



旷代,许学斌,张建民,等.上海市动物源食品中山夫登堡沙门菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分型研究[J].华南农业大学学报,2015,36(1):113-116.

上海市动物源食品中山夫登堡沙门菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分型研究

旷代^{1,2},许学斌³,张建民²,杨筱薇²,石维敏⁴,陶燕⁴,潘海建²,罗开健¹,任涛¹

(1 华南农业大学 兽医学院,广东 广州 510642; 2 上海交通大学 农业与生物学院,上海 200240;

3 上海市疾病预防控制中心,上海 200336; 4 上海科玛嘉微生物技术中心,上海 200434)

摘要:【目的】了解上海市动物源食品中山夫登堡沙门菌 *Salmonella* Senftenberg 的流行情况、耐药性和分子分型情况。【方法】于2008—2012年在上海分离鉴定得到15株动物食品源山夫登堡沙门菌,通过琼脂稀释法进行最小抑菌浓度测定,并应用脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)对菌株进行分子分型研究。【结果和结论】15株山夫登堡沙门菌有7株对磺胺异恶唑具有耐药性(46.7%),除1株对链霉素耐药外(6.67%),对其他抗生素均较为敏感。PFGE分型分为10个基因型。部分不同来源的基因型(X3, X4, X5)具有高度的相似性(88.2%),表明这些不同来源的菌株可能存在流行相关性。

关键词:山夫登堡沙门菌; 动物源食品; 最小抑菌浓度; 抗菌素耐药性; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号:S811.6; S879.2

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2015)01-0113-04

Antimicrobial resistance and pulse field gel electrophoresis analyses of *Salmonella* Senftenberg from food of animal origins in Shanghai, China

KUANG Dai^{1,2}, XU Xuebin³, ZHANG Jianmin², YANG Xiaowei², SHI Weimin⁴,

TAO Yan⁴, PAN Haijian², LUO Kaijian¹, REN Tao¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 3 Shanghai Municipal Center for

Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 4 Shanghai Municipal Ke-Ma-Jia Technology

Center for Microbiology, Shanghai 200434, China)

Abstract:【Objective】To investigate the antimicrobial resistance and molecular types of *Salmonella* Senftenberg isolates from food of animal origins in Shanghai. 【Method】A total of 15 *Salmonella* Senftenberg isolates were collected from 2008 to 2012 in Shanghai. Agar dilution method and pulse field gel electrophoresis (PFGE) were applied to the determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) and molecular typing, respectively. 【Result and conclusion】The 15 isolates exhibited resistance most often to sulfisoxazole(46.7%) and they were fully sensitive to the remaining antibiotics expect for one which was resistant to streptomycin (6.67%). PFGE analyses of 15 *Salmonella* Senftenberg isolates resulted in 10 unique patterns, among which three (X3, X4, X5) were grouped together at a high similarity index of 88.2%, su-

收稿日期:2014-04-16 优先出版时间:2014-12-02

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7671/j.issn.1001-411X.2015.01.021.html>

作者简介:旷代(1989—),男,硕士研究生, E-mail:kuangdai1989@163.com;通信作者:任涛(1968—),男,教授,博士, E-mail:rentao@scau.edu.cn

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303044)

ggesting that these isolates of different origins may be relevant in the epidemiology.

Key words: *Salmonella* Senftenberg; food of animal origins; minimum inhibitory concentration; antimicrobial resistance; pulse field gel electrophoresis

