

鸡肉源沙门氏菌对喹诺酮和氟喹诺酮类抗生素耐药状况及相关基因

郝宏珊, 杨保伟, 师俊玲*, 席美丽, 王新, 崔玥, 孟江洪

西北农林科技大学食品科学与工程学院 杨凌 712100

摘要:【目的】研究分离于陕西、河南、四川和北京四省(市)鸡肉源沙门氏菌对喹诺酮和部分氟喹诺酮类抗生素的药敏性及相关耐药基因,更好地了解耐药性的产生和传播途径,确保食品安全。【方法】用琼脂稀释法测定沙门氏菌的药敏性,用PCR和基因序列测定法确定耐药沙门氏菌中与(氟)喹诺酮类抗生素耐药相关的喹诺酮类抗性决定区基因突变及质粒携带的耐药基因。【结果】390株沙门氏菌中,63.59%的菌株对萘啶酮酸产生抗性,21.28%、16.67%和14.62%的菌株分别对环丙沙星、左氧氟沙星和加替沙星产生抗性。248株萘啶酮酸抗性菌中,*aac(6')*-*Ib-cr*、*qnrA*、*qnrB*和*qnrS*基因的检出率分别为20.16%、10.89%、10.08%和1.61%。83株耐环丙沙星的菌株中,*gyrA*和*parC*基因的点突变共199个;其中*gyrA*基因中以Ser83Phe和Asp87Gly双突变最为常见,其次分别为Ser83Phe和Asp87Asn双突变、Ser83Tyr、Ser83Phe、Asp87Gly;*parC*基因的65个点突变均为Ser80Arg突变。【结论】四省市中鸡肉源沙门氏菌耐药状况严重,其解旋酶和拓扑异构酶基因突变及质粒携带的耐药基因是导致沙门氏菌耐药的重要机制。

关键词:沙门氏菌,药敏性,氟喹诺酮,耐药,基因

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2011)10-1413-08

非伤寒沙门氏菌是最常见的食源性致病菌,也是导致我国食源性疾病的主要病原体之一。我国每年约3亿人因沙门氏菌感染而患病,达病原菌型食源性疾病总数的70%~80%^[1]。目前,在人类临床治疗、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^[2]。然而,病原菌耐药性的迅速增大给食品用动物生产和公共卫生安全造成了极大危害,同时对全球食品安全和人类健康也造成巨大威胁^[3-4]。鸡肉是人们获得动物蛋白的主要来源之一,并在人们的日常饮食中占有重要地位。在喂养过程中大量使用抗生素是肉食鸡商业化生产中普遍

存在的问题。由此必然会引发鸡肉源沙门氏菌的耐药性。了解鸡肉源沙门氏菌的耐药性及其耐药机制对该病原菌的有效预防与控制有重要意义。

食源性沙门氏菌的耐药性研究已在海外得到了高度关注,但在国内的相关研究较少。除马国柱等(2003)^[5]、张芳等(2008)^[6]、杨保伟等(2010)^[7]和张秀丽等(2009)^[8]曾分别研究了陕西和河南省食源性沙门氏菌的污染状况、药敏特性和相关耐药质粒,建立了河南省食源性沙门菌指纹图谱库等报道以外,尚未见其它相关报道。有关陕西省、四川、河南和北京市等地鸡肉源沙门氏菌的(氟)喹诺酮类抗

基金项目:农业部948项目(K332020905);后稷学者讲座教授奖励计划项目(Z111021003);西北农林科技大学校长基金(A213021001)

*通信作者。Tel: +86-29-87092486; E-mail: sjlshi2004@yahoo.com.cn

作者简介:郝宏珊(1987-),女,甘肃兰州人,硕士研究生,主要从事食品安全方面的研究。E-mail: haohongshan@126.com

收稿日期:2011-03-30;修回日期:2011-05-30

生素耐药性及其相关耐药基因的研究也未见报道。

本研究旨在分析陕西、河南、四川和北京 4 省(市)鸡肉源沙门氏菌的喹诺酮和部分氟喹诺酮类抗生素耐药状况及相关耐药基因,为保障食品安全提供部分参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:390 株沙门氏菌分离自 2010 年,采集于陕西、河南、四川和北京等地共 96 个超市和 48 个农贸市场的 576 份零售白条鸡样品。菌株的分离和鉴定按照 Cui 等(2006)^[9]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 *Escherichia coli* ATCC25922 和 ATCC35218, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 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) 营养琼脂购于北京陆桥技术有限责任公司, Mueller Hinton (MH) 琼脂购于北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.1.3 抗生素:4 种(氟)喹诺酮类抗生素萘啶酮酸(Nalidixic acid)、环丙沙星(Ciprofloxacin)、左氧氟沙星(Levofloxacin)和加替沙星(Gatifloxacin)均购自 Sigma 公司。

