

江苏部分地区食源性和人源沙门氏菌的多重耐药性研究

王晓泉 焦新安* 刘晓文 陈 祥 宦海霞

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室 江苏省人兽共患病学重点实验室 扬州 225009)

摘 要:从江苏省部分地区收集了 117 个沙门氏菌分离株,其中食物源和人源菌株分别有 81 株和 36 株。16 种抗生素敏感性试验表明,有 111 个分离株对 2 种或 2 种以上的抗生素有耐药性,人源沙门氏菌分离株的抗生素耐药率比食物源的高,单一抗生素以链霉素耐药率(92.3%, 108/117)最高。对 5 种或 5 种以上抗生素耐药的分离株有 59 株(50.4%),其中对特定六种抗生素(氯霉素、链霉素、磺胺、四环素和卡那霉素耐药(ACSSuTK_R型)的菌株有 12 株。设计 18 对耐药基因和 I 类整合子保守区的引物,对 36 株有不同来源和耐药特征的多重耐药菌株进行耐药基因和 I 类整合子的检测,PCR 扩增结果与抗生素敏感性表型一致。有 30 株细菌携带有 I 类整合子,大小为 0.3、0.6、1.0、1.2 和 1.6 kb,其中 1.6 kb(*aadA5-dfr17*)大小的整合子在 25 株细菌中分布(24/36)。接合试验表明,氯霉素、链霉素、甲氧苄氨嘧啶和四环素的耐药特性是由接合性质粒携带。结果显示,耐药基因多数由 I 类整合子和质粒携带,可以通过接合试验发生转移,可移动的 DNA 成分可能在耐药特性的转移和分布中起到重要作用。

关键词:沙门氏菌;多重耐药性;整合子;接合

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-6209(2007)02-0221-07

食源性沙门氏菌的耐药性在急剧上升,可能是抗生素在医学和兽医学上使用比较广泛引起。更为严重的是多重耐药(multidrug-resistant,MDR)菌株的出现,它们可能会从食用动物传播给人^[1,2]。人感染沙门氏菌常常是由于摄入沙门氏菌污染的食物,如禽肉、牛肉、猪肉、蛋、奶等所致。人的沙门氏菌病通常是一种自限性腹泻,一般不需要抗生素治疗。但是这些感染也会导致病人发生有生命危险的全身性感染,这时往往需要有效的药物治疗,目前临床上常用的抗生素为环丙沙星和头孢曲松,细菌对这两种药的敏感性如何直接影响治疗效果。

近 20 年来,世界各地都报道多重耐药性沙门氏菌的分离率越来越高^[3],尤其是鼠伤寒沙门氏菌。耐药表型大部分是通过质粒的接合性转移获得的,质粒通常携带 I 类整合子^[4]。I 类整合子作为可移动的 DNA 成分,在细菌尤其是在革兰氏阴性菌 MDR 的扩散中起重要作用。目前的研究表明 I 类整合子主要位于转座子内,整合子通过整合入转座子和质粒参与耐药基因的捕获及其在细菌之间的传播^[5]。本研究的目的是测定江苏部分地区食源性和人源沙

门氏菌的抗生素敏感性表型,并对其具有多重耐药表型的菌株作耐药基因和 I 类整合子检测,以探讨其耐药机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 2003~2005 年间在江苏部分地区分离的沙门氏菌共 117 株,其中来自动物源食品 81 株,来自饮食行业从业人员肠道 36 株。这些分离株由江苏四个市疾病预防控制中心分别提供,A 市 18 株、B 市 32 株、C 市 41 株和 D 市 26 株。SM10 λpir(*thi thr leu tonA lacY supE recA*:RP4-2-Tc::Mu, λpir, oriT of RP4;Kmr),大肠杆菌 DH5α 和大肠杆菌 ATCC 25922 由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室保存。

1.1.2 主要试剂:亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液、亚硫酸铋琼脂(BS)、麦康凯琼脂和生化发酵管均购自杭州微生物试剂有限公司;沙门氏菌诊断血清购自成都生物制品研究所;16 种抗生素分别购自 Roche 公司(氯霉素、链霉素、头孢孟多、头孢西丁、头

基金项目 国家自然科学基金(30425031)

