

源自合肥地区表观健康鸡的沙门氏菌耐药性与血清型、基因型相关性分析

王元兰, 刘军军, 邵颖, 方艳红, 魏建忠, 王桂军, 孙裴, 李郁*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 为了解源自合肥地区表观健康鸡的沙门氏菌耐药性及其与血清型、基因型的相关性, 在前期已鉴定血清型和 ERIC 基因型的基础上, 采用 K-B 纸片法对 21 株沙门氏菌分离株进行 21 种抗生素药物敏感试验, 利用 PCR 技术对耐药菌株进行 32 种耐药基因检测。结果显示, 总耐药率为 100%(21/21), 耐 2 种以上抗生素的菌株占 76.19% (16/21), 多重耐药谱为青霉素-氨苄西林-阿莫西林-链霉素-复方新诺明, 其中耐受 β -内酰胺类抗生素的类别最多, 耐药率最高达 100% (21/21)。21 株沙门氏菌均检出耐药基因, 涉及 *bla_{PSE}*、*sul1*、*strA*、*bla_{TEM}*、*sul2*、*tetA*、*tetB*、*aph3-IIa* 和 *cat I* 9 种, 其中 *bla_{PSE}* 基因的检出率最高, 为 85.7% (8/21)。可见源自合肥地区表观健康鸡的沙门氏菌对 β -内酰胺类抗生素耐药性最强, 与其携带 *bla_{PSE}* 基因有关; 耐药表型测定结果与耐药基因检测结果基本一致; 耐药性与具有相同来源的同一血清型、基因型相关。

关键词: 表观健康鸡; 沙门氏菌; 耐药性; 血清型; ERIC 基因型

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0540-07

Analysis of antimicrobial resistance on *Salmonella* isolated from nonsymptomatic chickens in clinic in Hefei and its serotype and genotype

WANG Yuan-lan, LIU Jun-jun, SHAO Ying, FANG Yan-hong, WEI Jian-zhong, WANG Gui-jun, SUN Pei, LI Yu
(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In order to investigate the relationship between antimicrobial resistance and serotypes, genotypes of *Salmonella* isolates from apparently healthy chickens in Hefei, the Kirby-Bauer method was applied to determine the sensitivity of 21 strains susceptibility to 21 antibiotics, and PCR technique also was used to detect 32 kinds of drug-resistance genes, based on identified serotypes and ERIC-PCR gene-type. It was found that 100%(21/21) of the *Salmonella* isolates were resistant to all antibiotics by Drug Susceptibility Test; 76.19% (16/21) were resistant to at least two antimicrobials among the 21 isolates, and the dominating multidrug-resistant spectrum was Penicillin G-Ampicillin-Amoxicillin-Streptomycin-Trimethoprim-sulfamethoxazole. It was the most extensive in resistance to β -lactamase antibiotics by 100%(21/21). Meanwhile, the resistance genes could be detected from all these isolates by PCR, including *bla_{PSE}*, *sul1*, *strA*, *bla_{TEM}*, *sul2*, *tetA*, *tetB*, *aph3-IIa* and *cat I*, and *bla_{PSE}* gene was the most prevalent with the detected rate of 85.7%(8/21). It is concluded that the strongest antimicrobial resistance to β -lactamases drugs on *Salmonella* isolated from apparently healthy chickens in Hefei due to the existence of *bla_{PSE}* gene; antimicrobial phenotype is also related to the antimicrobial resistance genes; antimicrobial resistance is in relevant with the same sources of the same serotypes and genotypes.

Key words: apparently healthy chickens; *Salmonella*; antimicrobial resistance; serotype; ERIC-PCR gene-type

