

2012~2016年广东省中山社区鼠伤寒沙门菌 同源性分析及对喹诺酮类药物耐药机制研究*

严海忠, 王娟, 罗锡华, 冯雪琴

(中山大学附属中山医院检验医学中心, 广东中山 528403)

摘要:目的 研究广东省中山社区鼠伤寒沙门菌(STM)的同源性以及对喹诺酮类药物的耐药机制。方法 收集中山大学附属中山医院2012年3月~2016年12月临床分离鼠伤寒沙门菌78株(排除同一病人重复送检菌株)。通过琼脂稀释法检测鼠伤寒沙门菌对喹诺酮类药物的敏感度;脉冲电场凝胶电泳(PFGE)方法分析耐药菌株的同源性;使用PCR和DNA测序法分析gyrA, gyrB, parC和parE基因喹诺酮耐药决定区(QRDRs)的突变;PCR检测质粒介导喹诺酮类药物耐药基因qnr(qnrA, qnrB, qnrS, qnrD)和aac(6')-Ib-cr。结果 33株鼠伤寒沙门菌对环丙沙星产生耐药。33株鼠伤寒沙门菌共产生33种不同的PFGE图谱,相似度小于90%。29株耐药株gyrA位点发生单突变导致在第83或87位存在唯一氨基酸替代,其中第83位突变率占93.1%(27/29)。4株喹诺酮高耐药菌株的gyrA同时存在83和87号位双突变导致两个氨基酸发生替代,其中2株菌额外出现parC基因单碱基突变导致第80号位出现氨基酸替代。所有菌株中均未检测到qnr基因,但有15株鼠伤寒沙门菌检出aac(6')-Ib-cr基因。结论 中山社区鼠伤寒沙门菌对喹诺酮类药物耐药性较高,主要机制是gyrA基因的单突变和携带aac(6')-Ib-cr耐药基因。

关键词:鼠伤寒沙门菌;同源性分析;喹诺酮类;耐药机制

中图分类号:R378.22;Q781 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)04-063-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.016

Study on the Homology and Resistance Mechanism of *Salmonella Typhimurium* to Quinolone from 2012 to 2016 in Zhongshan Community of Guangdong Province

YAN Hai-zhong, WANG Juan, LUO Xi-hua, FENG Xue-qin

(the Center for Medicine Laboratory,

Affiliated Sun Yat-sen Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Zhongshan 528403, China)

Abstract: Objective Study on the homology and mechanism of quinolones-resistance in *Salmonella typhimurium* (STM) in Zhongshan community of Guangdong Province. **Methods** 78 strains of *Salmonella typhimurium* (the same strains from the same patient were excluded) were isolated from March 2012 to December 2016 in Affiliated Sun Yat-sen Hospital of Sun Yat-sen University. Antibiotic susceptibility testing for these isolates were performed by the agar dilution method. The PFGE was used to determine the existence of the same clone strains in *Salmonella typhimurium* strains. PCR and DNA sequencing were used to investigate the mutation in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) (include gyrA, gyrB, parC and parE) and detected the plasmid-mediated quinolones-resistance genes qnr (qnrA, qnrB, qnrS, qnrD) and aac(6')-Ib-cr. **Results** Totally 33 (42.3%) of 78 *Salmonella typhimurium* isolates were resistant to ciprofloxacin. 33 different PFGE patterns were appeared among the selected strains with the genetic similarity under 90%. 29 isolates had a single mutants in the ORDRs of gyrA, and 93.1% (27/29) of these isolates had the position No. 83 mutations. The double mutant in the QRDRs of gyrA were detected in both of four ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhimurium*, with the additional one mutation in parC in two of them carried the mutant in position No. 80. Qnr was not detected in all of the isolates, but aac(6')-Ib-cr gene was detected in 15(19.2%) isolates. **Conclusion** There was high quinolones-resistance in *Salmonella typhimurium* in Zhongshan Community infections. The single mutation in the QRDRs of gyrA and its containing aac(6')-Ib-cr were the key mechanism for the resistances.

