

一株猪源鼠伤寒沙门氏菌的耐药性鉴定及其消除

贾爱卿^{1,2} 刘维红¹ 郭爱珍^{1*} 陈焕春¹

(¹ 华中农业大学动物医学院农业微生物学国家重点实验室 湖北省预防兽医学重点实验室 武汉 430070)

(² 广东省农业科学院兽医研究所 广州 510640)

摘 要 猪源鼠伤寒沙门氏菌临床分离株 17Y 检测其对 19 种抗生素的耐药性,结果耐 14 种抗生素。用高温及高浓度 SDS 处理后,获得对 11 种抗生素的敏感性,该菌株命名为 17S1。PCR 检测证明,大部分耐药基因存在于质粒上,包括 I 型整合子携带耐药基因,且随着质粒的消除而被消除。所鉴定的耐药基因有 *bla*_{TEM}、*bla*_{OXA-1}、*cat*1、*tet*(B)、*aac*C2、*aad*A8b、*dhfr*X II 和 *sul*1 等。喹诺酮类药物的靶基因 *gyrA* 与 *parC* 位于染色体上。*GyrA* 在耐药决定区第 87 位氨基酸突变(N78D),导致了喹诺酮类药物的耐药性逆转。敏感菌中扩增不到质粒毒力基因 *spv* 与 *rck*。耐药性消除后的菌株 17S1 对小鼠的毒力降低(LD₅₀ 增加 10 倍),在小鼠体内的增长与散速度也显著降低($P < 0.05$)。以上证据表明,鼠伤寒沙门氏菌的多重耐药性主要由质粒决定,研究开发新型质粒消除剂将对克服鼠伤寒沙门氏菌多重耐药性具有重要意义。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌 耐药性 质粒消除 细菌毒力 整合子

中图分类号: S85 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)05-0789-07

细菌耐药性是全世界广为关注的公共卫生问题,耐药性使得大多数原本对感染治疗十分有效的抗菌素失去效力^[1]。细菌耐药性机制主要包括:获得外源耐药基因、改变药物靶位、改变膜渗透屏障、改变药物主动外排泵机制等^[2]。其中外源耐药基因主要通过耐药质粒、整合子、转座子等可动遗传要素的 DNA 水平转移而获得。而获得耐药质粒是细菌耐药性最为普遍的机制^[3]。解决耐药性问题的途径有许多,但研制新型抗菌药及耐药性逆转剂无疑是两条行之有效的途径。由于新型抗菌药的研制需要较长的周期及大量的投入,因此,耐药性逆转剂的研究已成为当前的热点领域之一。耐药性逆转剂主要包括耐药质粒消除剂、外排泵抑制剂、染色体突变抑制剂等^[4,5]。传统耐药质粒消除剂如 SDS 对机体有较强的毒副作用。近年来,人们纷纷寻找中药、植物提取物等毒副作用低的自然物质,或质粒不相容性分子作为耐药性逆转剂^[4-7],配合抗生素,用于耐药菌所致疾病的治疗^[8]。

沙门氏菌是属于肠杆菌科沙门氏菌属的一大群革兰氏阴性杆菌,血清型众多,有 2500 种以上,能致多种动物的沙门氏菌病。家畜、禽沙门氏菌病多表现为肠炎及败血症^[9]。同时,动物沙门氏菌可通过

食物感染人类,是致人类食物中毒的主要细菌,因此,动物沙门氏菌耐药性已成为十分重要的全球性公共卫生问题^[10,11]。

本实验室从临床发病猪中分离出多株多重耐药性沙门氏菌,主要包括猪霍乱沙门氏菌与鼠伤寒沙门氏菌等血清型,其中鼠伤寒沙门氏菌的耐药性最为严重。本研究以其中一株多重耐药性鼠伤寒沙门氏菌为研究材料,探讨沙门氏菌的耐药机制,并通过观察耐药性消除对沙门氏菌毒力及生长特性的影响,为进一步研究沙门氏菌耐药性逆转剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和主要材料 致病性猪源鼠伤寒沙门氏菌分离株 17Y,为本实验室从临床发病猪病料中分离获得。病猪来自于实验室接收的临床送检猪,同栏猪群均有腹泻症状,且经抗生素治疗无效。初诊为沙门氏菌病。用灭菌棉签在盲肠部位采集粪样,接种选择性富集肉汤培养基分离,经培养特征、生化特征、血清型检测等鉴定为鼠伤寒沙门氏菌,其血清型抗原式为 O4Hi。药敏质控菌大肠埃希氏菌

基金项目: 国家自然科学基金(30571386); 中国教育部留学回国人员科研基金(教外司函[2004]176号)

* 通讯作者。Tel: 86-27-87286861; Fax: 86-27-87281795; E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 贾爱卿(1979-),女,山东烟台人,硕士研究生,研究方向为预防兽医学。E-mail: aiqingjia1123@sohu.com