1.1.4 主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、ExTaq DNA 聚合酶、dNTPmix、10 × PCR Buffer 和 DL2000DNA Ladder 均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。所用仪器分别为:超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司)、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(SANYO 公司)、-80℃ 低温冰箱(日本 SANYO 公司)、恒温摇床(上海智成分析仪器制造有限公司)、移液器(德国 Eppendorf 公司)、Mycycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、DNA 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:*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*aac(6')*-*Ib-cr*、*gyrA* 和 *parC* 基因扩增用引物使用 primer Premier5 软件设计,均由上海捷锐生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 PCR 扩增用引物

Table 1 Primers for PCR Amplification

Gene	Primer and Sequence	
	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
<i>qnrA</i>	AGAGGATTTCTCAGCCAGG	TGCCAGGCACAGATCTTGAC
<i>qnrB</i>	GATCGTAAAAGCCAGAAAAGG	ATGAGCAACGATGCCTGGTA
<i>qnrS</i>	GCAAAGTTTCATTGAACAGGGT	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG
<i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	TTGCCGATGCTCTATGAGTGGCTA	CTCGAATGCCTGGCGTGTTC
<i>gyrA</i>	CGTTGGTGACGTAATCGGTA	CCGTACCGTCATAGTTATCC
<i>parC</i>	CTATGCGATGTCAGAGCTGG	TAACAGCAGCTCGGCGTATT

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)^[10]推荐的琼脂稀释法测定抗生素的最小抑制浓度(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^[11]。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。不同基因扩增

过程退火温度由相应的引物序列确定。5 μL PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测分离后,使用凝胶成像系统照相。得到的 *gyrA* 和 *parC* PCR 粗产物在低温下送至北京奥科生物技术有限责任公司(<http://www.augct.com>)纯化后测序,将测定得到的 *gyrA* 和 *parC* 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。

2 结果分析

2.1 鸡肉源沙门氏菌的耐药性

沙门氏菌对萘啶酮酸产生的抗性最强,对环丙沙星、左氧氟沙星和加替沙星的抗性基本相当。390株沙门氏菌中,63.59%的菌株对萘啶酮酸产生抗性,耐环丙沙星、左氧氟沙星和加替沙星的沙门氏菌比例分别为21.28%、16.67%和14.62%(图1)。就萘啶酮酸而言,分离于陕西省的沙门氏菌对其耐药性最强,耐药率为70.13%,其次分别为分离自河南省、四川省和北京市的菌株,耐药率分别为70.00%、62.67%和56.76%,其中来自陕西和河南省的菌株对萘啶酮酸的耐药率均高于平均水平

