

# 南京市肠道感染性腹泻样本中食源性致病菌分离及耐药监测分析

金萍<sup>1</sup>, 江晓<sup>1</sup>, 叶艳华<sup>1</sup>, 刘品<sup>1</sup>, 王燕<sup>1</sup>, 吴正超<sup>2</sup>

1. 南京市疾病预防控制中心, 江苏 南京 210003; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008

**摘要:** **目的** 分析南京市食源性致病菌对常用抗生素的耐药情况,对食源性疾病的预防及临床合理用药的指导提供依据。**方法** 采用微量肉汤稀释法,对于2019年1月至12月南京市食源性疾病患者腹泻便标本中分离的食源性致病菌(沙门菌、副溶血性弧菌、5种致泻大肠埃希菌共计85株)进行药敏鉴定。**结果** 85株菌株在药敏实验前,进行生化鉴定菌株复核均阳性,35株沙门菌、36株副溶血性弧菌、14株致泻大肠埃希菌多重耐药率分别为65.7%、0%、78.6%;沙门菌中发生耐受的抗生素主要有红霉素(100.0%)、氨苄西林/舒巴坦(65.7%)、头孢唑啉(65.7%)、萘啶酸(65.7%)、氨苄西林(62.9%);副溶血性弧菌中发生耐受的抗生素主要有头孢唑啉(100.0%)、氨苄西林(11.1%)、庆大霉素(2.8%);致泻性大肠埃希菌发生耐受的抗生素主要有红霉素(100.0%)、萘啶酸(71.4%)、氨苄西林(64.3%)、氨苄西林/舒巴坦(57.1%)、阿奇霉素(57.1%)。**结论** 南京市食源性疾病患者粪便标本中分离到的食源性致病菌中致泻大肠埃希菌及沙门菌存在多种抗生素耐药,应进一步加强监测。及时了解南京市食源性致病菌分离及耐药情况,以指导本地区合理使用抗菌药。

**关键词:** 食源性致病菌; 肉汤稀释法; 沙门菌; 副溶血性弧菌; 致泻大肠埃希菌; 耐药性

**中图分类号:** R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)08-1077-04

## Isolation and drug resistance analysis of food-borne pathogens from intestinal samples of infectious diarrhea in Nanjing

JIN Ping\*, JIANG Xiao, YE Yan-hua, LIU Pin, WANG Yan, WU Zheng-chao

\* Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210003, China

Corresponding author: WU Zheng-chao, E-mail: 275772167@qq.com

**Abstract: Objective** To analyze the antibiotic resistance of food-borne pathogens in Nanjing and provide the basis for the prevention of food-borne diseases and the guidance of clinical rational drug use. **Methods** The broth microdilution method was used to identify the drug sensitivity of 85 strains of *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* and diarrheogenic *Escherichia coli* isolated from diarrhea samples of food-borne diseases patients treated in Nanjing from January 2019 to December 2019. **Results** Before drug sensitivity test, 85 strains were confirmed to be positive by biochemical identification, and the multiple drug resistance rates of *Salmonella* (35 strains), *Vibrio parahaemolyticus* (36 strains) and diarrheogenic *Escherichia coli* (14 strains) were 65.7%, 0% and 78.6% respectively. The main antibiotics in drug-resistant strain of salmonella were erythromycin (100.0%), ampicillin/sulbactam (65.7%), cefazolin (65.7%) and nalidixic acid (65.7%), ampicillin (62.9%). Cefazolin (100.0%), ampicillin (11.1%) and gentamicin (2.8%) were the main antibiotics in drug-resistant strain of *Vibrio parahaemolyticus*. The main antibiotics in drug-resistant strain of diarrheogenic *Escherichia coli* were erythromycin (100.0%), nalidixic acid (71.4%), ampicillin (64.3%), ampicillin/sulbactam (57.1%), azithromycin (57.1%). **Conclusions** Multiple antibiotic resistance in diarrheogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from fecal samples of food-borne diseases patients should be continuously monitored to understand the isolation and drug resistance of food-borne pathogens in Nanjing and to guide the rational use of antibiotics in this area.

