

## 研究报告

# 新疆阿克苏地区一株羊源沙门菌及其小菌落变异株的生物学特性

鲁壮壮, 吴自豪, 池昊明, 龚洁, 陈伟\*

塔里木大学生命科学与技术学院 新疆生产建设兵团塔里木动物疫病诊断与防控工程实验室,  
新疆 阿拉尔 843300

鲁壮壮, 吴自豪, 池昊明, 龚洁, 陈伟. 新疆阿克苏地区一株羊源沙门菌及其小菌落变异株的生物学特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3467-3478.

LU Zhuangzhuang, WU Zihao, CHI Haoming, GONG Jie, CHEN Wei. Biological characteristics of a sheep-derived strain of *Salmonella* and its small colony variant in Aksu, Xinjiang of China[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3467-3478.

**摘要:**【背景】小菌落变异株(small colony variant, SCV)是一种具有独特的表型及致病特征且生长缓慢的细菌亚群, 而国内鲜有关于食源性沙门菌 SCV 的研究报道。【目的】为食源性沙门菌的防治及动物性食品安全提供实验数据。【方法】使用氨基糖苷类抗生素对羊源胆汁中分离的沙门菌进行实验室诱导得到 SCV, 然后分别对野生株和诱导株的菌落形态、生长、生化特性、营养缺陷型检测、运动性、耐药性检测及耐药基因、毒力基因、生物被膜形成能力进行比较和分析。【结果】经卡那霉素诱导获得一株血红素依赖型沙门菌 SCV, 与野生株相比, 诱导株生长缓慢, 低于野生株 84%, 不利用柠檬酸盐, 溶血能力增强 40%, 对磺胺类和氨基糖苷类药物的耐受性增强, 生物被膜形成能力减弱 45%, 运动能力减弱 78%。【结论】沙门菌 SCV 的生长和生理生化特性与野生株相比有显著差异, 使得沙门菌 SCV 的分离鉴定尤为困难; 并且 SCV 的致病性与耐药性等方面的变化可能给沙门菌病的防治带来更大挑战, 其机制还有待深入研究。

**关键词:** 沙门菌; 小菌落变异株; 耐药性; 生物膜形成能力; 生物学特性

资助项目: 兵团重点领域科技攻关计划(2020AB025)

This work was supported by the Science and Technology Research Program in Key Areas of the XPCC (2020AB025).

\*Corresponding author. E-mail: L187369315@163.com

Received: 2022-10-24; Accepted: 2022-12-06; Published online: 2023-02-16

# Biological characteristics of a sheep-derived strain of *Salmonella* and its small colony variant in Aksu, Xinjiang of China

LU Zhuangzhuang, WU Zihao, CHI Haoming, GONG Jie, CHEN Wei\*

Tarim Engineering Laboratory of Animal Disease Diagnosis, Prevention and Control of Xinjiang Production and Construction Corps, College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

**Abstract:** **[Background]** The small colony variants (SCVs) of bacteria are subpopulations with small colonies, slow growth, and atypical phenotypic characteristics, leading to recurrent infection. Little is known about the food-borne SCVs of *Salmonella* in China. **[Objective]** To provide experimental data for the prevention and control of food-borne *Salmonella* and the guarantee of animal food safety. **[Methods]** The SCV was induced by the addition of aminoglycoside antibiotics in the medium of a *Salmonella* strain isolated from sheep bile. The colony morphology, growth, biochemical characteristics, auxotrophy, antibiotic resistance, resistance genes, virulence genes, and biofilm formation ability of the wild type and SCV were determined and compared. **[Results]** A heme-dependent *Salmonella* SCV was obtained after induction with kanamycin. Compared with the wild type, the SCV showed a growth rate decrease of 84%, the inability of using citrate, a hemolysis ability increase of 40%, increased tolerance to sulfonamides and aminoglycosides, a biofilm formation reduction of 45%, and a motility decrease of 78%. **[Conclusion]** The biological characteristics of the *Salmonella* SCV were significantly different from those of the wild type, which made it difficult to identify the SCVs of *Salmonella*. The changes of the pathogenicity and drug resistance of SCVs may pose great challenges to the prevention and control of salmonellosis, and the mechanism remains to be studied.

**Keywords:** *Salmonella*; small colony variants; drug resistance; biofilm formation ability; biological characteristics

沙门菌(*Salmonella*)作为兼性胞内菌,可通过侵袭人和动物的肠黏膜淋巴上皮细胞或周围的肠上皮细胞使机体发病,主要的临床症状为发热、胃肠炎、腹泻、败血症及流产等<sup>[1]</sup>。沙门菌可在人与动物之间直接或间接传播,是我国细菌性食物中毒案例中的主要病原菌之一<sup>[2]</sup>。鸡肉、羊肉、牛肉、蛋、奶等畜禽产品被认为是人感染沙门菌的主要传播媒介之一<sup>[3]</sup>。因此,沙门菌病不仅给养殖业造成严重的经济损失,同时也是影响公共卫生安全的重大隐患,是一种

重要的人畜共患病。

20世纪初,德国第一次报道了一种非正常菌落形态的伤寒沙门菌(*Salmonella typhi*),这种只有正常菌落 1/10 大小、呈针尖状的小菌落就是小菌落变异体<sup>[4]</sup>。随后越来越多的细菌小菌落变异株(small colony variant, SCV)被相继报道,其中包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)及葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的成

