

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(6):788-796; 4 June 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因

杨保伟¹, 曲东¹, 申进玲², 席美丽², 只帅², 崔生辉³, 寄宝义², 孟江洪²

(西北农林科技大学,¹ 生命科学学院,² 食品科学与工程学院, 杨凌 712100)

(³ 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要:【目的】研究食源性沙门氏菌对常用抗生素的药敏性及相关耐药基因, 更好的了解耐药性的产生和传播途径, 确保食品安全。【方法】使用 the Clinical and Laboratory Standards Institute 推荐的琼脂稀释法测定沙门氏菌的药敏性, PCR 和基因序列测定方法确定耐药沙门氏菌中整合子及其携带的耐药基因、与头孢菌素抗性相关的基因、沙门氏菌基因岛及与氟喹诺酮类抗生素耐药相关的基因突变。【结果】359 株沙门氏菌中, 67% 的菌株对磺胺甲恶唑产生抗性, 对甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、四环素、卡那霉素、萘啶酮酸、氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、链霉素、氯霉素和庆大霉素、环丙沙星、头孢曲松、头孢西丁和头孢哌酮的耐药率分别为 58%、56%、37%、35%、33%、32%、29%、26%、21%、16%、9% 和 8%。284 株耐药菌中, 79% 的菌株可抗至少 1 种抗生素, 25.9% 可抗 10 种以上抗生素, 2.5% 可抗 14 种抗生素。耐药的 I 类整合子以 1.4 kb 最为常见, 携带的耐药基因有 *aadA1*、*aadA2*、*aadA5*、*tetR*、*bla*_{PSE-1}、*bla*_{DHA-1}、*bla*_{VEB-1}、*dhfr* I、*dhfr* V、*dhfr* VII 和 *dhfr*17 等。62 株耐头孢曲松和/或头孢哌酮的沙门氏菌中, *bla*_{TEM} 和 *bla*_{CMY-2} 基因的检出率分别为 51.6% 和 56.5%。13.6% 的沙门氏菌中检出了沙门氏菌基因岛。35 株耐氟喹诺酮类抗生素的沙门氏菌的 *gyrA*、*parC* 和 *parE* 基因中共检出 68 个点突变, *gyrA* 基因中常见突变为 Ser83Phe、Ser83Tyr、Asp87Gly 和 Asp87Asn, *parC* 基因中为 Ser80Arg。 *parE* 基因中检出了 Lys441Ile、Lys428Gln、Asp494Asn、Lys428Gln 和 Gly442Ser 突变, 这些点突变均为首次在食源性沙门氏菌中检出。【结论】陕西食源性沙门氏菌耐药状况严重, 整合子、沙门氏菌基因岛和 β -内酰胺酶编码基因的存在及解旋酶和拓扑异构酶基因突变是导致沙门氏菌耐药的重要机制。

关键词: 沙门氏菌; 药敏性; 耐药机制

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0788-09

非伤寒沙门氏菌是最常见的引发食源性疾病的首要病原菌, 也是我国食源性疾病的主要病原体。我国每年约 3 亿人因沙门氏菌感染而患病, 达病原菌食源性疾病总数的 70% - 80%^[1]。目前, 在人类临床治疗和农业及畜牧业生产中, 抗生素仍然是对付各种病原菌的首选药物。抗生素广泛使用及滥用产生的选择性压力使得很多病原菌, 包括沙门氏菌均出现了多重耐药 (Multi-drug Resistance, MDR) 现象。监测数据表明, 整个沙门氏菌属的多

重耐药率已从 20 世纪 90 年代的 20% 增加到了本世纪初的 70%^[2]。病原菌耐药性的不断增强将使现有抗生素失去相应的治疗功效, 把人类推向无药可治的境地。由于耐药性可通过食物链或环境在人与食品、人与人或人畜之间传递, 因此, 正在快速增加的沙门氏菌耐药性不但给食品性动物生产和公共卫生安全造成了极大的危害, 同时对全球食品安全和人类健康也是一个巨大的威胁^[3-4]。

除马国柱等 (2003)^[5] 和张芳等 (2008)^[6] 对陕

基金项目: 长江学者讲座教授奖励计划项目 (Z111020001); 西北农林科技大学留学回国人员基金 (Z111020525)

作者简介: 杨保伟 (1974 -), 男, 陕西商洛人, 硕士, 讲师, 主要从事食源性致病菌快速检测和多重耐药机理研究。Tel: +86-29-87092486; E-mail: ybwsheng@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2009-11-19; **修回日期:** 2010-02-02

西食源性沙门氏菌的污染状况进行了调查外,目前尚无该地区食源性沙门氏菌药敏性的研究报道。本研究旨在对陕西食源性沙门氏菌药敏特性及相关耐药基因进行研究,为确保食品安全提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 359 沙门氏菌分离自 2007—2008 年采集于陕西省西安、杨凌和宝鸡等地各大超市和农贸市场的 764 份零售鸡肉、猪肉、牛肉和羊肉样品,菌株的分离和鉴定按照 Cui 等 (2006) [7] 所述方法进行。沙门氏菌标准菌株 *Salmonella* Typhimurium LT2、药敏性测定用标准质控菌株 *Esherichia coli* ATCC25922 和 ATCC35218 及 *Enterococcus faecalis* ATCC29212、整合子阳性菌株 *Salmonella* 345 和 *Salmonella* 661 等均为中国药品生物制品检定所崔生辉博士惠赠。