Keywords: *Salmonella typhimurium*; homology analysis; quinolones; resistance mechanism

日常生活中,沙门菌是一类常见的可以引起肠道腹泻及肠道外感染的致病菌,可以引起暴发感

染^[1]。由于其特殊性因此也引起全世界各国卫生监测机构的高度重视。每年的8~9月是中山地区

* 作者简介:严海忠(1985—),男,本科,主管技师,主要从事血液及泌尿系统感染研究, E-mail: yanhaizhong_love@163.com。

沙门菌感染的高发期。该菌致病性强,通常通过污染水源和食物来感染人畜。治疗沙门菌引起的腹泻和肠道外感染通常使用广谱的头孢菌素。但是,由于抗生素的不正规使用导致沙门菌对头孢菌素的耐药性不断提高,尤其是鼠伤寒沙门菌(STM)。近年来,检出耐头孢菌素 STM 不断在世界上被报道,并有不断增加的态势。对于危及生命的多耐 STM 我们可以选择使用喹诺酮类药物,因为它可能是治疗危及生命严重感染的最后一道防线^[2]。然而,全世界最近发现沙门菌对耐喹诺酮类药物的耐药性在不断提高^[3]。国内已有文献报道,沙门菌中尤其是 STM 在某些地区已经出现喹诺酮类药物高水平耐药。STM 对喹诺酮类药物耐药主要是由于喹诺酮耐药决定区(QRDR)基因的突变^[4]和喹诺酮耐药基因 qnr 及 aac(6')-Ib-cr 的携带^[5]。本研究搜集了 2012~2016 年间中山社区感染 STM 并对其药物敏感度和同源性分析,同时对耐药分子机制进行分析,希望为临床谨慎合理选择抗生素并做好其流行病学监测提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集中山大学附属中山医院 2012 年 3 月~2016 年 12 月从患者标本中分离的鼠伤寒沙门菌 78 株(排除同一病人重复送检菌株)。菌株在梅里埃 VITEK 2 COMPACT 系统鉴定并使用 16s RNA 测序进行验证,参照标准血清分型方法,使用沙门菌属多价诊断血清(宁波天润生物药业有限公司)进行菌株血清学分群和分型。

1.2 试剂与仪器 诺氟沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、美罗培南、头孢噻肟、头孢他啶、亚胺培南和萘啶酸均购自中国药品生物制品检定所;药敏试验 MH 琼脂购自广州迪景公司;所有 PCR 扩增试剂、Taq 酶、内切酶 Xba I 及 Bln I 均采购自中国宝生物工程(大连)公司;测序通过中国上海生工生物工程公司进行;全自动细菌鉴定仪 VITEK 2 COMPACT 购自法国梅里埃公司;ABI 9700 PCR 仪和 cHEF MAPPER 电泳仪分别购自美国 ABI 和伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感性试验:抗生素通过倍比稀释后加入琼脂中制成平板,参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)2016 版标准使用检测沙门菌对各实验药物的 MIC 值并根据 M100-s18 文件判定敏感(S)、中介(I)和耐药(R)。药敏质控菌株为 ATCC 25922 和 ATCC 27853。

1.3.2 脉冲电场凝胶电泳(PFGE):33 株耐喹诺酮类药物 STM 根据美国 CDC 推荐的 PulseNet 分

子分型方案^[6],通过内切酶 xba I 限制性酶切沙门菌染色体 DNA,使用 cHEF MAPPER 电泳仪在 0.5×TBE 缓冲液,温度 14℃,电压为 6V/cm,角度 120 度,脉冲时间为 5~20 s,电泳时间为 19 h,分子量标记物为 Ladder DNA。电泳分离后放入成像系统获得电泳图谱。图谱导入 Fingerprinting II 软件生成聚类树分析沙门菌株间 DNA 的相似性。

1.3.3 喹诺酮类相关基因检测:PCR 扩增质粒介导耐药基因 qnr(qnrA, qnrB, qnrS, qnrD)和 aac(6')-Ib-cr,相关扩增引物和反应条件见参考文献^[7,8];多重 PCR 技术同时扩增基因 gyrA, gyrB, parC 和 parE,得到的阳性产物送公司进行测序,测序结果与鼠伤寒沙门菌标准 QRDR DNA 序列在 BLAST 系统进行比对找出突变位点,实验所用涉及引物和反应条件见参考文献^[9]。