员等<sup>[5-6]</sup>。而且随着研究的深入,人们发现细菌能以 SCV 的形式巧妙地逃避宿主免疫系统的清除和抗菌药物的杀伤作用,从而在细胞内存活造成反复感染<sup>[7]</sup>。

虽然细菌 SCV 是在沙门菌中首先被发现的,但是关于细菌 SCV 的形成、耐药性和致病性等方面的机理机制研究却多来自以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为代表的葡萄球菌属成员<sup>[8]</sup>。而且国内关于沙门菌 SCV 的报道少之又少,其可能原因为 SCV 和野生菌株相比有着不一样的生理生化特性,导致在实验室检查时被当成其他杂菌而被忽略。因此,本研究从健康羊的胆汁中分离获得沙门菌,然后进行实验室诱导,并对比研究野生株和诱导株在生理生化特性、药物敏感性及生物被膜形成能力等方面的差异,初步探究沙门菌及其 SCV 的生物学特性差异,为临床合理使用抗菌药物及保障动物性食品安全提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品 与 菌 株

样品来源:阿克苏地区某屠宰场健康羊的胆汁。

菌株:大肠杆菌 ATCC 25922、鼠伤寒沙门菌 ATCC 14028、表皮葡萄球菌 ATCC 35984 均保藏于新疆生产建设兵团塔里木动物疫病诊断与防控工程实验室。

#### 1.1.2 主要试剂、仪器及培养基

沙门菌生化鉴定套盒,北京陆桥技术有限责任公司;普通 2×*Es Taq* Master Mix (Dye),北京天根生化试剂公司产品;药敏试验药片,OXOID 公司;9 cm 培养皿, Normax 公司。

超净工作台,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;移液器, Eppendorf 公司;高速冷

冻离心机, Thermo Scientific 公司;电子天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司;PCR 仪, Senso Quset Labcycler 公司;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;凝胶成像系统, Bio-Rad 公司;光学显微镜, Zeiss 公司;全波长酶标仪, Gene Company Limited 公司。

亚硒酸盐胱氨酸肉汤(selenite cystine broth, SC)培养基、氯化镁孔雀绿培养基(Rappaport-Vassiliadis medium, MM)、SS 琼脂(*Salmonella-Shigella* agar, SS)培养基、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(xylose lysine desoxycholate agar, XLD)培养基,青岛海博生物技术有限公司;胰蛋白胍大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)培养基, OXOID 公司;运动力培养基(g/L):胰蛋白胍 10.0, 氯化钠 5.0, 阿拉伯糖 1.5, 琼脂 3.0。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 样品的处理与菌株分离鉴定

采集阿克苏地区某屠宰场健康羊的胆汁,保存在无菌的离心管中,4 h 内使用冰盒带回实验室进行实验。

使用 SC 培养基和 MM 培养基对样品进行 18–24 h 的增菌培养,用接种环挑取培养物划线于 SS 培养基和 XLD 培养基进行分离纯化。沙门菌在 SS 培养基上表现为无色透明、有或无黑色中心的菌落,在 XLD 培养基上表现为无色透明有黑色中心的菌落。挑取符合沙门菌培养特征的单菌落进行 IMViC 生化鉴定,并对疑似菌株进行 16S rRNA 基因扩增产物测序。PCR 反应体系(20 μL): 2×*Es Taq* Master Mix 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 20 ng/μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s; 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。将所得 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.2.2 沙门菌 SCV 的诱导

参考文献[9]中的方法,将沙门菌接入 TSB 培养基中,37 °C、180 r/min 培养 6–8 h 获得细菌混悬液,用无菌生理盐水稀释至 0.5 个麦氏比浊标准,使用无菌棉签蘸取菌液均匀涂布于 TSA 平板上,将含有 30 µg/片卡那霉素或 5 µg/片庆大霉素的无菌滤纸片分别贴于 TSA 平板表面,然后放入 37 °C 恒温培养箱中培养 18–24 h,得到 F1 代。蘸取 F1 代抑菌圈边缘单菌落接种于 TSB 中,37 °C、180 r/min 培养 24–56 h,然后划线分离纯化,观察是否有生长缓慢、呈针尖状的小菌落出现。同时将细菌悬液用无菌生理盐水稀释至 0.5 个麦氏比浊标准,使用无菌棉签蘸取菌液均匀涂布于 TSA 平板上,将含有 60 µg/片卡那霉素或 10 µg/片庆大霉素的无菌滤纸片贴于平板表面,放入 37 °C 恒温培养箱中培养 18–24 h,得到 F2 代。增加抗生素浓度再重复上述步骤,直到有特征菌落出现。

### 1.2.3 生长曲线测定

将沙门菌及其 SCV 划线接种于 LB 固体培养基上,37 °C 培养过夜,然后挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养至菌液呈云雾状,然后取 1 mL 菌液转接至 200 mL 新鲜的 LB 培养基中,37 °C、180 r/min 恒温培养,定时吸取菌液置于 96 孔板(200 µL/孔),使用酶标仪测定  $OD_{600}$ 。

### 1.2.4 营养缺陷型测定实验

用无菌生理盐水将沙门菌 SCV 菌悬液稀释至 0.5 麦氏比浊标准,使用无菌棉签蘸取菌液均匀涂布于 LB 平板上,然后分别滴 5 µL (100 µg/mL) 氯化血红素、10 µL (50 µg/mL) 甲萘醌、10 µL (50 µg/mL) 胸腺嘧啶脱氧核苷、10 µL (50 µg/mL) 硫辛酸于 LB 平板上,37 °C 培养 24–48 h,观察是否有回复现象。