收稿日期: 2005-11-30; 接受日期: 2006-01-09; 修回日期: 2006-04-18

(ATCC25922)及金黄色葡萄球菌(ATCC25923)购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.2 试剂和仪器 实验所用酶均购于大连宝生物公司, M-H 琼脂、SS 增菌液和药敏试纸等均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 药敏实验

采用 Kirby-Bauer (K-B) 纸片扩散法, 通过抑菌圈的大小判断细菌对药物的敏感性。判断按产品说明和美国实验室标准化委员会(NCCLS)制定标准(NCCLS2000)进行。所用抗生素为革兰氏阴性细菌可能敏感的抗生素, 共 19 种。(1)氨基糖苷类: 丁胺卡那(Amk), 庆大霉素(Gen), 卡那霉素(Kan), 新霉素(Neo), 链霉素(Str); (2)氟喹诺酮类: 环丙沙星(Cip), 恩诺沙星(Enr), 氟哌酸(Nor); (3) β -内酰胺酶类: 先锋 V(Cfz), 先锋 VI(Rad), 氨苄青霉素(Amp), 阿莫西林(Amx); (4)其它: 氯霉素(Chl), 强力霉素(Dox), 痢特灵(Fur), 多粘菌素 B(Pol), 四环素(Tet), 甲氧胺嘧啶(TMP), 复方新诺明(TMP/SMZ)

等。

1.3 耐药基因及 I、II 型整合子检测

用全细菌裂解上清液为模板, PCR 扩增耐药基因及 I 型、II 型整合子。引物设计参考 GenBank 中的已知序列, 退火温度和预期产物大小详见表 1, 引物由北京奥科生物有限公司合成。耐药基因包括氨基糖苷类耐药基因(*bla*TEM、*bla*OXA-1)、氯霉素耐药基因(*cat*1)、四环素耐药基因(*tet*(B))、庆大霉素耐药基因(*aac*C2)、喹诺酮耐药基因(*gyr*A、*par*C)、I 型整合酶(*in*TI1)及 II 型整合酶(*in*TI2)、I 型整合子两端保守序列(*in*F、*sul*R)等。

整合子检测采用如下策略: 先用高度保守性引物 *in*TI1 进行 PCR 扩增, 结果为阴性者放弃, 结果阳性者再进一步用 I 型整合子两端保守序列引物 *in*F 和 *sul*R 扩增整合子, 得到的 PCR 产物回收纯化后, 克隆至 T 载体, 大连 TaKaRa 公司测序鉴定, 并用 NCBI 的 Blast2.2.12 软件进行同源性比对分析。II 型整合子只检测 II 型整合酶 *in*TI2。

表 1 PCR 扩增耐药基因所用引物序列

Table 1 PCR primer sets of resistance genes used in this study

Genes ^a	Sequence of primers (5' ~ 3')	T _m /°C	Length of genes/bp	GenBank accession
<i>bla</i> TEM	TTGGGTGCACGAGTGGGT TAATTGTTGCCGGAAGC	56	504	AY509004
<i>bla</i> OXA-1	AGCAGCGCCAGTGCATCA ATTGACCCCAAGTTTCC	56	708	AY259086
<i>cat</i> 1	CTTGTCCCTTGCCTATAAT ATCCAATGGCATCCTAAAG	56	507	BX248359
<i>tet</i> (B)	TTGGTTAGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCAATAACACCG	56	704	BA000035
<i>aac</i> C2	GGCAATAACGGAGGAATTCCA CTCGATGGCGACCGAGCTTCA	57	557	BA000030
<i>gyr</i> A	ATGAGCGACCTTGGGAGAGA TACTCCTCAGCGTCATCCG	60	2600	AL627274
<i>par</i> C	CAGCACGTACAGGTGCGCCA GTAGAGCATATGCTGATGGA	60	334	AL627277
<i>in</i> TI1	CTACCTCTACTAGTGAGGG ATGAAAACCGCCACTGCGCC	60	1000	AM040708
<i>in</i> TI2	TFACTGATTGATAAGTAGCAT CTAACAGTCCATTTTTAAATT		977	AY509004
<i>in</i> F	TGACCGAACGACGGCTGGT	57	Unknown	AM040708
<i>sul</i> R	CTAGGCATGATCTAACCCCTC			AM040708

^a *bla*TEM, *bla*OXA-1: resistance gene of aminoglycosides; *Cat*1: resistance gene of chloramphenicol; *tet*(B): resistance gene of tetracycline; *aac*C2: resistance gene of gentamicin; *gyr*A, *par*C: resistance gene of quinolones; *in*TI1: type I integrase; *in*TI2: type II integrase; *in*F, *sul*R: 3', 5' conserved sequence of type I integron.

