

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.04.001

· 论 著 ·

## 临床分离非伤寒沙门菌耐药性及对头孢曲松耐药机制

师 伟, 夏琳林, 刘晓霞, 韩双羽, 杨 杰, 赵 展, 王玉宝

(天津医科大学第二医院感染性疾病研究所, 天津 300211)

**[摘要]** 目的 了解临床分离非伤寒沙门菌(NTS)耐药情况及对头孢曲松的耐药机制,为防治 NTS 感染与合理使用抗菌药物提供依据。**方法** 选取 2014 年 5—10 月天津医科大学第二医院和天津医科大学总医院肠道门诊急性腹泻患者粪便标本分离的 108 株 NTS, 对其进行药敏试验; 对头孢曲松不敏感的 NTS 进行血清学分型、多位点序列分型(MLST)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型以及超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)和 AmpC 基因检测。**结果** 108 株 NTS 对 11 种抗菌药物的单药耐药率为 49.07%(53 株), 多重耐药率为 17.59%。对萘啶酸、左氧氟沙星、环丙沙星、头孢曲松和厄他培南的敏感率依次为 61.11%、66.67%、68.52%、97.22% 和 100.00%。共检出 3 株 NTS 对头孢曲松不敏感, 其中 2 株为 ST11 型肠炎血清型(Sa8709、Sa8771), 1 株为 ST34 型鼠伤寒血清型(Sa8763)。PFGE 聚类分析显示, Sa8709 和 Sa8771 菌株相似度较高(91.70%), 但与 Sa8763 菌株相似度较低, 为 55.80%; Sa8709 菌株携带 CTX-M 基因, Sa8771 菌株携带 CTX-M 和 TEM 基因, Sa8763 菌株携带 OXA 基因。**结论** 该地区临床分离 NTS 对氟喹诺酮类抗菌药物敏感率不高, 出现了携带 ESBLs 基因的多重耐药菌株。

**[关键词]** 非伤寒沙门菌; 多位点序列分型; 脉冲场凝胶电泳; 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶; 氟喹诺酮; 抗药性, 微生物; 耐药性

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2 R378.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)04-0217-05

## Antimicrobial resistance and mechanisms of ceftriaxone resistance in clinically isolated nontyphoidal *Salmonella*

SHI Wei, XIA Lin-lin, LIU Xiao-xia, HAN Shuang-yu, YANG Jie, ZHAO Zhan, WANG Yu-bao (Institute of Infectious Diseases, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate antimicrobial resistance and ceftriaxone resistance mechanisms in clinically isolated nontyphoidal *Salmonella*(NTS), and provide evidence for the prevention and control of NTS infection and rational use of antimicrobial agents. **Methods** 108 NTS isolates were isolated from stool specimens of outpatients with acute diarrhea in the Second Hospital of Tianjin Medical University and Tianjin Medical University General Hospital from May to October of 2014, NTS were performed antimicrobial susceptibility testing; non-ceftriaxone-susceptible isolates were typed by serological, multilocus sequence (MLST), and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) methods, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) detection and AmpC genes were detection. **Results** Among 108 NTS isolates, mono-drug resistance rate to 11 antimicrobial agents was 49.07% ( $n=53$ ), multidrug resistance rate was 17.59%. Susceptibility rates to nalidixic acid, levofloxacin, ciprofloxacin, ceftriaxone, and ertapenem were 61.11%, 66.67%, 68.52%, 97.22%, and 100.00% respectively. Three non-ceftriaxone-susceptible NTS isolates were detected, 2 were ST11 *Salmonella enterica* serotype (Sa8709, Sa8771), 1 was ST34 *Salmonella typhimurium* serotype (Sa8763). Cluster analysis of PFGE revealed that Sa8709 was highly similar to Sa8771 strains (91.70%), but the similarity to Sa8763 was low (55.80%); Sa8709 strain carried CTX-M gene, Sa8771 strain carried CTX-M

[收稿日期] 2015-12-25

[基金项目] 天津市卫生局科研基金资助项目(2013KZ112)

[作者简介] 师伟(1986-),男(汉族),河北省张家口市人,硕士研究生,主要从事细菌耐药及致病机制研究。

[通信作者] 王玉宝 E-mail: wyb2046@163.com

and TEM genes, Sa8763 strain carried OXA gene. **Conclusion** Clinically isolated NTS in this area are low resistant to fluoroquinolones, multidrug resistant strains carrying ESBLs have emerged.