收稿日期: 2013-01-23

基金项目: 国家科技支撑项目 (2009BADB9B01), 安徽省高等学校省级自然科学基金项目 (KJ2008B056) 和安徽省家禽产业体系基金。

作者简介: 王元兰, 女, 硕士研究生。E-mail: wylan23@163.com

* 通信作者: 李郁, 女, 教授。E-mail: liyu@ahau.edu.cn

沙门氏菌是一种重要的人兽共患病原菌, 目前已有 2 500 种以上的血清型。沙门氏菌在自然界中分布广泛, 常寄生于人和动物肠道内, 其中家禽, 尤其是鸡构成沙门氏菌最大的储存宿主^[1]。在养殖生产中, 随着抗菌药物长期乱用、滥用和超剂量使用, 致使沙门氏菌逐渐产生耐药性, 且日趋严重, 多重耐药菌株不断出现^[2], 这不仅对畜禽生产造成威胁, 而且也通过食品的污染与传播威胁着人类的健康。沙门氏菌产生的耐药机制复杂, 可移动基因元件(如质粒、转座子和整合子等)介导耐药及耐药基因的散播是其中的一个方面。本实验系在前期自合肥地区 500 羽表观健康鸡肛拭子分离获得的 21 株沙门氏菌, 并已鉴定血清型、ERIC-PCR 基因型的基础上, 利用标准 Kirby-Bauer (K-B) 纸片法测定其耐药表型, 应用 PCR 技术对耐药菌株进行相关

耐药基因的检测, 旨在分析表观健康鸡携带的沙门氏菌耐药及多重耐药性与耐药基因、血清型、基因型之间的关系, 从而为深入了解沙门氏菌耐药性的产生奠定理论基础, 也为合理指导养殖生产中抗菌药物的使用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 受试菌株 21 株受试沙门氏菌来自合肥地区 500 羽表观健康鸡肛拭子, 由安徽农业大学动物传染病实验室分离鉴定并保存, 其编号、来源、血清型、ERIC-PCR 基因型见表 1。

1.1.2 质控菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠杆菌(ATCC25922) 均购自中国药品生物制品检定所。

表 1 21 株受试沙门氏菌背景资料^[3]

Table 1 The background materials of 21 *Salmonella* isolates

菌株编号 No. of strain	采样地点 Sampling site	血清型 Serotype	ERIC-PCR 基因型 ERIC-PCR genotype
S1	B 养殖场 (父母代鸡) Farm B (parent birds)	茨昂威沙门氏菌 <i>S.tshiongwe</i>	c
S2	B 养殖场 (父母代鸡) Farm B (parent birds)	鸡-雏沙门氏菌 <i>S.gallinarum-pullorum</i>	d
S3	C 养殖场 (商品鸡) Farm C (commercial birds)	圣保罗沙门氏菌 <i>S.saintpaul</i>	g
S4-S6	C 养殖场 (商品鸡) Farm C (commercial birds)	鸡-雏沙门氏菌 <i>S.gallinarum-pullorum</i>	f
S7-S16	E 农贸市场 (商品鸡) Farmer's market E (commercial birds)	鸡-雏沙门氏菌 <i>S.gallinarum-pullorum</i>	e
S17-S19	E 农贸市场 (商品鸡) Farmer's market E (commercial birds)	纽兰沙门氏菌 <i>S.newlands</i>	b
S20、S21	E 农贸市场 (商品鸡) Farmer's market E (commercial birds)	明斯特沙门氏菌 <i>S.muenster</i>	a

1.1.3 主要仪器 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 电泳仪 (北京六一仪器厂 DYY. 11C 型); 凝胶成像分析系统 (上海天能科技公司)。

1.1.4 主要试剂 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)、胰酪胨大豆酵母液膏肉汤 (TSB)、水解酪蛋白琼脂(M-H)、M-H 液体培养基均购自绍兴天恒生物科技有限公司; 10×*Taq* Reaction Buffer (Mg²⁺ Plus)、dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹)、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U·μL⁻¹)、10×Loading Buffer、DNA Marker-DL2000 均购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.5 21 种抗生素药敏纸片 青霉素 (penicillin G, P-G)、氨苄西林 (ampicillin, AMP)、阿莫西林 (amoxicillin, AML)、头孢氨苄 (cefalexin, CLX)、头孢曲松 (ceftriaxone, CRO)、庆大霉素 (gentamycin, GEN)、链霉素 (streptomycin, SM)、卡那霉素

(kanamycin, KAN)、丁胺卡那霉素 (amikacin, AMK)、四环素 (tetracycline, TET)、强力霉素 (doxycycline, DOX)、氯霉素 (chloramphenicol, CAT)、氟苯尼考 (florfenicol, FFC)、恩诺沙星 (enrofloxacin, ENR)、环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP)、氧氟沙星 (ofloxacin, OFL)、诺氟沙星 (norfloxacin, NOR)、复方新诺明 (trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT)、甲氧苄啶 (trimethoprim, TMP)、呋喃唑酮 (furazolidone, FR)、呋喃妥因 (nitrofurantoin, FD), 均购自杭州微生物制剂生物有限公司。