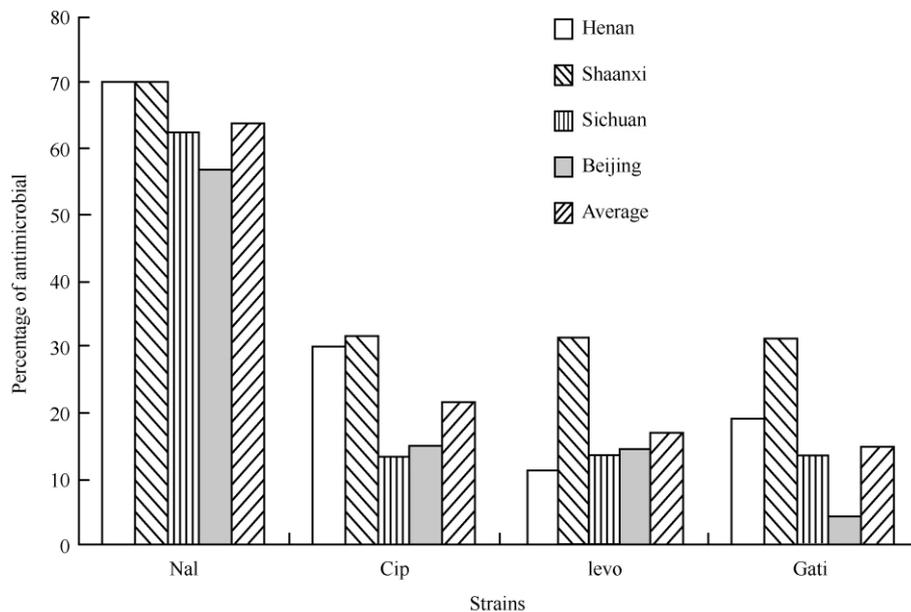


图1 4省(市)鸡肉源沙门氏菌对(氟)喹诺酮类抗生素的耐药率(%)

Fig. 1 Ratio of Fluoroquinolones resisted Chicken-borne *Salmonella* Isolates from 4 Provinces (cities) (%).

Denotes: Nal: nalidixic acid, Cip: ciprofloxacin, levo: Levofloxacin, Gati: Gatifloxacin.

2.2 鸡肉源沙门氏菌中与(氟)喹诺酮类抗生素耐药相关质粒

248株耐萘啶酮酸的沙门氏菌中,*aac(6')-Ab-cr*基因检出率(20.16%)最高,*qnrA*和*qnrB*的检出率(分别为10.89%和10.08%)相当,*qnrS*的检出率(1.61%)最少。*aac(6')-Ab-cr*的检出率明显高于其它3种*qnr*质粒。

就耐药质粒*qnrA*而言,在4省市鸡肉源沙门氏菌中的检出率以北京市最高,为27.38%;其次分别

(图1)。4省(市)沙门氏菌分离株对环丙沙星的耐药状况依次为陕西省(31.17%)、河南省(30.00%)、北京市(14.86%)和四川省(13.33%),对左氧氟沙星的耐药状况分别为陕西省(31.17%)、北京市(14.19%)、四川省(13.33%)和河南省(11.11%),对加替沙星耐药情况分别为陕西省(31.17%)、河南省(18.89%)、四川省(13.33%)和北京市(4.05%)(图1)。

分离于陕西省的沙门氏菌总体上对供试(氟)喹诺酮类抗生素的抗性最强。就单一抗生素而言,陕西省沙门氏菌分离株的耐药率均为4省之首,就4种抗生素而言,分离于陕西省的沙门氏菌平均耐药率均高于其它省(市)。相对而言,分离于北京的菌株对4种抗生素的敏感性最强(图1)。

为河南省、四川省和陕西省,检出率依次为3.17%、2.13%和1.85%,并且北京市鸡肉源沙门氏菌*qnrA*质粒的检出率明显高于其它3省。对于耐药质粒*qnrB*4省市鸡肉源沙门氏菌中的检出率仍以北京市分离株居首,为11.90%,其余依次为陕西省、四川省和河南省,检出率分别为11.11%、8.51%和7.94%。*qnrS*质粒的检出率则是以河南省鸡肉源沙门氏菌居于首位,为3.17%,其次为北京市,检出率为2.38%,陕西省及四川省鸡肉源沙门氏菌的*qnrS*

质粒的检出率均为0。耐药质粒 *aac(6')-Ib-cr* 在北京市鸡肉源沙门氏菌中的检出率为(28.57%), 依旧高于陕西省(22.22%)、四川省(14.89%)和河南省(11.11%)。由此可见,除了 *qnrS* 质粒外,北京市鸡肉源沙门氏菌质粒携带的其余3种编码(氟)喹诺酮类抗生素耐药的相关基因的检出率明显高于其它三省。

同一省(市)鸡肉源沙门氏菌对不同抗生素的耐药率之间也存在着一定的差异。各省市鸡肉源沙门氏菌的耐药质粒检出率都以 *aac(6')-Ib-cr* 为首,从平均水平来看,北京市鸡肉源沙门氏菌的4种耐药质粒的检出率最多,为17.56%,其它依次为陕西省、四川省和河南省4种耐药质粒的平均检出率分别为8.80%、6.35%和6.38%。