1.4 质粒毒力基因的扩增

用全细菌裂解上清液为模板, PCR 扩增质粒毒力基因。引物序列及退火温度列于表 2。毒力基因引物设计参考 <http://www.mgc.ac.cn/VFs> 中给出的序列^[12], 由北京奥科生物有限公司合成。

1.5 耐药性消除

1.5.1 耐药质粒消除: 采用高温 SDS 法^[13]进行耐药质粒消除。将沙门氏菌接种于 3mL SDS 终浓度为 0.5% 的 SS 增菌液中, 置 45°C 水浴 18h, 取 30 μ L 菌液接种于 3mL SS 增菌液中, 37°C 振荡 18h, 取 30 μ L 菌液再次接种于含相应浓度 SDS 的 SS 增菌液中, 置

45℃水浴 18h,取 30 μ L 菌液再次接种于 3mL SS 增菌液中,37℃振摇 18h 后,提质粒检测。质粒带未发生变化则继续消除,若质粒带发生变化,则进一步做药敏实验。质粒 DNA 和基因组 DNA 的抽提均按文献 [14] 进行。消除率试验以耐药性消除后抗生素敏感株(17S1)对氨苄青霉素(Amp)的敏感性作为筛选

参考条件,将 17S1 单个菌落点接于含 100 μ g/mL Amp 的 LB 平板,耐药性消除前的耐药株(17Y)做平行对照,37℃过夜培养,计数菌落数,计算其消除率。消除率(%)=(点接菌落总数-抗性平板上生长菌落数) \times 100/点接菌落总数。

表 2 质粒毒力基因 PCR 所用引物序列

Table 2 PCR primer sets for plasmid virulence gene amplification used in this study

Genes	Sequence of primer(5'→3')	Length of genes/bp	T _m /℃	GenBank accession
<i>spuA</i>	ATGAATATGAATCAGACCAC CTAAACTGCCGCTGGCAGC	768	60	AE006471
<i>spuB</i>	ATGTTGATACTAAATGGTTT CTATGAGTTGAGTACCCTCA	1772	56	AE006471
<i>spuC</i>	ATGCCCATAAATAGGCCTAA TTACTCTGTCATCAAACGAT	726	60	AE006471
<i>spuD</i>	ATGAGAGTTTCTGGTAGTGC TCAATCGTGTITTTTCATCAT	651	60	AE006471
<i>spuR</i>	ATGGATTCTTGATTAATAA TCAGAAGGTGGACTGTTTCA	894	56	AE006471
<i>rck</i>	ATGAAAAAATCGTTCTGCC TCAGAACC GGTAACCGACAC	558	60	AE006471

1.5.2 耐药消除稳定性实验 将 17S1 在普通 LB 平板上传 100 代,按 10 代间隔进行药敏检测,跟踪耐药性变化,同时将 17S1 接种含 Amp 的液体 LB,初浓度为 10 μ g/mL,逐次递加 10 μ g/mL,按 5 代间隔做药敏实验,传代至 17S1 不能生长为止。

1.6 小鼠急性毒性实验

用半数致死量(LD₅₀)评价耐药性消除对细菌毒力的影响。18~20g 昆明鼠 92 只,雌雄各半,由湖北省疾病预防控制中心提供。按简化寇氏法(Karber 法)规定操作^[15],采用腹腔注射接种动物。先经动物预实验测出细菌对小鼠的最高致死量和最低致死量,确定组间间距为 1.4。每株菌设 4 个剂量组。实验前小鼠禁食禁水,随机分成 9 组,每组各 8 只,包括 1 个对照组。对照组腹腔注射生理盐水。接种后禁食半小时,接着恢复常规管理,连续观察 15d。及时观察记录死亡数,按以下公式计算 LD₅₀: $\log LD_{50} = X_m - d(\sum p - 0.5)$,其中, X_m:最大剂量对数;d:相邻剂量比值的对数;p:各组的死亡率(以小数表示); $\sum p$:各组死亡率的总和。

1.7 细菌在小鼠体内各器官中的动态分布

分析耐药性消除对细菌体内侵袭与扩散能力的影响。20 只昆明系小鼠,随机分成两组,分别腹腔注射 1 \times 10⁵CFU 的 17Y 和 17S1。从注射后 24h 开始,每 48h 取 2 只小鼠解剖,取其肝脏和脾脏,匀浆

