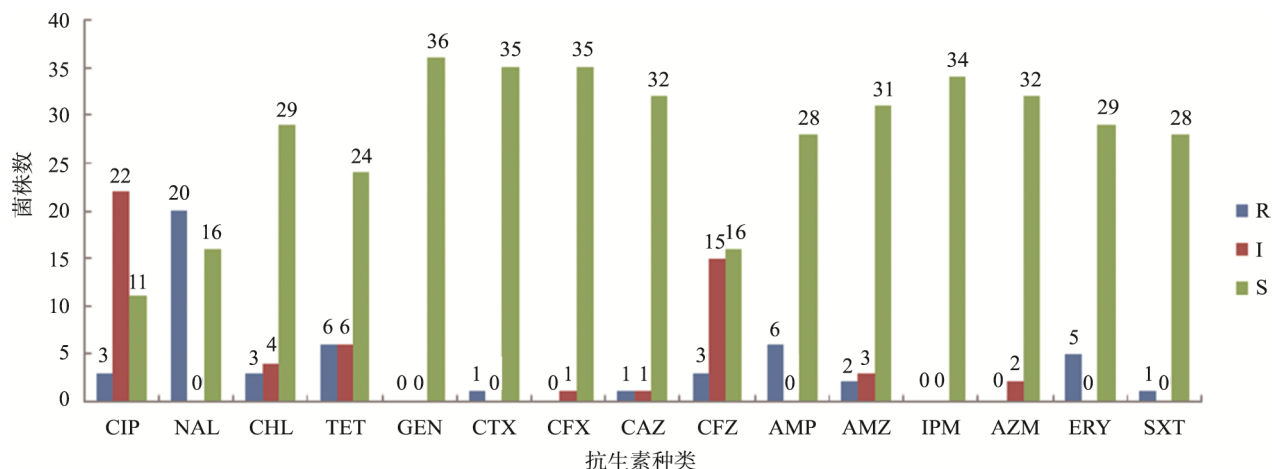


图 2 36 株伤寒、副伤寒沙门菌耐药分析结果

Fig.2 Results of drug resistance analysis of 36 strains of *Salmonella typhi* and *paratyphi*

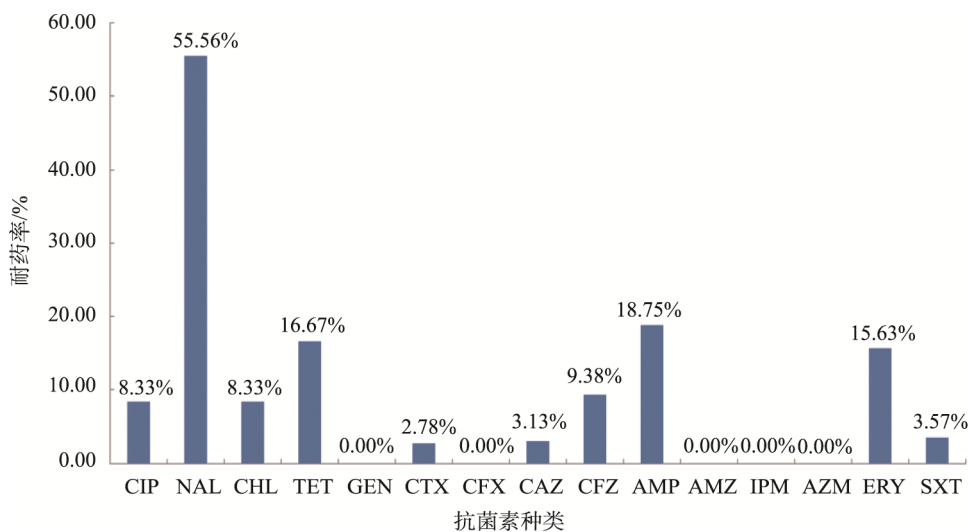


图 3 36 株伤寒、副伤寒沙门菌抗菌素耐药率

Fig.3 Drug resistance rate of 36 strains of *Salmonella typhi* and *paratyphi*

表 1 36 株伤寒、副伤寒沙门菌多重耐药结果

Table 1 Results of multiple drug resistance of 36 strains of *Salmonella typhi* and *paratyphi*

同时耐药种类	耐药谱	菌株数	占比/%
3 类	TET+NAL+CHL	1	2.78
	TET+NAL+AMP	1	2.78
	TET+AMP+ERY	1	2.78
4 类	TET+AMP+CHL+SXT	1	2.78
	TET+AMP+ERY+AMZ+NAL	1	2.78
5 类	TET+AMP+ERY+AMZ+CHL+CTX+CFZ+CAZ	1	2.78
合计		6	16.68