* 通讯作者。Tel:86-514-7971136;Fax:86-514-7311374;E-mail:xajiao@yahoo.com

作者简介 王晓泉(1973-),女,江苏高邮人,博士研究生,主要从事病原微生物致病机理研究。

其他作者 刘秀梵

收稿日期 2006-07-24;接受日期 2006-09-27;修回日期 2006-09-25

孢曲松,头孢噻肟),Amresco 公司(壮观霉素,卡那霉素,四环素,萘啶酮酸,庆大霉素)和 Sigma 公司(磺胺,复方新诺明,氯霉素,环丙沙星,甲氧苄氨嘧啶); Taq DNA 聚合酶、dNTP、100bp Marker 和 PCR 产物回收试剂盒购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒为 Qiagen 公司产品;克隆载体为 pGEM-T easy vector,购自 Promega 公司。DNA 测序工作由上海联合基因科技有限公司完成。

1.2 菌株血清型鉴定

所收集的细菌接种于 SS 及 DHL 琼脂平皿上,挑取可疑菌落接种于 TSI 鉴别培养基及斜面进行纯培养,置于 37℃ 培养 18~24h,观察反应,将斜面纯培养物与沙门氏菌菌属诊断血清 O 多价、O 复合因子、H 多价因子血清分别做玻片凝集反应。根据检测结果,分别选用 O 单价及 H 单价血清做玻片凝集试验。同时设立生理盐水对照。

1.3 耐药表型测定

采用微量稀释法^[6,7]测定 16 种抗生素对 117 株沙门氏菌的最小抑菌浓度,参照 NCCLS 标准判定结

果,计算各菌对各种抗生素的耐药率,判断细菌的耐药表型。质控菌为大肠杆菌 ATCC 25922。

1.4 耐药性基因的 PCR 检测

1.4.1 细菌总 DNA 和质粒的提取:选取 36 株具有代表性耐药表型的多重耐药性菌株,其总 DNA 的制备以 CTAB/NaCl 法进行^[8]。质粒提取按照 Qiagen 公司质粒提取试剂盒产品说明书进行。

1.4.2 PCR 反应:参照 GenBank 中耐药基因的序列,设计了 18 对引物,分别扩增 β 内酰胺类耐药基因、四环素类耐药基因、磺胺类耐药基因、氨基甙类耐药基因、氯霉素耐药基因和甲氧苄氨嘧啶耐药基因。PCR 引物见表 1。PCR 扩增条件:94℃ 4min; 94℃ 30s, 55~59℃ 45s, 72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 10min。4℃ 保存。

另外分别在 I 类整合子 5'和 3'端保守序列设计上下游引物扩增 I 类整合子内耐药基因盒,产物长度可变。PCR 扩增条件:94℃ 4min, 94℃ 45s, 59℃ 45s, 72℃ 90s, 35 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物经胶回收试剂盒回收,并进行克隆、测序。

表 1 沙门氏菌耐药基因 PCR 引物

Table 1 Sequences of oligonucleotide primers used in PCR assays for identification of antimicrobial resistance genes in <i>Salmonella</i> isolates				
Resistance gene	Oligonucleotide primer sequences		Accession No.	Size/bp
	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')		
<i>bla</i> _{TEM-1} *	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA	ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	AF309824	643
<i>bla</i> _{PSE-1}	GGTGTTCCTGTTCTTGATAC	TATTGCCTTAGGAGTTGTGCG	AF261825	423
<i>bla</i> _{CMY-2}	CTGACAGCCTCTTTCTCCAC	GAACCGTAATCCAGGTATGC	DQ017661	601
<i>bla</i> _{CMY-9}	GCAACAACGACA ATCCATC	TAGCCATAGGCATAACTCG	AB061794	678
<i>tetA</i> (A)	CACTATGGCAITCTGCTGGC	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	X00006	948
<i>tetA</i> (B)	GCCCAGTGCTGTTGTTGTC	AAGACCAAGACCCGCTAATG	J01830	553
<i>tetA</i> (C)	TCCTGCTCGCTTCGCTACT	TGG TCG TCA TCT ACC TGC	AB089598	730
<i>tetA</i> (G)	CGGTCTTATGGGTGCTCTAT	CCTTGCTTGTACTGCTGAC	AF071555	721
<i>sulI</i>	GTGACCGTGTTCCGCCATTCTG	TCTAACCCCTCGGTCTCTGGC	AF071555	824
<i>sul</i> II	CATTTTCGGCATCGTCAAC	AGTTTGCCAGATGATTTCGC	AF542061	356
<i>aadA1</i>	TTGATTGCTGTTACGGT	CTTCAAGTATGACGGGCTG	AY125351	537
<i>StrA-B</i>	AACGCCCTGCCITCTATCTGC	CCAAAGCCCACTTCACCGAC	AF100173	645
<i>aac</i> (3)-IV	GTCTCTGACACATTCTGGCG	ATGACCGACTGGACCTTC	X01385	387
<i>aph</i> (3)-Ia	AGCGTCTCCGACCTGATG	GTATTGACCGATTCTTGCG	V01499	373
<i>cml</i> A	CTCTTGTTCGACCGCTATC	ACAACCAGAAAGTTCAGGCAC	DQ018384	454
<i>CatI</i>	GTATGGCAATGAAAGACGG	TCAGCACCTTGTCG CTT	U46780	333
<i>floR</i>	TATGCTGATGCTCGGCGT	TTCGTGCCACCTGAAACC	AY499129	403
<i>dfp</i> -12	TCGGGTATTGGCAATGG	ATTGGGAAGAAGGCGTCA C	AF175203	354
<i>Integron</i> I	GTTTGATGTTATGGAGCAG	CTTGACCTGATAGTTTGG	AF071413	varied