沙门菌 *Salmonella* 是世界范围内重要的人畜共患病原菌,其在自然界分布广泛,种类繁多,目前已发现超过 2 500 个血清型^[1]. 2006—2010 年上海地区腹泻病人中分离到的山夫登堡沙门菌 *Salmonella* Senftenberg 位列所分离肠道沙门菌的第 3 位^[2]. 上海疾病控制与预防中心按照全球沙门菌监测方案进行连续性腹泻病例监测,其数据显示 2006 年的山夫登堡病例符合沙门菌性相对散发和集中暴发的分子流行特征^[3]. 本研究于 2008—2012 年在上海地区各农贸市场的动物源性食品中分离到 15 株山夫登堡沙门菌,并对其进行了药物敏感性分析和脉冲场凝胶电泳技术(Pulse field gel electrophoresis, PFGE)分子分型的相关性研究,以对其流行态势进行合理评估,为预防和控制该病危害提出合理化数据支持和理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 15 株山夫登堡沙门菌于 2008—2012 年先后分离自上海市部分农贸市场内动物源食品中;药敏试验质控菌株大肠埃希菌 *Escherichia coli* ATCC25922、ATCC35218, PFGE 分型用标准菌株 H9812,由上海交通大学农业与生物学院食品微生物实验室保存.

1.1.2 主要试剂 预增菌、增菌及分离纯化沙门菌所用培养基均购自上海科玛嘉科技有限公司;药敏试验抗生素为 Sigma 公司产品;*Xba* I 限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品;蛋白酶 K(Proteinase K)为 Merck 公司产品;PFGE 专用琼脂糖 Semkem Gold 为 Cambrex Bio Science Rockland 公司产品;沙门分型诊断血清(SS1 丹麦);细菌微量生化反应管(杭州微生物试剂有限公司).

1.2 方法

1.2.1 分离鉴定 参考许学斌等^[4]的文献方法对上海部分农贸市场的动物源性食品进行沙门菌分离、菌株初筛鉴定;系统生化反应符合沙门菌,再根据 Kauffmann-White 法测定其血清分型,血清抗原式符合[3,19:g,s,t:-]者鉴定为山夫登堡沙门菌.

1.2.2 药敏试验 选用常见的 16 种抗生素,包括氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸(质量比 2:1)、头孢曲松、头孢噻唑、氯霉素、萘啶酸、环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、四环素、磺胺异恶唑、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑(质量比 1:19). 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、ATCC35218. 按照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的琼脂稀释法进行药敏性测定,按照 CLSI 的规范进行测定结果判读^[5],链霉素的耐药折点参考文献[6].

1.2.3 PFGE 分子分型方法 参考美国 CDC 的 PulseNet 网络实验室推荐的沙门菌 PFGE 分型标准方法操作^[7]. 将标准菌株 H9812 与试验菌分别用 PFGE 专用琼脂糖 Semkem Gold 固定、裂解、洗涤后,包埋 DNA 在 37 °C 水浴中,使用 50 U 的 *Xba* I 至少酶切 2 h. 得到的酶切后限制性 DNA 片段在 0.01 kg/L 的 Semkem Gold 琼脂糖凝胶中使用 Chef Mapper 脉冲场凝胶电泳分型,电泳缓冲液为 0.5 × TBE,电泳时间为 19 h,电泳温度为 14 °C,起始与最终转换时间分别设置为 2.16、63.8 s. 凝胶使用 Gelrad 染色及纯水脱色后成像,PFGE 成像后的 DNA 图谱用 Bionumerics 5.1 软件进行聚类分析,导出亲缘关系树状图谱.

2 结果与分析

2.1 分离鉴定结果

根据 GB4789-2010 标准的生化反应表,其中 14 株菌株硫化氢(H₂S)阳性、靛基质阴性、pH7.2 尿素阴性、氰化钾阴性、赖氨酸脱羧酶阳性,为沙门菌典型反应. 另外 1 株(SH09SF118) H₂S 呈阴性,补做 ONPG 试验呈阴性,为不典型沙门菌. 经血清学确认后,分离到山夫登堡沙门菌 15 株. 其中,5 株来自禽肉制品,5 株来自猪肉制品或其加工品,4 株来自水产品,1 株来自牛肉制品.