## 4 结论与讨论

目前 PFGE 是国际上公认的食物源性传染病暴发流行确认的重要手段<sup>[10]</sup>, 被推荐为多种致病菌分子分型的金标准<sup>[11]</sup>。对云南省 2015~2019 年分离到的 36 株伤寒、副伤寒进行 PFGE 分子分型研究, 结果揭示:(1)优势带型 005、006、011、012 主要分离自昆明、曲靖、玉溪、大理地区, 提示这些菌株有可能是当地流行的基因型菌株。(2)优势带型 005、006、011、012 菌株都是甲型副伤寒, 张静<sup>[12]</sup>报道了全球范围伤寒或副伤寒流行与菌株的优势血清型有关, 所以甲型副伤寒沙门应该是云南省流行的主要血清型, 故需加强对甲型副伤寒沙门菌的监测。(3)优势带型 005、006、011、012 菌株间有明显的时间、地域聚集性, 提示云南省局部地区存在甲型副伤寒沙门菌的局部爆发流行。(4)云南省伤寒、副伤寒发病高峰是 5~8 月。随着传染病综合防治措施的落实, 我国伤寒、副伤寒的发病率呈逐年下降趋势<sup>[13,14]</sup>, 但其仍然是严重危害人民健康的肠道传染病之一, 造成的疾病负担仍然不容忽视<sup>[15]</sup>。

云南省 36 株伤寒及副伤寒沙门菌, 对萘啶酸的耐药率最高, 为 55.56%, 这与江苏、浙江<sup>[4,16,17]</sup>等地报道相同, 但比江苏(100%)、浙江(100%)两省低; 36 株伤寒、副伤寒沙门菌对庆大霉素敏感率 100%, 这与我国其他地区相关报道不尽相同<sup>[18-20]</sup>。该结果提示我国伤寒、副伤寒沙门菌可能普遍对萘啶酸耐药, 在治疗伤寒、副伤寒沙门菌时, 应特别关注对喹诺酮类药物的耐药问题; 云南省 36 株伤寒及副伤寒沙门菌, 对环丙沙星中介的菌株数最多, 与云南省肠炎、德尔比沙门菌相同<sup>[8]</sup>, 提示云南省沙门菌对环丙沙星中介率高, 应防止环丙沙星成为新的耐药抗菌素。近年来, 在抗生素的选择压力下, 沙门菌耐药现象日趋严重<sup>[21]</sup>, 对临床使用的 3 类或 3 类以上抗菌药物同时呈现耐药的多重耐药菌株(multidrug-resistant, MDR)<sup>[22]</sup>日益增多, 本次研究也对云南省伤寒、副伤寒沙门菌多重耐药菌株的耐药谱进行了报道, 这些研究结果可对云南省伤寒及副伤寒的用药选择、缩短伤寒及副伤寒病程、降低并发症和死亡率有一定的意义。

## 参考文献

- [1] 卫生部疾病预防控制局. 中国疾病预防控制中心. 伤寒副伤寒防治手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.  
Disease Prevention and Control Bureau of the Ministry of Health. Chinese Center for Disease Control and Prevention. Manual on prevention and treatment of typhoid and paratyphoid [M]. Beijing: People's Health Press, 2006.
- [2] Dobinson HC, Gibani MM, Jones CA, et al. Evaluation of the clinical and microbiological response to *Salmonella paratyphi* A infection in the first paratyphoid human challenge model [J]. Clin Infect Dis, 2017, 64(8): 1066-1073.
- [3] 阳波, 张静, 刘凤凤, 等. 2015-2016 年全国和高发省份副伤寒、副伤寒流行病学分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(5): 407-412.  
Yang B, Zhang J, Liu FF, et al. Epidemiological analysis of national and high typhoid and paratyphoid fever during 2015-2016 [J]. Dis Surveill, 2018, 33(5): 407-412.
- [4] 顾敏华, 姚建香, 刘晓骏, 等. 一起食源性伤寒暴发疫情的耐药分析和分子分型[J]. 医学动物防制, 2019, 35(11): 1033-1036.  
Gu MH, Yao JX, Liu XJ, et al. Drug resistance analysis and molecular typing of an outbreak of foodborne typhoid fever [J]. J Med Pest Control, 2019, 35(11): 1033-1036.
- [5] 刘玉霞, 李红叶, 王炳全, 等. 甲型/乙型副伤寒疫情交叉暴发的病原分析[J]. 疾病监测, 2019, 34(8): 721-724.  
Liu YX, Li HY, Wang BQ, et al. Pathogen analysis of A/B paratyphoid epidemic cross outbreak [J]. Dis Surveill, 2019, 34(8): 721-724.
- [6] 王树坤, 王志刚, 张晓和, 等. 云南省元江县 2010—2011 年一起甲型副伤寒暴发调查与处置[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(2): 200-204.  
Wang SK, Wang ZG, Zhang XH, et al. Investigation and treatment of an outbreak of paratyphoid A in Yuanjiang county, Yunnan province from 2010 to 2011 [J]. Chin J Epidemiol, 2017, 38(2): 200-204.
- [7] 朱超, 许学斌. 沙门氏菌属血清型诊断[M]. 上海: 同济大学出版社, 2009.  
Zhu C, Xu XB. Serotype diagnosis of *Salmonella* [M]. Shanghai: Tongji University Press, 2009.
- [8] 田云屏, 任翔, 邹颜秋, 等. 云南省肠炎沙门菌及德尔卑沙门菌脉冲场凝胶电泳分子分型及耐药性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(22): 7707-7714.  
Tian YP, Ren X, Zou YQS, et al. Molecular typing and drug resistance of *Salmonella enteritis* and *Salmonella derby* pulse-field gel electrophoresis in Yunnan province [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(22): 7707-7714.
- [9] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, 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.
- [10] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状[J]. 疾病监测, 2006, 21(5): 276-279.  
Wang LL, Xu JG. Application status of pulse field gel electrophoresis (PFGE) in molecular typing [J]. Dis Surveill, 2006, 21(5): 276-279.
- [11] Gerner SP, Kincaid J, Kubota K, et al. Molecular surveillance of *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* O157 by Pulse Net USA [J]. J Food Prot, 2005, 68(9): 1926-1931.
- [12] 张静. 伤寒副伤寒干预方法与实践[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2015.  
Zhang J. Intervention methods and practice of typhoid and paratyphoid [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2015.
- [13] John J, Van-Aart CJ, Grassly NC. The burden of typhoid and paratyphoid in India: Systematic review and meta analysis [J]. PLoS Neglect Trop Dis, 2016, 10(4): 1-14.
- [14] 伏晓庆, 古文鹏, 尹建雯, 等. 云南省 2003-2012 年伤寒副伤寒流行特征分析[J]. 现代预防医学, 2014, 41(14): 2497-2499, 2502.  
Fu XQ, Gu WP, Yin JW, et al. The epidemic characteristics of typhoid and paratyphoid in Yunnan province from 2003 to 2012 [J]. Mod Prev Med, 2014, 41(14): 2497-2499, 2502.
- [15] 刘亚华. 2004-2013 年南通市通州区伤寒副伤寒流行病学分析[J]. 职