后用生理盐水稀释进行活菌计数,计算肝脏和脾脏中的含菌量^[15]。

1.8 细菌体外生长曲线的测定

测定细菌体外生长曲线,以分析耐药性消除对细菌生长特性的影响。分别取耐药株 17Y 与抗生素敏感株 17S1,按参考文献 [16] 的方法进行体外生长曲线测定。

2 结果

2.1 耐药性消除鉴定

所检测的 19 种抗生素中,致病性猪源鼠伤寒沙门氏菌 17Y 对其中 14 种有抗药性,只对 Kan、Cfz、Rad、Amk、Pol 等 5 种抗生素敏感。

耐药菌 17Y 经高温(42℃)高浓度 SDS(0.5%)处理 72h,进行药敏检测,结果发现共消除了 11 种抗生素的耐药性。耐药性消除后的敏感菌 17S1 对 Fur、Cip、Nor、Enr、Amp、Amx、Gen、TMP/SMZ、TMP、Chk、Tet 等 11 种抗生素均敏感(图 1)。虽然 17S1 对 Neo、Dox 2 种药物仍有抗性,但药敏检测时已经有抑菌圈出现。细菌对 Str 的耐药性未被消除(表 3)。以氨苄青霉素为参考抗菌素,检测了耐药性消除率。结果抗性菌 17Y 35 个对照菌落在 Amp+LB 平板上均生长良好,而 Amp⁺LB 平板上的 144 个 17s1 菌落均未生长,说明消除率达 100%(144/144)。

表3 细菌质粒消除处理后对抗生素敏感性的变化

Table 3 Reversal of antimicrobial resistance after plasmid elimination treatment

Sort of antibiotics	Antibiotics	17y		17S1	
		Diameter of inhibition zone/mm	Sensitivity	Diameter of inhibition zone/mm	Sensitivity
Aminoglycosides	Gen	0	R ^a	21	S ^b
	Neo	16	R	16	R
	Str	0	R	0	R
Fluoroquinolones	Cip	9	R	24	S
	Enr	0	R	23	S
	Nor	7	R	23	S
β -lactams	Amp	0	R	19	S
	Amx	0	R	28	S
Others	Chl	0	R	18	S
	Fur	10	R	22	S
	Tet	0	R	19	S
	TMP	0	R	32	S
	TMP/SMZ	0	R	27	S
	Dox	0	R	13	R

^a R : Resistance ^b S : Sensitivity.

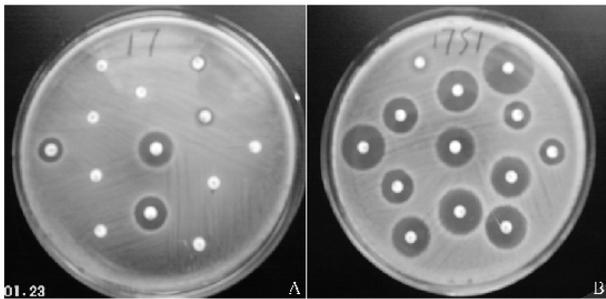


图1 SDS消除细菌耐药性结果

Fig.1 Drug resistance reversal after SDS treatment. 1. Drug resistance for resistant strain 17Y; 2. Drug resistance was reversed by SDS.

耐药性消除前后细菌质粒图谱发生明显改变。抗性菌经琼脂糖凝胶电泳后可检测到4条质粒带。SDS高温处理后,一条质粒带消失。剩下3条带中,有一条最大质粒带与处理前相同,另检测到两条较小的质粒带(图2)。

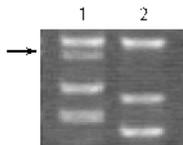


图2 耐药性消除前后细菌质粒图谱变化

Fig.2 Plasmid profile comparison of resistant strain 17Y (lane 1) and susceptible strain 17S1 (lane 2). The arrow shows the disappeared plasmid band in 17S1 after SDS treatment of 17Y.

2.2 质粒毒力基因的检测

为了证明耐药性消除与鼠伤寒沙门氏菌毒力质粒相关,进行了质粒毒力基因的PCR检测。抗性菌株17Y的6个质粒毒力基因 *spvA*, *spvB*, *spvC*, *spvD*, *spvR*, *rek* 检测均为阳性,而17S1检测均为阴性(图3)。由于这些毒力基因都位于沙门氏菌的毒力相关质粒上,由此可见该质粒已被消除掉。

2.3 耐药基因定位分析

在耐药基因的检测中,从原耐药菌株17Y中扩

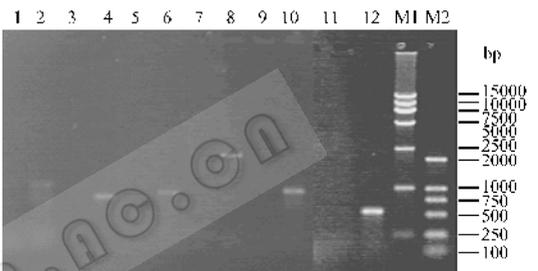


图3 鼠伤寒沙门氏菌质粒毒力基因PCR扩增产物

Fig.3 PCR products of *Salmonella typhimurium* plasmid virulence genes. 1. 17S1 *spvR*; 2. 17Y *spvR* (894bp); 3. 17S1 *spvD*; 4. 17Y *spvD* (651bp); 5. 17S1 *spvC*; 6. 17Y *spvC* (726bp); 7. 17S1 *spvB*; 8. 17Y *spvB* (1772bp); 9. 17S1 *spvA*; 10. 17Y *spvA* (768bp); 11. 17S1 *rek*; 12. 17Y *rek* (558bp); M1. DNA ladder DL15000; M2. DNA ladder DL2000.