* Reference[9]

1.5 质粒接合试验

6 株多重耐药性沙门氏菌分离株作为供体菌,一株卡那霉素抗性 *E. coli* SM10 用作受体菌。接合试验参照膜过滤接合法(filter mating method)^[9]进行,

供体菌和受体菌过夜培养,以细菌量 1:10 混合,混合物用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤,然后将膜置于 LB 平板上,37℃ 过夜。洗下膜上的细菌混合物,稀释后涂布于含卡那霉素(75 μ g/mL)和氯霉素(50 μ g/mL),

或卡那霉素(75μg/mL)和四环素(25μg/mL) ,或卡那霉素(75μg/mL)和链霉素(50μg/mL)的 LB 平板 37℃ 培养过夜。挑取平板上的单个菌落转移到麦康凯琼脂平板上培养 ,确定接合子对 9 种抗生素的敏感性。PCR 测定抗生素抗性基因是否发生转移。

2 结果

2.1 菌株的耐药表型

16 种抗生素敏感性试验表明 ,111 个分离株至

少对 2 种抗生素产生耐药性 ,其它 6 株只耐链霉素或卡那霉素一种抗生素。对 5 种或 5 种以上抗生素耐药的分离株有 59 株(50.4%) ,其中对氨苄青霉素、氯霉素、链霉素、磺胺、四环素和卡那霉素 6 种特定抗生素耐药的菌株有 12 株(8 株来自同一地区的肉制品)。人源肠道沙门氏菌分离株的耐药发生率普遍比食源性沙门氏菌要高 ,人源肠道沙门氏菌分离株对头孢孟多、卡那霉素、庆大霉素、磺胺、氯霉素、萘啶酮酸的耐药率明显高于食源性沙门氏菌 ,但是对四环素的耐药性明显较低(表 2)。

表 2 从肉食品和饮食行业从业人员所分离的沙门氏菌的耐药性

Table 2 Characteristics of antimicrobial resistance of <i>Salmonella</i> isolates from retail meats and human								
Antimicrobial	MIC50	MIC90	Meats (n = 81)		Human (n = 36)		Total (n = 117)	
			R ^a	I ^b	R	I	R	I
β-Lactams								
Ampicillin	4	> 64	45.7	40.7	41.7	22.2	44.4	35.0
Cefamandole	32	> 64	53.1	11.1	66.7	11.1	57.3	11.1
Cefoxitin	0.5	4	4.9	0	5.6	0	5.1	0
Ceftriaxone	0.5	1	1.2	0	2.8	0	1.7	0
Cefotaxime	0.25	2	1.2	2.5	0	19.4	0.9	5.1
Chloramphenicol	8	> 32	19.8	17.3	27.8	0	22.2	12.0
Tetracycline	8	> 32	43.2	42.0	11.1	5.6	33.3	30.8
Trimethoprim	32	> 128	90.1	1.2	83.3	2.8	88.0	1.7
Aminoglycosides								
Gentamycin	1	> 16	9.9	14.8	19.4	2.8	12.8	11.1
Kanamycin	64	> 128	28.4	16.0	66.7	5.6	40.2	12.8
Streptomycin	64	> 128	97.5	2.5	80.6	0	92.3	1.7
Spectinomycin	8	32	3.7	2.5	0	0	2.6	1.7
Sulfonamides								
Sulfamethoxazole	128	> 512	22.2	14.8	33.3	13.9	25.6	14.5
Trimethoprim-sulfamethoxazole	0.25/4.8	0.5/9.6	7.4	3.7	0	0	5.1	2.6
Quinolones								
Nalidixic acid	8	> 64	24.7	12.3	63.9	2.8	36.8	9.4
Ciprofloxacin	0.01	0.02	1.2	0	0	0	0.9	0

a. R :% With resistant ; b. I :% With intermediate susceptibility.