1.1.2 培养基: Luria-Bertani (LB) 营养琼脂购自北京陆桥技术有限责任公司, Mueller Hinton (MH) 琼脂购自北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.1.3 抗生素: 15 种抗生素包括氨苄西林 (Ampicillin)、氯霉素 (Chloramphenicol)、链霉素 (Streptomycin)、四环素 (Tetracycline)、庆大霉素 (Gentamicin)、卡那霉素 (Kanamycin)、阿莫西林/克拉维酸 (Amoxicillin/Clavulanic acid)、阿米卡星 (Amikacin)、萘啶酮酸 (Nalidixic acid)、环丙沙星

(Ciprofloxacin)、甲氧苄啉/磺胺甲基异恶唑 (Trimethoprim/ Sulfamethoxazole)、磺胺甲基异恶唑 (Sulfamethoxazole)、头孢哌酮 (Cefoperazone)、头孢曲松 (Ceftriaxone) 和头孢西丁 (Cefoxitin) 等均购自 Sigma 公司。

1.1.4 主要试剂和仪器: ExTaq DNA 聚合酶、dNTPmix、PCR 产物胶回收试剂盒 (TaKaRa Agroase Gel DNA Purification Kit Ver 2.0)、DL2000 和 100bp DNA Ladder 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa)。所用仪器及所购公司分别为:超净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司)、生物安全柜 (美国 Nuaire 公司)、高压灭菌锅 (日本 TOMY 公司)、超纯水处理器 (美国 Millipore 公司)、-40℃ 低温冰箱 (日本 SANYO 公司)、-80℃ 低温冰箱 (日本 SANYO 公司)、恒温摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司)、隔水式培养箱 (金坛梅香仪器有限公司)、移液器 (德国 Eppendorf 公司)、mycycler PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)、电泳 (美国 Bio-Rad 公司)、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)、高速离心机 (德国 Eppendorf 公司) 和恒温水浴 (宁波赛福实验仪器厂)。

1.1.5 引物: 解旋酶基因 *gyrA* 和 *gyrB*、拓扑异构酶基因 *parC* 和 *parE*、沙门氏菌基因岛 (*Salmonella* Gene Island, SGI) 和 I 类整合子检测用引物如表 1 所示,使用 primer Premier5 软件设计,由上海捷锐生物工程有限公司合成。

表 1 PCR 扩增用引物

Table 1 Primer for PCR Amplification

Gene	Primer and Sequence	
	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
Integron I	GGCATCCAAGCAGCAAGC	AAGCAGACTTGACCTGAT
<i>bla</i> _{TEM}	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA	ACTCCCCGTCTGTAGATAA
<i>bla</i> _{CMV-2}	GACAGCCTCTTTCTCCACA	TGGAACGAAGGCTACGTA
<i>gyrA</i>	ACGTACTAGGCAATGACTGG	AGAGTCGCCGTCGATAGAAC
<i>gyrB</i>	GCGCTGTCCGAACGTACCT	TGATCAGCGTCGCCACTTCC
<i>parC</i>	CTATGCGATGTCAGAGCTGG	TAACAGCAGCTCGGGCTATT
<i>parE</i>	TCTCTTCCGATGAAGTGCTG	ATACGGTATAGCGCGGTAG
SGI left junction	ACACCTTGAGCAGGGCAAG	AGTTCTAAAGTTCTGACTCG
SGI right junction	TGACGAGCTGAAGCGAATTG	AGCAAGTGTGCGTAATTTGG

1.2 药敏性测定

采用临床实验室标准化委员会 (the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) [8] 推荐的琼脂稀释法测定沙门氏菌的最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentrations, MICs), 按照 CLSI 标准判读结果并确定耐药表型。药敏测定中使用 *E. coli* ATCC25922 和 ATCC35218、*E. faecalis* ATCC29212

作为标准质控菌株。

1.3 PCR 扩增及序列测定

使用煮沸法制备 PCR 用 DNA 模板 [9]。PCR 反应条件为 94℃ 10 min; 94℃ 1 min、60℃ 1 min、72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。退火温度随扩增用引物不同而异。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测分离后, 使用

PCR 产物胶回收试剂盒对相应的 PCR 产物进行纯化,纯化的 PCR 产物在低温条件下送北京奥科生物技术有限责任公司(<http://www.augct.com>)测序。

1.4 基因突变和整合子基因盒携带耐药基因分析

将测定得到的 *gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 和 Integron I 基因 DNA 序列输入基因库,采用基因库在线比对软件 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 程序进行比对,确定标准菌株 *Salmonella* Typhimurium LT2 的上述 DNA 序列和基因库序列完全吻合后,分析比对供试菌相应的 DNA 序列,确定突变点和突变种类以及整合子基因盒所含耐药基因。

2 结果和分析

2.1 食源性沙门氏菌的耐药性

359 株沙门氏菌中,67% 的菌株对磺胺甲恶唑产生抗性,为 15 种供试抗生素中最强。耐甲氧苄

啉/磺胺甲恶唑的沙门氏菌菌株比例为 58%、四环素为 56%、卡那霉素为 37%、萘啶酮酸为 35%、氨苄西林为 33%、阿莫西林/克拉维酸为 32%、链霉素为 29%、氯霉素和庆大霉素均为 26%、环丙沙星为 21%、头孢曲松为 16%,对头孢西丁和头孢哌酮的耐药率较低,分别为 9% 和 8% (图 1)。抗 β -内酰胺类抗生素的沙门氏菌多见于鸡肉分离株,有 11% 的鸡肉源沙门氏菌对头孢西丁钠产生抗性,与之相比,只有 5% 猪肉源沙门氏菌可抗头孢西丁钠,未发现源自于牛肉的沙门氏菌对头孢西丁钠产生抗性。与沙门氏菌对环丙沙星的抗性相似,对头孢曲松的抗性也多见于鸡肉源的沙门氏菌,抗性比例分别为 26% 和 19%。4 种不同来源的沙门氏菌对四环素的抗性比例比较相似,鸡肉源为 57%,猪肉源为 53%,牛肉源为 46%,羊肉源为 56%。总而言之,源于牛肉的沙门氏菌对供试抗生素比较敏感(数据未显示)。