**[Key words]** nontyphoidal *Salmonella*; multilocus sequence typing; pulsed-field gel electrophoresis; extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; fluoroquinolone; drug resistance, microbial; drug resistance

[Chin J Infect Control, 2016, 15(4): 217-221]

全球非伤寒沙门菌(nontyphoidal *Salmonella*, NTS)感染呈现普遍上升趋势,美国每年约有 100 万例患者感染 NTS<sup>[1]</sup>,我国每年因 NTS 感染所致急性腹泻患者约 823.5 万例<sup>[2]</sup>。NTS 主要引起急性胃肠炎,约 6% 的患者可发展为败血症而威胁生命<sup>[3]</sup>。NTS 是细胞内生存菌,某些抗菌药物虽然对其有体外活性但无临床疗效,可供临床选用的药物主要包括氨基苄西林、复方磺胺甲噁唑、氟喹诺酮类(FQs)和头孢曲松等。近年来,NTS 对抗菌药物耐药率明显上升,美国疾病控制与预防中心(CDC)将 NTS 耐药威胁列为“严重”级别。近期国内少有临床分离 NTS 对抗菌药物耐药监测报道,本研究开展临床分离 NTS 的耐药监测,以及对头孢曲松耐药机制的初步探讨,为 NTS 感染防治和临床合理使用抗菌药物提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取 2014 年 5—10 月天津医科大学第二医院和天津医科大学总医院肠道门诊的急性腹泻患者粪便标本分离的 108 株非重复 NTS。按照《食品卫生检验方法微生物学部分》GB/4789-2010 中肠道致病菌检验方法进行分离培养,API 20 E 试纸条进行生化鉴定。

1.2 药敏试验 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2013 年抗微生物药物敏感性试验执行标准中 K-B 纸片扩散法和微量肉汤稀释法进行药敏试验<sup>[4]</sup>。药敏纸片包括氨基苄西林、四环素、氯霉素、复方磺胺甲噁唑、链霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、萘啶酸、头孢曲松、头孢他啶和厄他培南 11 种抗菌药物。厄他培南药敏纸片由赛默飞世尔科技有限公司提供,其余均购自北京天坛药物生物技术开发公司。质控菌株为本研究所保存的大肠埃希菌 ATCC 25922。多重耐药<sup>[5]</sup>为对 3 类或 3 类以上抗菌药物耐药。

1.3 对头孢曲松不敏感 NTS 菌株的相关检测

1.3.1 血清学分型 沙门菌血清诊断试剂盒为丹麦国立血清研究所产品,参照试剂盒说明书步骤和

食品安全国家标准中食品微生物学检验沙门菌方法(GB/T4789.4-2010),根据测定得到的抗原结果,比对 Kauffmann-White 抗原表确定菌株的血清型<sup>[6]</sup>。

1.3.2 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型 PFGE 分型按照美国 CDC 推荐的分型方案进行,PFGE 成像结果采用 BioNumerics 软件进行聚类分析。分型标准质控菌株为布伦登卢普沙门菌 H9812。