所有分离株对链霉素(92.3%)、甲氧苄氨嘧啶(88.0%)和头孢孟多(57.3%)的耐药性非常普遍 ,其次为氨苄青霉素(44.4%)和卡那霉素(40.2%) ,虽然氨苄青霉素和四环素的耐药率不到 50% ,但是对两者产生中度敏感的分离株的比例比其他抗生素的高 ,分别达到 35.0%和 30.8%。分离株对头孢西丁、头孢曲松、头孢噻肟、复方新诺明和环丙沙星比较敏感(表 2)。A 市疾病控制中心提供的沙门氏菌分离株(18 株)对复方新诺明、壮观霉素和环丙沙星全部敏感 ,有 11 株对 7 类抗生素(β-内酰胺类、氨基糖甙类、氯霉素、四环素、甲氧苄氨嘧啶、磺胺、喹

诺酮)同时产生耐药性。B 市 32 株沙门氏菌分离株中 MDR(27 株)发生率较高 ,有 2 株细菌分别对头孢噻肟(Cefotaxime)或环丙沙星产生耐药性 ,其余菌株对这两种抗生素都敏感。在 C 和 D 市分离到的沙门氏菌(67 株)对所测试的抗生素均有耐药菌株出现。这些数据说明 ,这些沙门氏菌分离株普遍对壮观霉素、头孢西丁、头孢噻肟、庆大霉素、复方新诺明、氯霉素、环丙沙星等抗生素高度敏感 ,而对氨苄青霉素、头孢孟多、链霉素、卡那霉素、四环素等抗生素耐药。所有分离株对多粘菌素 B、万古霉素、杆菌肽、乙酰螺旋霉素产生耐药性(表 2 中未列出)。因

为这些药物目前在临床上很少使用,所以未列入统计结果。

2.2 耐药基因和 I 类整合子

在检测的 36 株多重耐药菌株(对 2 种或 2 种以

上抗生素耐药)中,检测出 15 种耐药基因,没有检测到 *bla*_{CMY-2}、*bla*_{CMY-9} 和 *tetC* 基因。PCR 结果与抗生素敏感性表型基本一致(图 1)。36 株 MDR 沙门氏菌的耐药特征见表 3。