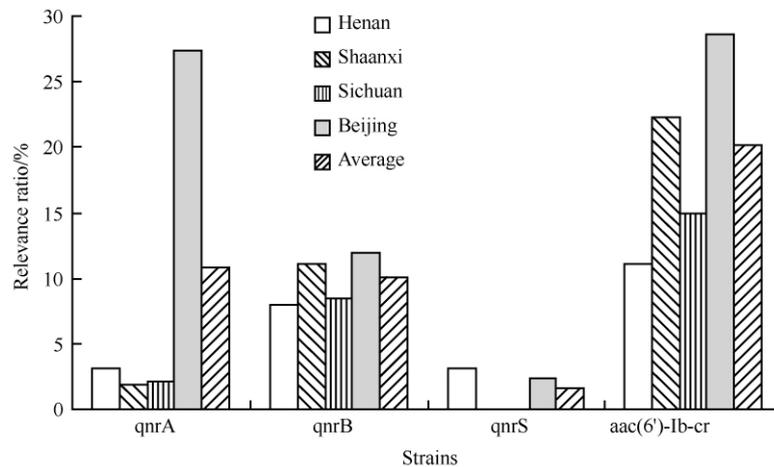


图2 4省市食源性沙门氏菌耐药质粒的检出率(%)

Fig. 2 Ratio of Resistance Plasmid among Foodborne Salmonella (n=248) in 4 Provinces(%)

2.3 鸡肉源沙门氏菌中与(氟)喹诺酮类抗生素耐药相关基因突变

83株环丙沙星抗性沙门氏菌中, *gyrA* 和 *parC* 基因中共检出199个点突变,其中 *gyrA* 点突变有134个, *parC* 突变点有65个。 *gyrA* 基因中以 Ser83Phe 和 Asp87Gly (40.20%) 双突变最为常见,其次分别为 Ser83Phe 和 Asp87Asn 双突变(24.12%)、Ser83Tyr(3.52%)、Asp87Gly(0.50%)、Ser83Phe(0.50%)。 *parC* 基因中共检出65个点突变,均为 Ser80Arg 突变。

沙门氏菌对供试(氟)喹诺酮类抗生素的耐药表型与突变点检出率之间存在着一定关系。研究中沙门氏菌以同时耐萘啶酮酸、环丙沙星、左氧氟沙星和加替沙星(耐药谱为 Nal-Cip-Levo-Gati)的现象最为常见,在58株具有该耐药表型的沙门氏菌中共检出141个突变点,达全部突变点的67.79%;耐药表型为 Nal-Cip-Gati 和 Nal-Cip-Levo 的菌株比例共为14.46%,这些菌株中检出的突变点较少,分别为24个和6个;耐药表型为 Cip、Nal-Cip 和 Nal-Levo 的菌株比例共为15.66%,其检出的突变点分别为1个、25个和3个(表2)。

对4种供试(氟)喹诺酮类抗生素同时产生耐药的沙门氏菌中 *gyrA* 和 *parC* 基因点突变的检出率要高于其它几种耐药表型的菌株中相同基因中的点突变,表明沙门氏菌对(氟)喹诺酮类抗生素的耐药性越强,菌株中和(氟)喹诺酮类抗生素抗性有关的解旋酶编码基因 *gyrA* 及拓扑异构酶编码基因 *parC* 发生点突变的机率就越大。

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WHO2001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,食用动物抗生素的使用量是人用量的10倍^[12]。

各种抗生素药物的广泛使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^[12]。在2004-2005年对美国1个家禽屠宰场的沙门氏菌检测中发现79.8%的菌株至少耐1种抗生素,53.4%的菌株耐多种抗生素^[13]。Breuil等

表 2 83 株 (氟) 喹诺酮抗生素抗性沙门氏菌 *gyrA* 和 *parC* 基因突变Table 2 Mutations in *gyrA* and *parC* Genes among 83 Fluoroquinolones Resistant *Salmonella*