增到5个耐药基因,分别为耐 β -内酰胺酶类基因 *blaTEM* 和 *blaOXA-1*、耐氨基糖苷类的基因 *cat1*、耐四环素的基因 *tet(B)*、耐庆大霉素的基因 *aacC2* 等。在耐药性消除后的敏感菌株17S1中均未检测到上述5个基因,说明这5种抗性基因均定位在耐药质粒上。

用PCR进行了整合子检测。从耐药性消除后的敏感菌17S1中未扩增出整合酶1基因 *intI1* 与整合酶2基因 *intI2*。原耐药菌17Y的整合酶2基因 *intI2* 检测为阴性,但整合酶1基因 *intI1* 为阳性。进一步以I型整合子两端特异保守序列为引物 *inF/sulR*,成功地从17Y菌中扩增出一条约3200bp的I型整合子基因片段,说明该整合子位于质粒上。

对I型整合子进行测序鉴定及用BLAST进行序列同源性比对分析,发现该整合子依次携带有一个甲氧苄胺嘧啶耐药基因 *dhfrXII*,一个开放读码框ORF和一个氨基糖苷类耐药基因 *aadA8b* 和I型整合子的3'保守序列,其中包括 *qacE* Δ 基因和 *sul1* 基因。*qacE* Δ 基因是季铵酸盐及溴化乙锭耐药基因,*sul1* 基因是磺胺类耐药基因。该整合子与 GenBank

中公布序列 AM030708 的同源性为 98%。

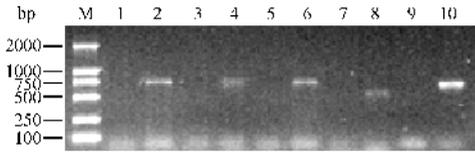


图 4 鼠伤寒沙门氏菌 5 种耐药基因的 PCR 扩增产物

Fig. 4 PCR products of five resistance genes. M. DNA ladder DL2000 ; 1. 17S1blaTEM; 2. 17Y blaTEM(504bp); 3. 17S1 blaOXA-1 ; 4. 17Y blaOXA-1(708bp); 5. 17S1cat1 ; 6. 17Y cat1(507bp); 7. 17S1 aacC2 ; 8. 17Y aacC2(557bp); 9. 17S1 te(B); 10. 17Y te(B)(704bp).

SDS 高温处理消除了鼠伤寒沙门氏菌 17Y 对 3 种氟喹诺酮类抗生素的耐药性,但运用 PCR 从原耐药菌 17Y 和敏感菌 17S1 中均扩增到喹诺酮类耐药基因 *gyrA* 与 *parC* 基因,说明这两个基因位于细菌染色体上。进一步将 PCR 产物进行克隆测序,发现 17Y 和 17S1 耐药基因 *parC* 的耐药决定区(quinolone resistance determinational region, QRDR)碱基序列完全相同。但是,敏感菌 17S1 的 *gyrA* 耐药决定区(QRDR)第 87 位氨基酸发生了突变,由耐药菌的天冬酰胺(N)突变为敏感菌的天冬氨酸(D),说明耐药性消除是由于 *gyrA* 基因耐药决定区的点突变(N87D, AAC→AGC)引起。

2.4 耐药性消除对细菌生物学特性影响

为了评价耐药性消除对细菌生物学特性的影响,对细菌进行了小鼠半数致死量测定、细菌体内侵袭与传播能力观察、及体外生长曲线的比较。

2.4.1 耐药性消除前后半数致死量的差异 耐药菌 17Y 的接种剂量分别为: 1.0×10^6 、 7.1×10^5 、 5.1×10^5 、 3.6×10^5 CFU。敏感菌 17S1 的接种剂量分别为: 1.0×10^7 、 7.1×10^6 、 5.1×10^6 、 3.6×10^6 CFU。小鼠注射沙门氏菌后出现精神萎靡、食欲下降、拉稀等现象,17Y 在第 5 天开始出现死亡,并开始大量死亡;17S1 在第 7 天出现死亡,第 9 天后开始死亡的数量增加。通过计算,17Y 的半数致死量 LD_{50} 为 5.23×10^5 , 17S1 的半数致死量 LD_{50} 为 5.01×10^6 ,表明耐药性消除前后沙门氏菌对小鼠的半数致死量相差 10 倍。