表 3 多重耐药性沙门氏菌的耐药基因谱

Table 3 Characteristics of antimicrobial resistance genes of MDR <i>Salmonella</i> isolates						
Strain	Serotype	Source	R type	Antimicrobial resistance gene(s)	Integron/kb	
5101	Enteritidis	chicken	ACSSuTKCeGmNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6	
5108	Enteritidis	chicken	STKNTm	<i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetB</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	b	
5109	Enteritidis	pork	ACSTKCeGmNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
3204	Derby	chicken	ACSSuTCeGmTm	<i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>Cat</i> 1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sul</i> I, <i>sul</i> II, <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfr</i> 12	0.3	
4201	Anatum	pork	ACSSuTCeTm	<i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sul</i> II, <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	-	
4202	Sinstorf	pork	CSSuTKCeGmTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sul</i> II, <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
4206	Thompson	human	ASSuTKTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6	
5201	Derby	pork	ACSSuKTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6 0.6	
5202	Enteritidis	chicken	ASSuTNTm	<i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.2	
5207	Thompson	pork	CSSuTGmCeTm	<i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetB</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6	
5210	Virchow	beef	CSSuTGmNTm	<i>Cat</i> 1, <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.2	
5213	Indiana	pork	ACSSuTKCeGmNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>floR</i> , <i>Cat</i> 1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>aac</i> (3)-IV, <i>dhfr</i> 12	0.6	
5216	Derby	pork	CSTNCeTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6	
5217	Derby	pork	SSuTNCeTm	<i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfr</i> 12	-	
5220	Derby	pork	ACSTKNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5301	Indiana	pork	ACSTKTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6,	
5302	Sinstorf	beef	ASTKCeTm	<i>blap</i> se-1, <i>StrA-B</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5303	Agona	beef	ACSKCeTm	<i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>StrA-B</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	-	
5308	Thompson	human	SKCeNTm	<i>blap</i> se-1, <i>StrA-B</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5309	Derby	human	SKCeN	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	-	
5310	Enteritidis	human	SKCeNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6	
5311	Thompson	human	ASTCeN	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia	1.6	
5312	Indiana	human	SSuKCeGmNTm	<i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5316	Derby	human	ACSSuKCeNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>Cat</i> 1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>tetB</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5317	Senftenberg	human	SKCeGmTm	<i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	-	
5320	Derby	human	SSuTKCeTm	<i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>sul</i> II, <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>dhfr</i> 12	1.0	
5328	Agona	human	ACSSuKCeGmNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sulI</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6	
5331	Lomita	human	ACSSuTNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sul</i> II, <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5335	Enteritidis	human	ACSKCeNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5336	Tennessee	human	ACSSuGmNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul</i> I, <i>sul</i> II, <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5339	Agona	human	CSTKCeGmNTm	<i>blap</i> se-1, <i>cat</i> 1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6, 1.2	
5340	Newlands	human	ACSSuCeTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>Cat</i> 1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sul</i> I, <i>sul</i> II, <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5404	Anatum	pork	ASKNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5406	Meleagridi	pork	STKCeNTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>aph</i> (3)-Ia, <i>dhfr</i> 12	1.6	
5410	Sinstorf	beef	CSSuTCeGmTmSt	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>floR</i> , <i>cmlA</i> , <i>Cat</i> 1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sul</i> II, <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.2, 1.0	
5413	Enteritidis	chicken	ASSuTCeTm	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>blap</i> se-1, <i>aadA1</i> , <i>StrA-B</i> , <i>sul</i> I, <i>tetG</i> , <i>dhfr</i> 12	1.6, 0.6	

^a Ce, cefamandole; A, ampicillin; Cf, ceftiofur; Ct, ceftriaxone; F, cefoxitin; C, chloramphenicol; Gm, gentamicin; K, kanamycin; N, nalidixic acid; S, Streptomycin; St, Spectinomycin; Su, sulfamethoxazole; T, tetracycline; Tm, trimethoprim.
^b -, negative.

具有 β-内酰胺类抗生素耐药表型的菌株中,主要是针对氨苄青霉素和头孢孟多(Cefamandole)的耐药菌株,其中 *bla*_{TEM-1}、*bla*_{PSE-1} 基因阳性的菌株分别为

22 和 30 株,共同携带这两种基因的菌株为 18 株,这些菌株中未能检测到 *bla*_{CMY-2} 和 *bla*_{CMY-9} 基因(广谱 β-内酰胺酶基因)。氨基糖甙类耐药菌株中,检测到

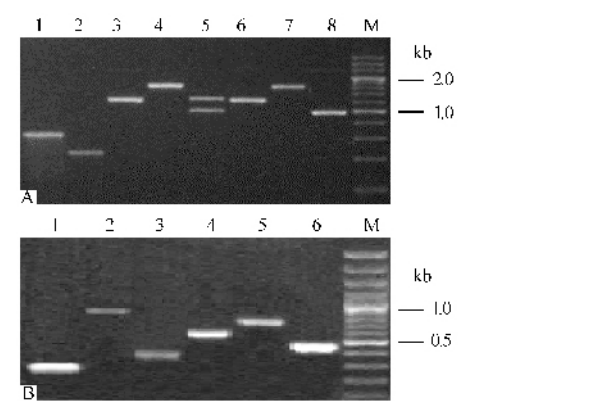


图 1 多重耐药沙门氏菌分离株 I 类整合子和耐药基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of antimicrobial resistance genes and class I integron variable region from MDR *Salmonella* isolates. A : CVclass I integron. 1. isolate 5213 ;2. isolate 3204 ;3. isolate 5202 ;4. isolate 5109 ;5. isolate 5410 ;6. isolate 5210 ;7. isolate 5406 ;8. isolate 5320 ;M. 200bp ladder. B : Resistance genes. 1. *dfr12* ;2. *qacEΔ1-sul I* ;3. *aph(3)-Ia* ;4. *tetG* ;5. *sul I* A ;M. 100 bp ladder.