1.1.6 32 种耐药基因及其 PCR 引物 参考文献[4-7] 针对 8 种 β-内酰胺类、3 种磺胺类、4 种喹诺酮类、6 种四环素类、3 种氯霉素类、8 种氨基糖苷类耐药基因合成引物, 见表 2。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 2 检测沙门氏菌耐药基因的 PCR 引物

Table 2 Sequences of oligonucleotide primers used in PCR assays for identification of antimicrobial resistance genes in *Salmonella* isolates

目的基因类别及命名 Name and type of target gene	引物序列 Sequence of primer		片段大小/bp Fragment length	
	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')		
	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')		
β-内酰胺类 Beta-lactam	<i>bla</i> _{TEM}	CAACATTTTCGTGTCGCCCT	TTAICCGCCTCCAICCCAGICT	629
	<i>bla</i> _{PSE}	GCGTGTTCGCAACTATGACT	GCCATTGAAGCCTGTGTTTGA	449
	<i>bla</i> _{SHV}	TGCGCAAGCTGCTGACCAGC	TTAGCGYTGCCAGTGTCTGA	305
	<i>bla</i> _{CTX-M-1 #}	ATGGTTAAAAATCACTGCGYCAGTTC	TCACAAACCGTYGGTGACGATTTTAGCCGC	876
	<i>bla</i> _{CTX-M-2 #}	ATGATGACGCAGAGCATTCGCCCTCA	TCAGAAACCGTGGTTACGATTTTCGC	876
	<i>bla</i> _{CTX-M-9 #}	ATGATGAGACATCGGTTAAGCGG	TTAATAACCGTCCGTGACGATTTTCGCG	876
	<i>bla</i> _{CYMLAT #}	TGGCCAGAACTGACAGGCAA	TTTCTCCTGAACGTGGCTGG	460
	<i>bla</i> _{CYMMOX #}	GCTGTCTAAGGAGCACAGGAT	CACATTGACATAGGTGTGGTG	520
磺胺类 Sulfanila	<i>sul1</i>	TTTCTGACCTGAGCTCTAT	GTCCGGACGTAGTCAGCGCCA	425
	<i>sul2</i>	CCTGTTTCGTCCGACACAGA	GAAGCGCAGCCGCAATTCAT	435
midis	<i>sul3</i>	ATGAGCAAGATTTTTGGAATCGTAA	CTAACCTAGGGCTTTGGATATT	792
喹诺酮类 Quinolones	<i>qnrA</i>	TCAGCAAGAGGATTTCTCA	GGCAGCACTATTACTCCCA	627
	<i>qnrB</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGC	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469
	<i>qnrS</i>	GCAAGTTCATGAACAGGGT	TCTAAACCGTCCGAGTTCGGCG	427
	<i>qepA</i>	CGGCGCGTGTGCTGGAGTTCCT	CCGACAGGCCACGACGAGGATGC	548
四环素类 Tetracyclines	<i>tetA</i>	AGGATCGCTTTCCTGCGGAC	CACCCGTTCCACGTGTGTTATA	395
	<i>tetB</i>	CTTATCATGCCAGTCTTGCCA	CCAACCATCATGCTATTCAT	680
	<i>tetC</i>	GCTGATGGCATAAGGCTTGGTAA	CGTCTCCCTTATGCGACTC	515
	<i>tetD</i>	GTTGCGGCTTCGGTAGTGG	CTGCGCTTCTGTGTTCTCGT	256
	<i>tetE</i>	CGGCGTATTACGGGAGTIT	CCAGCTTTGTGTAATGACCGC	821
	<i>tetG</i>	CTGCTGATCGTGGGCTTGA	GCTTGAAGATCGCATGTGTT	761
氯霉素类 Chloromyces	<i>flor</i>	GGTGATTTTTGGTCCGCTCTC	CGGACACCGTGAAGACAATACC	779
	<i>cmlA</i>	GCTGCTACTCCCGTAAAGTG	GCGACACCAATACCCACTAGC	351
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>catI</i>	AACATTTTGAGGCATTCAGTCA	ACCTTGTGCGCTTGGTATAAT	490
	<i>aadA1</i>	GGCAGTCCGCCATAAAACAAA	ACCTTGGTGATCTCGCTTTC	809
	<i>aadA2</i>	CCTGAAGCCATACAGCGATATT	CTTGATGATCTCGCTTTCACA	655
	<i>aadB</i>	GGACACAACGCAGGTCACATT	ACGCAAGACCTCAACCTTTTC	502
	<i>aadD</i>	CGTGTCTTCTGTCCACTCCT	GCAAGGACCGACAACATTCTA	260
	<i>aac(3)-Ia</i>	AAGTATGGGCATCATTCGCAC	CAATGACGCTTAGCACCTCTGA	437
	<i>aph(3')-IIa</i>	TCGTATCAAAAATCACTCGCA	TATGGGTATAAATGGGCTCCG	437
	<i>aacC2</i>	TGCCTCACTTAAAGCCATTGG	GCTCCGAAGTGCTTCTCAAGA	729
	<i>strA</i>	AGCAGAGCGCGCTTCGCTC	CCAAAGCCACTTCACCGAC	704