### 1.2.5 生物被膜形成能力检测

将培养过夜的沙门菌菌液用新鲜的 TSB 以 1:100 (体积比)稀释,吸取 200 µL 稀释后的菌液至 96 孔板中,每株接种 4 孔。每一培养板中同时设阳性对照组(ATCC 35984)和空白对照组(等体积的 TSB)各 4 孔。37 °C 静置培养 48 h 后测定  $OD_{595}$ ,无菌水洗去未黏附细菌。56 °C 烘干固定 1 h 后,用 0.5% 结晶紫染色 5 min,冲洗后晾干,使用丙酮:乙醇(1:4, 体积比)溶液溶解 15 min 后测定  $OD_{595}$ 。

### 1.2.6 溶血活性测定

按照文献[10]的方法测量溶血活性:收集培养过夜的细菌上清液(100 µL)与含 3% 绵羊红细胞的 900 µL 磷酸盐缓冲液(PBS)混合进行溶血活性测定。37 °C 孵育 30 min 后 8 000 r/min 离心 2 min,在 543 nm 处测定上清液溶血程度。阳性对照为 1 000 µL 含 3% 绵羊红细胞的 ddH<sub>2</sub>O 混合液,阴性对照为 1 000 µL 含 3% 绵羊红细胞的 PBS 混合液。计算溶血活性对阳性对照的百分率。

### 1.2.7 运动力检测方法

配制新鲜的运动力培养基,干燥 15 min。用无菌生理盐水将培养至对数期( $OD_{600}$  为 0.613)的菌悬液稀释至 0.5 个麦氏比浊标准,取 2 µL 稀释后的菌悬液滴加在运动力检测平板上,37 °C 恒温培养 12 h,然后测量其运动的直径<sup>[11]</sup>。

### 1.2.8 药物敏感性实验及耐药基因检测

参考世界卫生组织(World Health Organization, WHO)所推荐的 K-B 法和 CLSI 手册<sup>[12]</sup>,以大肠杆菌菌株 ATCC 25922 用作质控菌株,对菌株进行六大类 12 种药的药物敏感性检测。分别为:β-内酰胺类(青霉素、氨苄西林、头孢噻吩),氨基糖苷类(链霉素、阿米卡星),四环素类(四环素、多西环素),氯霉素类(氟苯尼考),磺胺类(复方新诺明),喹诺酮类(恩诺沙星、环

丙沙星、诺氟沙星)。

参考文献[13-14]中耐药基因引物序列(表1), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。通过 PCR (退火温度见表 1, 反应体系、条件见 1.2.1)检测确定耐药基因的携带情况。

### 1.2.9 毒力基因检测

参考文献[15-18]中的毒力基因引物序列(表 2), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。通过 PCR (退火温度见表 2, 反应体系、条件见 1.2.1)检测确定毒力基因的携带情况。

表 1 沙门菌耐药基因引物信息

Table 1 *Salmonella* drug resistance gene primer information

引物名称 Primer name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
β-内酰胺类 β-lactams	<i>TEM</i> F: ATGAGTATTCAACATTTCCGTG R: TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	861	54
	<i>CXT-M</i> F: TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R: CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	544	54
	<i>SHV</i> F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R: ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713	54
	<i>OXA</i> F: GGCACCAGATTCAACTTTCAAG R: GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	564	54
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>rmtA</i> F: CCTAGCGTCCATCCTTTCCCTC R: AGCGATACCAACACACGATGG	315	50
	<i>aac(6)-Ib</i> F: ATGACCTTGCGATGCTCTAGA R: CGAATGCCTGGCGTGTTT	486	54
四环素类 Tetracyclines	<i>tetA</i> F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	60
	<i>tetB</i> F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCAATAACACCG	695	60
	<i>tetM</i> F: GAACTCGAACAAGAGGAAAGC R: ATGGAAGCCCAGAAAGGAT	740	60
氯霉素类 Chloramphenics	<i>cmlA</i> F: GCGGGCTATCTTTGCGTTTC R: AAGTAGACTGCCGTGACCGTTCC	540	55
	<i>floR</i> F: AACCCGCCCTCTGGATCAAGTCAA R: GCACCAGCCCCAACGAAACCAGT	590	55
磺胺类 Sulfonamides	<i>sul1</i> F: TCACCGAGGACTCCTTCTTC R: CAGTCCGCCTCAGCAATATC	331	56
	<i>sul2</i> F: CGGCATCGTCAACATAACCT R: TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	721	66
喹诺酮类 Quinolones	<i>parC</i> F: CTGGGTAAATACCATCCGCAC R: CGGTTCATCTTCATTACGAA	987	53
	<i>gyrA</i> F: ATGAGCGACCCTTGCGAGAGAAAT R: AGCCCTTCAATGCTGATGTCTTC	685	59
	<i>gyrB</i> F: CCTCCCAGACCAAAGACAAACT R: CAGCATTGCTTTCGGATAACG	821	60
	<i>qnrA</i> F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	67