Antimicrobial Resistance Profile	<i>gyrA</i> (Strain Number / Ratio / %)					Total Mutation	<i>parC</i> (Strain Number Ratio / %)
	Mutation						Ser80 Arg
	Ser83 Phe	Ser83 Tyr	Asp87 Gly	Ser83 Phe Asp87 Asn	Ser83 Phe Asp87 Gly		
Cip	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0	1/1.2
Nal-Cip	1/1.2	7/8.4	1/1.2	0/0	5/6.0	19	6/7.2
Nal-Levo	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1.2	2	1/1.2
Nal-Cip-Levo	0/0	0/0	0/0	1/1.2	1/1.2	4	2/2.4
Nal-Cip-Gati	0/0	0/0	0/0	1/1.2	7/8.4	15	8/9.6
Nal-Cip-Levo-Gati	0/0	0/0	0/0	21/25.3	26/31.3	94	47/56.6

Nal: nalidixic acid, Cip: ciprofloxacin, levo: Levofloxacin, Gati: Gatifloxacin. Ser: Serine, Phe: Phenylalanine, Tyr: Tyrosine, Gly: Glycine, Asp: Aspartic acid, Asn: Asparagine.

(2000)^[14] 对源于法国 25 526 株沙门氏菌的耐药性监测研究表明, 从 1994 年到 1997 年, 对氟苯西林耐药率由 61% 上升到 73%, 对萘啶酸耐药率从 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)^[15] 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%。代娟娟等^[16] 在 2008 年对分离于 2002-2007 年内沙门氏菌的耐药性分析中也发现, 沙门氏菌的耐药现象具有逐年上升的趋势, 这可能与养殖场为了控制疫情任意加大抗菌药物投放量有关。各种研究均表明, 病原菌耐药问题已成为当前食品安全和公共安全卫生领域的核心问题之一。本研究分离到的 390 株沙门氏菌中, 63.59% (248 株) 的菌株对萘啶酮酸产生抗性, 对环丙沙星、左氧氟沙星和加替沙星的耐药率分别为 21.28%、16.67% 和 14.62%, 与现有报道比较一致。

导致沙门氏菌耐药率上升的原因很多, 其中质粒携带耐药基因的转移是沙门氏菌产生耐药的一个重要机制^[17]。含多种耐药基因的耐药质粒存在于大多数细菌并且广泛分布于自然界, 它们可以通过接合或转导作用在不同的细菌之间进行转移, 同时将多种耐药性从一个细菌传递给其他细菌^[18]。近几年, 在美国^[19-20]、中国^[21-22]、法国^[23]、德国^[22]、韩国^[24] 及土耳其^[25] 等多个国家分离的包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、肠杆菌科细菌和弗劳地枸橼酸杆菌中, 先后检测到质粒介导耐药基因 *qnrA*, 明确

了这一新耐药机制的存在。*qnrA* 的检出率各研究报道不一, 小于 1% 至 20% 以上均有报道, 近期的研究发现 *qnrA* 在阴沟肠杆菌中的检出率最高, 达 17% 及 27%^[19, 26]。另有研究表明^[24, 26], 对 *qnrA* 研究的同时, 在分离自日本的弗氏志贺菌中发现另一个质粒介导的喹诺酮耐药基因 *qnrS*, 编码的蛋白也为 218 个氨基酸, 与 *qnrA* 的同源性为 59%, 但尚无该耐药基因在临床菌株中流行情形的报道。*qnrB* 是美国学者 Jacoby 等^[27] 在对来自印度的菌株进行 β -内酰胺酶的研究时发现的 *qnr* 基因新亚型, 目前对其分布等方面的研究还很少。研究表明 *qnrB* 在大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌及肠杆菌属细菌中的检出率为 2%—20%, 与 *qnrA* 的检出率相仿^[28]。同时由质粒携带的一个氨基糖苷乙酰转移酶的变异基因 *aac* (6')-*Ab-cr* 也可使细菌易于对喹诺酮类抗生素产生诱导耐药, 导致其对环丙沙星及诺氟沙星的 MIC 上升 4 倍, *aac* (6')-*Ab-cr* 基因在分离自上海的 72 株大肠埃希菌中的检出率为 50%^[26], 表明此基因的检出率颇高。该基因还可与 *qnrA* 基因由同一个质粒携带, 致使细菌对氟喹诺酮类的耐药性进一步上升, 在氟喹诺酮类耐药性形成中起着重要作用^[26]。本研究在 248 株抗萘啶酮酸抗性沙门氏菌中, *aac* (6')-*Ab-cr* 的检出率明显高于其它 3 种 *qnr* 质粒, 共检出 50 株 (占 20.16%); 其次是 *qnrA* 质粒的检出率, 共检出 27 株沙门氏菌 (占 10.89%); *qnrB* 及 *qnrS* 的检出率分别为 10.08% 和 1.61%。其中北京地区的鸡肉源沙门氏菌除 *qnrS* 质粒外, 其