aadA1、*aadA2*、*aadA5*、*StrA-B*、*aac(3)-IV*(庆大霉素耐药抗性基因)和 *aph(3)-Ia*(卡那霉素耐药基因) 6 种不同耐药,其中 *aadA2* 和 *aadA5* 分别位于 1.0kb 和 1.6kb 大小 I 类整合子。*StrA-B* 和 *aadA1* 在这些菌株中分布广泛,分别有 34 株和 32 株,同时携带这两种基因的菌株有 31 株。分离株 5213 同时对所检测的 10 种抗生素产生耐药性,该菌株携带 *aac(3)-IV* 基因,同时可以检测到 *aadA1*、*StrA-B* 和 *aph(3)-Ia*,但是没有 1.6kb 的整合子。

甲氧苄氨嘧啶耐药的主要耐药机制是因为存在整合子相关的二氢叶酸还原酶基因(*dihydrofolate reductase*, *dfr*) ,结果表明在这些沙门氏菌分离株中至少存在 *dfr1*、*dfr12*和 *dfr173*种 *dfr*基因,而且在

每一株甲氧苄氨嘧啶耐药菌株中都能检测到 *dfr12*。20 株磺胺类耐药菌株中全部可检测到 *sul I* 和/或 *sul II* 基因,有 12(12/20)株细菌同时携带这两种基因;*tetA*、*tetB* 和/或 *tetG* 在每一株四环素耐药菌株中都检测到。*floR* 和/或 *CmlA* 基因在每一株氯霉素耐药菌株中均检测到,只有 7 株氯霉素耐药菌株中检测到 *Cat1* 基因。

36 株 MDR 分离株检测到 5 种 I 类整合子,大小为 0.3、0.6、1.0、1.2 和 1.6kb,测序表明:0.3、0.6kb 大小的整合子不携带基因盒;有 2 个分离株具有 1.0kb 的整合子,含有 *aadA2* 基因(链霉素和壮观霉素耐药基因);4 株沙门氏菌含有 1.2kb 大小的整合子,编码 *dfr1C*(甲氧苄氨嘧啶耐药基因)和一个未知功能的 ORF;1.6kb 大小的整合子分离株中广泛分布(24/36),携带 *aadA5*(链霉素耐药基因)和 *dfr17C*(甲氧苄氨嘧啶耐药基因)基因。*qacEΔ1C*(抗季胺化合物和溴化乙锭)和 *sul I* 基因通常位于整合子的 3'保守区,用 *qacEΔ1* 的上游引物和 *sul I* 的下游引物进行 PCR 可以扩增出 1.1kb 的条带 *qacEΔ1-sul I*。

2.3 质粒接合试验

6 株沙门氏菌分离株的质粒的接合效率在 $3.8 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-5}$ 之间,接合试验的结果见表 4。分别测定所获得的 6 种接合子(transconjugants)对 9 种抗生素的敏感性。本研究中,氨苄青霉素、链霉素、四环素、氯霉素和甲氧苄氨嘧啶的耐药表型可通过接合发生转移,提取接合菌的质粒,以质粒为模板可以扩增出相应的耐药基因。*sul II* 基因传递的磺胺甲异噁唑耐药特性不能通过接合试验发生转移。庆大霉素的耐药表型没有通过接合发生转移。

表 4 接合试验中供、受体和接合子的抗生素敏感性

Table 4 Antimicrobial susceptibility of donor , recipient and transconjugants											
Strain	Type	MIC (μg/mL) ^a									Conjugation or transform rate
		A	C	S	Su	T	K	Ce	Gm	Tm	
SM10	recipient	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	> 64	< 2	< 2	< 2	3.8 × 10 ⁻⁷
3204	Donor	> 32	> 32	< 2	> 512	> 16	16	> 64	> 16	> 128	
3204/SM10	Transconjugant	> 32	> 32	> 64	> 512	> 16	> 64	> 64	< 2	8	
4201	Donor	> 32	> 32	> 64	> 512	> 16	8	> 64	< 2	32	2 × 10 ⁻⁶
4201/ SM10	Transconjugant	> 32	> 32	> 64	16	> 16	> 64	> 64	< 2	32	
5301	Donor	> 32	> 32	> 64	16	> 16	16	> 64	< 2	16	
5301/SM10	Transconjugant	> 32	> 32	> 64	16	> 16	> 64	> 64	< 2	16	1.5 × 10 ⁻⁷
5320	Donor	< 2	< 2	> 64	> 512	> 16	16	> 64	< 2	> 128	
5320/SM10	Transconjugant	< 2	< 2	> 64	> 512	> 16	> 64	> 64	< 2	> 128	
5410	Donor	< 2	> 32	> 64	> 512	> 16	< 2	> 64	> 16	64	2 × 10 ⁻⁵
5410/SM10	Transconjugant	< 2	> 32	> 64	16	> 16	> 64	> 64	< 2	64	
5413	Donor	> 32	2	> 64	> 512	> 16	8	> 64	< 2	32	
5413/SM10	Transconjugant	> 32	2	> 64	> 512	> 16	> 64	> 64	< 2	32	6.4 × 10 ⁻⁵