1.3.3 多位点序列分型(MLST) 将 MLST 网站(<http://mlst.ucc.ie>)上公布的沙门菌属的 7 个管家基因(*thrA*、*purE*、*sucA*、*hisD*、*aroC*、*hemD*、*dnaN*)作为本实验的目的基因,采用煮沸法提取细菌 DNA 模板,PCR 反应体系及反应条件参照文献<sup>[6]</sup>。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,测序由英潍捷基技术有限公司进行。测序结果提交至 MLST 网站,得到菌株的等位基因谱和对应的 ST 分型。

1.3.4 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)和 AmpC 基因检测 选取对头孢曲松不敏感的 NTS 菌株(Sa8709、Sa8771、Sa8763)和敏感菌株(Sa8690)进行 ESBLs 基因(*CTX-M*、*TEM*、*SHV*、*OXA*)及 AmpC 基因(*CMY*、*ACC* 进行)检测,引物序列、PCR 反应体系和条件参照文献<sup>[7]</sup>。对 PCR 扩增阳性产物进行测序分析,以确保扩增产物的特异性和准确性,用敏感菌株 Sa8690 作为阴性质控。合成引物与测序公司同前。

## 2 结果

2.1 NTS 基本情况 共分离 108 株非重复 NTS,其中 88 株来自天津医科大学第二医院,20 株来自天津医科大学总医院。患者平均年龄 36.6(17~88)岁;男性 66 例(61.11%),女性 42 例(38.89%)。

2.2 NTS 药敏结果 108 株 NTS 对 11 种抗菌药物的单药耐药率为 49.07%(53/108),多重耐药率为 17.59%(19/108)。对萘啶酸、左氧氟沙星、环丙沙星、头孢曲松和厄他培南的敏感率依次为 61.11%、66.67%、68.52%、97.22%和 100.00%。详见表 1。

表 1 108 株 NTS 对 11 种抗菌药物的药敏结果

Table 1 Antimicrobial susceptibility testing results of 108 NTS isolates to 11 kinds of antimicrobial agents

抗菌药物	敏感(S)		中介(I)		耐药(R)	
	株数	率(%)	株数	率(%)	株数	率(%)
氨苄西林	80	74.07	1	0.93	27	25.00
头孢他啶	107	99.07	1	0.93	0	0.00
头孢曲松	105	97.22	1	0.93	2	1.85
厄他培南	108	100.00	0	0.00	0	0.00
链霉素	56	51.85	27	25.00	25	23.15
四环素	87	80.55	3	2.78	18	16.67
氯霉素	98	90.74	0	0.00	10	9.26
左氧氟沙星	72	66.67	33	30.55	3	2.78
环丙沙星	74	68.52	32	29.63	2	1.85
萘啶酸	66	61.11	0	0.00	42	38.89
复方磺胺甲噁唑	96	88.89	0	0.00	12	11.11

2.3 对头孢曲松不敏感的 NTS 菌株

2.3.1 基本情况 共有 3 株 NTS 对头孢曲松不敏感,均为 MDR 菌株,其中 2 株耐药菌株为 Sa8709 和 Sa8771,1 株中介为 Sa8763。Sa8709 菌株分离自天津医科大学第二医院,对氨苄西林、萘啶酸、头孢曲松耐药,对环丙沙星中介耐药;Sa8771 菌株分离自天津医科大学总医院,对氨苄西林、链霉素、萘啶酸、头孢曲松、头孢他啶耐药,对环丙沙星和左氧氟沙星中介;Sa8763 菌株分离自天津医科大学总医院,对头孢曲松中介,对氨苄西林、萘啶酸、左氧氟沙星、环丙沙星、氯霉素、四环素耐药。

2.3.2 血清学分型结果 耐药菌株 Sa8709 和 Sa8771 均为肠炎血清型(*Salmonella enterica*),中介耐药菌株 Sa8763 为鼠伤寒血清型(*typhimurium Salmonella*)。

2.3.3 PFGE 分型结果 聚类分析显示,3 株对头孢曲松不敏感 NTS 菌株的 PFGE 带型不同,Sa8709 和 Sa8771 菌株相似度较高,为 91.70%;Sa8709 和 Sa8771 菌株与 Sa8763 菌株相似度较低,为 55.80%。见图 1。