2.2 药敏试验结果

药敏试验结果(表 1)显示:15 株山夫登堡沙门菌对磺胺异恶唑耐药率最高,为 46.7%,除 1 株对链霉素耐药,所有菌株对其他抗生素均不耐药. 将 16 种抗生素的 MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 进行比较,发现磺胺异恶唑的

MIC50 及 MIC90 最高,分别为 256、 ≥ 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$;另外,尽管只发现 1 株对链霉素耐药的菌株,但是其 MIC50 及 MIC90 分别高达 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$;头孢曲松以及

环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星的 MIC50 及 MIC90 都 ≤ 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

表 1 15 株山夫登堡沙门菌药敏试验结果

Tab.1 Antimicrobial susceptibility of 15 strains of *Salmonella* Senftenberg

抗菌药物	耐药折点	MIC50/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	MIC90/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	耐药率/%
氨苄西林	≥ 32	2	2	0
阿莫西林/克拉维酸	$\geq 32/16$	1/0.5	1/0.5	0
头孢曲松	≥ 64	≤ 0.125	≤ 0.125	0
头孢噻唑	≥ 8	1	1	0
氯霉素	≥ 32	4	4	0
萘啶酸	≥ 32	4	4	0
环丙沙星	≥ 4	≤ 0.125	≤ 0.125	0
氧氟沙星	≥ 8	≤ 0.125	≤ 0.125	0
左氧氟沙星	≥ 8	≤ 0.125	≤ 0.125	0
阿米卡星	≥ 64	2	4	0
庆大霉素	≥ 16	2	2	0
卡那霉素	≥ 64	4	8	0
链霉素	≥ 64	16	16	6.67
四环素	≥ 16	2	4	0
磺胺异恶唑	≥ 512	256	≥ 512	46.70
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑	$\geq 4/76$	0.5/9.5	0.5/9.5	0

2.3 PFGE 分型结果

PFGE 聚类分析的结果见图 1. 15 株沙门菌可分为 10 个 PFGE 型别,即 X1 ~ X10;X4、X7 分别包括 2 株禽肉制品来源的菌株,X5、X9 分别包括 2 株猪肉

制品源的菌株. X3 包括 1 株水产品来源以及 1 株猪肉蛋饺来源的菌株. 按相似度 $\geq 85\%$ 划分,X3、X4、X5 又可划分到同一簇.



图 1 15 株山夫登堡沙门菌 PFGE 基因型聚类结果

Fig.1 PFGE genotype cluster analysis of 15 strains of *Salmonella* Senftenberg

3 讨论与结论

食物传播是引起人感染沙门菌的主要途径. 周晓红等^[8]对我国杭州地区食品、公共场所从业人员健康体检中山夫登堡沙门菌监测结果表明,食品相

关行业的人员极有可能成为该种细菌的隐性传染源. Dong 等^[9]的研究显示在牛肉加工厂分离到的山夫登堡高居所有沙门菌血清型的第 2 位. 这就要求我们进一步做好食品来源中山夫登堡沙门菌的耐药及分子分型的监测.

本研究共分离到 15 株山夫登堡沙门菌,其中有 5 株分离自禽肉制品,5 株分离自猪肉制品及其加工品,有研究表明这是我国沙门菌分离率最高的两种零售肉类型^[10];1 株分离自牛肉源,还有 4 株分离自水产品,其中 1 株为硫化氢阴性沙门菌,而 2006 年上海市山夫登堡的多点暴发病例中 12 株属于硫化氢阴性^[11],二者可能存在一定的流行相关性。

抗菌药物耐药性分析表明,这 15 株山夫登堡沙门菌对磺胺异恶唑的耐药性最高,达到 46.7%,这与我国上海地区分离到的人源沙门菌对该抗生素的耐药率(47.9%)相似^[2]. 15 株细菌对其他抗生素十分敏感,除 1 株细菌对链霉素耐药,对另外 14 种抗生素均无耐药性,表明相对于鼠伤寒、肠炎沙门菌等常见血清型,上海地区山夫登堡沙门菌的整体耐药情况不高. 然而随着我国沙门菌整体耐药情况的逐年严重,同时鉴于山夫登堡沙门菌在近年造成过暴发流行,监测以及评估这一血清型的流行态势及耐药趋势对于防控这一疾病具有重要的意义。