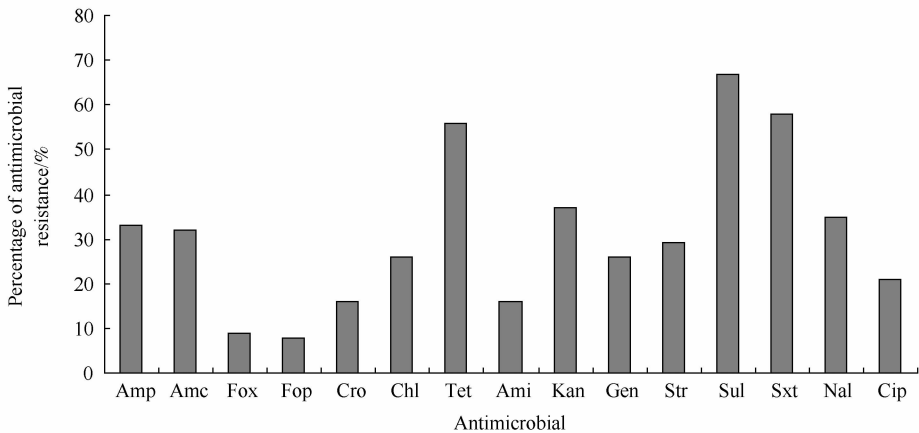


图 1 沙门氏菌分离株对 15 种抗生素的耐药特性 (n = 359)

Fig. 1 Characterization of Resistance to 15 Antimicrobials of *Salmonella* Isolater (n = 359)

Denotes: AMP: ampicillin, AMC: amoxicillin-clavulanic, Fox: Cefoxitin, Fop: Cefoperazone, Cro: ceftriaxone, Chl: chloramphenicol, Tet: tetracycline, Amk: Amikacin, Kan: kanamycin, Gen: gentamicin, Str: streptomycin, Sul: sulfamethoxazole, Sxt: trimethoprim-sulfamethoxazole, Nal: nalidixic acid, Cip: ciprofloxacin.

2.2 食源性沙门氏菌的多重耐药性

359 株沙门氏菌中,除 75 株对供试抗生素表现敏感外,284 株(79%)至少可抗 1 种抗生素,189 株(52.6%)可抗 4 种或 4 种以上的抗生素,93 株(25.9%)可抗 10 种或 10 种以上的抗生素。耐药株中,28 株(7.8%)可抗 2 种抗生素,43 株(12.0%)可抗 3 种抗生素,12 株(3.3%)可抗 5 种抗生素,10 株(2.8%)可抗 8 种抗生素,33 株(9.2%)可抗 11 种抗生素,25 株(7.0%)可抗 12 种抗生素,17 株(4.7%)可抗 13 种抗生素,9 株(2.5%)可抗高达 14 种抗生素(图 2)。

沙门氏菌对 3 种抗生素产生抗性的现象最为普遍(12.0%),其次为分别对 11 种、2 种、12 种、9 种和 1 种及 4 种抗生素产生耐药(图 2)。除耐 1 种和 2 种抗生素的菌株外,其它抗性菌株几乎全部对磺胺甲恶唑和(或)甲氧苄啉/磺胺甲恶唑产生抗性。在至少抗 10 种抗生素的沙门氏菌(共 93 株)中,有 81 株(87.1%)对环丙沙星产生抗性,全部菌株对氨苄西林和阿莫西林产生抗性,49 株(52.7%)可耐头孢曲松,16 株(17.2%)可耐头孢西丁,37 株(39.8%)可耐头孢哌酮(数据未显示)。

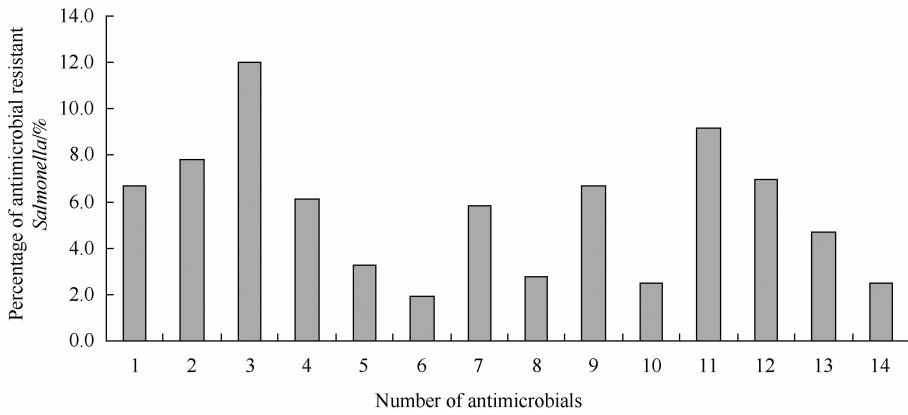


图 2 耐不同数量抗生素沙门氏菌比例 (n = 359)

Fig. 2 Percentage of Different Number of Antimicrobial Resistant Salmonella (n = 359).