**Keywords:** Food-borne pathogens; Broth dilution method; *Salmonella*; *Vibrio parahaemolyticus*; Diarrheogenic

*Escherichia coli*; Antibiotics resistance

**Fund program:** Scientific Research Project of Preventive Medicine Fund of Jiangsu Provincial Department of Health (Y2018003); The 12th Five Year Plan Major Project of Nanjing Health Bureau (ZDX12006)

当前,由食源性致病菌引起的疾病时有发生,食品安全已成为社会普遍关注的热点问题。随着各类抗菌药物的广泛使用,细菌的耐药谱不断变化,呈现由低水平耐药到高水平耐药、由单一耐药到多重耐药的发展趋势,且不同地区的菌群分布及耐药谱差异较大。为了解南京市食源性致病菌对常用抗生素的耐药情况,为制定防控计划提供基础数据,现对85株南京市哨点医院食源性疾病患者粪便标本中分离出的食源性致病菌株(沙门菌、副溶血性弧菌、致泻性大肠杆菌)进行15种抗生素的耐药性监测并对耐药监测结果进行汇总分析。

## 1 材料与方法

**1.1 分离菌株** 菌株由实验室于2019年1月至12月自南京市省级哨点医院腹泻门诊样本中分离而来,依据《2019江苏省食源性疾病监测工作手册》在南京市共采集主动监测病例粪便标本1246份,依据《2019江苏省实验室检验标准操作程序》,共分离阳性菌株85株,分别为沙门菌35株,副溶血性弧菌36株,致泻大肠埃希菌14株。

**1.2 质控菌株** 大肠埃希菌 ATCC 25922,购于中国工业微生物菌种保藏管理中心,本实验室保存。

**1.3 主要试剂** 分离所用显色平板(沙门菌、副溶血弧菌及大肠埃希菌均购自郑州博赛,致泻性大肠埃希菌多重荧光 PCR 检测试剂盒购自硕世生物科技公司,细菌定量药敏(MIC)试剂(药敏板,肉汤培养基,稀释液)购自山东鑫科生物科技有限公司,生化鉴定条购自法国梅里埃,均在有效期内使用。

### 1.4 方法

**1.4.1 菌株鉴定及分离** 根据2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验》沙门氏菌检验、致泻大肠埃希菌检验;2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验》副溶血性弧菌检验;《2019年江苏省食源性疾病监测工作手册》进行沙门菌、副溶血性弧菌以及5种致泻大肠埃希菌的分离鉴定。致泻性大肠埃希菌菌株的鉴定方法:无菌拭子采集少量新鲜粪便,拭子在MAC或大肠埃希菌显色培养基四区划线,36℃培养24h。在MAC平板上为粉红色或红色,光滑湿润菌落;在大肠埃希菌显色平板上为蓝绿色光滑可疑菌落。初步生化鉴定:挑取5个疑似大肠埃希菌菌落分别接

种双糖铁斜面,36℃培养24h,将双糖铁斜面产酸或不产酸、底层产酸、不产H<sub>2</sub>S的菌株接种营养平板作进一步生化实验鉴定(ATBID32E),将生化鉴定为致泻大肠埃希菌属的纯菌落采用荧光PCR鉴定分型(用5种致泻大肠埃希菌目的基因多重荧光PCR试剂盒检测其是否含有毒力基因片段),根据毒力基因片段大小判定分型。

**1.4.2 药敏检测** 采用微量肉汤MIC药敏板法,使用鑫科药敏分析系统进行菌株耐药性检测。根据美国临床实验室标准化研究所CLST文件M100-S24推荐的药敏试验抗菌药物选择原则,确定15种耐药监测的抗菌药物:氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢西丁、头孢唑啉、头孢噻肟、头孢他啶、亚胺硫霉素、庆大霉素,四环素、氯霉素、红霉素,环丙沙星、阿奇霉素、萘啶酸以及磺胺甲恶唑;将待检菌株以及质控标准菌株(大肠杆菌 ATCC25922)分别划线于相应平板,培养18h后从新鲜的营养琼脂平皿中挑选纯培养的菌落,取10ml样本稀释液1支;用无菌接种针从新鲜的待检细菌的平板中挑取菌落,制备0.5麦氏菌悬液,吸取50μl加入到无菌肉汤培养基内进行稀释并混匀,配制成药敏分析液;采用全自动加样仪完成上样。药敏板于37℃培养24h后细菌鉴定药敏分析仪利用vizion软件读取数据。