表 2 沙门菌毒力基因引物信息

Table 2 *Salmonella* virulence gene primer information

引物名称 Primer name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
铁摄取类 Iron ion uptake	<i>irp2</i> F: CTGATGAACTCACTCGCTATCC R: AGCATCTCCTGGCTCTGCTC	440	67
	<i>iroN</i> F: CCTCCGACGATGATAATGACG R: GATACCATTATGCGTAATGCC	866	62
	<i>iucD</i> F: GAAGCATATGACACAATCCTG R: CAGAGTGAAGTCATCACGCAC	613	55
黏附素类 Adhesins	<i>csgA</i> F: ACTCTGACTTGACTATTACC R: AGATGCAGTCTGGTCAAC	220	50
	<i>fimH</i> F: TCGAGAACGGATAAGCCGTGG R: GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	58
	<i>aatA</i> F: CATAGGCGTTTCTCTTTCCGAT R: CCTGTCTGTTTCATACAGATTCGTT	1 226	55
保护素类 Protectins	<i>ompA</i> F: AGCTATCGCGATTGCAGTG R: GGTGTTGCCAGTAACCGG	919	55
	<i>kspM</i> F: GCGCATTTGCTGATACTGTTG R: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	271	63
	<i>sodA</i> F: CTGGAACCGCACTTCGATAAGCA R: TTCGTCCCAGTTCACCACGTT	549	58
侵袭素类 Invasins	<i>yijp</i> F: TGGCTTGATTCTGCATCCGAT R: CATCGTCTGCTGTTGGTGAT	517	55
	<i>ibeB</i> F: GTTCTCACTCAGCCAGAACG R: CATCCAGCACTTCCAGATAAC	1 172	55
	<i>mat</i> F: CGACCTGGTCAGCAACAGCC R: TCCACGCCACATTCAGTGT	238	55
毒素类 Toxins	<i>toxA</i> F: ATTTACGGCGTTACTATCCTC R: TTTTGGTCTCGGTCAGATATG	281	60.5
	<i>estA</i> F: GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA R: AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	190	52

## 2 结果与分析

### 2.1 羊源沙门菌分离与 SCV 的诱导结果

从健康屠宰羊胆汁分离到疑似沙门菌 d58-1, 培养 24 h 后在 SS 培养基上菌落表现出边缘透明、中心带黑点; 在 XLD 培养基上显现出无色透明、中心带黑点。在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对疑似菌株的 16S rRNA 基因序列, 相似性分析结果显示,

该分离株与 10 株已公布的沙门菌株 16S rRNA 基因序列的相似性为 99.9%, 确定为沙门菌。

沙门菌野生株 d58-1 经卡那霉素诱导得到的一株沙门菌 SCV, 命名为 d58-1-S。与野生株一样, 沙门菌 SCV 的特异性基因 *invA* 扩增为阳性, 目的条带明亮且单一(图 1)。与野生株不同的是, 沙门菌 SCV 在 LB 平板和哥伦比亚血平板上为乳白色、半透明、呈针尖状的小菌落。

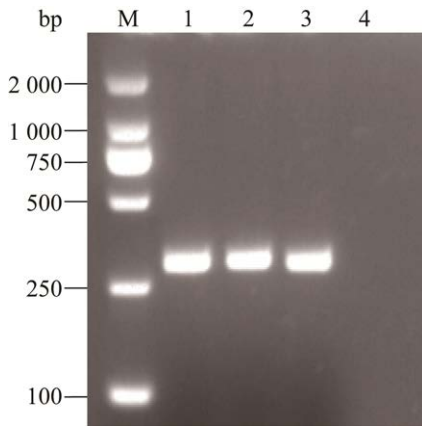


图1 *invA* 基因电泳结果 M: DNA Marker; 1: d58-1; 2: d58-1-S; 3: 鼠伤寒沙门菌 ATCC 14028; 4: 空白对照. 目的片段大小 284 bp

Figure 1 *invA* gene electrophoresis results. M: DNA Marker; 1: d58-1; 2: d58-1-S; 3: *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; 4: Blank control. Target fragment size: 284 bp.

## 2.2 生化试验结果

根据生化鉴定管使用说明对野生株 d58-1 和其 SCV 菌株进行生化试验, 结果表明, 沙门菌野生株及其 SCV 菌株在靛基质试验、甲基红试验和乙二酰试验均无差异, 但野生株可利用柠檬酸盐, 而 SCV 不利用柠檬酸盐。

## 2.3 生长曲线测定

连续监测 36 h 内沙门菌 SCV 及其野生株在 LB 培养基中的生长情况, 结果表明沙门菌 SCV 生长速度缓慢, 且生长量明显低于野生株 d58-1, 处于稳定期的细菌  $OD_{600}$  仅为 0.190, 而野生株  $OD_{600}$  最高可达 1.179, SCV 菌株比野生株低约 84%。对比二者的生长周期, 发现 SCV 菌株迟缓期明显延长, 且无明显的对数生长期(图 2)。

## 2.4 营养缺陷型测定实验

在滴加了甲萘醌(VK<sub>3</sub>)、胸腺嘧啶核苷(thymidine, TD)和硫辛酸(C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>)的滤纸片周围均未出现回复菌落; 而在滴加氯化血红素(H)的滤纸片周围出现回复菌落(图 3)。因此可以

判定此 SCV 菌株为血红素依赖型。

## 2.5 生物被膜形成能力检测

对沙门菌 SCV 及其野生株进行生物被膜形成能力检测, 结果显示, SCV 菌株的  $OD_{595}$  仅为

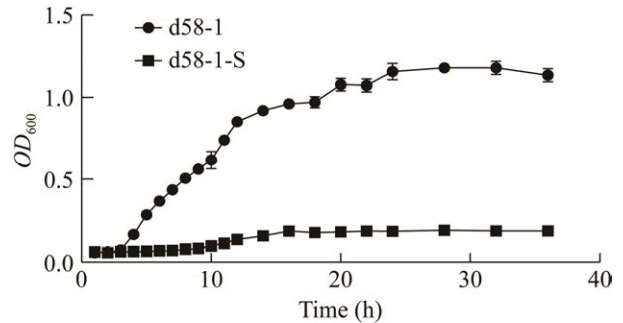


图2 菌株 d58-1 和 d58-1-S 在 LB 培养基中的生长曲线

Figure 2 Growth curves of strains d58-1 and d58-1-S in LB medium.