2.3 食源性沙门氏菌中 I 类整合子及其耐药基因

在部分耐磺胺甲恶唑的沙门氏菌中共检出 14 株 I 类整合子阳性菌株,各菌株所携带的整合子大小及其所含耐药基因如表 2 所示。

14 株沙门氏菌扩增出的 I 类整合子长度分别为 0.75kb、1kb、1.2kb、1.4kb、1.8kb 和 2kb,其中以 1.4kb 的整合子比较常见,在菌株 S8 中同时扩增出长度分别为 1.2kb 和 1.8kb 的两个整合子。携带整合子的菌株分别分布于 *Salmonella* Agona、*S.*

Virchow、*S. Enteritidis*、*S. Indiana*、*S. Galiema* 和 *S. Shubra* 等 6 个血清型,在检出整合子的沙门氏菌中,以鸡肉来源的沙门氏菌居多。整合子携带可赋予宿主沙门氏菌对链霉素和壮观霉素耐药的 *aadA1/aadA2/aadA5* 基因,对四环素耐药的 *tetR* 基因,对 β -内酰胺类抗生素耐药的 *bla_{PSE-1}/bla_{DHA-1}/bla_{VEB-1}* 基因及对甲氧苄啶耐药的 *dhfr1/dhfr V/dhfr VII/dhfr17* 等基因(表 2)。

表 2 食源性沙门氏菌中代表性 I 类整合子大小及其所含耐药基因 (n = 14)

Table 2 Representative Class I Integron-associated Resistance Genes among Foodborne Salmonella (n = 14)

Isolate	Serovar	Source	Integron/kb	Gene cassette ^a
LC37	Agona	Beef	0.75	<i>aadA2</i>
S7NC0173	Virchow	Pork	1.0	<i>tetR</i>
F51	Virchow	Chicken	1.2	<i>bla_{PSE1}</i>
F53	Virchow	Chicken	1.2	<i>bla_{PSE1}</i>
BJ23D	Derby	Pork	1.4	<i>aadA2-bla_{DHA-1}</i>
XA35D	Virchow	Chicken Leg	1.4	<i>dfrA1</i>
S7NC0172	Virchow	Beef	1.4	<i>aadA1 - dhfr I</i>
S9xc002c	Indiana	Pork	1.4	<i>aadA2-bla_{DHA-1}</i>
S8xc010a	Galiema	Chicken	1.4	<i>dhfrV-unknown</i>
S8xc010b	Galiema	Chicken	1.4	<i>aadA1-bla_{VEB-1}</i>
J55	Shubra	Chicken	1.8	<i>dhfrXII-aadA2</i>
J91	Shubra	Chicken	1.8	<i>dhfrXII-aadA2</i>
J93	Shubra	Chicken	2.0	<i>dhfrXII-orf-aadA2</i>
S8	Enteritidis	Chicken	1.2/1.8	<i>bla_{PSE-1} / dhfr17-aadA5</i>

^a *aadA1/aadA2/aadA5* encode resistance to streptomycin/spectinomycin, *tetR* encode resistance to tetracycline, *bla_{PSE-1}/bla_{DHA-1}/bla_{VEB-1}* encode resistance to beta-lactam antibiotics, *dhfr1/dhfr V/dhfr VII/dhfr17* encode resistance to trimethoprim, unknown is gene cassette of unknown function.

2.4 食源性沙门氏菌中与超广谱 β -内酰胺类抗生素耐药相关的 *bla_{TEM}* 和 *bla_{CMY-2}* 基因

359 株沙门氏菌中,有 62 (17.2%) 株对头孢曲松和/或头孢哌酮产生抗性,该 62 株菌分布于包括 *Salmonella* Kallo、*S. Derby*、*S. Enteritidis*、*S. Tennessee*、*S. Djugu*、*S. Shubra*、*S. Typhimurium* 和 *S. Indiana* 等在内的 8 个血清型,且其主要来源于鸡

肉。62 株沙门氏菌中,32 株 (51.6%) 检出了 *bla_{TEM}* 基因,35 株 (56.5%) 检出了 *bla_{CMY-2}* 基因。部分携带有 *bla_{TEM}* 和 *bla_{CMY-2}* 的菌株及其耐药表型如表 3 所示。

从表 3 中知,携带 *bla_{TEM}* 和/或 *bla_{CMY-2}* 的沙门氏菌除对氨苄西林、头孢曲松和/或头孢哌酮等青霉素类和头孢类抗生素产生抗性外,同时还对氨

基糖苷类抗生素庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星和链霉素, 氟喹诺酮类抗生素萘啶酮酸和环丙沙星,

氯霉素等其他种类的抗生素产生抗性, 多为多重耐药菌株。

表 3 部分携带 bla_{TEM} 和 bla_{CMY-2} 基因的菌株及其相应的耐药谱

Table 3 Representative *Salmonella* Isolates with bla_{TEM} and bla_{CMY-2} Genes and Corresponding Antimicrobial Resistance Profile

Isolate	Source	Serotype	Antimicrobial resistance profile	ESBLs gene detection	
Y114Ta	Chicken	Djugu	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop	bla_{TEM}	bla_{CMY-2}
S7NC0053	Chicken	Enteritidis	Amc-Kan-Tet-Sxt-Tmp/Sxt-Nal-Cro-Fop	bla_{TEM}	
S8xc013a	Chicken	Enteritidis	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Nal-Cro-Ami-Fop		bla_{CMY-2}
S8XC004c	Chicken	Shubra	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop	bla_{TEM}	bla_{CMY-2}
S6xc013	Chicken	Shubra	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Nal-Cro	bla_{TEM}	bla_{CMY-2}
S9xc007a	Chicken	Shubra	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro	bla_{TEM}	bla_{CMY-2}
S8XC008a	Chicken	Indiana	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Amk-Fop	bla_{TEM}	
S8XC007a	Chicken	Indiana	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop	bla_{TEM}	bla_{CMY-2}
S8XC004a	Chicken	Indiana	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop	bla_{TEM}	
S8XC004b	Chicken	Indiana	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop	bla_{TEM}	