余 3 种质粒的检出率均要高于其它三省,本研究中质粒的检出率与现有研究结果比较一致。

抗生素靶位编码基因突变导致表达产物的空间构型与理化性质发生变化,进而致使药物的结合作用下降或消失而产生耐药性也是常见的耐药机制。氟喹诺酮类药物对微生物最主要的作用靶位是 DNA 解旋酶 A 亚基和 B 亚基(*gyrA* 和 *gyrB*)和拓扑异构酶 IV C 亚基和 E 亚基(*parC* 和 *parE*),这 2 种酶的改变是引起氟喹诺酮类药物耐性的最主要因素。值得关注的是,本研究中沙门氏菌对萘啶酮酸和环丙沙星的耐药率分别达 63.59% 和 21.28%,对氟喹诺酮类抗生素出现了较为严重的多重耐药,菌株染色体 DNA 上的突变点多发生于 *gyrA* 蛋白的喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance determining region, QRDR) 编码基因及 *parC* 基因,菌株 *gyrA* 中最常见突变位点为第 83 位和第 87 位氨基酸。*parC* 中最常见位点为第 80 位氨基酸。与 *gyrA* 及 *parC* 比较,*gyrB* 及 *parE* 的突变发生率相对较低^[29],因此本研究并未检测该 2 个亚基蛋白编码基因的突变情况。研究在 83 株沙门氏菌的上述基因中共检出 199 个点突变,其中 *gyrA* 基因中以 Ser83Phe 和 Asp87Gly 双突变最为常见,其次分别为 Ser83Phe 和 Asp87Asn 双突变、Ser83Tyr、Asp87Gly、Ser83Phe。*parC* 基因中共检出 65 个点突变,均为 Ser80Arg 突变。细菌对喹诺酮类的敏感性(MIC)主要由作用靶位决定,主要靶位的点突变可引起细菌对喹诺酮类敏感性的降低,多个点突变或同时存在次要靶位的突变使耐药程度进一步上升^[10]。这些突变的产生是沙门氏菌对氟喹诺酮类抗生素抗性以及多重耐药现象出现的根本原因。

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、河南、四川和北京四省(市)鸡肉源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] L H Su, Chiu C H, Chu C, Ou J T. Antimicrobial resistance in nontyphoidal Salmonella serotypes: A global challenge. *Clinical Infectious Disease*, 2004, 39(4): 546-551.
- [3] 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(2): 100-103.
- [4] S Kariuki, 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(1): 38-43.
- [5] 马国柱,王安礼,刘长宏,连西兰,潘丽,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, 6(15): 489-491.
- [6] 张芳,马国柱,潘立,刘长宏,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(2): 222-224.
- [7] 杨保伟,曲东,申进玲,席美丽,只帅,崔生辉,寄宝义,孟江洪. 陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因. *微生物学报 (Acta Microbiologica sinica)*, 2010, 50(6): 788-796.
- [8] 张秀丽,廖兴广,郝宗宇,胡巖,炊慧霞,张广伟. 2006-2007 年河南省生肉食品中沙门菌的主动监测及其 DNA 指纹图谱库的建立. *中国卫生检验杂志 (Chinese Journal of Health Laboratory Technology)*, 2009, 19(7): 1545-1548.
- [9] S Cui, Zheng J, Meng J. An improved method for rapid isolation of salmonella from chicken carcasses. *Journal of Food Safety*, 2006, 26(1): 49-61.
- [10] Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 2nd

- ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2003.
- [11] Joseph Sambrook , David W. Russell. 分子克隆实验指南, 黄培堂, 王恒堃, 周晓巍, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 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, 30(5): 257-259.
- [13] Parveen S, Taabodi M, Schwarz JG. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella recovered from processed poultry. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(11): 2466-2472.
- [14] Breuil J, Brisaboise A, Casin I, Armand-Lefèvre L, Frémy S, Ekkehard. Antibiotic resistance in salmonella isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 46(6): 965-971.
- [15] 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.
- [16] 代娟娟, 孙金华, 常维山. 鸡白痢沙门氏菌耐药性分析. 山东畜牧兽医 (*Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*), 2008, 29(11): 56-57.
- [17] 王明贵. 喹诺酮类抗菌药的耐药性及质粒介导耐药机制. 中华医学杂志 (*National Medical Journal of China*). 2006, 86(9): 645-647.
- [18] 杜雄伟, 李叶, 王晓辉. 沙门氏菌耐药机制的研究进展. 江苏农业科学 (*Jiangsu Agricultural Science*), 2010, (6): 487-490.
- [19] A Robicsek, Sahm DF, Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC. Broader distribution of Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 3001-3003.
- [20] Wang M, Sahm D F, Jacoby G A, Hooper D C. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in Klebsiella pneumoniae clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(4): 1295-1299.
- [21] 李涛, 熊自忠, 沈继录, 周强, 徐元宏, 王中新. 大肠埃希菌与克雷伯菌属细菌 *qnr* 基因的检测. 检验医学 (*Laboratory Medicine*), 2005, 20(2): 112-114.
- [22] Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang YY, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli from Shanghai China. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2003, 47(7): 112-114.
- [23] Mammeri H, Loo van de M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in Escherichia coli in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(1): 71-76.
- [24] J Jeong, Yoon HJ, Kim ES, Lee Y, Choi S, Kim NJ, Woo JH, Kim YS. Detection of *qnr* in clinical isolates of Escherichia coli from Korea. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2005, 49(6): 2522-2524.
- [25] H Nazic, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in Enterobacteriaceae in Turkey. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2005, 49(5): 2146-2147.
- [26] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 2006, 83-88(12).
- [27] Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, H Oh, Robicsek A, Hooper DC. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(4): 1178-1182.
- [28] Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(8): 2872-2874.
- [29] Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*, 1999, 1(2): 38-55.

Drug resistance and related genes of chickenborne *Salmonella* to quinolone and fluoroquinolones

Hongshan Hao , Baowei Yang , Junling Shi* , Meili Xi , Xin Wang , Yue Cui , Jianghong Meng

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

Abstract: [**Objective**] Antimicrobial susceptibility to quinolone and fluoroquinolones and the related genes of chickenborne *Salmonella* in Shaanxi , Henan , Sichuan and Beijing provinces were studied to better understand the development of antimicrobial resistance and routes of transmission to ensure food safety. [**Methods**] Antimicrobial susceptibility was tested according to agar dilution method. *GyrA* and *parC* gene mutations of quinolone resistance determination region (QRDR) of fluoroquinolone resistant *Salmonella* and the resistant genes of *qnrA* , *qnrB* , *qnrS* and *aac* (6')-*Ib-cr* were determined using PCR and DNA sequencing analysis. [**Result**] Among the 390 *Salmonella* isolates , 63.59% were resistant to nalidixic acid , followed by ciprofloxacin (21.28%) , levofloxacin (16.67%) , and gatifloxacin (14.62%) . Among 248 nalidixic acid resistant *Salmonella* , antimicrobial resistant genes carried by plasmid were detected as *aac* (6')-*Ib-cr* (20.16%) , *qnrA* (10.89%) , *qnrB* (10.08%) and *qnrS* (1.61%) , respectively. In total 199 point mutations were detected in *gyrA* and *parC* of 83 fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates. The most common mutations in *gyrA* gene was Ser83Phe and Asp87Gly double mutation , followed by Ser83Phe and Asp87Asn double mutation , Ser83Tyr , Ser83Phe , Asp87Gly. Sixty-five point mutations detected in *parC* was Ser80Arg . [**Conclusion**] Antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from chicken in the four provinces was common. Genetic elements including mutations of unwindase , topoisomerase , and plasmid with antimicrobial , played important roles in the antimicrobial resistance of *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella* , antimicrobial susceptibility , fluoroquinolones , antimicrobial resistance , genes

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the 948 Project of Ministry of Agriculture (K332020905) , by the Houji Scholars Program (Z111021003) and by the Funding for President of Northwest A&F University (A213021001)

* Corresponding author. Tel: +86-29-87092486; E-mail: sjlshi2004@yahoo.com.cn

Received: 30 March 2011 / Revised: 30 May 2011