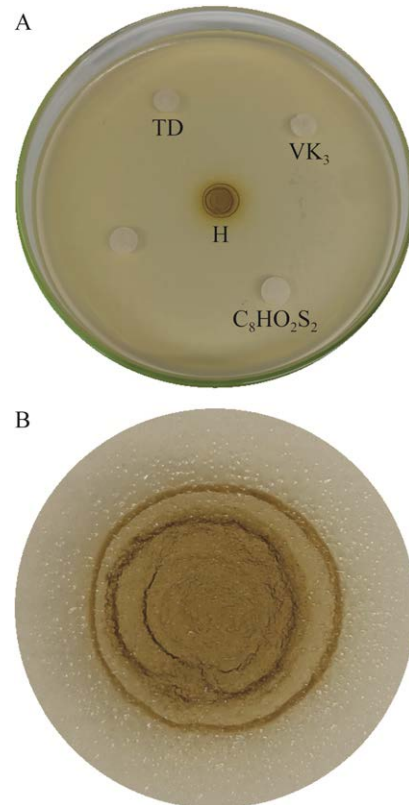


图3 SCV 菌株营养缺陷性检测实验

Figure 3 SCV strain atrophic deficiency detection experiment.

0.156, 而野生株的  $OD_{595}$  为 0.285, 且两组数据存在显著差异, SCV 菌株比野生株低约 45% (图 4)。结果表明, SCV 菌株的生物被膜形成能力明显低于野生株 d58-1。

## 2.6 溶血活性测定

使用 3% 的绵羊红细胞对沙门菌 SCV 及其野生株进行溶血活性检测, 结果显示, SCV 菌株的  $OD_{543}$  为 0.096, 而野生株的  $OD_{543}$  为 0.057, 两组数据存在显著差异, SCV 菌株比野生株高约 40% (图 5)。结果表明, SCV 菌株的溶血活性明显高于野生株 d58-1。

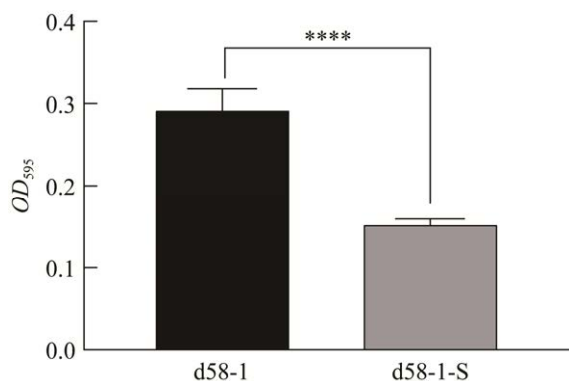


图 4 菌株 d58-1 与 d58-1-S 生物被膜形成能力检测结果

Figure 4 Test results of bacterial biofilm formation ability of strains d58-1 and d58-1-S. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

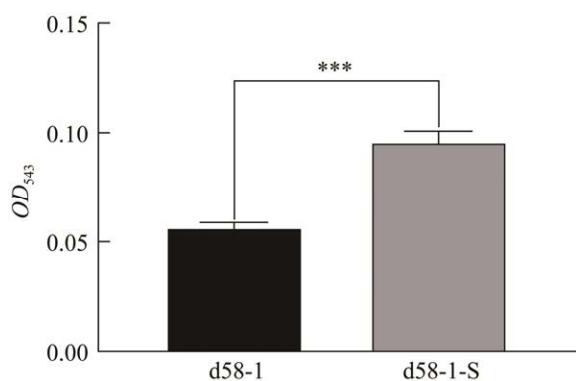


图 5 菌株 d58-1 和 d58-1-S 的溶血活性检测

Figure 5 Detection of hemolytic activity of strains d58-1 and d58-1-S. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## 2.7 运动力检测

在运动力检测平板上, 连续监测 12 h 内沙门菌 SCV 和野生株的运动情况, 结果显示, SCV 菌株在平板上的运动直径仅为 4.4 mm, 而野生株则高达 20.15 mm, 两组数据存在显著差异, SCV 菌株比野生株低约 78% (图 6)。结果表明, SCV 菌株的运动能力明显低于野生株 d58-1。

## 2.8 药物敏感性实验和耐药基因检测结果

### 2.8.1 药物敏感实验结果

按照世界卫生组织(WHO)所推荐的 K-B 法和 CLSI 手册标准对 2 株菌进行六大类 12 种药的药敏敏感性试验检测。野生株 d58-1 对链霉素和青霉素中介, 对复方新诺明敏感; 而 SCV 对链霉素和复方新诺明耐药, 对青霉素敏感(表 3)。说明沙门菌 SCV 对链霉素和复方新诺明的敏感性降低。

### 2.8.2 耐药基因检测结果

使用 PCR 技术对  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类、磺胺类和喹诺酮类耐药基因进行检测, 分析耐药基因的携带情况, 其中野生株 d58-1 与 SCV 菌株无差异, 均携带  $\beta$ -内酰胺类基因 *TEM* 和喹诺酮类基因 *gyrA*、*gyrB*。