2.4.2 耐药性消除对沙门氏菌在小鼠体内扩散及体外生长的影响 两株细菌以同样剂量(1×10^5 CFU)分别腹腔接种 10 只小鼠,定期扑杀小鼠,从脏器回收细菌。结果表明,耐药株 17Y 在小鼠肝脏和脾脏中的增长速度均大于敏感株 17S1,但其基本趋势相当。细菌回收量在接种 1d 后迅速升高,并达到最高值,第 3 天迅速下降,但到第 5 天菌量又有所回升,却低于第 1 天;接下来菌量降到一个很低的水平,并一直维持这个水平(图 5),*t* 检验均有具有显著性差

异 ($P_{肝} = 0.04$, $P_{脾} = 0.03$)

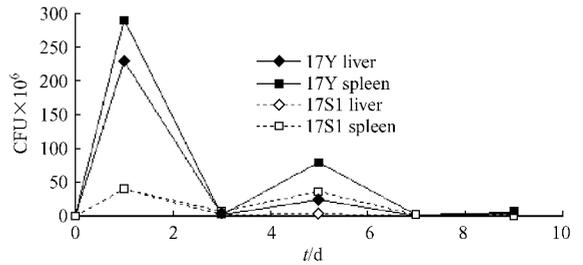


图 5 17y 和 17S1 在小鼠肝脏和脾脏中的动态平衡分布

Fig. 5 Dynamic distribution of *Salmonella typhimurium* 17Y and 17S1 in mouse liver and spleen.

体外培养条件下,17Y 和 17S1 的生长情况也有所差异,17Y 比 17S1 的增长速度慢。而 17S1 比 17Y 提前 1h 进入对数生长期,且持续时间长。17Y 的生长期为 3~7h,17S1 的生长期为 2~8h。

2.4.3 耐药性消除的稳定性: 将耐药消除菌 17S1 在 LB 平板上连续传 100 代后做药敏实验,17S1 的药敏性没有发生改变。将其在含有 Amp 的培养基中连续培养,至第 5 代时就开始出现抗性。随着 Amp 浓度的增加,耐药性加重,到 25 代时已经对同一类药物出现了不同程度的耐药,完全耐 Amp 和 Amx,对原先敏感的先锋 V 和先锋 VI 也产生了耐药。表明耐药性消除菌在没有特殊抗生素压力下可稳定生存,但施加抗生素压力时还会再次诱导出耐药性。

3 讨论

鼠伤寒沙门氏菌是导致人类食物中毒的主要细菌^[17],而猪肉又是我国消费者膳食中的主要肉制品,占肉类消费的 65% 以上(<http://www.fao.org>)。因此,致病性猪源鼠伤寒沙门氏菌的多重耐药性应该引起高度重视。在本实验室的前期研究中,于 2003~2004 年间对实验室临床初诊为沙门氏菌病的送检病猪样本进行细菌分离,共获得 33 株猪源沙门氏菌,其中 94.3% 的菌株耐 10 种以上抗生素。所调查地区涉及 7 个省份,但以湖北省为主。4 年前的一项类似调查表明,沙门氏菌分离株对庆大霉素、新霉素、复方新诺明等 3 种抗生素的耐药率在 15% 以下,因此建议该 3 种抗生素可作为治疗猪沙门氏菌的首选药^[18]。然而本实验室证实,80% 以上的猪源沙门氏菌分离株均对以上 3 种抗菌素具有耐药性,说明猪源沙门氏菌耐药性增长迅速。本论文所用的抗性菌株 17Y 为其中之一,对 19 种抗生素中的 14 种具有抗药性,尤其是喹诺酮类药物。喹诺酮类药物为当前兽医学与医学治疗感染的首选药^[8],其耐药性将对医学及兽医学临床治疗产生严重后果。该猪源致病性鼠伤寒沙门氏菌对所检测的 3 种氟喹诺

酮药物均不敏感,其潜在后果十分严重。本研究对猪源鼠伤寒沙门氏菌耐药机理的探讨及耐性消除研究,对控制猪源沙门氏菌耐药性具有理论与实践指导意义。

应用 SDS 高温处理消除质粒法对耐药性鼠伤寒沙门氏菌进行质粒消除,并通过耐药基因 PCR 检测、质粒毒力基因 PCR 检测、质粒图谱分析等鉴定耐药基因的消除情况。试验结果表明,14 种抗生素耐药性中,大部分耐药性均由质粒耐药基因决定。随着质粒消除,细菌的抗药性被逆转。因此,开发新型质粒消除剂在耐药菌临床治疗中具有广阔的应用前景。本研究中确定存在于质粒上的鼠伤寒沙门氏菌耐药基因有:氨苄青霉素耐药基因(*bla*_{TEM} 和 *bla*_{OXA-1})、氯霉素耐药基因(*cat*1)、四环素耐药基因(*tet*(B))、庆大霉素耐药基因(*aac*C2)、氨基糖苷类耐药基因(*aad*A8b)、甲氧苄胺嘧啶耐药基因(*dhfr*XII)、磺胺类耐药基因(*sul*1)等,并随质粒消除而被消除。整合子是能够整合耐药基因并将其在细菌间水平传播的 DNA 片段,其中以 I 型整合子最为常见。从耐药菌 17y 中检测到 I 型整合子,该整合子也存在于质粒上,且携带氨基糖苷类耐药基因(*aad*A8b)、甲氧苄胺嘧啶耐药基因(*dhfr*XII)、磺胺类耐药基因(*sul*1)、季铵酸盐及溴化乙锭耐药基因 *qacE*△等。由于敏感菌中未扩增到质粒毒力基因,说明毒力相关质粒(94kDa)被消除。质粒图谱分析证实,质粒消除处理后细菌的质粒 DNA 带发生改变,除一条消失外,还有两条变小的 DNA 带。因此,耐药基因是全部位于毒力相关质粒上,还是分散位于毒力相关质粒及其它质粒上,尚有待进一步研究。

