

由沙门氏菌引起食源性腹泻的病原学检测分析

靳秀秀 王彧超* 许海燕 张鑫 黄爱龙

江苏省南通市疾病预防控制中心微检科 江苏 南通 226007

【摘要】目的: 了解近年来我市沙门氏菌分布特征、耐药状况及 PFGE 分子分型聚类分析特性, 为制定针对性防控措施提供技术支撑。方法: 采集哨点医院食源性腹泻患者的粪便样品, 进行沙门氏菌分离鉴定、血清分型、PFGE 分子分型检测及药敏试验, 利用 WPS office 2016 及 SPSS26 及 Bio Numerics7.6 对数据进行统计和流行病学分析。结果: 836 份食源性腹泻样品中阳性有 26 份, 阳性率为 3.11%, 其中肠炎沙门氏菌的阳性率最高, 其次为鼠伤寒沙门氏菌和伦敦沙门氏菌。沙门氏菌人群普遍易感, 10 岁以下组更敏感, 感染出现的高峰为夏秋季。PFGE 分型以带型完全相同的菌株为同一个 PFGE 型别为原则对 26 株沙门氏菌进行分析, 发现同型别菌株, 均为肠炎沙门氏菌。沙门氏菌对氨基苄西林 (AMP) 耐药率最高, 为 88.46%。结论: 沙门氏菌仍是南通市细菌性食源性疾病的主要病原, 流行季节以夏秋季为主。本次监测发现同源性极高的肠炎沙门氏菌菌株, 结合分子生物学技术对病原菌进行生物学分型是预防控制病原菌所致疾病流行的重要手段之一, 在疫情预警与溯源及制定针对性防控措施等方面意义重大。

【关键词】沙门氏菌; 血清分型; PFGE 分子分型; 耐药性状况

Pathogenic Detection and Analysis of Foodborne Diarrhea Caused by Salmonella

Xiuxiu Jin, Yuchao Wang, Haiyan Xu, Xin Zhang, Ailong Huang

Micro examination department of Nantong Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nantong 226007

Abstract: Objective: To understand the distribution characteristics, drug resistance status, and PFGE molecular typing clustering analysis characteristics of Salmonella in our city in recent years, and to provide technical support for formulating targeted prevention and control measures. Methods: Fecal samples from patients with foodborne diarrhea at sentinel hospitals were collected to conduct Salmonella isolation and identification, serum typing, PFGE molecular typing detection, and drug sensitivity testing. Using WPS office 2016, SPSS 26, and Bio Numerics 7.6 to conduct statistical and epidemiological analysis of the data. Result: Out of 836 samples of foodborne diarrhea, 26 were positive, with a positive rate of 3.11%. Among them, Salmonella enteritidis had the highest positive rate, followed by Salmonella typhimurium and Salmonella London. The Salmonella population is generally susceptible, with the group under 10 years old being more sensitive, and the peak of infection occurs in summer and autumn. PFGE typing was based on the principle of using strains with identical bands as the same PFGE type. Analysis of 26 Salmonella strains revealed that all strains of the same type were Salmonella enteritidis. Salmonella has the highest resistance rate to ampicillin (AMP), at 88.46%. Conclusion: Salmonella is still the main pathogen of bacterial foodborne diseases in Nantong City, and the epidemic season is mainly in summer and autumn. This monitoring found highly homologous strains of Salmonella enteritidis. Combining molecular biology techniques for biological typing of pathogenic bacteria is one of the important means of preventing and controlling disease epidemics caused by pathogenic bacteria. It is of great significance in epidemic warning and tracing, as well as developing targeted prevention and control measures.