1.2 方法

1.2.1 耐药表型的测定 采用标准 K-B 纸片法, 参照美国临床实验室标准委员会(CLSI/NCCLS)2012 版执行标准^[8]判定结果。

1.2.2 细菌总 DNA 的提取 采用热裂解法提取沙门氏菌的总 DNA。

1.2.3 耐药基因的 PCR 检测 PCR 反应体系为 25 μL: 10×Taq Reaction Buffer (Mg²⁺ Plus) 3.0 μL, dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹) 2.0 μL, 上下游引物各 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶(2.5 U·μL⁻¹) 0.25 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 17.75 μL。反应条件: 95℃预变性 5 min;

95℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 1min, 经过 35 个循环; 72℃延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物分析 取 8 μL PCR 产物与 1 μL 10×Glycerol DNA Loading buffer 混匀, 在 2%的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg·mL⁻¹ 溴化乙锭)上, 以 100 V 电压电泳 30 min 后, 凝胶成像系统观察并拍照, 分析结果。

2 结果与分析

2.1 耐药表型的测定

21 株沙门氏菌对 21 种抗生素的总耐药率为

100% (21/21), 其中对 β -内酰胺类抗生素的耐药类别最多, 且耐药率最高达 100%, 见表 3。在 21 株沙门氏菌中有 16 株对 2 种以上抗生素耐药, 多重耐

药率为 76.19% (16/21), 最主要的多重耐药谱为 PG-AMP-AML-SM-SXT, 构成比达 66.7%, 见表 4。

表 3 21 株沙门氏菌对 21 种抗生素的感受性分布
Table 3 Distribution of susceptibility to 21 antibiotics from 21 *Salmonella* isolates

抗菌药物种类 Type of antibiotics	抗菌药物缩写 Abbr. of antibiotics	敏感率/% Sensitive rate	中介率/% Moderate sensitivity rate	耐药率/% Resistant rate
β -内酰胺类 Beta-lactam	PG	0	0	100 (21/21)
	AMP	33.3(7/21)	0	66.7(14/21)
	AML	33.3(7/21)	0	66.7(14/21)
	CLX	52.4(11/21)	14.3(3/21)	33.3(7/21)
	CRO	90.5(19/21)	9.5(2/21)	0
氨基糖苷类 Aminoglycosides	GEN	100(21/21)	0	0
	SM	33.3(7/21)	0	66.7(14/21)
	KAN	95.2(20/21)	0	4.8(1/21)
	AMK	100(21/21)	0	0
四环素类 Tetracyclines	TET	81.0(17/21)	0	19.0(4/21)
	DOX	81.0(17/21)	0	19.0(4/21)
	CAT	95.2(20/21)	0	4.8(1/21)
氯霉素类 Chloromycetins	FFC	100(21/21)	0	0
	喹诺酮类 Quinolones	ENR	42.9(9/21)	23.8(5/21)
磺胺类 Sulfanilamides	CIP	81.0(17/21)	19.0(4/21)	0
	OFL	76.2(16/21)	19.0(4/21)	4.8(1/21)
	NOR	71.4(15/21)	28.6(6/21)	0
硝基呋喃类 Nitrofurans	SXT	33.3(7/21)	0	66.7(14/21)
	TMP	33.3(7/21)	4.8(1/21)	62.0(13/21)
	FR	100(21/21)	0	0
	FD	100(21/21)	0	0