**1.4.3 结果判读及解释** 终点值为细菌抑制生长的最低浓度的上样孔值(MIC值)。出现单一的跳孔忽略不计,不读取其MIC值,仅读取连续没有生长的最低药物浓度孔。同时,以标准菌株大肠杆菌 ATCC25922的MIC读数在定制药敏板的质控范围内为质控合格。耐药性分析结果为耐药(R)、中介(I)和敏感(S),对所选抗菌药物耐药≥3种即判定为多重耐药。根据CLST推荐的稀释法抗菌药物敏感试验执行标准(2007年)及抗菌药物敏感性试验执行标准(2013年)进行结果解释。

## 2 结果

**2.1 菌株生化鉴定情况** 分离的85株阳性菌株经ATBID32E生化复核鉴定,均为阳性。

**2.2 菌株多重耐药情况** 共有34株耐≥3种抗生素,多重耐药率为40.0%,其中沙门菌多重耐药率

65.7%,大肠菌多重耐药率为78.6%;耐 $\geq 6$ 种抗生素的沙门菌为34.3%,大肠菌为50.0%;36株副溶血性弧菌未检测到多重耐药菌株。见表1。

2.3 沙门菌耐药情况 沙门菌主要耐受的抗生素:红霉素(100.0%)、氨苄西林/舒巴坦(65.7%)、头孢唑啉(65.7%)、萘啶酸(65.7%)、氨苄西林(62.9%)。35株沙门菌中最多可耐受11种抗生素,多重耐药率达65.7%。见表2。

2.4 副溶血性弧菌耐药情况 副溶血性弧菌中发生耐受的抗生素主要有头孢唑啉(100.0%)、氨苄西林(11.1%)、庆大霉素(2.8%)。在36株副溶血性弧菌中多重耐药率为0。见表2。

2.5 致泻性大肠埃希菌耐药情况 致泻性大肠埃希菌主要耐受的抗生素:红霉素(100.0%)、萘啶酸

(71.4%)、氨苄西林(64.3%)、氨苄西林/舒巴坦(57.1%)、阿奇霉素(57.1%)、头孢唑啉(50.0%)。在14株致泻性大肠埃希菌中多重耐药率达78.6%,最多耐受9种抗生素。见表2。

表1 2019年南京市食源性致病菌监测菌株耐药情况 [例(%)]

耐药种数	沙门菌 (n=35)	副溶血性弧 菌(n=36)	致泻大肠埃希 菌(n=14)	合计 (n=85)
0	1(2.9)	0	0	1(1.2)
1	4(11.4)	36(100.0)	1(7.1)	41(48.2)
2	7(20.0)	4(11.1)	2(14.3)	13(15.3)
3	1(2.9)	0	2(14.3)	3(3.5)
4	0	0	0	0
5	10(28.6)	0	2(14.3)	12(14.1)
$\geq 6$	12(34.3)	0	7(50.0)	19(22.4)

表2 2019年南京市食源性致病菌监测菌株耐药情况 (%)

抗生素	沙门菌(n=35)			副溶血弧菌(n=36)			致泻大肠埃希菌(n=14)		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
氨苄西林/舒巴坦(AMS)	65.7	0	34.3	0	0	100.0	57.1	7.1	35.7
头孢噻肟(CTX)	5.7	0	94.3	0	0	100.0	28.6	0	71.4
头孢他啶(CAZ)	5.7	0	94.3	0	0	100.0	14.3	0	85.7
甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(SXT)	17.1	0	82.9	0	0	100.0	21.4	0	78.6
亚胺硫霉素(IPM)	0	0	100.0	0	0	100.0	0	0	100.0
四环素(TET)	37.1	0	62.9	0	0	100.0	21.4	0	78.6
头孢唑啉(CFZ)	65.7	31.4	2.9	100.0	0	0	50.0	50.0	0
头孢西丁(CFX)	0	2.9	97.1	0	0	100.0	0	0	100.0
庆大霉素(GEN)	5.7	0	94.3	2.8	0	97.2	7.1	0	92.9
氨苄西林(AMP)	62.9	0	37.1	11.1	25.0	63.9	64.3	0	35.7
氯霉素(CHL)	14.3	2.9	82.8	0	0	100.0	0	0	100.0
环丙沙星(CIP)	0	0	100.0	0	0	100.0	7.1	0	92.9
红霉素(ERY)	100.0	0	0	0	13.9	86.1	100.0	0	0
萘啶酸(NAL)	65.7	0	34.3	0	0	100.0	71.4	0	28.6
阿奇霉素(AZM)	5.7	0	94.3	0	0	100.0	57.1	0	42.9