Keywords: Salmonella; Serum typing; PFGE molecular typing; Drug resistance status

沙门菌分布广泛、种类繁多, 包括 2000 多种血清型, 是全球报道最多、各国公认的食源性疾病的重要病原菌之一^[1]。文献显示, 在世界各国的细菌性腹泻中, 沙门氏菌引起的腹泻最为常见, 我国内陆地区也以沙门氏菌为主^[2]。目前, 大多数实验室对沙门氏菌的鉴定仍然采用以形态学、生物化学、血清学及药敏试验为主的生物表型特征手段, 如不少医疗机构的实验室。运用生物表型特征分析沙门氏菌虽然是传统经典技术, 但对全面认识沙门氏菌具有很大的局限性。为此, 我们将沙门氏菌的生物表型特征与 PFGE 分子分型技术相结合, 对 2019-2020 年来自哨点医院感染性腹泻样品的沙门氏菌分离株进行分析研究。

1 材料和方法

1.1 样品来源

于 2019 年 1 月至 2020 年 12 月, 在感染性腹泻监测哨点医院采集由可疑食品引起以腹泻症状为主的患者粪便样品, 同时收集患者的临床与流行病学相关资料。每份病例样品采集 2~5g, 将样品置于 Cary-Blair 运送培养基中, 在冷藏条件下送检。共采集 836 份样品。病例诊断标准: 每日排便 3 次以上, 且粪便性状异常, 如稀便、水样便、粘液便、脓血便或血便等。

1.2 检测试剂与设备

脉冲场凝胶电泳所用标准菌株 H9812 和药敏质控菌株 ATCC25922 均由江苏省疾病预防控制中心提供, BS 琼脂、Mac 琼脂、TTB 增菌液、三糖铁琼脂、营养琼脂等培养基购自广东环凯微生物科技有限公司, 内切酶 XbaI 购自 TAKARA-BIO 公司, SeakemGoldAgarose 购自 LONZA 公

司,沙门氏菌属诊断血清(138种,1ml/瓶*138瓶)购自宁波天润生物药业有限公司, BD Phoenix M-50 革兰氏阴性生化反应及药敏板购自美国 BD 公司,上述试剂均在有效期内使用。BD 全自动细菌鉴定/药敏分析系统(型号: Phoenix M-50)、BIO-RAD 脉冲场凝胶电泳系统(型号: CHEF Mapper Power Module)、BIO-RAD 凝胶成像系统(型号: Gel Doc XR+ Universal Hood II)、ABI 核酸扩增仪(型号: 7500)性能良好。

1.3 检测方法

1.3.1 分离鉴定: 参照《感染性腹泻诊断标准》(WS271-2007)方法对沙门氏菌进行分离鉴定。将样品分别接种强选择性培养基 BS 琼脂和弱选择性培养基 Mac 琼脂各一块, 37°C 培养 24h; 取粪便 0.5g 接种 10mL TTB 增菌液, 37°C 培养 8h 后, 挑取增菌液分别接种 BS 和 Mac 琼脂平板各一块, 37°C 培养 24h; 从 BS 和 Mac 琼脂平板上挑取可疑菌落接种三糖铁琼脂培养基 37°C 培养 24h, 选择符合沙门氏菌反应特征的三糖铁培养基, 挑取菌苔接种营养琼脂平板 37°C 纯培养 24h; 从纯化的平板上挑取菌落配制 0.5 麦氏浓度菌液, 加至 BD 公司的革兰氏阴性生化

反应板, 将板条置 BD Phoenix M-50 全自动细菌生化鉴定/药敏系统, 等待判读结果。

1.3.2 血清学分型: 对鉴定为沙门氏菌的菌株用沙门氏菌属诊断血清进行血清分型, 确定菌株血清型。

1.3.3 PFGE 分子分型: 参照《脉冲场凝胶电泳(PFGE)操作规范》(PulseNet China 管理工作规范)对鉴定为沙门氏菌的菌株进行 PFGE 分子分型, 对分子分型图谱进行聚类分析。

1.4 统计学分析

利用 WPS office 2016、SPSS 26 及 Bio Numerics 7.6 对数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 腹泻病例中沙门氏菌检出情况

836 份样品检出沙门氏菌的共 26 份, 检出率为 3.11%。26 株沙门氏菌分别分布在 B 群、C1 群、D 群、E1 群, 其中 B 群和 D 群分布较多; 血清学分型共分得 8 个血清型, 以肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和伦敦沙门氏菌为主, 该 3 个血清型共检出 20 株, 占总检出数的 76.92%。见表 1。

