

# 惠州地区儿童患者中三代头孢菌素耐药沙门菌的耐药表型与耐药基因分析

张育超<sup>1</sup>, 黄雪霞<sup>1</sup>, 李文珊<sup>2</sup>

(1. 惠州市第一妇幼保健院检验科, 广东 惠州 516000; 2. 惠州市第一妇幼保健院药剂科, 广东 惠州 516000)

**摘要** 目的: 探讨惠州地区儿童患者中三代头孢菌素耐药沙门菌的耐药表型及耐药基因分布特点。方法: 选择2022年1月至2023年12月惠州市第一妇幼保健院经细菌培养证实为沙门菌感染的511例患儿, 对分离到的沙门菌进行药敏试验, 筛选出对三代头孢菌素耐药的沙门菌, 采用宏基因组二代测序(mNGS)对筛选出的三代头孢菌素耐药沙门菌进行耐药基因检测。结果: 共分离出31株沙门菌对三代头孢菌素耐药, 其中对头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟产生耐药的分别有31株(100%)、16株(51.61%)、13株(41.94%); 31株三代头孢菌素耐药沙门菌中主要以鼠伤寒沙门菌为主, 占67.74%, 其他血清型分别是肠炎沙门菌、纽兰沙门菌、都柏林沙门菌、未分型沙门菌分别占3.23%、6.45%、3.23%、19.35%; 31株沙门菌中30株检出了产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBL)耐药基因, 检出率为96.77%, 其中blaCTX、blaOXA、blaTEM分别有22株(73.33%)、16株(53.33%)、25株(83.33%)。结论: 惠州地区儿童患者中三代头孢菌素耐药沙门菌主要以鼠伤寒沙门菌血清型为主, 携带的ESBLs耐药基因以blaTEM和blaCTX为主, 且耐药基因呈多样性, 应继续强化临床分离株的耐药表型与耐药基因监测。

**关键词** 三代头孢菌素; 沙门菌; 耐药基因

中图分类号: R446.13 文献标识码: A 文章编号: 2095-9664(2024)04-0008-05

## Analysis of resistance phenotypes and resistance genes of third-generation cephalosporin-resistant Salmonella in pediatric patients in Huizhou area

ZHANG Yuchao<sup>1</sup>, HUANG Xuexia<sup>1</sup>, LI Wenshan<sup>2</sup>

(1. Department of Laboratory, The First Maternal and Child Health Hospital of Huizhou, Huizhou 516000, Guangdong, China; 2. Department of Pharmacy, The First Maternal and Child Health Hospital of Huizhou, Huizhou 516000, Guangdong, China)

Corresponding author: ZHANG Yuchao, Email: eacher2024@163.com

**Abstract Objective:** To characterize the resistance phenotype and distribution of resistance genes of third-generation cephalosporin-resistant Salmonella in pediatric patients in Huizhou area. **Methods:** Five hundred and eleven children with Salmonella infections confirmed by bacterial culture in the First Maternal and Child Health Hospital of Huizhou City from January 2022 to December 2023 were selected, and drug sensitivity tests were performed on the isolated Salmonella to screen out Salmonella resistant to third-generation cephalosporins, and drug-resistance genes of screened out third-generation cephalosporin-resistant Salmonella were detected by using second-generation sequencing of the macrogeneration genomes (mNGS). **Results:** A total of 31 strains of Salmonella were isolated resistant to three generations of cephalosporins, of which 31 (100%), 16 (51.61%), and 13 (41.94%) were resistant to ceftriaxone, ceftazidime, and cefepime respectively. The 31 strains of triple cephalosporin-resistant Salmonella were mainly dominated by Salmonella typhimurium, which accounted for 67.74% of the total, while the other serotypes were Salmonella enteritidis, Salmonella neurona, Salmonella dublin, and Salmonella untyphi, which accounted for 3.23%,

6.45%, 3.23%, and 19.35%, respectively. Ultra broad-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing (ESBLs) resistance genes were detected in 30 out of 31 *Salmonella* strains, with a detection rate of 96.77%. blaCTX, blaOXA, and blaTEM were found in 22 (73.33%), 16 (53.33%), and 25 (83.33%) of the strains, respectively. **Conclusion:** Third-generation cephalosporin-resistant *Salmonella* in pediatric patients in Huizhou area are mainly *Salmonella typhimurium* serotypes, carrying ESBLs resistance genes mainly blaTEM and blaCTX, resistance genes are diversified, and should continue to strengthen clinical isolates resistance phenotype and resistance gene monitoring.