Denotes: AMP; ampicillin, AMC; amoxicillin-clavulanic, Fox; Cefoxitin, Cro; ceftriaxone, Chl; chloramphenicol, Tet; tetracycline, Amk; Amikacin, Kan; kanamycin, Gen; gentamicin, Str; streptomycin, Sul; sulfamethoxazole, Sxt; trimethoprim-sulfamethoxazole, Nal; nalidixic acid, Cip; ciprofloxacin.

2.5 食源性沙门氏菌 SGI I

PCR 结果表明, 359 株沙门氏菌中共有 49 株携带有 SGI I, 检出率为 13.6%。部分携带有 SGI I 的沙门氏菌及其耐药表型如表 4 所示。

从表 4 可知, 携带有 SGI I 的沙门氏菌株一般都具有比较宽的耐药谱, 可对氨苄西林、头孢曲松、

头孢哌酮等青霉素类和头孢类抗生素及其它种类的抗生素同时产生抗性。此外, 在部分携带有 bla_{TEM} 和/或 bla_{CMY-2} 基因的沙门氏菌株(如 S8XC008a、S8XC007a 和 S7NC0053)中也检出了 SGI I, 且这些沙门氏菌都具有很强的多重耐药特性。

表 4 部分携带 SGI I 的沙门氏菌及相应的耐药谱

Table 4 Representative *Salmonella* Isolates with SGI I and Corresponding Antimicrobial Resistance Profile

Isolates	Serotype	Source	Antimicrobial resistance profile
Y114Ta	Djugu	Chicken	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop
S7NC0173	Virchow	Chicken	Amp-Amc-Str-Tet-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Fop
S7NC0053	Enteritidis	Chicken	Amc-Kan-Tet-Sxt-Tmp/Sxt-Nal-Cro-Fop
S8xc011b	S. II	Chicken	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal
S8XC004c	Shubra	Chicken	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop
S8XC008a	Indiana	Chicken	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop
S8XC007a	Indiana	Chicken	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Cro-Ami-Fop
XA33D	Indiana	Chicken	Amp-Amc-Gen-Kan-Str-Tet-Cip-Sxt-Tmp/Sxt-Chl-Nal-Ami

Denotes: AMP; ampicillin, AMC; amoxicillin-clavulanic, Fox; Cefoxitin, Cro; ceftriaxone, Chl; chloramphenicol, Tet; tetracycline, Amk; Amikacin, Kan; kanamycin, Gen; gentamicin, Str; streptomycin, Sul; sulfamethoxazole, Sxt; trimethoprim-sulfamethoxazole, Nal; nalidixic acid, Cip; ciprofloxacin.

2.6 食源性沙门氏菌中与氟喹诺酮类抗生素耐药相关基因突变

35 株 MDR 沙门氏菌与氟喹诺酮类抗生素耐药相关的 $gyrA$ 、 $parC$ 和 $parE$ 基因中共检出 68 个点突变, 没有在 $gyrB$ 基因中检出突变。 $gyrA$ 基因中最常见突变为第 83 位氨基酸突变为 Ser83Phe, 其次为 Ser83Tyr, 第 87 为氨基酸突变为 Asp87Gly 和 Asp87Asn。 $parC$ 基因中最常见突变为 Ser80Arg。发生 $parE$ 基因突变的菌株和突变位点总数较少, 但发生的突变类型却较多, 分别为 Lys441Ile、Lys428Gln、Asp494Asn、Lys428Gln 和 Gly442Ser(表 5)。

食源性沙门氏菌对氟喹诺酮类抗生素的耐药谱以 Nal-Enro-Gati-Cip-Dif-Sal 最为常见(57.1%), 在 20 株具有该耐药表型的沙门氏菌中共检出 46 个突变点, 达全部突变点的 67.6%。耐药表型为 Nal-Enro-Gati-Levo-Cip-Dif-Sal 和 Nal-Dif 的菌株比例为 14.3%, 其中检出的突变点较少, 分别为 15 个和 4 个(表 5)。此外, 从表 5 还可得知, 沙门氏菌对氟喹诺酮类抗生素的耐药性越强, 菌株中和氟喹诺酮类抗生素有关的解旋酶编码基因 $gyrA$ 和 $gyrB$ 基因及拓扑异构酶编码基因 $parC$ 和 $parE$ 基因发生点突变的几率就越大。

表 5 35 株食源性 MDR 沙门氏菌 *gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE* 基因突变Table 5 Mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes among 35 MDR *Salmonella*

Antibiotic resistance profile	Gene mutation (Mutation number)				Strain Number/Ratio (%)
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	
Nal	Asp87Asn (1)	NM	NM	NM	1 / 2.9
Nal-Enro	NM	NM	NM	NM	1 / 2.9
Nal-Dif	Ser83Tyr (1)	NM	NM	NM	5 / 14.3
	Ser83Phe (2)				
	Asp87Asn (1)				
Nal-Enro-Dif	Asp87Gly (1)	NM	NM	NM	1 / 2.9
	NM				
Nal-Dif-Sar	Ser83Tyr (1)	NM	NM	NM	2 / 5.8
Nal-Enro-Gati-Cip-Dif-Sar	Ser83Phe (13)	NM	Ser80Arg (15)	Lys441Ile (1)	20 / 57.1
	Ser83Tyr (2)			Asp494Asn (1)	
	Asp87Gly (12)			Lys428Gln (2)	
	NM				
Nal-Enro-Gati-Levo-Cip-Dif-Sar	Ser83Phe (6)	NM	Ser80Arg (3)	Gly442Ser (1)	5 / 14.3
	Asp87Gly (4)				
	Asp87Asn (1)				