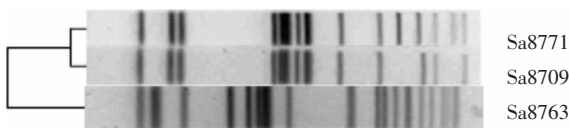


Figure 1 Clustering analysis of PFGE of 3 non-ceftriaxone-susceptible NTS isolates

2.3.4 MLST 结果 Sa8709、Sa8771 和 Sa8763 菌株均能扩增出预期长度的 7 个管家基因 DNA 片段。见图 2。将测序结果提交至 MLST 网站数据库进行比对,显示 Sa8709 和 Sa8771 菌株的 7 个管家基因 *aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA*、*thrA* 的等位基因谱依次均为 5、2、3、7、6、6、11,对应的 MLST 分型均为 ST11 型;Sa8763 菌株的等位基因谱依次为 10、19、12、9、5、9、2,对应的分型是 ST34 型。

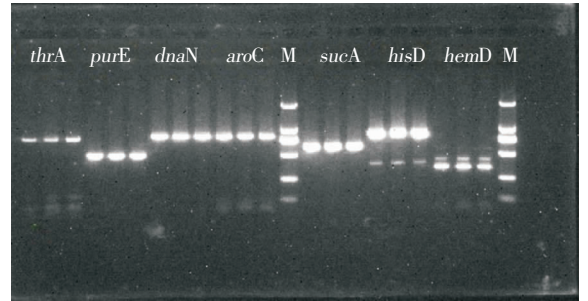
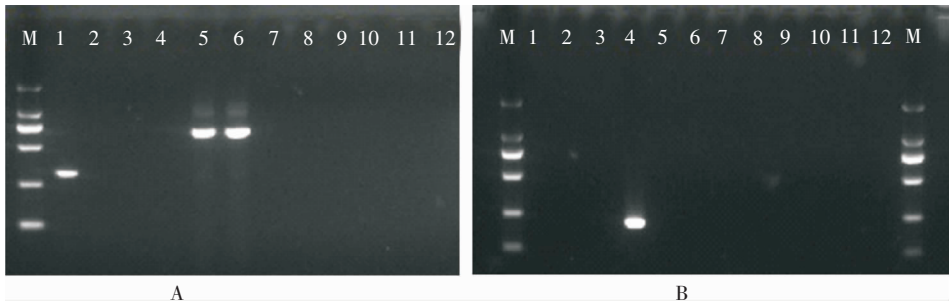


Figure 2 Electrophoresis results of PCR products of 7 housekeeping genes in 3 non-ceftriaxone-susceptible NTS isolates

Figure 2 3 株对头孢曲松不敏感 NTS 7 个管家基因 PCR 产物电泳图

Figure 2 Electrophoresis results of PCR products of 7 housekeeping genes in 3 non-ceftriaxone-susceptible NTS isolates

2.3.5 ESBLs 和 AmpC 基因检测结果 Sa8709、Sa8771 菌株 CTX-M 基因,Sa8771 菌株 TEM 基因,Sa8763 菌株 OXA 基因均扩增到符合预期长度的基因片段。测序结果显示,Sa8709、Sa8771 菌株的 CTX-M 基因片段序列与肠炎沙门菌 Hd63 的 CTX-M 序列(GenBank NO. NG 036027)相似性为 99%;Sa8771 菌株的 TEM 基因片段序列与肠炎沙门菌 D7795 的 TEM 序列(GenBank NO. LN879484)相似性为 100%;Sa8763 菌株 OXA 基因片段序列与鼠伤寒沙门菌 ST0653 的 OXA 序列(GenBank NO. KT 334335)相似性为 98%。阴性对照 Sa8690 菌株未扩增出上述任何耐药基因。见图 3。