表 4 21 株沙门氏菌的多重耐药谱测定结果
Table 4 The result of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* from 21 isolates

菌株编号 No. of strain	抗生素缩写 Abbr. of antibiotics	菌株数 Strain
S1、S17、S18、S19、S21	PG	5
S20	PG-CLX	1
S3	PG-KAN-TET-DOX-CAT	1
S10	PG-AMP-AML-SM-SXT	1
S7、S8、S9	PG-AMP-AML-SM-SXT-TMP	3
S11	PG-AMP-AML-SM-ENR-SXT-TMP	1
S2、S12、S13、S15、S16	PG-AMP-AML-CLX-SM-ENR-SXT-TMP	5
S4、S5、S6	PG-AMP-AML-SM-TET-DOX-SXT-TMP	3
S14	PG-AMP-AML-CLX-SM-ENR-OFL-SXT-TMP	1

多重耐药菌谱为 PG-AMP-AML-SM-SXT, 构成比为 66.7%

The dominating multidrug-resistant spectrum was PG-AMP-AML-SM-SXT, constituent ratio was 66.7%.

2.2 耐药基因的检测

在 21 株沙门氏菌进行 32 种耐药基因检测中, 共检测出 9 种耐药基因, 其中以 *bla_{PSE}* 耐药基因的检出率最高, 85.7% (18/21); 其次是 *sul1* 耐药基因, 66.7% (14/21); *strA*、*bla_{TEM}*、*sul2*、*tetA*、*tetB*、*aph3-IIa*、*cat I* 的耐药基因检出率分别为 38.1% (8/21)、33.3% (7/21)、33.3% (7/21)、14.3% (3/21)、4.8%

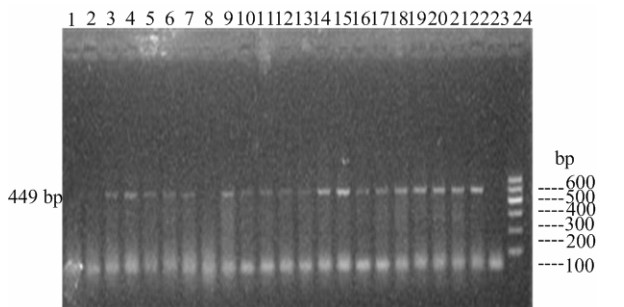
(1/21)、4.8% (1/21)、4.8% (1/21)。没有检测到 β -内酰胺类的 *bla_{SHV}*、*bla_{CTX-M-1}* #、*bla_{CTX-M-2}* #、*bla_{CTX-M-9}* #、*bla_{CYM/LAT}* #、*bla_{CYM/MOX}* # 耐药基因, 磺胺类的 *sul3* 耐药基因, 喹诺酮类的 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qepA* 耐药基因, 四环素类的 *tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG* 耐药基因, 氯霉素类的 *flor* 和 *cmlA* 耐药基因, 以及氨基糖苷类的 *aadA1*、*aadA2*、*aadB*、*aadD*、*aac(3)-*

Ia、*aacC2* 耐药基因 (见表 5)。PCR 检测耐药基因的结果与其耐药表型基本一致,符合率达 88.1%。PCR 扩增结果分别见图 1~图 8。

表 5 21 株沙门氏菌耐药基因的检测结果

Table 5 The carrying situation of antimicrobial resistance genes in 21 *Salmonella* isolates