**Key words** third generations of cephalosporins; *Salmonella*; drug resistance genes

沙门菌为肠杆菌科细菌,普遍存在于自然界中,其主要经食物或水源致人类发生感染,而肠道常常是受感染的首要部位,故以细菌性食物中毒、急性胃肠炎最常见<sup>[1]</sup>。据统计<sup>[2]</sup>,全世界范围内因沙门菌而导致腹泻的病例每年有9380万例,而死亡病例达15.5万人。三代头孢菌素是治疗沙门菌感染的主要药物,但随着近年来抗生素在临床上的广泛应用,沙门菌三代头孢菌素耐药问题愈发严峻,特别是对产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBL)的耐药问题,ESBLs不仅可水解头孢菌素类抗生素,还是多重耐药基因传播的重要机制之一<sup>[3]</sup>。儿童是沙门菌感染的高发群体,大部分儿童患者感染后易引发脑膜炎、肺炎、败血症等威胁患儿生命安全的疾病。因此,如何有效防控三代头孢菌素耐药沙门菌感染已成为儿童患者临床研究的重点。沙门菌感染具有季节性特点,且血清型十分复杂,可细分为2600多个血清分型,故准确对沙门菌血清分型具有重要意义<sup>[4]</sup>。目前,针对惠州地区儿童患者中三代头孢菌素耐药沙门菌的耐药性研究相对较少,且主要停留在流行病学调查等基础层面,而对三代头孢菌素耐药沙门菌的耐药基因分析暂未见相关报道。因此,本研究以本地区儿童患者为研究对象,分析其中三代头孢菌素耐药沙门菌的耐药表型和与耐药基因,旨在为本地区儿童患者的沙门菌感染防控及临床科学用药提供更多参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

选择2022年1月至2023年12月惠州市第一妇幼保健院经细菌培养证实为沙门菌感染的511例患儿,纳入标准:均为惠州地区儿童;年龄 $\leq 14$ 岁儿童;资料完整。排除标准:先天性脏器异常;标本受到污染;标本中除沙门菌感染外的其他病原菌。剔除同一例儿童患者分离的重复菌株。511例儿童沙门

菌患者中,男性279例,女性232例,年龄1个月~14岁,平均年龄(12.40 $\pm$ 8.86)月。居住地:农村317例,城市194例。

### 1.2 方法

**1.2.1 分离培养及细菌鉴定** 将儿童患者的粪便或肛拭子置于GN肉汤增菌液(江门凯林贸易有限公司)中,35 $^{\circ}$ C增菌培养6h后分别转种于SS平板和中国蓝平板(江门凯林贸易有限公司)上,在35 $^{\circ}$ C继续培养,24h后选取疑似菌落进行分离纯化以获得目标菌落,接着采用VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃公司)进行细菌鉴定,符合沙门菌属的进行后期研究。

**1.2.2 药敏试验** 围绕所分离的沙门菌,采用VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃公司)进行药敏试验。参照美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)<sup>[5]</sup>对判读药敏结果,并选取对三代头孢菌素(头孢他啶、头孢曲松)耐药的沙门菌。

**1.2.3 血清型鉴定** 对三代头孢菌素耐药的沙门菌进行血清型鉴定。将1滴沙门菌A-F群多价抗O血清滴至玻片上,应用无菌接种环取适量纯培养物,与多价血清混合成乳液状,混合60s内在黑色背景下观察血清中的凝集现象,如出现凝集为阳性,而均匀浑浊为阴性。另用生理盐水为阴性对照,用相同方式鉴定O抗原与H抗原,并结合O抗原和H抗原组合结果对照沙门菌抗原表,判断沙门菌血清型。

**1.2.4 耐药基因检测** 采用宏基因组二代测序(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)对筛选出的三代头孢菌素耐药沙门菌进行耐药基因检测。将标本破壁离心后取600 $\mu$ l上清液,并通过DNA提取试剂盒(广州核源)完成DNA的提取。提取的DNA通过超声破碎至200~300bp大小片段后,进行DNA末端修复、接头连接及PCR扩增,通过