M: DNA 分子量标志物 DL2000, 从上到下条带大小依次为: 2 000、1 000、750、500、200 和 100 bp; 图 A 1—4、5—8、9—12 泳道分别为 *TEM*、*CTX-M*、*SHV* 基因扩增结果, 图 B 1—4、5—8、9—12 泳道分别为 *OXA*、*CMY* 和 *ACC* 基因扩增结果; 上述基因预期产物长度分别为 311、550、768、198、475、179 bp; 每个基因对应的菌株从左至右依次为 Sa8771、Sa8709、Sa8690 和 Sa8763 菌株, Sa8690 菌株为阴性对照

图 3 ESBLs 和 AmpC 基因 PCR 产物电泳图

Figure 3 Electrophoresis results of PCR products of ESBLs and AmpC genes

### 3 讨论

NTS 与伤寒沙门菌不同, 主要引起自限性胃肠炎, 但是部分患者可出现严重并发症, 如败血症、局灶感染等, 幼儿、老人、免疫功能低下以及有血管内植入物等患者是高风险人群。美国每年因 NTS 感染导致约 2 万例住院患者, 以及近 400 例患者因此而死亡<sup>[1]</sup>。FQs 被认为是经验治疗 NTS 感染非常有效的药物, 但是在某些地区耐药率明显上升<sup>[3]</sup>。近年来, 发现若 NTS 对萘啶酸耐药, 会导致 FQs 临床治疗失败或者反应延迟, 故 FQs 不适用于萘啶酸耐药的 NTS 感染<sup>[4]</sup>。2013 年美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 标准指出, 萘啶酸耐药可用于预测 FQs 耐药或者敏感性降低, 并且为了更好地反映临床疗效, 采用新的标准判定环丙沙星和左氧氟沙星对 NTS 的敏感性, 部分既往判断为敏感的菌株按照新标准会判定为中介<sup>[4]</sup>。本研究发现, 本地区 NTS 对萘啶酸的耐药率达 38.89%, 对环丙沙星和左氧氟沙星的敏感率仅为 68.52% 和 66.67%。国内多个地区前期报道显示, NTS 对萘啶酸的耐药率较高, 约为 45%~85%<sup>[8-10]</sup>。以上数据提示我国临床 NTS 对 FQs 敏感性降低的菌株比例较高, 并且涉及多个地区, 因此应考虑重新评估 FQs 在我国是否仍适用于经验治疗 NTS 感染。

头孢曲松是治疗 NTS 感染非常重要的替代药物, 虽然临床分离 NTS 对头孢曲松耐药比率仍较低, 但是呈现上升趋势。2014 年 CHINET<sup>[11]</sup> 对来自 17 所教学医院的菌株检测发现, 肠炎血清型沙门

菌和鼠伤寒血清型沙门菌对头孢曲松的耐药率分别为 10.60% 和 11.40%。NTS 对头孢曲松耐药的主要机制是携带 ESBLs 基因 (*CTX-M*、*TEM*、*SHV* 和 *OXA* 等) 和/或 AmpC 基因 (*CMY* 和 *ACC* 等)<sup>[12-14]</sup>。PCR 扩增和序列分析表明, 本研究中 3 株对头孢曲松耐药的 NTS, 其中 1 株携带 *CTX-M* 基因, 1 株同时携带 *CTX-M* 和 *TEM* 基因, 1 株中介菌株携带 *OXA* 基因, 均属于 ESBLs 基因; 未检出 *AmpC* 基因。值得关注的是, 肠炎型和鼠伤寒型 NTS 是引起人体感染的主要血清型, 并且常导致暴发。本地区曾有肠炎血清型 ST11 型沙门菌造成感染暴发的报道<sup>[5]</sup>。本研究中对头孢曲松耐药或中介菌株为肠炎型和鼠伤寒型 NTS, 不仅对头孢曲松不敏感, 而且对 FQs 耐药或中介, 若引起感染暴发, 则治疗将更为困难, 危害更加严重。