Denote: in the table, Nal: Nalidixic acid, Enro: Enrofloxacin, Gati: Gatifloxacin, Levo: Levofloxacin, Cip: Ciprofloxacin, Dif: Difloxacin, Sar: Sarafloxacin. Ser: Serine, Phe: Phenylalanine, Gly: Glycine, Asp: Aspartic, Ile: Isoleucine, Gln: Glutamine, Lys: Lysine.

3 讨论

近年来,除人类医疗领域外,在农业和畜牧业中使用了囊括人类使用的多种抗生素。根据 WHO 2001 年统计报道,每年约有 12000 吨和 900 吨抗生素分别作为饲料添加剂和治疗用于食用动物,仅有 1300 吨抗生素用于人类治疗,食用动物中抗生素的使用量是人用量的 10 倍^[10]。

抗生素药物的广泛使用及滥用导致沙门氏菌及其它细菌对抗菌药物的耐药状况已经十分严重^[10]。Breuil 等(2000)^[11]对源于法国的 25,526 株沙门氏菌的耐药性监测研究表明,从 1994 年到 1997 年,对氨苄西林耐药率由 61% 上升到 73%,对萘啶酮酸耐药率从 3% 上升到 72%,对链霉素、壮观霉素、四环素和氯霉素耐药率超过 70%。朱力军(2001)^[12]研究表明,我国 60 年代分离的菌株还无多重耐药现象,对四环素的耐药率只有 20%,到了 90 年代对四环素的耐药率则高达 100%。因此,病原菌抗生素耐药性问题已成为全球关注的焦点。

近 20 年来,世界各地报道多重耐药沙门氏菌的分离率越来越高^[13-14]。李郁等(2008)^[15]对屠宰生猪肉沙门氏菌分离株的药敏性研究表明,3.92% 的菌株可耐 3 种抗生素,25.49% 的菌株可耐 4 种抗生素,27.45% 的菌种可耐 10 种以上的抗生素。本研究中 72.4% 的沙门氏菌可以耐 2 种以上抗生素,耐 12 种抗生素的菌株为 7.0%,耐 13 种抗生素的为 4.7%,耐 14 种抗生素的达 2.5%。刘渠等(2004)^[16]、王晓泉等(2007)^[14]和关文英等(2006)^[17]对食源性沙门氏菌及刘芳萍等(2007)^[18]

对鸡源沙门氏菌进行药敏性研究时均得到类似的结果。

研究中大部分沙门氏菌对广泛用于人药和兽药 的抗生素如氨苄西林、四环素和磺胺类药都产生了较高的抗性,与 Molla 等(2007)^[19]、An 和 Duijkeren(2006)^[20]、Lauderdale 等(2006)^[21] 的研究结果基本一致。与我们 2007 年^[22]对分离于美国食源性沙门氏菌的药敏性研究结果相比,陕西零售肉沙门氏菌对氨苄西林、四环素、氯霉素和卡那霉素的抗性与之相当,对萘啶酮酸、环丙沙星、阿莫西林和磺胺甲恶唑—甲氧苄啶的抗性较强,但对头孢西丁的抗性较差。沙门氏菌对氨苄西林和阿莫西林耐药率较高可能与青霉素类药物是我国畜牧养殖业中应用最广泛,最早用于鸡、猪和牛商品饲料中的抗生素之一有关。另外,四环素早在 20 世纪 60—70 年代就广泛应用于人和兽医临床,因此细菌对其耐药性普遍偏高^[4]。本研究沙门氏菌分离株对头孢菌素类抗生素有着不同程度的耐药,对头孢西丁的耐药率为 9%,对头孢曲松的耐药率为 16%。该结果均高于 Chen 等(2004)^[23]1999—2000 年从中国 10 个省零售肉及 1998—2000 年从美国零售肉中分离的沙门氏菌对头孢西丁、头孢曲松的耐药率,也高于严纪文等(2007)^[24]2001—2006 从广东省分离的食源性沙门氏菌对头孢噻吩的耐药率(6.8%)和对头孢曲松的耐药率(2.7%)。研究中沙门氏菌耐药率为何如此之高,其原因还有待于进一步探讨。头孢类抗生素价格昂贵,我国目前仍未广泛用于养殖业,但耐药株已经出现,并且耐药性率越来越高^[25-26]。更为重要的是,本研究从对部分头孢菌素产生抗性

的沙门氏菌中检出了与编码超广谱 β -内酰胺酶相关的 bla_{TEM} 和 bla_{CMY-2} 基因,这就表明这些菌株具有对其它头孢菌素和第三或第四代头孢菌素产生耐药性的潜能。此外,整合子测序结果也表明,其它编码对头孢类抗生素耐药的基因,如 bla_{PSE1} 、 bla_{DHA-1} 和 bla_{VEB-1} ,也广泛存在于整合子之中。研究在部分检出 bla_{TEM} 和/或 bla_{CMY-2} 基因的菌株中同时也检出了 SGII。作为常见的可移动基因元件,整合子和 SGII 在沙门氏菌耐药性的传递过程起着非常重要的作用^[13,19,27-29],应引起相关管理部门的高度重视。