Qubit 荧光计检测 DNA 文库浓度进行质控,将带有接头序列的双链 DNA 文库通过高温变性成单链 DNA,并添加 DNA 连接酶和环化引物使 ssDNA 两端互补配对连接成环,将反应体系中未环化的单链 DNA 进行消化降解,得到可用于制备 DNA 纳米球的单链环状 DNA。最后将单链环状 DNA 进行上机测序,采用标准的 mNGS 分析流程,对耐药基因信息进行数据处理。

### 1.3 统计方法

SPSS 23.0 统计学软件分析处理所得的研究数据,计数资料用率表示。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三代头孢菌素耐药沙门菌药敏情况分布

511 例儿童沙门菌感染患者中,共分离到 31 株沙门菌对三代头孢菌素耐药,其中对头孢曲松的耐药率最高 31 株,达 100%,详见表 1。

表 1 沙门菌对三代头孢菌素的耐药率

抗菌药物	耐药株数	耐药率(%)
头孢曲松	31	100
头孢他啶	16	51.61
头孢吡肟	13	41.94

### 2.2 三代头孢菌素耐药沙门菌血清型分布

31 株三代头孢菌素耐药沙门菌共分离出 5 种血清型,其中鼠伤寒沙门菌 21 株(67.74%),纽兰沙门菌 2 株(6.45%)。具体血清型分布情况见表 2。

表 2 三代头孢菌素耐药沙门菌血清型分布

血清型	株数	占比(%)
鼠伤寒沙门菌	21	67.74
纽兰沙门菌	2	6.45
肠炎沙门菌	1	3.23
都柏林沙门菌	1	3.23
未分型沙门菌	6	19.35

### 2.3 三代头孢菌素耐药沙门菌耐药基因分布

31 株沙门菌中 30 株检出了 ESBLs 耐药基因。检出率为 96.77%,包括 blaCTX-M 耐药基因 22 株(73.33%),blaOXA 型 16 株(53.33%),blaTEM 型 25

株(83.33%),其中有 12 株合并三种耐药基因、11 株合并两种耐药基因。具体耐药基因分布情况见表 3。另通过分析三代头孢菌素耐药与耐药基因相关性分析,发现三代头孢菌素耐药沙门菌与 blaCTX、blaOXA、blaTEM 耐药基因呈显著相关( $OR=5.17$ 、 $5.71$ 、 $6.40$ , $P < 0.05$ )。

表 3 三代头孢菌素耐药沙门菌耐药基因分布

耐药基因	检出数	占比(%)
blaCTX(22 株)		
blaCTX-55	12	54.55
blaCTX-14	2	9.09
blaCTX-65	8	36.36
blaOXA(16 株)		
blaOXA-10	16	100.00
blaTEM(25 株)		
blaTEM-206	14	56.00
blaTEM-166	2	8.00
blaTEM-104	6	24.00
blaTEM-105	1	4.00
blaTEM-214	1	4.00
blaTEM-70	1	4.00

## 3 讨论

成年人在感染沙门菌后大部分可自愈,症状较轻或者是无症状,是沙门菌的携带者,但儿童沙门菌感染后因机体免疫功能等因素易引发腹泻、发热等症状,甚至可导致儿童死亡<sup>[6-7]</sup>。

随着抗生素的广泛应用及滥用,抗生素耐药菌株在临床分离株的占比呈不断上升趋势,特别是治疗沙门菌感染的常用药物三代头孢菌素类,直接增加临床抗感染的治疗难度。目前虽有较多文献报道分析沙门菌感染的耐药情况,但不同地区沙门菌的耐药情况也存在一定的差异<sup>[8-9]</sup>。因此,研究惠州地区儿童患者中三代头孢菌素沙门菌耐药表型与耐药基因情况对于本地区沙门菌的防控及合理应用抗菌药物具有重要的临床指导意义。

本研究药敏结果显示,511 例患儿中对三代头孢菌素类耐药的沙门菌有 31 株,其中对头孢曲松耐药率最高,头孢他啶与头孢吡肟较低,与雷莹等<sup>[10]</sup>研究相符,提示临床需结合药敏试验结果合理选择抗菌药物,以减轻沙门菌对三代头孢菌素的耐药情况。对分离的 31 株三代头孢菌素耐药沙门菌中检