### 3 讨论

感染性腹泻是突发公共卫生事件的主要原因,病原菌以沙门菌、致泻性大肠杆菌、副溶血性弧菌及志贺菌最为常见。细菌性感染疾病在临床治疗中最大的难题是细菌耐药<sup>[1-3]</sup>,特别是近年来超级细菌的出现。为了更好地给临床合理用药提供依据,现将本中心2019年食源性疾病监测中分离的85株食源性病原菌进行耐药性检测分析。

耐药研究结果显示,2019年南京市引起腹泻的主要致病菌(沙门菌、副溶血性弧菌及致泻性大肠埃希菌)耐药率较高,其中致泻性大肠埃希菌,沙门菌多重耐药率也较高,沙门菌多重耐药率达65.7%,致泻性大肠埃希菌多重耐药率达78.6%,副溶血性弧菌目前无多重耐药。

2019年南京市省级哨点医院监测1246份样本,

共对分离的85株食源性致病菌,进行15种抗生素耐药检测(国家致病菌识别网和风评中心要求),其中致泻性大肠埃希菌14株(多重耐药率78.6%),沙门菌35株(多重耐药率65.7%),副溶血性弧菌36株(多重耐药率0)。沙门菌、副溶血性弧菌、致泻性大肠埃希菌是南京市食源性疾病主要致病菌,也是引发细菌性食物中毒最重要的致病菌。近年来,全国沙门菌分离株耐药较为严重,不同地区耐药特点有一定的差异<sup>[4-6]</sup>。特别是由于沙门菌耐药基因可以在质粒水平传染给动物和人,因而会对健康造成严重威胁<sup>[7]</sup>。本地区检出的沙门菌分离株,对一代头孢(头孢西丁)和三代头孢类(头孢噻肟、头孢他啶)抗生素相对敏感,对环丙沙星、氯霉素、庆大霉素及四环素耐药性均 $>60.0\%$ ,且36.5%的分离株耐 $\geq 5$ 种抗生素。

副溶血性弧菌为嗜盐菌,一直以来主要是我国沿

海城市引起食源性疾病腹泻的主要原因之一<sup>[8]</sup>,大多因携带 *tdh* 毒力基因<sup>[9-10]</sup>,少数携带 *trh* 毒力基因,但近年来非沿海城市中食物中毒及腹泻中分离率不断上升。本次监测表明,南京市检出的副溶血性弧菌,除对头孢唑啉耐药为 100%,氨苄西林为 11.1%,庆大霉素 2.8%外,其余均 100%敏感,与全省范围统计结果基本相同<sup>[11-12]</sup>。今后建议同步开展各地水产和腹泻中分离的副溶血性弧菌耐药检测比对,从而不断完善耐药监测和数据。