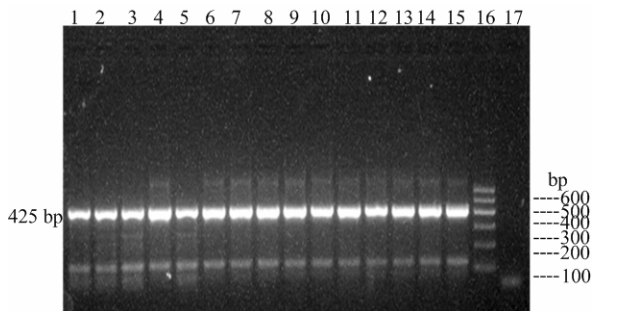
菌株编号 No. of strain	耐药基因 Resistance gene
S1、S17-S21	<i>bla_{PSE}</i>
S2	<i>sul1</i> 、 <i>strA</i>
S3	<i>bla_{PSE}</i> 、 <i>tetB</i> 、 <i>aph3-IIa</i> 、 <i>cat I</i>
S4、S6	<i>bla_{PSE}</i> 、 <i>sul1</i> 、 <i>strA</i> 、 <i>bla_{TEM}</i> 、 <i>sul2</i> 、 <i>tetA</i>
S5	<i>sul1</i> 、 <i>strA</i> 、 <i>bla_{TEM}</i> 、 <i>sul2</i> 、 <i>tetA</i>
S7-S10	<i>bla_{PSE}</i> 、 <i>sul1</i> 、 <i>strA</i> 、 <i>bla_{TEM}</i> 、 <i>sul2</i>
S11-S15	<i>bla_{PSE}</i> 、 <i>sul1</i>
S16	<i>sul1</i>



1: S2; 2: S5; 3: S1; 4~5: S3~S4; 6~7: S6~S7; 8: S16; 9~21: S8-S15, S17-S21; 22: *bla_{PSE}* 基因阳性对照 Gene positive control; 23: *bla_{PSE}* 基因阴性对照 Gene negative control; 24: DNA Marker I

图 1 *bla_{PSE}* 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 1 PCR electrophoretogram of *bla_{PSE}* gene



1: S2; 2~14: S4~S16; 15: *sul1* 基因阳性对照 Gene positive control; 16: DNA Marker I; 17: *sul1* 基因阴性对照 Gene negative control

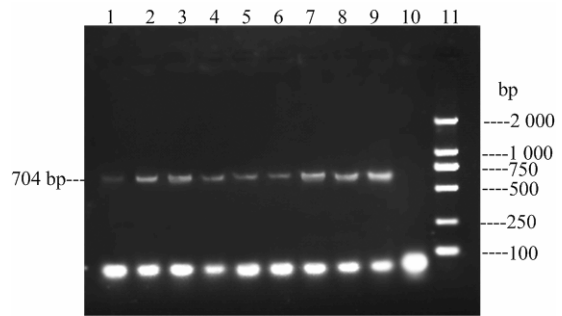
图 2 *sul1* 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 2 PCR electrophoretogram of *sul1* gene

3 讨论

21 株受试沙门氏菌对 21 种抗菌药物的总耐药率为 100%,其中 16 株至少对 2 种以上抗生素耐药,最严重的菌株对 9 种药物耐受结果显示源自合肥地

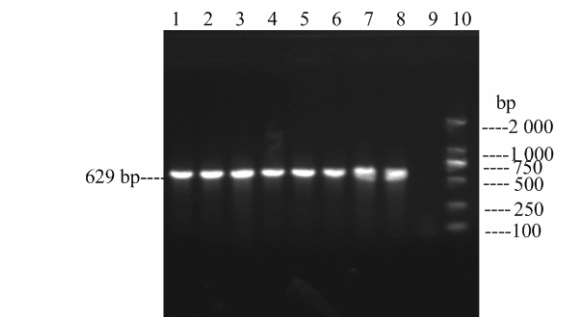
区表观健康鸡的沙门氏菌对抗生素的耐受性已相当严重。受试菌株主要对青霉素、氨苄西林、阿莫西林、链霉素、磺胺类药物产生耐受,且对 β -内酰胺类耐药率最高,这可能与合肥地区养鸡场长期使用 β -内酰胺类药物防治细菌病有关。尽管抗生素的使用在致病菌的控制方面是必要的,但不合理的使用却增加了细菌耐药性的产生与传播的风险。因此,在养殖生产中规范科学使用抗生素十分重要。



1: S2; 2~8: S4~S10; 9: *strA* 基因阳性对照 Gene positive control; 10: *strA* 基因阴性对照 Gene negative control; 11: DNA Marker DL2000