测到多种血清分型,其中鼠伤寒沙门菌(67.74%)是本地区最主要的流行血清型,与广州地区<sup>[11]</sup>、茂名地区<sup>[12]</sup>的沙门菌血清型分布相似,而北京地区<sup>[13]</sup>及欧洲地区<sup>[14]</sup>主要以肠炎沙门菌为主,提示不同地域的沙门菌感染血清型分布存在显著差异。此外,本研究因抗原血清检测的局限性及抗原结构的多样性等因素,有6株沙门菌无法确定到血清型,因此归为未分型沙门菌。

沙门菌对三代头孢菌素产生耐药性最重要的机制之一是ESBLs,其亦是革兰阴性杆菌中常见的水解酶, $\beta$ 内酰胺酶能通过水解头孢类药物的活性基团,从而使沙门菌对头孢类抗生素产生耐药<sup>[15]</sup>。ESBLs中常见的基因型为blaCTX-M、blaOXA、blaTEM及blaSHV,本研究共分离出30株ESBLs耐药基因,其中blaCTX-M、blaOXA、blaTEM分别有22株(73.33%)、16株(53.33%)、25株(83.33%),均高于黄晓黎等<sup>[16]</sup>研究报道,且blaTEM基因型检出最高,而有研究报道<sup>[17]</sup>blaCTX-M是最主要沙门菌ESBLs耐药基因,以上研究结果产生的差异可能与研究对象的地域不同及年份差异有关。研究指出<sup>[18]</sup>,blaCTX-M是导致ESBLs引发产酶株传播或流行的主要原因,且blaCTX-M型对头孢他啶水解能力较低。blaCTX-M基因亚型种类较多,而本研究主要检出blaCTX-55、blaCTX-M-65、blaCTX-M-14基因亚型,并以blaCTX-55(54.55%)较为多见,与穆玉姣等<sup>[19]</sup>研究报道一致。blaOXA型主要对苯唑西林、氯唑西林具有较高水平的水解活性,且对头孢类抗生素也产生耐药性<sup>[20]</sup>。blaTEM型在革兰阴性杆菌中最为常见,也是导致肠杆菌科对头孢菌素耐药最主要的机制。本研究主要检出blaTEM-166、blaTEM-105、blaTEM-214和blaTEM-70 4种基因亚型,进一步提示耐药基因型呈现多样性分布。此外,本研究还发现三代头孢菌素耐药沙门菌耐药基因与三代头孢菌素产生耐药性密切相关,但具体耐药机制还需深入研究。

综上,惠州地区儿童沙门菌感染患者仍存在对三代头孢菌素耐药情况,且血清型分布及耐药基因分型呈多样性,需进一步开展此类耐药菌株的监测,为防控本地区沙门菌对三代头孢菌素耐药情况提供更多参考数据。

#### 参考文献

[1] 陈建辉,欧剑鸣,陈伟伟,等. 1984—2016年福建省人源

与食源性沙门菌血清分型和耐药特征研究[J]. 疾病监测, 2019, 34(4): 316-321.

- [2] 陈文,冷嘉玲,林黎,等. 2020年四川省哨点医院沙门菌腹泻病例监测结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2023, 39(7): 777-781.
- [3] 孙双勇,王蒙蒙,李丽,等. 抗生素耐药与抗生素新药开发的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(2): 221-229.
- [4] 李毅,章乐怡,谢爱蓉,等. 2006—2021年温州地区沙门菌感染流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(6): 940-945.
- [5] Clinical and Laboratory Standard Institute. M100S. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Nine Edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2019.
- [6] 单鸣凤,崔荣星,周凯,等. 92例儿童沙门菌肠炎病原学及临床特征[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(14): 2212-2217.
- [7] 周明明,史秋橙,张秀彩,等. 儿童来源肠道沙门菌肠道亚种非~群血清型分离株的耐药性及分子流行病学和毒力基因分布[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(11): 1057-1063.
- [8] 沈珑慧,何娟妃,罗巧二,等. 2019—2022年某院213例儿童沙门菌感染的临床特点和菌株表型分析[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(10): 1192-1197.
- [9] 王彩红,黄美恋,卓志强,等. 厦门地区儿童侵袭性非伤寒沙门菌感染临床特征和耐药性分析[J]. 中华儿科杂志, 2023, 61(8): 685-689.
- [10] 雷莹,王茵娜,林春丽. 泉州地区腹泻患儿沙门菌的流行趋势及耐药特征研究[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(17): 35-39.
- [11] 黄水飞,彭淑萍,许铭清,等. 2017—2019年茂名市沙门菌流行特征及耐药性分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(6): 681-685.
- [12] 高飞,郑浩,王洁琳,等. 1022例儿童感染沙门菌的流行特征及耐药分析[J]. 中华生物医学工程杂志, 2021, 27(5): 533-540.
- [13] 王维钧,舒高林,彭华,等. 北京市昌平区感染性腹泻标本常见病原菌谱分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(10): 1274-1277.
- [14] European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report [J]. EFSA J, 2023, 21(12): e8442.
- [15] Hsu P - C, Wang Y - W, Chen B - H, et al. Carbapenem resistance in extensively drug - resistant Salmonella enterica serovar Agona and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing S. Infantis[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(6): e0292223.