表 1 26 株沙门氏菌的血清学分型结果

群别	菌名	数量	构成比	检出率
B 群(8)	鼠伤寒沙门氏菌	6	23.08%	0.72%
	德尔卑沙门氏菌	1	3.85%	0.12%
	印第安纳沙门氏菌	1	3.85%	0.12%
C1 群(2)	婴儿沙门氏菌	2	7.69%	0.24%
D 群(12)	肠炎沙门氏菌	10	38.46%	1.20%
	都柏林沙门氏菌	1	3.85%	0.12%
	鸡雏沙门氏菌	1	3.85%	0.12%
E1 群(4)	伦敦沙门氏菌	4	15.38%	0.48%
合计		26	100%	3.11%

2.2 不同性别腹泻病例沙门氏菌检出情况

836 例感染性腹泻患者中, 男性 406 例, 检出沙门氏菌 11 例, 阳性率为 2.71%; 女性 430 例, 检出阳性 15 例, 阳性率为 3.49%, 两者阳性率经 χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.421, P>0.05$)。

2.3 不同季节腹泻病例中沙门氏菌检出情况

沙门氏菌感染高峰在夏秋季, 6-10 月份共检出 18 例, 冬春季少见阳性病例。

2.4 26 株沙门氏菌 PFGE 分子分型和聚类分析

对 26 株沙门氏菌 PFGE 分子分型图谱利用 Bio Numerics 7.6 软件进行聚类分析, 其中优势血清型肠炎沙门氏菌(10 株)、鼠伤寒沙门氏菌(6 株)及伦敦沙门氏菌(4 株)。依据 PFGE 分子分型规则, 将带型完全相同的菌株划为同一个 PFGE 型别, 25 株沙门氏菌分出 21 个 PFGE 型别, 总体条带相似度为 52.6%。10 株肠炎沙门氏菌分出 6 个型别, 总体条带相似度 53.7%, 其中 2020056、2020057、2020186 三株同为一种型别, 2020013、2020014、2020157 三株同属另一型别, 且两组间的相似度高达 96.0%, 提示菌株同源性较高; 另外 4 菌株与此 6 株的相似度为 53.7%~90.2%。6 株鼠伤寒沙门氏菌均为不同型别, 总体条带相似度 69.0%。4 株伦敦沙门氏菌分得 4 个型别的总体相似度为 54.2%。

2.5 沙门氏菌的药敏试验结果

对 26 株沙门氏菌进行临床常用 14 种抗生素药敏试验, 仅有 5 种抗生素的敏感率超过 80%, 分别为亚胺培南(IPM)100%、头孢西丁(CFX)96.15%、头孢噻肟(CTX)88.46%、头孢他啶(CAZ)88.46%、阿奇霉素(AZM)80.77%。而耐药率在 50% 以上的有 2 种, 分别为氨基苄西林(AMP)88.46%、氯霉素(CHL)50%。

沙门氏菌分离株存在多重耐药现象, 对 14 种抗生素的耐药以耐 2 种(简称 2R)为最多, 有 6 株(占 23.08%), 其次是 3R 和 5R, 分别有 5 株(占 19.23%)和 4 株(占 15.38%); 6 种及以上耐药的有 8 株, 占 30.77%, 其中 6R 2 株、7R 3 株、8R 1 株、11R 2 株。

3 讨论

本次食源性腹泻沙门氏菌检测分析结果提示, 沙门氏菌仍是引起我市食源性腹泻的重要病原菌之一。分离的菌株以肠炎沙门氏菌最为多见, 其次是鼠伤寒沙门氏菌和伦敦沙门氏菌。与同期周边省市监测结果比较, 检出率和湖州市(3.33%)报道水平相近, 低于张家港市(4.94%)报道水平, 但主要致病血清型别一致, 以肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌为主^{[3][4]}。分析结果表明, 我市沙门氏菌所致食源性腹泻具有明显的季节分布特征, 夏秋季多发, 冬春季少见, 提示夏秋季应是我市沙门氏菌引起食源性腹泻防控的重点季节。我市人群普遍易感沙门氏菌, 但以 10