图 3 *strA* 基因扩增电泳图

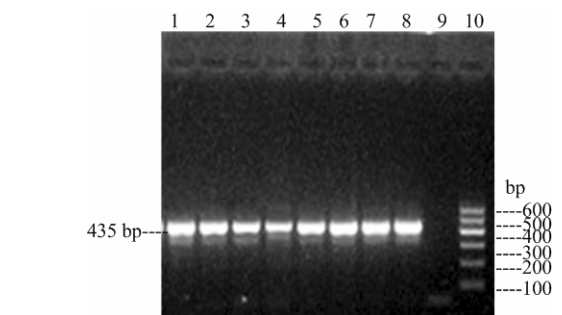
Figure 3 PCR electrophoretogram of *strA* gene



1~7: S4~S10; 8: *bla_{TEM}* 基因阳性对照 Gene positive control; 9: *bla_{TEM}* 基因阴性对照 Gene negative control; 10: DNA Marker DL2000

图 4 *bla_{TEM}* 基因 PCR 扩增电泳图

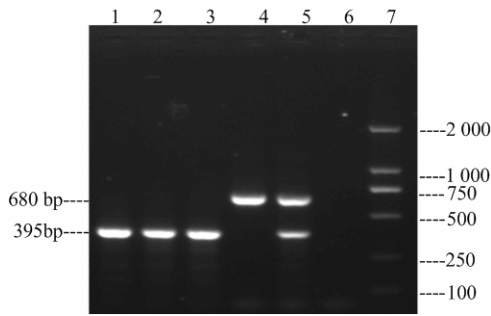
Figure 4 PCR electrophoretogram of *bla_{TEM}* gene



1~7: S4~S10; 8: *sul2* 基因阳性对照 Gene positive control; 9: *sul2* 基因阴性对照 Gene negative control; 10: DNA Marker I

图 5 *sul2* 基因 PCR 扩增电泳图

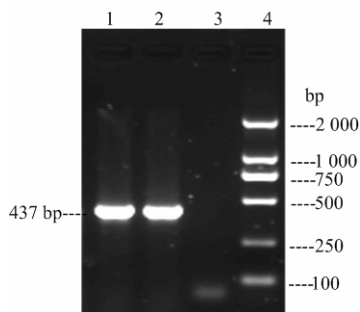
Figure 5 PCR electrophoretogram of *sul2* gene



1: S4; 2: S5; 3: S6; 4: S3; 5: *tetA* 和 *tetB* 基因阳性对照 Gene positive control; 6: *tetA* 基因阴性对照 Gene negative control; 7: DNA Marker DL2000

图 6 *tetA*、*tetB* 基因 PCR 扩增电泳图

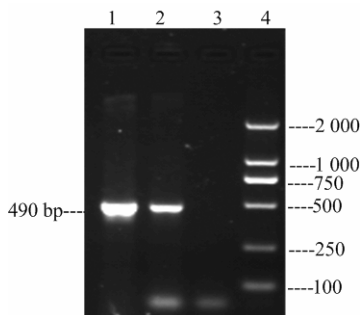
Figure 6 PCR electrophoretogram of *tetA* and *tetB* gene



1: S3; 2: *aph3-IIa* 基因阳性对照 Gene positive control; 3: *aph3-IIa* 基因阴性对照 Gene negative control; 4: DNA Marker DL2000.

图 7 *aph3-IIa* 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 7 PCR electrophoretogram of *aph3-IIa* gene



1: S3; 2: *cat I* 基因阳性对照 Gene positive control; 3: *cat I* 基因阴性对照 Gene negative control; 4: DNA Marker DL2000

图 8 *cat I* 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 8 PCR electrophoretogram of *cat I* gene

21 株受试沙门氏菌耐药表型与耐药基因的检测结果基本一致,其中对 β -内酰胺类的耐药率最高,而在 8 种 β -内酰胺类耐药基因中,以 *bla_{PSE}* 基因检出率最高,达 85.7%。*bla_{PSE}* 基因是抗青霉素羧苄西林的基因,也可导致细菌对氨苄西林、羧苄西林、头孢噻吩、头孢孟多等多种 β -内酰胺类抗生素耐药^[9]。本研究结果表明,源自合肥地区表观健康鸡