- [16] 黄晓黎,陈晓,王若南,等. 耐三代头孢菌素沙门菌的耐药基因分析[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(2): 105-109.
- [17] 邱玉锋,陈建辉,黄梦颖,等. 福建省鼠伤寒沙门菌 $\beta$ -内酰胺耐药表型及ESBLs耐药基因分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(10): 944-949.
- [18] Nargesian M, Saffari M, Zargar M. Molecular Evaluation of  $\beta$ -Lactamase (blaSHV, blaTEM, blaCTX-M) Genes in Multidrug Resistant of Klebsiella Pneumoniae [J]. Clin Lab, 2023, 69(12).
- [19] 穆玉姣,李东晓,尤爱国,等. 2015—2018年河南省儿童腹泻患者分离的非伤寒沙门菌病原特征及耐药性[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2020, 40(10): 787-791.
- [20] Muddassir M, Munir S, Raza A, et al. Epidemiology and high incidence of metallo- $\beta$ -lactamase and AmpC- $\beta$ -lactamases in nosocomial Pseudomonas aeruginosa [J]. Iran J Basic Med Sci, 2021, 24(10): 1373-1379.

(收稿日期:2024-04-17)

(本文编辑:张翔)

## · 读者 · 作者 · 编者 ·

### 关于论文写作中的作者署名与致谢

我国著作权法公布以来,已得到社会各界的广泛重视,作为医学科技期刊必须不折不扣地执行著作权法。为此将本刊对作者署名和致谢的有关要求重申如下。

#### 1 作者署名的意义和应具备的条件

##### 1.1 署名的意义

(1)标明论文的责任人,文责自负。(2)医学论文是医学科技成果的总结和记录;是作者辛勤劳动的成果和创造智慧的结晶;也是作者对医学事业做出的贡献,并以此获得社会的尊重和承认的客观指标;是应得的荣誉;也是论文版权归作者的一个声明。(3)作者署名便于编辑、读者与作者联系,沟通信息,互相探讨,共同提高。作者姓名在文题下按序排列,排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再做更改;作者单位名称及邮政编码脚注于同页左下方。

##### 1.2 作者应具备下列条件

(1)参与选题和设计,或参与资料的分析和解释者。(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者。(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术界进行答辩,并最终同意该文发表者。以上3条均需具备。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。其他对该研究有贡献者应列入致谢部分。对文章中的各主要结论,均必须至少有1位作者负责。在每篇文章的作者中需要确定1位能对该论文全面负责的通讯作者。通讯作者应在投稿时确定,如在来稿中未特殊标明,则视第1作者为通讯作者。论文首页脚注通讯作者姓名及Email地址。作者中如有外籍作者,应附本人亲笔签名同意在本刊发表的函件。集体署名的论文于文题下列署名单位,于文末列整理者姓名,并于论文首页脚注通讯作者姓名及Email地址。集体署名的文章必须将对该文负责的关键人物列为通讯作者。通讯作者只列1位,由投稿者决定。

#### 2 致谢

在文后致谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予致谢。但必须征得被志谢人的书面同意。致谢应避免以下倾向:(1)对确实给予了帮助的单位或个人,甚至用了他人的方法、思路、资料,为了抢先发表,而不公开致谢和说明。(2)出于某种考虑,将应被志谢人放在作者的位置上,混淆了作者和被志谢者的权利和义务。(3)以名人、知名专家包装自己的论文,抬高论文的身份,将未曾参与工作的,也未阅读过该论文的知名专家写在被志谢中。被志谢者包括:(1)对研究提供资助的单位和个人、合作单位。(2)协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人。(3)协助诊断和提出重要建议的人。(4)给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者。(5)做出贡献又不能成为作者的人,如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人,阐明其支援的性质。(6)其他需志谢者。