致泻大肠埃希菌广泛存在于自然界中,是人和动物肠道中的常居菌,属于条件致病菌,也是近年来引起食源性疾病的主要致病菌之一,主要包括肠产肠毒素大肠埃希菌(ETEC,携带 LT/ST)、致病性大肠埃希菌(EPEC,携带 *eaeA*)、侵袭性大肠埃希菌(EIEC,携带 *IpaH*)、肠出血性大肠埃希菌(EHEC,携带 STX1、STX2)和肠聚集性大肠埃希菌(EAEC,携带 *aggR*)以及近年来发现的肠产志贺样毒素且具侵袭力的大肠埃希菌(STES),婴幼儿及老年人为易感人群腹泻<sup>[13]</sup>,且食物中毒中常有分离,分离株对药物出现了较高的耐药性,因此受到了广泛的关注。本次监测来源于腹泻门诊病例的致泻大肠埃希菌耐药情况最为严重,致泻大肠埃希菌多重耐药率 78.6%(11/14),其中 2 株耐 3 种抗生素,2 株耐 5 种抗生素,7 株耐 6 种以上抗生素。由于多重耐药菌株的广泛存在,一定要根据药物敏感试验结果合理选择使用药物<sup>[14]</sup>。

细菌耐药性监测对了解食源性疾病腹泻感染菌对抗生素的敏感性及其耐药性变迁情况有重要意义,有助于南京市对食源性致病菌耐药趋势的研究与掌握,为预防食源性疾病及临床上合理使用抗菌药提供科学依据。同时建议农业部门对养殖的牲畜及使用的饲料加强抗生素使用的合理控制和管理,以减少耐药致病菌的产生。鉴于南京市沙门菌和致泻大肠埃希菌多重耐药现象较严重,建议同时加强高危食品样品中病原菌监测,并结合哨点医院对腹泻患者持续开展

长期有效的主动监测,进一步完善实验室监测系统,及时发布预警预报。

## 参考文献

- [1] Rahmani M, Peighambari SM, Svendsen CA, et al. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran [J]. BMC Vet Res, 2013, 9: 66.
- [2] Ballesté-Delpierre C, Solé M, Domènech ò, et al. Molecular study of quinolone resistance mechanisms and clonal relationship of *Salmonella enterica* clinical isolates [J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 43(2): 121-125.
- [3] 贾华云, 陈帅, 湛志飞, 等. 湖南省食源和人源汤卜逊沙门菌耐药性研究 [J]. 热带医学杂志, 2019, 19(10): 1221-1224.
- [4] 谭维维, 安娜. 2013—2014 年南通市城区食源性疾病哨点医院监测结果分析 [J]. 职业与健康, 2015, 31(20): 2776-2779.
- [5] 刘建平, 袁清连, 李俊彦, 等. 2013—2016 年深圳市食源性疾病暴发流行病学分析 [J]. 公共卫生与预防医学, 2017, 28(2): 6-9.
- [6] 黄方, 姜勇超, 王丽, 等. 沙门菌感染急性腹泻患儿预后及危险因素分析 [J]. 热带医学杂志, 2020, 20(9): 1236-1239.
- [7] Grimwood K, Forbes DA. Acute and persistent diarrhea [J]. Pediatr Clin N Am, 2009, 56(6): 1343-1361.
- [8] 周方满, 谢红意, 叶鸿雁, 等. 临床来源副溶血弧菌毒力基因及耐药性分析 [J]. 现代实用医学, 2016, 28(7): 949-950.
- [9] 韩东升, 陈晓, 李中杰, 等. 浙江省急性腹泻副溶血弧菌的流行及多位点序列分型分析 [J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(10): 917-919.
- [10] 孙宇峰, 范艳艳, 黄艳飞, 等. 临床分离副溶血弧菌药敏表型和毒力特征分析 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93(34): 2733-2735.
- [11] 秦思, 沈赞, 马恺, 等. 2012 年江苏省食源性致病菌耐药监测分析 [J]. 江苏预防医学, 2014, 25(1): 28-30.
- [12] 薛渊, 许金凤, 巢秀琴, 等. 2015 年镇江市食源性致病菌耐药监测分析 [J]. 江苏预防医学, 2018, 29(1): 84-85, 87.
- [13] 李顺姬, 王树东, 曹铁红, 等. 41 株致泻大肠埃希菌的药敏试验检测及结果分析 [J]. 中国卫生工程学, 2016, 15(2): 127-129.
- [14] 李月婷, 龚云伟, 刘桂华. 吉林省 2014 年食源性金黄色葡萄球菌的耐药性分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(21): 3772-3774.

收稿日期: 2021-01-06 修回日期: 2021-03-05 编辑: 李方