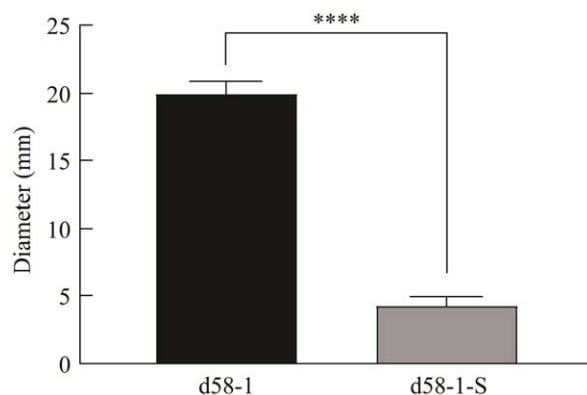


图 6 菌株 d58-1 和 d58-1-S 运动力检测

Figure 6 Strains d58-1 and d58-1-S motion force detection. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .



表3 药物敏感性实验结果

Table 3 Drug sensitivity test results

药物	d58-1	d58-1-S
Medicine		
链霉素 Streptomycin	I	R
青霉素 Penicillin G	I	S
诺氟沙星 Norfloxacin;	S	S
四环素 Tetracycline	S	S
复方新诺明	S	R
Sulfamethoxazole-trimethoprim		
阿米卡星 Amikacin	S	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	S	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	S
头孢噻吩 Cephalothin	S	S
氨苄西林 Ampicillin	S	S
氟苯尼考 Florfenicol	S	S
多西环素 Doxycycline	S	S

S: 敏感; I: 中介; R: 耐药

S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant.

## 2.9 毒力基因检测

使用 PCR 技术对五大类 25 种毒力基因进行检测。结果显示, 野生株 d58-1 与 SCV 菌株均携带黏附素类基因 *fimH*, 保护素类基因 *ompA*、*sodA* 及侵袭素类基因 *yijP*、*mat*、*ibeB*。

## 3 讨论与结论

食源性沙门菌引起的中毒和感染一直位于细菌性疾病的首位, 各种抗生素的不当使用会导致沙门菌的耐药性日益复杂。在抗生素和宿主免疫机制的选择性压力下产生的 SCV 会降低沙门菌对抗菌药物的敏感性, 并且造成疾病的复发性感染, 使得沙门菌的治疗更加困难。研究表明, 柠檬酸盐在柠檬酸裂解酶的作用下分解成醋酸盐和草酰乙酸, 随后在草酰乙酸脱羧酶作用下脱羧生成丙酮酸, 然后进入柠檬酸-丙酮酸循环, 并且此过程需要消耗 ATP<sup>[9]</sup>。本研究中沙门菌 SCV 的菌落细小呈针尖状、生长缓慢、不利用柠檬酸盐。其可能原因为 SCV 菌株

因血红素(电子传递过程中细胞色素类物质的重要辅基)合成障碍, 导致能量代谢缓慢, 进而使得柠檬酸-丙酮酸循环受阻, 表现出生长较慢、代谢率低、生理生化发生变化等特性。细菌 SCV 代谢水平的降低可促使细菌产毒素能力下降和对机体防御系统的刺激性降低等, 从而更能适应体内环境<sup>[4]</sup>。这不仅加大了宿主免疫系统和抗生素清除菌体的难度, 还使其成为一个持续存在的病原库。因此, 食源性致病菌 SCV 引起的食品安全风险应该受到临床微生物学家和医务工作人员的高度重视。SCV 菌株在临床上的分离鉴定并不容易, 特别是和其他细菌混合感染时容易被忽略, 本实验室提出一种新的诱导细菌形成 SCV 的制备方法<sup>[9]</sup>, 将前人在液体培养基中添加特定浓度的抗生素对细菌进行诱导培养然后划线分离纯化的诱导方法改良为在固体培养基上添加一定量的抗生素, 形成以滤纸片为中心的连续药物梯度浓度, 提高了细菌 SCV 诱导效率。

早期的研究将细菌 SCV 的缺陷型大致分为 CO<sub>2</sub> 依赖型、胸腺嘧啶合成缺陷型、甲萘醌合成缺陷型、血红素合成缺陷型及未鉴定出缺陷物质的其他缺陷型, 后续又有其他缺陷型被鉴定出, 如硫胺素和硫辛酸等<sup>[8]</sup>。这些营养缺陷物质是物质合成中的基本原料或能量形成过程中的重要辅酶, 因此这些物质合成缺陷导致细菌 SCV 生长缓慢, 生理生化特性改变, 致病性、耐药性、运动能力和生物膜形成能力等也发生全局性的变化。在本研究中, 经卡那霉素诱导获得的沙门菌 SCV 为血红素缺陷型, 血红素是电子传递过程中细胞色素类物质的重要辅基, 起着将电子从辅酶 Q 传递到氧的重要作用。不仅如此, 血红素也是过氧化物酶和过氧化氢酶的重要组分, 在应对宿主的氧化应激方面起着重要作用。有文献报道, 金黄色葡萄球

菌通过分泌中性鞘磷脂酶溶解红细胞,以摄取更多的血红素实现免疫逃避<sup>[10]</sup>。本研究中沙门菌 SCV 的溶血能力也显著增强,推测其为了保证自身生存生长的需要调节某些毒素蛋白的表达,从而可以在宿主体内获得更多的血红素。其调控途径还有待深入研究。