值得关注的是,研究中沙门氏菌对萘啶酮酸和环丙沙星的耐药率分别达 35% 和 21%,对氟喹诺酮类抗生素也出现了较为严重的交叉耐药。沙门氏菌对氟喹诺酮类抗生素的抗性主要与其染色体上编码解旋酶的基因 $gyrA$ 和 $gyrB$ 以及编码拓扑异构酶的基因 $parC$ 和 $parE$ 的突变有关^[25,29-32],而本研究在 35 株沙门氏菌的上述基因中共检出 68 个点突变,这些突变的产生为沙门氏菌对氟喹诺酮类抗生素的抗性以及交叉耐药奠定了基础。目前,我国在动物养殖中滥用氟喹诺酮类药物的现象非常严重,而且兽用与人用药物没有严格区分。虽然兽医专用的氟喹诺酮类药物有恩诺沙星、麻保沙星、沙拉沙星等可供选择,可一旦人医临床某种氟喹诺酮类药物刚上市,兽医临床就已大量使用,这应该是沙门氏菌对氟喹诺酮类抗生素耐药性不断增强且存在交叉耐药的重要原因之一^[33]。

细菌耐药问题已经成为一个世界性的难题。抗生素作用靶位编码基因突变、抗生素水解或钝化酶编码基因以及携带耐药基因的可移动基因元件的存在是导致细菌产生耐药性的主要因素。研究陕西食源性沙门氏菌的药敏性特征及与耐药性产生的相关基因,有助于从食物链的源头和食品性动物生产中采取合理的干预措施,坚持合理用药,减少和防止沙门氏菌耐药性的产生,保障食品安全。同时,也对更好的了解沙门氏菌的耐药机理和有效控制日趋严重的沙门氏菌耐药性问题提供了依据。

参考文献

[1] World Health Organization. Overcoming antimicrobial resistance, World Health Organization Report on Infectious Diseases. Publication Code: WHO / CDS / 2000. .

[2] Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* serotypes: A global challenge. *Clinical Infectious Disease*, 2004, 39: 546-551.

[3] Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Muyodi J, Mwituria J, Munyalo A, Kagendo D, Murungi L, Hart C A. Increasing prevalence of multidrug-resistant non-typhoidal *salmonella*, Kenya, 1994-2003. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005, 25: 38-43.

[4] 郭云昌, 刘秀梅. 市售鸡肉中沙门氏菌分离株多重耐药谱测定. *中国食品卫生杂志 (Chinese Journal of Food Hygiene)*, 2005, 17: 100-103.

[5] 马国柱, 王安礼, 刘长宏, 连西兰, 潘立, 张芳. 2002 年陕西省食品中食源性致病菌监测. *中国食品卫生杂志 (Chinese Journal of Food Hygiene)*, 2003, 15(6): 489-491.

[6] 张芳, 马国柱, 潘立, 刘长宏, 王安礼, 李雪梅, 连西兰, 石一. 陕西省 2002 - 2006 年食源性致病菌污染状况. *中国公共卫生 (China Public Health)*, 2008, 24: 222-224.

[7] Cui S, Zheng J, Meng J. An improved method for rapid isolation of *Salmonella* from chicken carcasses. *Journal of Food Safety*. 2006, 26: 49-61.

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.

[9] Joseph Sambrook, David W. Russell. 分子克隆实验指南, 黄培堂, 王恒樑, 周晓巍, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.

[10] 金少鸿, 马越. 国内细菌耐药性监测研究的回顾与展望. *中国抗生素杂志 (Chinese Journal of Antibiotics)*, 2005, (5): 257-259.

[11] Breuil J, Brisabois A, Casin I, Armand-Lefèvre L, Frémy S, Collatz E. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 46: 965-971.

[12] 朱力军. 动物大肠杆菌的耐药变化趋势. *中国兽药杂志 (Chinese Journal of Veterinary Drug)*, 2001, 35(2): 16-18.

[13] Guerra B, Soto SM, Arguelles JM, Mendoza MC. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class I integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4, 5, 12: i: -]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2001, 45: 1305-1308.

[14] 王晓泉, 焦新安, 刘晓文, 陈祥, 宦海霞, 刘秀梵. 江苏部分地区食源性和人源沙门氏菌的多重耐药性研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47: 221-227.

[15] 李郁, 焦新安, 魏建忠, 王伟, 王强, 李春芳, 王桂军. 屠宰生猪沙门氏菌分离株的血清型和药物感受性分析. *中国人兽共患病学报 (Chinese Journal of Zoonoses)*, 2008, 24(1): 67-70.