1.4 数据处理 所有数据均在 Excel 表格中处理。

2 结果

2.1 药敏试验结果 见表 1。

表 1 鼠伤寒沙门菌对 8 种抗生素的耐药率(%)

抗生素	菌株数	耐药率(%)
萘啶酸	68	87.2
诺氟沙星	33	42.3
环丙沙星	33	42.3
左氧氟沙星	33	42.3
头孢他啶	8	10.3
头孢噻肟	11	14.1
亚胺培南	0	0.0
美罗培南	0	0.0

2.2 PFGE 结果 33 株耐喹诺酮类药物鼠伤寒沙门菌 PFGE 图谱的相似性不高,共产生 33 种不同的图谱。聚类分析结果见图 1。

2.3 QRDR 突变及喹诺酮类耐药基因检测结果分析 29 株 STM gyrA 的 QRDR 均发生单个碱基点突变致使第 83 或 87 位产生一个氨基酸的改变,以第 83 号位(TCC→TTC)突变为主,占 93.1%(27/29);4 株喹诺酮高耐药 STM gyrA 的 QRDR 同时发生 83 和 87 号位的双突变引起两个氨基酸替代(TCC→TTC 和 GAC→GGC),并且其中 2 株 STM parC 的 QRDR 还存在单个碱基点突变使 80 号位氨基酸发生替代(AGC→CGC)。78 株 STM 中均未检出 qnr 基因,15 株(19.2%)菌株 aac(6')-Ib-cr 阳性,结果见表 2。