^a Ce, cefamandole; A, ampicillin; C, chloramphenicol; Gm, gentamicin; K, kanamycin; S, streptomycin; Su, sulfamethoxazole; T, tetracycline; Tm, trimethoprim. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

3 讨论

本研究中检测了从江苏部分地区肉食品和饮食行业从业人员肠道中分离的沙门氏菌的耐药表型和基因型。研究结果表明,两个来源的沙门氏菌分离株普遍对链霉素、卡那霉素、头孢孟多、氨苄青霉素和四环素等耐药,其中饮食行业从业人员肠道分离株的耐药发生率比肉食品要高。由于所收集的样品分布不均匀,饮食行业从业人员肠道分离株主要集中在一个地区,所以如果要进一步比较两个来源的细菌在耐药性上的差别,还需要扩大收集范围和增加样品的数量。

目前,在临床治疗沙门氏菌病时,动物主要使用环丙沙星和氟哌酸,而人主要使用头孢曲松(Ceftriaxone)和环丙沙星^[9,11,12]。幸运的是,目前我们所分离的非伤寒沙门氏菌分离株对这三种抗生素的耐药率还很低。头孢曲松的耐药性主要由广谱 β -内酰胺酶基因 *bla_{CMY-2}* 编码,而且我们也未能在 36 株 MDR 菌株中检测到该基因,Chen 等^[9]从中国地区肉食品中分离的沙门氏菌对头孢曲松全部敏感,且没有一个菌株中检测出 *bla_{CMY-2}* 基因。36 株细菌有 21 株具有氨苄青霉素耐药性,这种耐药性与 β -内酰胺酶有关, *bla_{TEM-1}* 基因在每一株氨苄青霉素耐药菌株中发现,本研究中所用的 *bla_{TEM-1}* 引物可以扩增 *tem* 家族所有基因。

虽然分离株对环丙沙星和氟哌酸尚未产生耐药性,但是萘啶酮酸的耐药率比较高,萘啶酮酸的耐药机制主要是 DNA 回旋酶 A 亚单位 *gyrA* 氨基酸在 83 或 87 位点处发生了单个点突变^[11,12], Ser83 → Phe、Tyr 或 Ala,或 Asp87 → Gly、Asn 或 Tyr,如果这两个位点同时发生了点突变,将会对环丙沙星等氟喹诺酮类抗生素产生高水平的耐药性。

目前一般认为,多重耐药性的水平转移通常是由质粒、转座子或整合子内基因盒介导。而且据报道,沙门氏菌可从动物体肠道正常菌群获得可转移质粒^[13]。本研究中大部分抗性基因都是位于质粒上,虽然有部分细菌的耐药基因不是位于接合性质粒上,当我们从这些分离株中提取的质粒为模板,可以扩增出大部分耐药基因,表明这些基因位于质粒上。1.0、1.2 和 1.6kb 3 个含有耐药基因的整合子分别携带 *aadA2* 基因、*dfr1-ORF_x* 和 *aadA5-dfr17*,都是编码链霉素和甲氧苄氨嘧啶耐药性的基因,这些可转移的 DNA 成分在细菌中分布广泛可能与这