DNA 促旋酶是喹诺酮类抗生素的主要作用靶位,耐药性主要由抗生素靶位的基因突变所致,以 *gyrA* 基因突变最为常见。拓扑异构酶 IV 的 *parC* 基因是喹诺酮的次要作用位点,其基因突变也与耐药性产生有关。喹诺酮类抗生素的靶基因主要存在于染色体上,但也可存在于质粒上^[19]。本研究用 PCR 技术从耐药性消除前后的细菌基因组中均扩增到 *gyrA* 基因,说明该基因存在于细菌染色体上。

细菌对喹诺酮类药物的耐药性由 *gyrA* 和 *parC* 上的耐药决定区(QRDR)决定。本研究中耐药性消除对 *parC* 基因序列未产生任何影响,因而耐药性逆转主要与 *gyrA* 基因突变有关。基因 *gyrA* 的耐药决定区存在于 67~106 位氨基酸残基之间,其中第 83 位丝氨酸和 87 位天冬氨酸常发现突变导致耐药性出现^[20]。本研究发现:经耐药性消除处理,原耐药菌 17Y 第 87 位的天冬酰胺(N)回复突变为敏感菌 17S1 的天冬氨酸(D)。这一结果从相反方向证实

gyrA 基因第 87 位氨基酸残基容易发生突变,且 87 位为天冬氨酸时对维持细菌对喹诺酮类药物的敏感性具有重要意义。

此外,耐药性消除菌 17S1 连续传 100 代,其药物敏感性未发生改变,说明耐药性消除状态是稳定的。然而值得注意的是,如果细菌再度长期处于抗生素压力之下,细菌又将重新产生耐药性。因此,控制抗生素的临床使用始终是解决临床耐药性的有效途径。

毒力基因 *spv* 和 *rck* 基因是沙门氏菌质粒毒力基因。基因 *spv* 与细菌的粘附和定居有关,且可以提高细菌在宿主细胞中的生长速度^[21]。基因 *rck* 与细胞的入侵有关。本研究的相关结果证实了这些毒力基因的生物学功能。耐药性消除后,两毒力基因(*spv* 与 *rck*)相应消失,细菌对小鼠的毒力降低(LD50 增加 10 倍),在肝脏、脾脏中的存活数量及增长速度也显著降低。体外培养条件下,敏感菌 17S1 较耐药菌 17Y 的生长速度快,可能是由于敏感菌 17S1 消除了部分质粒,代谢负担减少了,而且又是在一种比较优越的生存环境中,所以表现出较快的生长速度,且比 17Y 提前进入对数生长期,并持续较长的时间。

综合前述结果,质粒消除剂不但逆转了鼠伤寒沙门氏菌的耐药性,而且使细菌毒力降低,体内存活与扩散能力显著减弱。因而,质粒消除剂可望成为解决细菌耐药性的重要途径。

参 考 文 献

- [1] Cirz RT, Chin JK, Andes DR, et al. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol*, 2005, **3**(6): e176.
- [2] 杨帆,王红宁. 细菌耐药机理及控制对策研究进展. 四川畜牧兽医科学, 2003, **30**(1): 32-34.
- [3] Bushman F. Lateral DNA transfer: mechanisms and consequences. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [4] Marquez B, Neuville L, Moreau NJ, et al. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. *Phytochemistry*, 2005, **66**(15): 1804-1811.
- [5] 虞红,李英伦. 中药逆转细菌耐药性的研究进展. 中国畜牧兽医, 2005, **32**(4): 54-56.
- [6] DeNap JCB, Thomas JR, Musk DJ, et al. Combating drug-resistant bacteria: Small molecule mimics of plasmid incompatibility as antiplasmid compounds. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(47): 15402-15404.
- [7] Thomas JR, DeNap JC, Wong ML, et al. The relationship between aminoglycosides' RNA binding proclivity and their antiplasmid effect on an IncB plasmid. *Biochemistry*, 2005, **44**(18): 6800-6808.
- [8] Ginsburg H. Should chloroquine be laid to rest? *Acta Trop*, 2005, **96**(1): 16-23.
- [9] Chiu CH, Su LH, Chu CS. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease and treatment. *Clin Microbiol Rev*, 2004, **17**(2): 311-322.