的沙门氏菌对 β -内酰胺类抗生素耐药主要是由于携带了 *bla_{PSE}* 基因。*bla_{PSE}* 基因主要存在于铜绿假单胞菌中,但在沙门氏菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌等细菌中也有检出^[10]。在沙门氏菌中, *bla_{PSE}* 基因检出率各不相同,王晓泉等^[11]报道 *bla_{PSE}* 基因在江苏部分地区食源性和人源性沙门氏菌中的检出率为 83.3%; Casin 等^[12]报道 *bla_{PSE}* 基因在人和动物分离的鼠伤寒沙门氏菌中的检出率为 78.0%; de Toro 等^[13]报道 *bla_{PSE}* 基因在 3 家西班牙医院分离的沙门氏菌中的检出率为 45.6%。有研究显示^[14], *bla_{PSE}* 基因序列的突变能引起其编码的 PSE 型酶发生改变,导致产超广谱 β -内酰胺酶菌株的产生,从而引起细菌的耐药谱更加广泛。因此,在合肥地区表观健康鸡的鸡源沙门氏菌中, *bla_{PSE}* 基因的高检出率应引起有关部门的重视。

21 株受试沙门氏菌血清型与基因型的相关性分析显示,ERIC-PCR 基因型与同一血清型的来源有关^[3]。本研究中,分别来自 B 养殖场 1 株、C 养殖场 3 株以及 E 农贸市场 10 株鸡-雏沙门氏菌,血清型相同,基因型和耐药性不同;分别来自 C 养殖场 3 株鸡-雏沙门氏菌、E 农贸市场 3 株纽兰沙门氏菌血清型、基因型、耐药性均相同;而来自 E 农贸市场的 10 株鸡-雏沙门氏菌、2 株明斯特沙门氏菌虽然也具有相同血清型和基因型,但耐药性却不相同。此外,分别来自 B 养殖场的 1 株茨昂威沙门氏菌和 1 株鸡-雏沙门氏菌、C 养殖场的 1 株圣保罗沙门氏菌和 3 株鸡-雏沙门氏菌血清型、基因型、耐药性均不相同。虽然农贸市场是活禽的集散地,商品鸡往往来源于不同的养殖场,但鉴于采样的局限性,采集并分离到来源同一个养鸡场的沙门氏菌是可能的,如分离自 E 农贸市场商品鸡的 3 株纽兰沙门氏菌,具有相同的 ERIC-PCR 基因型 (b)。综上分析表明,源自合肥地区表观健康鸡的沙门氏菌的耐药性与具有相同来源的同一血清型、基因型相关,进一步显示药物选择性压力对沙门氏菌耐药性变化的作用。

参考文献:

- [1] Babu U, Scott M, Myers M J, et al. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 91: 39-44.
- [2] Ribot E M, Wierzbicka R K, Angulo F J, et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, 1995[J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(4): 387-391.
- [3] 刘建军, 张宏海, 方艳红, 等. 合肥地区鸡沙门菌带菌

- 情况调查及其血清型与基因型分析[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 13(7): 582-585.
- [4] 张玮, 李郁, 姚健, 等. 健康猪直肠粪便中沙门菌 I 类整合子与耐药基因的检测[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(7): 594-598.
- [5] Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm D F, et al. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(8): 2872-2874.
- [6] 蔡培泉, 范晓东, 赵寅滢, 等. 肺炎克雷伯菌临床分离株获得性耐药基因检测及指标聚类分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(20): 4194-4197.
- [7] 羊云飞. 多重 PCR 检测沙门氏菌、大肠杆菌对磺胺类、氯霉素类药物耐药基因的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [8] CLSL. M100-S22 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement[S]. Wayne: Clinical Land Laboratory Standards Institute, 2012.
- [9] 李岩, 苏建荣, 许淑珍, 等. 阴沟肠杆菌的 I 类整合子检测及相关耐药基因分析[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(9): 1356-1358.
- [10] 王佩, 李玉珍. β -内酰胺酶-细菌耐药性机制之一[J]. 首都医药, 2000, 7(10): 21-23.
- [11] 王晓泉, 焦新安, 刘晓文, 等. 江苏部分地区食源性和人源沙门氏菌的多重耐药性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 221-227.
- [12] Casin I, Breuil J, Brisabois A, et al. Multidrug-resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome and integron-encoded β -lactamase PSE-1[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999, 179: 1173-82.
- [13] de Toro M, Sáenz Y, Cercenado E, et al. Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals[J]. *International Microbiology*, 2011, 14: 173-181.
- [14] Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, 50(1): 11-18.