药敏实验结果显示,与野生株相比,诱导株对链霉素和复方新诺明的药物敏感性降低,但野生株和诱导株均未检测到氨基糖苷类药物和磺胺类药物相关的耐药基因。有报道称,氨基糖苷类药物因带正电形成高膜电势能穿过细胞质膜进入细菌体内,细菌膜电势能的改变可影响氨基糖苷类抗生素的摄入<sup>[20]</sup>。而血红素依赖性 SCV 因其电子传递障碍,导致膜内外电位差值较小,减少氨基糖苷类药物的吸收,所以对氨基糖苷类药物的敏感性降低<sup>[21-22]</sup>。磺胺类药物的耐药性增加可能存在多重因素,*sul1* 通常由一类整合子介导,*sul2* 基因通常位于小的非接合性质粒或大的可以转移的多重耐药质粒,但在本研究中均未检测到相关基因。相关文献也有对质粒源磺胺耐药基因 *sul3* 的报道<sup>[23]</sup>,本研究中沙门菌 SCV 对磺胺类药物的耐受是否与这一类未发现的磺胺类药物耐药基因相关,还需进一步鉴定<sup>[24]</sup>。此外,也有研究证明染色体上的二氢叶酸合成酶的 *dhps* 基因产生突变可降低二氢叶酸合成酶对磺胺类药物的亲和力,从而对磺胺类药物产生抗性<sup>[25]</sup>。

毒力基因检测结果显示,野生株和诱导株均检测到 *fimH*、*ompA*、*sodA*、*yijP*、*mat* 和 *ibeB* 基因。其中由 *sodA* 基因编码的超氧化物歧化酶(SOD)起到抵御细胞氧化应激、及时修复损伤细胞的作用。*fimH* 是编码I型菌毛的 *fim* 基因簇中的一个关键基因,有文献报道,虽然沙门菌 I 型菌毛的主要亚单位是 Fim A,但其黏附性还是取决于位于菌毛顶部的 Fim H<sup>[26]</sup>。

*OmpA* 是革兰阴性菌的主要外膜蛋白,介导细菌侵入、黏附宿主细胞,还可作为一种免疫逃逸蛋白避免宿主防御,同时也参与细菌生物被膜的形成<sup>[27-28]</sup>。*yijP*、*mat*、*ibeB* 基因也可能与沙门菌的黏附侵袭密切相关。研究表明,生物被膜的形成不仅受到黏附性、疏水性和黏附表面材质等多重因素的影响,并且运动性对于细菌与黏附表面的初始相互作用和沿表面的运动也很重要,是正常生物膜形成的关键。本研究检测到的 *fimH* 基因(I型菌毛)是初始表面附着所必需的,而鞭毛的能量来源于膜两侧的电化学梯度产生的势能<sup>[29]</sup>。因此本研究中沙门 SCV 的运动力和生物膜形成能力明显下降,其可能原因为细菌 SCV 的电子传递系统受阻,膜电位差值较小,所以能量供能减少,导致细菌 SCV 运动力减弱,从而使生物被膜形成能力减弱。

本研究通过对健康羊源沙门菌 d58-1 及其 SCV 菌株进行生理生化、耐药性和运动性等生物学特性的比较分析,为沙门菌 SCV 的临床诊疗和食源性沙门菌的防治提供了实验数据。

## REFERENCES

- [1] CAMPIONI F, BERGAMINI AMM, FALCAO JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil[J]. Food Microbiology, 2012, 32(2): 254-264.
- [2] 曹正花,谭艾娟,吕世明,王雄,杜国琴. 贵州省猪源沙门氏菌对  $\beta$ -内酰胺类药耐药性及耐药基因分析[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(7): 1737-1742.  
CAO ZH, TAN AJ, LV SM, WANG X, DU GQ. Analysis of drug resistance and resistant genes of *Salmonella* to  $\beta$ -lactams antimicrobial agents isolated from pigs in Guizhou Province[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 43(7): 1737-1742 (in Chinese).
- [3] 王娟,郑增忍,王玉东,龚振华,黄秀梅. 市售禽肉产品中沙门氏菌污染状况调查[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(7): 50.  
WANG J, ZHENG ZR, WANG YD, GONG ZH,