岁以下幼儿居多,这与蔡彦秋等人的报道类似^[5],其机制可能与该年龄段幼儿肠道系统尚未完全发育成熟、免疫系统相对较弱有关。

PFGE分子分型技术具有分辨率高、特异性强与重复性好等特征,是目前病原菌分型最好的技术之一^[6]。其根据病原菌同源性来推断传染源与可能的传播途径,正在细菌性感染性疾病的防控工作中发挥越来越重要的作用。本次沙门氏菌分离株PFGE分子分型结果呈现型别多样性的特点,共21个型别,无优势型别,提示在2019年1月至2020年12月监测时间段我市没有出现绝对优势的流行株,在该时段我市沙门氏菌病一直散发未发生聚集性或暴发性疫情的现象可能与此相关。进一步的分析发现,同源性高的菌株所致食源性腹泻病例的发病时间相近,有的在同一天。同源的菌株尽管没有引起暴发流行或聚集性疫情,但短时间内的高度散发也应引起疾病预防控制部门的高度关注。PFGE分子分型对感染性疾病具有极佳的溯源性,因本次监测仅局限于食源性腹泻病例,加之PFGE分子分型数据库有限与病例高度散发,未能追踪到感染源。后续,我们将扩大食品、水源及外环境沙门氏菌监测并对分离株进行PFGE分子分型,不断拓展菌株来源与扩大数据库,为沙门氏菌病疫情预警及感染的精准溯源提供强有力的技术支持。

药敏试验结果显示,沙门氏菌分离株主要耐受的抗生素包括:氨苄西林(88.46%)、氨苄西林/舒巴坦(57.69%)、氯霉素(50%)、复方新诺明(46.15%)、萘啶酸(46.15%)及四环素(42.31%)。且存在多重耐药现象,六耐(6R)及以上达30.77%(8/26),最多耐受11种抗菌药物,与2017-2019年杭州地区沙门氏菌的多重耐药率水平(33.92%)接近^[7]。沙门氏菌严重的耐药现象不容忽视,如不从源头管理,加大打击滥用抗生素的力度,未来的细菌性感染可能面临无药可治的窘境。

我们以食源性腹泻病例为分析对象,在以生物表型特

征分析沙门氏菌的基础上,进一步以分子生物学手段(PFGE分子分型)研究认识沙门氏菌,取得了一定成果。本次监测分析获得的结果对研究分析其他致病菌有一定的借鉴意义^[8-9]。

参考文献:

- [1] 罗荣芳,钱香,王和敬,周明明.腹泻患儿沙门菌鉴定及耐药性分析[J].浙江中西医结合杂志,2022,32(07):665-667.
- [2] 汪国翥,胡弘宇.食品中沙门氏菌检测现状分析[J].食品安全导刊,2020(06):146.
- [3] 施爱萍,施菊萍,刘芳,吴鹏程,徐兰,樊飞.2019-2020年张家港市食源性疾病特定病原菌主动监测结果分析[J].医学动物防制,2022,38(07):667-670.
- [4] 吴晓芳,徐德顺,纪蕾,查赞峰,陈莉萍.2018-2020年浙江省湖州市食源性疾病监测结果分析[J].疾病监测,2021,36(09):958-962.
- [5] 蔡彦秋,马智龙.泰州市2016—2020年食源性腹泻患者沙门菌感染状况及耐药性分析[J].江苏预防医学,2022,33(02):194-196.
- [6] 施爱萍,倪佳敏,施菊萍,吴鹏程.腹泻患者中肠炎沙门菌的分子分型与耐药性监测[J].职业与健康,2022,38(12):1624-1627+1633.
- [7] 郑之北,郑伟,汪皓秋,俞骅,潘劲草,陈琦,刘小东.杭州地区多重耐药沙门氏菌的耐药特征[J].微生物学通报,2021,48(02):536-544.
- [8] 王雪娇,刘钦,赵苗苗,杨岚.2016—2020年天津市滨海新区食源性疾病监测结果分析[J].职业与健康,2022,38(12):1637-1641.
- [9] 罗丽媛.警惕食品安全头号问题——食源性疾病[J].食品安全导刊,2020(11):44-45.