- [10] Humphrey T. *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(6): 504-509.
- [11] Cheung PY, Chan CW, Wong W, et al. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction pathogen detection kits for *Salmonella* spp. in food. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39(6): 509-515.
- [12] Chen LH, Yang J, Yu J, et al. VFDB: a database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acid Research*, 2005, 33: 325-328.
- [13] 鞠洪涛, 韩文瑜, 王世若, 等. 大肠杆菌耐药基因定位及耐药质粒消除. *中国兽医学报*, 2000, 20(5): 561-564.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 北京科学出版社, 1998.
- [15] 罗永江, 胡振英, 张新国, 等. 阿佛菌素对小白鼠的急性毒性实验. *黑龙江畜牧兽医*, 2004, 35(4): 60.
- [16] 王关林, 蒋丹, 方宏筠. 天南星的抑菌作用及其机理研究. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(3): 280-285.
- [17] 刘渠, 刘衡川, 李灶平, 等. 食品中沙门氏菌的耐药性研究. *现代预防医学*, 2004, 31(3): 330-332.
- [18] 王红宁, 刘书亮, 陶勇, 等. 规模化猪场致病性大肠杆菌、沙门氏菌药敏区系调查. *西南农业学报*, 2000, 13(Suppl.): 84-90.
- [19] Minnick MF, Wilson ZR, Smitheman LS, et al. *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant *Bartonella bacilliformis* strains obtained *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(1): 383-386.
- [20] Norbert L, Jutta SH, Theresla K. Characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* showing high levels of fluoroquinolone resistance. *Microbiology*, 1996, 34(3): 597-602.
- [21] Haneda T, Okada N, Nakazawa N, et al. Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*. *Infect Immun*, 2001, 69(4): 2612-2620.

Characterization of *Salmonella typhimurium* multidrug resistance and the reversal of antimicrobial resistance

JIA Ai-qing^{1,2}, LIU Wei-hong¹, GUO Ai-zhen^{1*}, CHEN Huan-chun¹

(¹ National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Salmonella typhimurium* 17Y, isolated from one diseased pig that was clinically diagnosed as pig salmonellosis, was a multiresistance strain with resistance to 14 antibiotics among tested 19 antibiotics. In this study, the resistance to 11 antimicrobials was reversed by high temperature and high concentration (0.5%) of SDS, resulting in the sensitive strain 17S1. PCR results showed that the resistant genes *BlaTEM*, *blaOXA-1*, *cat1*, *tet(B)*, *aacC2* located on the plasmid. Furthermore, PCR detected the class I integron which carries *dhfrXII* for trimethoprim resistance, *aadA18b* for aminoglycoside resistance and *sulI* for sulfamethoxazole resistance. The integron was identified to exist in the plasmid. Because the target genes *gyrA* and *parC* for quinolone category were detected by PCR from both resistant and sensitive strains, it was determined that the genes *gyrA* and *parC* were located in the bacterial genome. The gene sequencing of *gyrA* and *parC* revealed that a point mutation AAC→GAC resulting in one amino acid replacement of N87D in *gyrA* occurred for the sensitive strain 17S1. It was demonstrated that the amino acid 87 was a hot point for mutation in quinolone resistance determining region (QRDR). The finding suggests that the amino acid replacement of N87D is responsible for the quinolone susceptibility. In addition, the 100 continuous passages of the sensitive strain showed that the drug sensitive status was stable. However, when the drug pressure maintained for a long time, the resistance was induced again. Meanwhile, 6 salmonella plasmid virulence genes (*spvA-D*, *R* and *rck*) were eliminated with the resistance reversal, indicating that the virulence plasmid was cured. Reasonably, the bacterial virulence decreased shown by 10-fold increase of LD₅₀ for the sensitive strain, and the statistical significant decline of *in vivo* spread and growth ($P < 0.05$) in mice. Taken altogether, the multidrug resistance of *Salmonella typhimurium* was determined by its plasmid. The plasmid elimination with SDS reversed most of the resistance (11/14) and decreased the bacterial virulence. Therefore, strategy to eliminate the plasmids would be an effective way to deal with the multiresistance issue. However, drug control in routine clinical practice would not be neglected at any time.

Keywords: *Salmonella typhimurium*; Plasmid elimination; Antibiotic resistance; Integron; Bacterial virulence

Foundation item: National Natural Science Foundation of China Grant (30571386); Scientific Research Foundation for Returned Overseas Grant [(2004)176]

* Corresponding author. Tel: 86-27-87286861; Fax: 86-27-87281795; E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

Received: 30 November 2005/Accepted: 9 January 2006/Revised: 18 April 2006