两种抗生素耐药率最高有关;*sul I* 位于整合子的 3' 保守区,而且位于 *qacEΔ1*(抗季胺化合物和溴化乙锭)基因下游。

总的说来,沙门氏菌分离株的耐药性远低于志贺氏菌和致腹泻大肠杆菌^[13,14],这些细菌对氟喹诺酮类药物的耐药率远远高于沙门氏菌,但是沙门氏菌分离株的萘啶酮酸的耐药水平越来越高,可能会导致氟喹诺酮类药物在临床上使用价值下降。如果能了解耐药发生和传播的分子机制,这将帮助设计干预措施来减少耐药的发生。因为耐药细菌通常通过食物链传播给人^[10,14],动物源沙门氏菌新的耐药机制的出现,将直接决定人源沙门氏菌的耐药性。如果在食用动物用药上作出慎重选择,那么对控制耐药菌株的传播有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Angulo FJ, Baker NL, Olsen SJ, et al. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2004, 15(2): 78–85.
- [2] Rieke SC, Kunding MM, Miller DR, et al. Alternatives to antibiotics: chemical and physical antimicrobial interventions and foodborne pathogen response. *Poult Sci*, 2005, 84(4): 667–675.
- [3] Guerra B, Soto SM, Arguelles JM, et al. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype[4,5,12:i:-]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4): 1305–1308.
- [4] Poirel L, Guibert M, Bellais S, et al. Integron- and carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 from French patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5): 1098–1104.
- [5] Villa L, Pezzella C, Tosini F, et al. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(10): 2911–2914.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, 2002. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- [7] National Antimicrobial Resistance Monitoring System. NARMS 1999, Annual Report. Last revised October 1, 2003. Available from http://www.cdc.gov/narms/annual/1999/html/narms_1999_annual.htm
- [8] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] Chen S, Zhao S, White DG, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats.

- [10] Boltner D , MacMahon C , Pembroke JT , *et al.* R391 : a conjugative integrating mosaic comprised of phage , plasmid , and transposon elements. *J Bacteriol* , 2002 , **184** (18) : 5158 – 5169 .
- [11] Liebana E , Clouting C , Cassar CA , *et al.* Comparison of *gyrA* mutations , cyclohexane resistance , and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. *J Clin Microbiol* , 2002 , **40** (4) : 1481 – 1486 .
- [12] Eaves DJ , Liebana E , Woodward MJ , *et al.* Detection of *gyrA* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* , 2002 , **40** (11) : 4121 – 4125 .
- [13] Cabrera R , Ruiz J , Marco F , *et al.* Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella clinical* isolates causing traveler 's diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* , 2004 , **48** (10) : 3934 – 3939 .
- [14] Threlfall EJ , Ward LR. Decreased susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serotype Typhi , United Kingdom. *Emerg Infect Dis* , 2001 , **7** (3) : 448 – 450 .

Characterization of multidrug-resistant *Salmonella* serovars isolated from meats and human samples in some regions of Jiangsu

WANG Xiao-quan , JIAO Xin-an* , LIU Xiao-wen , CHEN Xiang , HUAN Hai-xia

(Animal Infectious Disease Laboratory of Ministry of Agriculture , Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

Abstract : A total of 117 *Salmonella* strains isolated from retail meats and human in some regions of Jiangsu were assayed for their antimicrobial susceptibility , the presence of integrons and antimicrobial resistance genes , and the ability of horizontal transfer of the characterized antimicrobial resistance determinants via conjugation. 111 (94.9%) were resistant to at least two antimicrobial agents. Resistance against streptomycin 92.3% (108/117) was the most common. Whereas 59 (50.4%) were resistant to at least five antimicrobials. Twelve isolates showed resistance to six antimicrobials : ampicillin , chloramphenicol , streptomycin , sulfamethoxazole , tetracycline , and kanamycin (R type ACSSuTK). A total of 15 different antimicrobial resistance genes were identified in 36 multidrug-resistant *Salmonella* isolates. While 30 (83%) of these isolates tested carried integrons ranging in size from 0.3 to 1.6 kb. The most common integron was 1.6 kb which carried *aadA5* and *dfr17* gene cassettes. Conjugation studies demonstrated that there was plasmid-mediated transfer of antimicrobial resistance genes. These data showed that the *Salmonella* isolates recovered from meats and human in some regions of Jiangsu were commonly resistant to multiple antimicrobials , and genes conferring antimicrobial resistance in *Salmonella* were often carried on integrons and plasmids and could be transmitted through conjugation. The mobile DNA elements might played very important role in transmission and dissemination of antimicrobial resistance determinants among *Salmonella* strains.

Keywords : *Salmonella* isolates ; multidrug-resistant ; integron ; conjugation

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30425031)

* Corresponding author. Tel : 86-514-7971136 ; Fax : 86-514-7311374 ; E-mail : xajiao@yahoo.com

Other author : LIU Xiu-fan

Received : 24 July 2006 / Accepted : 27 September 2006 / Revised : 25 September 2006