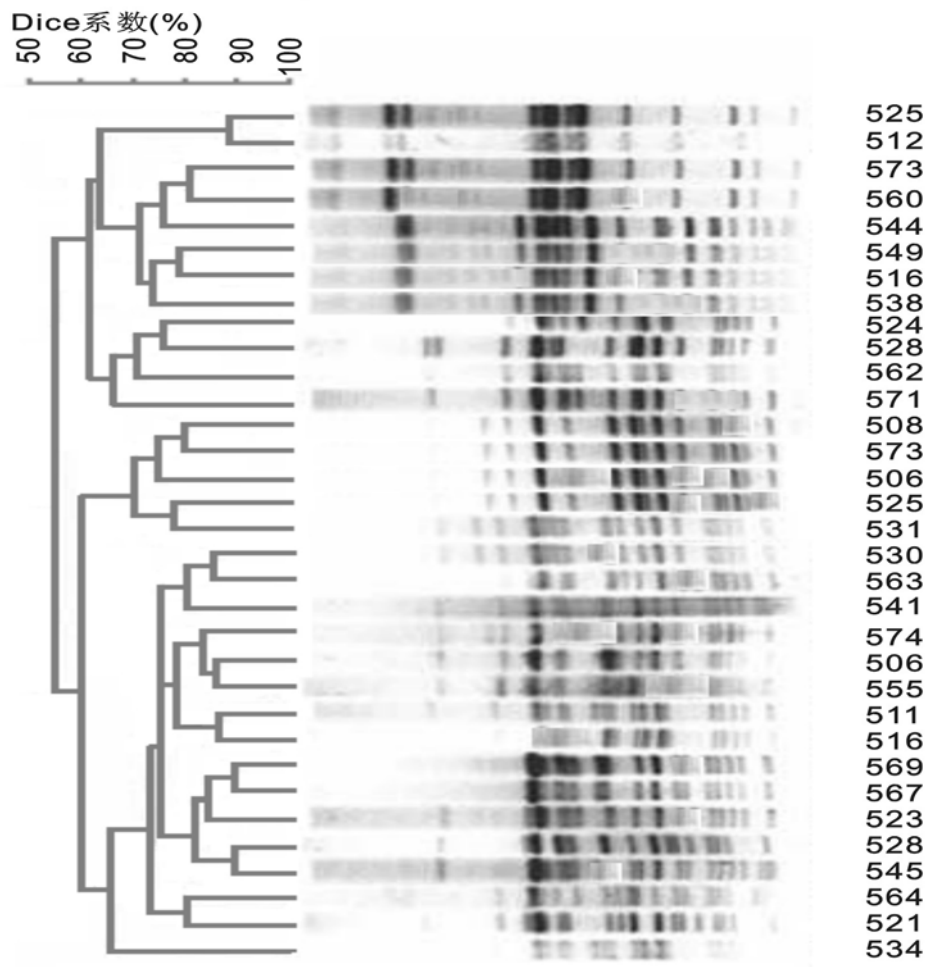


图 1 33 株耐喹诺酮类药物鼠伤寒沙门菌聚类分析图

表 2 4 段扩增片段 (gyrA, gyrB, parC 及 parE) 的突变特点及耐药基因检测结果

菌株数	gyrA, gyrB, parC 及 parE 突变特点				qnr	aac-(6')-Ib-cr
	gyrA	parC	gyrB	parE		
23	Ser83→Phe(TCC→TTC)	—	—	—	—	10
1	Asp87→Asn(GAC→AAC)	—	—	—	—	—
3	Ser83→Pro(TCC→CCC)	—	—	—	—	2
1	Ser83→Tyr(TCC→TAC)	—	—	—	—	—
1	Asp87→Gly(GAC→GGC)	—	—	—	—	—
2	Ser83→Phe(TCC→TTC)	Ser80→Arg	—	—	—	2
	Asp87→Gly(GAC→GGC)	(AGC→CGC)				
2	Ser83→Phe(TCC→TTC)	—	—	—	—	1
	Asp87→Gly(GAC→GGC)					

3 讨论 肠道杆菌的感染临床上多使用喹诺酮类药物治

疗,但因为人类在临床和畜牧业中无节制的大量使用,尤其是被当作动物的促生长剂被广泛使用,使得非伤寒沙门菌的抗生素耐药性异常严峻。因此防止沙门菌耐药性的相互传播和蔓延,严防多耐沙门菌的食源性传播感染早已成为全世界公共医疗行业密切关注和讨论的热点。

本研究发现,78 例 STM 对喹诺酮类药物的耐

药性已十分严重,耐药率高达 42.3%,仅对碳青霉烯类药物和三代头孢有比较好的敏感度。国内非伤寒沙门菌特别是 STM 对喹诺酮类药物耐药情况存在着明显不同的地域差异。根据骆艳婷等^[10]的相关报道,曾对佛山地区 2012 年从粪便标本中分离出的 28 株 STM 进行药敏试验,结果发现对环丙沙星的耐药率竟高达 50%;同时程招敏等^[11]也报道了广州市在 2014~2015 年收集到的 44 株

腹泻来源 STM 对环丙沙星的不敏感度为 29.5%。所以 STM 对环丙沙星耐药性的地域间差异可能是因为喹诺酮类药物在农作物种植和家禽饲养过程中使用含量的不同造成的。

历史经验教训发现沙门菌监控不力会造成大面积食源性暴发感染,本文 PFGE 分析中发现 33 株 STM 的 PFGE 图谱相似性不高,表明不是来自同一克隆菌株,体现出 STM 的遗传多样性,这与黄燕惠^[12]的研究结果相符,但不排除今后可能会引起 STM 耐药性的局部小暴发。喹诺酮类药物通过和 DNA 旋转酶(*gyrA* 和 *gyrB*)或拓扑异构酶(*parC* 和 *parE*)形成三元转录复合物从而导致它们结构形态发生改变,以此造成它们不能正常的发挥相应功能,最终细菌死亡。

经过此次实验研究我们发现,中山社区分离到的 STM 耐药株最常见的突变是 *gyrA* 上第 83 或 87 号位密码子的单突变。当这 2 个密码子同时引起突变时,STM 就会发生喹诺酮高耐药性。一直以来,*gyrA* 的点突变被认为在高喹诺酮类耐药革兰阴性菌的所有耐药机制中占主导地位。本次实验恰恰印证了这一点。33 株阳性耐药菌株都同时出现了 *gyrA* 的单突变,并且主要集中在第 83 号密码子,且有 4 株菌还同时出现第 83 和 87 号密码子的双重突变,其中 2 株菌合并有 *parC* 的单突变。与王伟等^[13]的研究发现基本相同。*aac*-(6')-Ib-cr 基因在美国伤寒沙门菌中检出率十分低(0.4%),虽然本实验研究结果均未发现 *qnr* 基因的存在,但是 *aac*-(6')-Ib-cr 基因的阳性检出率却高达(19.2%)。据武汉的报道,221 株从门诊儿科腹泻患者分离的肠炎沙门菌仅有 1.8% 为 *qnr* 基因阳性,而 *aac*-(6')-Ib-cr 基因为 8.1%。根据已有文献报道,*aac*-(6')-Ib-cr 基因的携带和引起耐喹诺酮类药物沙门菌的克隆性传播存在一定的关联。