- HUANG XM. Investigation on *Salmonella* contamination in poultry products on the market[J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2010, 27(7): 50 (in Chinese).
- [4] PROCTOR RA, von EIFF C, KAHL BC, BECKER K, MCNAMARA P, HERRMANN M, PETERS G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(4): 295-305.
- [5] BORDERON E, HORODNICEANU T. Metabolically deficient dwarf-colony mutants of *Escherichia coli*: deficiency and resistance to antibiotics of strains isolated from urine culture[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1978, 8(6): 629-634.
- [6] HÄUBLER S, TÜMMLER B, WEIßBRODT H, ROHDE M, STEINMETZ I. Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis[J]. Clinical Infectious Diseases, 1999, 29(3): 621-625.
- [7] STOKES JL, BAYNE HG. Dwarf colony mutants of salmonellae[J]. Journal of Bacteriology, 1958, 76(2): 136-141.
- [8] 高硕, 周万青. 大肠埃希菌小菌落变异型的特征及临床意义研究进展[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(4): 297-300.
- GAO S, ZHOU WQ. Research progress on characteristics and clinical significance of *Escherichia coli* microcolony variant[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2019, 37(4): 297-300 (in Chinese).
- [9] 陈伟, 吴自豪, 池昊明, 蔡依龙, 吴静. 诱导细菌形成小菌落变异体的制备方法: CN114107162A[P]. 2022-03-01.
- CHEN W, WU ZH, CHI HM, CAI YL, WU J. Preparation method for inducing bacteria to form small colony variants: CN114107162A[P]. 2022-03-01 (in Chinese).
- [10] FANG B, LIU BH, SUN BL. Transcriptional regulation of virulence factors Hla and phenol-soluble modulins  $\alpha$  by AraC-type regulator Rbf in *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2020, 310(5): 151436.
- [11] DRESSAIRE C, MOREIRA RN, BARAHONA S, ALVES de MATOS AP, ARRAIANO CM. BolA is a transcriptional switch that turns off motility and turns on biofilm development[J]. mBio, 2015, 6(1): e02352-e02314.
- [12] 任强. 新疆南疆地区奶牛乳源金黄色葡萄球菌分子特性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2020.
- REN Q. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* from dairy cows in southern Xinjiang[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2020 (in Chinese).
- [13] 刘少昆. 京津部分地区犍牛腹泻大肠杆菌分离鉴定及耐药性分析[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2016.
- LIU SK. Identification of calf diarrhea in some areas of Beijing and Tianjin and drug resistance of *E. Coli* isolated[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [14] 刘晟辰. 天山南麓绵羊沙门菌耐药性及耐药基因流行状况的调查分析[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2022.
- LIU SC. Investigation and analysis of drug resistance and gene prevalence of *Salmonella* in sheep in southern Tianshan Mountains[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2022 (in Chinese).
- [15] 胡会杰, 张琪, 周明旭, 朱国强. 不同禽源致病性大肠杆菌毒力基因分布规律研究[J]. 中国家禽, 2015, 37(10): 34-37.
- HU HJ, ZHANG Q, ZHOU MX, ZHU GQ. Study on distribution rule of major virulence genes of pathogenic *Escherichia coli* in different poultry origin[J]. China Poultry, 2015, 37(10): 34-37 (in Chinese).
- [16] 宋楠楠. 死鸭胚中大肠杆菌的耐药与毒力基因分子流行病学调查[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2018.
- SONG NN. Molecular epidemiological survey of resistance and virulence genes of *Escherichia coli* from dead duck embryos[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [17] 宋美英. 致病性牛源大肠杆菌毒力基因分子流行病学调查和耐药突变选择窗的应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2017.
- SONG MY. Detection of virulence genes, antibiotic resistance and mutant prevention concentration of pathogenic *E. coli* isolated from cattle[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [18] 王绍红, 柴荣, 李政志, 张艳芳, 刘伟石, 薛原, 孙颖. 狐源大肠杆菌毒力基因的检测[J]. 野生动物学报, 2018, 39(4): 933-937.
- WANG SH, CHAI R, LI ZZ, ZHANG YF, LIU WS, XUE Y, SUN Y. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from fox[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2018, 39(4): 933-937 (in Chinese).
- [19] LÜTGENS M, GOTTSCHALK G. Why a co-substrate is required for anaerobic growth of *Escherichia coli* on citrate[J]. Journal of General Microbiology, 1980,

- 119(1): 63-70.
- [20] 高翔, 郭玉茹, 杨杰, 黄程程, 田春莲, 宏伟, 刘明春. 菌落突变株与细菌适应性生存关系研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(11): 3300-3305.
- GAO X, GUO YR, YANG J, HUANG CC, TIAN CL, HONG W, LIU MC. Research progress on adaptive survival relationship between small colony variants and bacteria[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(11): 3300-3305 (in Chinese).
- [21] CURTIS TD, GRAM L, KNUDSEN GM. The small colony variant of *Listeria monocytogenes* is more tolerant to antibiotics and has altered survival in RAW 264.7 murine macrophages[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1056.
- [22] VESTERGAARD M, PAULANDER W, LENG BF, NIELSEN JB, WESTH HT, INGMER H. Novel pathways for ameliorating the fitness cost of gentamicin resistant small colony variants[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1866.
- [23] PERRETEEN V, BOERLIN P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(3): 1169-1172.
- [24] LINDSTEDT BA, HEIR E, NYGÅRD I, KAPPERUD G. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals[J]. Journal of Medical Microbiology, 2003, 52(Pt 2): 141-149.
- [25] 薛原, 王晓菲, 牛鑫鑫, 廖聪, 孙颖, 田丽红. 鸡源沙门氏菌中磺胺类药物耐药基因的检测[J]. 家禽科学, 2016(3): 10-12.
- XUE Y, WANG XF, NIU XX, LIAO C, SUN Y, TIAN LH. Source of *Salmonella* in chicken sulfa drug resistance gene detection[J]. Poultry Science, 2016(3): 10-12 (in Chinese).
- [26] GRZYMAJŁO K, UGORSKI M, KOLENDA R, KĘDZIERSKA A, KUŹMIŃSKA-BAJOR M, WIELICZKO A. FimH adhesin from host unrestricted *Salmonella* Enteritidis binds to different glycoprotein ligands expressed by enterocytes from sheep, pig and cattle than FimH adhesins from host restricted *Salmonella* Abortus-ovis, *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Dublin[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(3-4): 550-557.
- [27] PRASADARAO NV, BLOM AM, VILLOUTREIX BO, LINSANGAN LC. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950), 2002, 169(11): 6352-6360.
- [28] ORME R, DOUGLAS CW, RIMMER S, WEBB M. Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA[J]. Proteomics, 2006, 6(15): 4269-4277.
- [29] CHUN SY, PARKINSON JS. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein[J]. Science, 1988, 239(4837): 276-278.