在食源性致病菌监测项目中,食品中污染细菌的分型与溯源一直是问题的核心. PFGE 以其分辨力强,重复性好的特点,被称为细菌分子生物学分型技术的金标准. 本研究将 15 株山夫登堡沙门菌分为 10 个 PFGE 型,其中 X4、X7 型来自禽肉制品,X5、X9 来自猪肉制品,这 4 个 PFGE 型分别包括 2 株相似度为 100% 的菌株,表明在各自 PFGE 型中的菌株污染源一致. X3 包含的 2 株菌株,1 株分离自 2009 年的水产品,1 株分离自 2010 年的猪肉蛋饺,表明这一 PFGE 型的沙门菌有可能已经在环境中流行,并造成不同来源食品的交叉污染. 已有国外的研究证明,含有山夫登堡沙门菌的水产品被海水污染后,形成了生态循环能力,从而成为持续的污染源^[12]. 另外,X3、X4、X5 这 3 种不同来源菌株的 PFGE 型相似度高达 88.2%,按照 Tenover 等^[13]用相似度进行同源性的解释,认为相似性 $\geq 85\%$ 的菌株是高度同源,可能来自同一克隆株,即呈流行相关性,提示上海地区存在优势 PFGE 型并且这一 PFGE 型及其变型可能是造成上海地区山夫登堡沙门菌病散发和集中暴发的根源。

参考文献:

[1] FRESNO M, BARRETO M, GUTIERREZ S, et al. Serotype-associated polymorphisms in a partial rpoB gene sequence of *Salmonella enterica*[J]. Can J Microbiol,2014,

60(3):177-181.

- [2] ZHANG J, JIN H, HU J, et al. Serovars and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* from human patients in Shanghai, China,2006-2010[J]. Epidemiol Infect,2014,142(4):826-832.
- [3] 许学斌,顾宝柯,金汇明,等. 上海市沙门菌血清型流行特征[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(2):156-158.
- [4] 许学斌,顾宝柯,陈敏,等. 沙门菌检测方法的优化[J]. 检验医学,2007,22(6):677-680.
- [5] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing,20th informational supplement (M100-S20)[S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute,2010.
- [6] CHEN S, ZHAO S, WHITE D G, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats[J]. Appl Environ Microbiol,2004,70(1):1-7.
- [7] RIBOT E M, FAIR M A, GAUTOM R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet[J]. Foodborne Pathog Dis,2006,3(1):59-67.
- [8] 周晓红,商晓春,帅慧群,等. 89 株山夫登堡沙门菌脉冲场凝胶电泳分子分型及耐药性分析研究[J]. 疾病监测,2012,27(10):764-767.
- [9] DONG P, ZHU L, MAO Y, et al. Prevalence and profile of *Salmonella* from samples along the production line in Chinese beef processing plants[J]. Food Control,2014,38:54-60.
- [10] YANG B, QU D, ZHANG X, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China[J]. Int J Food Microbiol,2010,141(1/2):63-72.
- [11] 黄峥,许学斌,金汇明,等. 一类罕见硫化氢阴性山夫登堡沙门菌腹泻株的分子溯源[J]. 上海预防医学,2010,22(2):62-65.
- [12] MARTINEZ-URTAZA J, LIEBANA E. Investigation of clonal distribution and persistence of *Salmonella* Senftenberg in the marine environment and identification of potential sources of contamination[J]. FEMS Microbiol Ecol,2005,52(2):255-263.
- [13] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, 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.

【责任编辑 柴 焰】