总之,沙门菌尤其是 STM 对喹诺酮类药物的耐药性已达到需广大医务工作者和相关部门高度重视的地步,重视临床病原学诊断,以严谨的态度选择使用抗生素,做好耐药菌的预防控制工作。

参考文献:

- [1] 文明明,韩美玲,李卫宁,等. 2013~2014 年深圳市腹泻疾病的病原学分析研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016,31(3):143-146,149.
Wen MM, Han ML, Li WN, et al. Etiology of diarrheal disease years in Shenzhen from 2013 to 2014[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(3): 143-146, 149.
- [2] Lu Y, Zhao H, Liu Y, et al. Characterization of quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Indiana from chickens in China[J]. Poultry Science, 2015, 94(3):454-460.
- [3] Yuan J, Guo W. Mechanisms of resistance to quinolones in *Salmonella Typhimurium* from patients with infectious diarrhea[J]. Microbiology & Immunology, 2017, 61(3/4):138-143.
- [4] Macias-farrera GP, De Oca Jiménez RM, Varela-Guerrero J, et al. Antibiotics susceptibility of quinolones against *Salmonella spp.* strains isolated and molecularly sequenced for *gyrA* gene[J]. Microb Pathog, 2018, 114:286-290.
- [5] Liu L, Zhao XW, Song YM, et al. Difference in resistance to *Salmonella enteritidis* infection among allelic variants of TLR4(903, 1 832) in SPF chickens[J]. Journal of Applied Genetics, 2016, 57(3):389-396.
- [6] Ribot EM, Fair MA, 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.
- [7] Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, et al. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *enterobacteriaceae* isolates from the United States[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(8):2872-2874.
- [8] Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, et al. Prevalence in the United States of *aac*-(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11):3953-3955.
- [9] Giraud E, Brisabois A, Martel JL, et al. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro and in vivo selected mutants of *Salmonella spp.* suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(16):2131-2137.
- [10] 骆艳婷,梁景涛,陈爱贞,等. 广东省佛山市鼠伤寒沙门菌分子分型及其多重耐药分析[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(9):1079-1080.
Luo YT, Liang JT, Chen AZ, et al. Study on the status of multi-drug resistance and molecular characteristics of *Salmonella typhimurium* in Foshan city, Guangdong[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2014, 35(9):1079-1080.
- [11] 程招敏,蓝 锴,柏彩英,等. 鼠伤寒沙门菌分子分型及耐药性特点[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(12):1601-1603.
Cheng ZM, Lan K, Bo CY, et al. Characteristics of molecular typing and drug resistance for *Salmonella typhimurium*[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2016, 37(12):1601-1603.
- [12] 黄燕惠. 广东省鼠伤寒沙门菌的分子流行病学研究[D]. 广州:南方医科大学, 2014:1-133.
Huang YH. Molecular epidemiological study on *Salmonella typhimurium* strains in Guangdong province [D]. Guangzhou: Southern

(上接 66 页)Medical University,2014:1-133.

- [13] 王 伟,胡豫杰,徐 进,等.鼠伤寒沙门菌婴幼儿分离株耐药基因及毒力基因研究[J].中国食品卫生杂志,2016,28(5):567-575.

Wang W, Hu YJ, Xu J, et al. Analysis of antibiotic resistance genes and virulence genes in *Salmonella*

typhimurium isolated from fecal samples of children under 5 year old by whole genome sequencing[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(5): 567-575.

收稿日期:2018-03-30

修回日期:2018-06-29