PFGE 是目前细菌基因分型的“金标准”, 而 MLST 分型则能够反映菌株之间的进化和亲缘关系。本研究中对头孢曲松耐药 NTS 菌株 (Sa8709、Sa8771) 为肠炎血清型, 其 PFGE 谱型不同, 属于不同的克隆株, 但二者均为肠炎血清型 ST11 型, 说明在遗传学上有关联, 而且 PFGE 谱型相似度较高为 91.70%, 提示可能由同一克隆株进化而来。

本地区临床分离 NTS 菌株对复方磺胺甲噁唑、氯霉素的敏感率较高, 可能与这些药物较少使用有关。近年来, 阿奇霉素被发现对 NTS 有较好的临床疗效, 但是已开始有耐药菌株的报道。特别强调的是, NTS 感染大部分为自限性, 仅高危患者才需要使用抗菌药物治疗, 临床医生应把握适宜指征。NTS 感染主要是食源性, 畜牧养殖业也应该尽量减

少使用不必要的抗菌药物,其为抗菌药物合理使用中不可缺少的组成部分。

综上所述,本地区临床分离 NTS 对 FQs 敏感率不高,出现了携带 ESBLs 基因的 MDR 菌株,应高度重视抗菌药物在各个行业的合理应用,并需要更为广泛深入的监测与研究。

致谢:感谢中国疾病预防控制中心腹泻病研究室和天津医科大学总医院感染性疾病科对本研究提供的大力支持和帮助。

#### [参 考 文 献]

[1] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens[J]. Emerg Infect Dis, 2011,17(1):7-15.

[2] 毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅.用文献综述法估计我国食源性非伤寒沙门氏菌病疾病负担[J].中华疾病控制杂志,2011,15(7):622-625.

[3] Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, et al. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2015,28(4):901-937.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-three informational supplement [S]. CLSI document, M100-S23, 2013.

[5] 李春辉,吴安华.医疗机构耐药菌 MDR、XDR、PDR 的国际标准化定义专家建议(草案)[J].中国感染控制杂志,2011,10(3):238-240.

[6] 戈红雨,吴晓妹,王悦,等.肠炎沙门菌感染暴发的病原学检测及基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2013,23(20):4865-4867.

[7] Eller C, Simon S, Miller T, et al. Presence of  $\beta$ -lactamases in extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* of 30 different serovars in Germany 2005-11[J]. J Antimicrob Chemother, 2013,68(9):1978-1981.

[8] 李红星,杜浩森,李康,等.商丘市 2006—2010 年沙门菌感染性腹泻监测结果分析[J].现代预防医学,2011,38(17):3558-3560.

[9] 张新,王全意,曲梅,等.2009—2011 年北京市腹泻儿童沙门菌感染流行病学特征和耐药分析[J].中国病原生物学杂志,2012,7(10):728-730,742.

[10] 刘谢,柯碧霞,何冬梅,等.2007—2013 年广东省肠炎沙门菌耐药情况分析[J].中华疾病控制杂志,2015,19(3):269-272.

[11] 胡付品,朱德妹,汪复,等.2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2015,15(5):401-410.

[12] Yates C, Amyes S. Extended-spectrum beta-lactamases in non-typhoidal *Salmonella spp.* isolated in the UK are now a reality: why the late arrival? [J]. J Antimicrob Chemother, 2005,56(2):262-264.

[13] Yu F, Chen Q, Yu X, et al. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases among *Salmonella enterica Typhimurium* isolates from pediatric patients with diarrhea in China [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e16801.

[14] Bae D, Cheng CM, Khan AA. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing non-typhoidal *Salmonella* (NTS) from imported food products [J]. Int J Food Microbiol, 2015,214(2):12-17.

(本文编辑:刘思娣)