- [16] 刘渠, 刘衡川, 李灶平, 谢劲心, 林斯星, 张茂棠. 食品中沙门氏菌的耐药性研究. 现代预防医学 (*Modern Preventive Medicine*), 2004, 31: 330-332.
- [17] 关文英, 申志新, 张淑红, 王英豪, 侯凤伶. 河北省食品中沙门氏菌的耐药性研究. 现代预防医学 (*Modern Preventive Medicine*), 2006, 33(10): 1761-1763.
- [18] 刘芳萍, 佟恒敏, 李昌文, 陈洪岩, 刘怀然, 关云涛. 鸡源性沙门氏菌临床分离株的耐药性分析. 中国兽医杂志 (*Chinese Journal of Veterinary Medicine*), 2007, 43: 31-32.
- [19] Molla B, Miko A, Pries K, Hildebrandt G, Kleer J, Schroeter A, Helmuth R. Class I integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin Ethiopia. *Acta Tropica*, 2007, 103: 142-149.
- [20] An TT, Duijkeren EV. Class I integrons in Dutch *Salmonella enterica* serovar Dublin isolates from clinical cases of bovine salmonellosis. *Veterinary Microbiology*, 2006, 117: 192-200.
- [21] Lauderdale T, Aarestrup F, Chen P, Lai J, Wang H, Shiao Y, Huang I, Hung C. Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2006, 55: 149-155.
- [22] 杨保伟, 盛敏, 席美丽, 孟江洪. 食源性沙门氏菌耐药性检测及相关质粒. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(8): 1006-1012.
- [23] Chen S, Zhao S, White DG, Schroeder CM, Ran L, Yang H, McDermott PF, Ayers S, Meng J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 1-7.
- [24] 严纪文, 王海燕, 赖蔚冬, 朱海明, 马聪, 何冬梅, 杨冰, 宋曼丹, 王建, 邓峰. 广东省几种重要食源性致病菌的耐药状况及耐药谱研究. 中国卫生检验杂志 (*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2007, 17: 2030-2032.
- [25] Rotimi VO, Jamal W, Pal T, Sonnevend A, Dimitrov TS, Albert MJ. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella* spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 60: 71-77.
- [26] Su LH, Wu TL, Chia JH, Chu C, Kuo AJ, Chiu CH. Increasing ceftriaxone resistance in *Salmonella* isolates from a university hospital in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 55: 846-852.
- [27] Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, Mulvey MR. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *The Journal of Bacteriology*, 2001, 183, 5725-5732.
- [28] Doublet B, Lailler R, Meunier D, Brisabois A, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9: 585-591.
- [29] Yang B, Zheng J, Brown EW, Zhao S, Meng J. Characterisation of antimicrobial resistance associated integrons and mismatch repair gene mutations in *Salmonella* serotypes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 33: 120-124.
- [30] Ling JM, Chan EW, Lam AW, Cheng AF. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant *Salmonellae* in Hong Kong. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(11): 3567-3573.
- [31] Hirose KA, Hashimoto A, Tamura K, Kawamura Y, Ezaki T, Sagara H, Watanabe H. DNA sequence analysis of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV quinolone resistance-determining regions of *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46: 3249-3252.
- [32] Eaves DJ, Randall L, Gray DT, Buckley A, Woodward MJ, White AP, Piddock LJV. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(10): 4012-4015.
- [33] 魏秀丽, 陈杖榴. 沙门氏菌对六种氟喹诺酮类药物的敏感性试验. 中国兽药杂志 (*Chinese Journal of Veterinary Drug*), 2005, 39: 4-8.

Antimicrobial susceptibility and related genes of *Salmonella* serovars from retail food in Shaanxi Province

Baowei Yang^{1*}, Dong Qu¹, Jinling Shen², Meili Xi², Shuai Zhi², Shenghui Cui³,
Baoyi Ji², Jianghong Meng²

(¹ College of Life Science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

(² College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

(³ National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: [**Objective**] *Salmonella* isolates from retail food were examined for antimicrobial susceptibility and further characterized to better understand the development and dissemination of antimicrobial resistance among foodborne *Salmonella* in China. [**Methods**] Antimicrobial susceptibility of 359 *Salmonella* isolates was determined by using agar dilution methods recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial resistance integrons and resistance genes were identified using PCR. Mutations in gyrase and Topoisomerase genes related to fluoroquinolones resistance were also determined using PCR and gene sequencing analysis. [**Results**] Among the 359 *Salmonella* isolates, 67% were resistant to Sulfamethoxazole, followed by resistant to trimethoprim/Sulfamethoxazole (58%), tetracycline (56%), kanamycin (37%), nalidixic acid (35%), ampicillin (33%), amoxicillin/clavulanic acid (32%), streptomycin (29%), chloramphenicol and gentamicin (26%), ciprofloxacin (21%), ceftriaxone (16%), cefoxitin (9%) and cefoperazone (8%). Among the 284 resistant isolates, 79% were resistant to at least one antimicrobial, 25.9% to 10 or more than 10 antimicrobials, and 2.5% to 14 antibiotic agents. Integrons were detected in some of sulfamethoxazole-resistant *Salmonella*, and the most common integron was 1.4 kb. Antimicrobial resistance genes carried by integrons included *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *tetR*, *bla_{PSE-1}*, *bla_{DHA-1}*, *bla_{VEB-1}*, *dhfr I*, *dhfr V*, *dhfr VII* and *dhfr17*. The *bla_{TEM}* gene was also detected in 51.6% of 62 ceftriaxone and / or cefoperazone resistant isolates, and *bla_{CMY-2}* was detected in 56.5% of the isolates. 13.6% of the *Salmonella* isolates carried *Salmonella* Gene Island. Sixty-eight point mutations were detected in *gyrA*, *parC* and *parE* of 35 fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates. The common mutations in *gyrA* gene were Ser83Phe, Ser83Tyr, Asp87Gly and Asp87Asn, whereas ser80Arg was detected in *parC*. Mutations including Lys441Ile, Lys428Gln, Asp494Asn, Lys428Gln and Gly442Ser were detected in *parE*, which was first reported in *Salmonella*. [**Conclusion**] Antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from food in Shaanxi province was common. Several genetic elements including integron, *Salmonella* Gene Island, β -lactamase genes and mutations in gyrase and topoisomerase genes played an important role in antimicrobial resistance of *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella*; Antimicrobial Susceptibility; Mechanism of Antimicrobial Resistance

(本文责编:王晋芳)