- 业与健康, 2014, 30(20): 2983-2985.
- Liu YH. Epidemiological analysis of typhoid and paratyphoid in Tongzhou district, Nantong city, 2004-2013 [J]. J Occup Health, 2014, 30(20): 2983-2985.
- [16] 庄菱, 张永杰, 唐震, 等. 江苏省伤寒/副伤寒流行现况、菌株耐药及其分子分型[J]. 中华流行病学杂志 2012, 33(12): 1269-1272.
- Zhuang L, Zhang YJ, Tang Z, et al. Prevalence of typhoid/paratyphoid fever, strain resistance and molecular typing in Jiangsu province [J]. Chin J Eideimil, 2012, 33(12): 1269-1272.
- [17] 罗芸, 叶菊莲, 徐宝祥, 等. 浙江省伤寒副伤寒沙门菌耐药及分子分型[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(3): 328-330.
- Luo Y, YE JL, Xu BX, et al. Drug resistance and molecular typing of *Salmonella typhimurium* in Zhejiang province [J]. Chin J Publ Health, 2010, 26(3): 328-330.
- [18] 游旅, 韦小瑜, 马青, 等. 2005 - 2009 年贵州省伤寒和副伤寒沙门菌耐药性分析[J]. 医学动物防制, 2011, 27(8): 687-690.
- You L, Wei XY, Ma Q, et al. Resistance analysis of *Salmonella typhi* and *paratyphoid* in Guizhou from 2005 to 2009 [J]. J Med Pest Control, 2011, 27(8): 687-690.
- [19] 张新, 曲梅, 钱海坤, 等. 2008 -2013 年北京市 17 株伤寒和副伤寒沙门菌耐药和分子分型研究[J]. 职业与健康, 2015, 31(12): 1614-1617.
- Zhang X, Qu M, Qian HK, et al. Study on drug resistance and molecular typing of 17 strains of *Salmonella typhi* and *paratyphi* in Beijing from 2008 to 2013 [J]. J Occup Health, 2015, 31(12): 1614-1617.
- [20] 张雯霞, 陈敏, 张曦, 等. 2008 年 - 2010 年上海市部分伤寒副伤寒沙门菌耐药分析及分子分型[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(2): 285-289.
- Zhang WX, Chen M, Zhang X, et al. Drug resistance analysis and molecular typing of *Salmonella typhi* in Shanghai from 2008 to 2010 [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(2): 285-289.
- [21] 闫梅英, 梁未丽, 李伟, 等. 1995-2004 年全国伤寒副伤寒的流行分析[J]. 疾病监测, 2005, 20(8): 401-403.
- Yan MY, Liang WL, Li W, et al. Epidemic analysis of typhoid and paratyphoid in China from 1995 to 2004 [J]. Dis Surveill, 2005, 20(8): 401-403.
- [22] 卫生部. 多重耐药菌医院感染预防与控制技术指南(试行)[Z]. 2011. Ministry of Health. Technical guidelines for the prevention and control of nosocomial infections with multidrug-resistant bacteria (trial) [Z]. 2011.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介

田云屏, 主任技师, 主要研究方向为食品微生物检验。

E-mail: tian-yunping@hotmail.com

田云峰, 高级工程师, 主要研究方向为计算机软件研究。

E-mail: 504820232@qq.com