

# 肠炎沙门氏菌和哈瓦那沙门氏菌的耐药性及耐药基因分析

武运<sup>1</sup>, 吴浩天<sup>1</sup>, 宋生建<sup>1,2</sup>, 尹明远<sup>1</sup>, 田歌<sup>1</sup>, 马文瑞<sup>1</sup>, 王威<sup>1</sup>, 张亚南<sup>1</sup>, 古丽娜孜<sup>1</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 新疆维吾尔自治区科技项目服务中心, 新疆乌鲁木齐 830011)

**摘要:** 为了保障食品安全, 更好的了解耐药性的产生及传播的途径, 研究了新疆乌鲁木齐市部分农贸市场内检出的 17 株肠炎沙门氏菌和 11 株哈瓦那沙门氏菌的药敏性及相关耐药基因。用琼脂稀释法测定沙门氏菌的药敏性, 用聚合酶链式反应和测定基因序列的方法确定耐药沙门氏菌中与喹诺酮类药物相关的抗性决定区突变基因以及质粒携带的耐药基因。17 株肠炎沙门氏菌对环丙沙星和头孢西丁表现为 100%敏感, 对萘啶酮酸的耐药率为 94.1%, 头孢曲松的耐药率为 17.6%, *qnrB* 检出率为 64.7%, 17 株肠炎沙门氏菌发生 *GyrA* 基因突变, 主要突变类型为 Asp87Tyr; 11 株哈瓦那沙门氏菌对甲氧苄啶、氯霉素、磺胺二甲异唑、磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶、萘啶酮酸、头孢西丁的耐药率为 100%、63.6%、36.4%、18.2%、9.1%和 9.1%, 氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸敏感率为 100%, *qnrB*, *qnrS* 的检出率均为 9.1%, 11 株哈瓦那沙门氏菌 *ParC* 基因突变类型为 Thr57Ser。新疆乌鲁木齐肠炎沙门氏菌和哈瓦那沙门氏菌耐药情况比较严重, 对抗生素的耐药状况应当予以关注, 其喹诺酮类药物耐药决定区突变基因及质粒携带的耐药基因在一定程度上会影响肠炎沙门氏菌和哈瓦那沙门氏菌的耐药机制。

**关键词:** 肠炎沙门氏菌; 哈瓦那沙门氏菌; 耐药性; 耐药基因; 聚合酶链式反应

文章编号: 1673-9078(2017)10-37-44

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.006

## Analysis of Antibiotic Resistance and Related Genes of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella havana*

WU Yun<sup>1</sup>, WU Hao-tian<sup>1</sup>, SONG Sheng-jian<sup>1,2</sup>, YIN Ming-yuan<sup>1</sup>, TIAN Ge<sup>1</sup>, MA Wen-rui<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, ZHANG Ya-nan<sup>1</sup>, GULINAZI<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Pharmaceutical Science, Xinjiang Agricultural University, Ürümqi 830052, China)

(2. Science and Technology Project Service Center of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Ürümqi 830011, China)

**Abstract:** The drug susceptibility and the related resistance genes of 17 strains of *salmonella enteritidis* and 11 strains of *salmonella Havana* had been studied in detection by Xinjiang Urumqi part of the farmer's market, in order to ensure food safety, better understanding the development of drug resistance and the ways to spread. The drug sensitivity of *Salmonella* was evaluated by agar dilution method. In addition, PCR and gene sequencing were used to detect the presence of mutations in the quinolone resistance determining region (QRDR) and plasmid-mediated quinolone resistance genes. The susceptibility rates of these 17 *Salmonella enteritidis* isolates were 100% to ciprofloxacin and cefoxitin, these *Salmonella* isolates were 94.1%, these nalidixic acid and ceftriaxone isolates were 17.6%, and the gene detection rate of *qnrB* was 64.7%, 17 strains of *Salmonella enteritidis* *GyrA* gene mutation, the main mutation type Asp87Tyr; The drug resistance rates of 11 *Salmonella havana* isolates to trimethoprim, chloramphenicol, sulfadimethisoxazol, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, cefoxitin were 100%, 63.6%, 36.4%, 18.2%, 9.1%, 9.1% and the sensitive rate of ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid was 100%, the detection rate of *qnrB*, *qnrS* is 9.1%, gene mutation type of 11 strains of *Salmonella Havana ParC* is Thr57Ser. *Salmonella enteritidis* and *Salmonella havana* drug resistance is serious in Xinjiang Urumqi. There should be concerns about the serious case of resistance to antimicrobial in *Salmonella*. In addition, the quinolone resistance determining region (QRDR) mutations and the plasmid-mediated quinolone resistance genes may affect the antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella havana*.

**Key words:** *Salmonella enteritidis*; *Salmonella havana*; drug resistance; drug resistance gene; polymerase chain reaction (PCR)

收稿日期: 2017-03-05

基金项目: 新疆维吾尔自治区“十三五”重大专项项目“新疆民族特色食品品质分析及技术标准研究”(2016A01001-5)

作者简介: 武运 (1965-), 女, 教授, 研究方向: 食品生物技术

食源性疾病是指由于摄入有毒有害物质（包括生物病原体）等致病因素而引起的疾病。一般可分为中毒性和感染性，包括常见的食物中毒、人畜共患病、肠道传染病、寄生虫病和有毒有害的化学物质所引起的疾病，对人类和动物健康都具有极大威胁<sup>[1]</sup>。在过去的数十年中食物中毒事件的爆发大多与食品中致病菌的存在有关，食源性致病菌污染食物是影响食品安全的主要问题之一，当前，无论在发达国家还是在发展中国家，食源性疾病都尚未得到有效控制<sup>[2,3]</sup>。目前，沙门氏菌是我国最常见的食源性致病菌，也是我国引起食源性疾病的主要病原菌之一。抗生素类药物是人和动物的沙门氏菌性胃肠炎疾病的常规用药，有时为了能够让动物快速生长，会将该类抗生素药物伴随饲料添加到动物食用的食物中，长时间以后，多种血清型沙门氏菌对抗生素药物的敏感性下降，导致多重耐药性沙门氏菌变得越来越常见，因此掌握沙门氏菌的耐药机制对预防与控制沙门氏菌疾病有着重要意义<sup>[4-8]</sup>。

染色体介导的拓扑异构酶的改变和细胞内药物聚积的减少引起沙门氏菌对喹诺酮类药物的耐药，前者由于降低靶位和目标抗生素耐药的亲和力，后者通过孔道蛋白主动外排、缺失引起系统的功能亢进导致细胞内的药物浓度减少，降低耐药性<sup>[9,10]</sup>。抗喹诺酮类药物的沙门氏菌耐药表型在一定程度上影响突变点的检出率。抗生素广泛用于治疗呼吸道感染、泌尿道感染和腹腔感染等疾病，但随着临床应用的增加，沙门氏菌对抗生素耐药性也随之迅速上升。研究表明，染色体介导的主动外排及靶位改变、质粒介导，是沙门氏菌对喹诺酮类药物耐药的主要机制；引起沙门氏菌产生耐药性的主要因素是外排泵、质粒介导以及抗生素作用靶位编码基因突变<sup>[11-14]</sup>。

目前，国内外高度关注食源性沙门氏菌的耐药性及其相关耐药性基因方面的研究，大多数对耐药机理及耐药基因进行研究，但是在国内对这方面的研究起步比较晚，相关研究较少<sup>[15,16]</sup>，有关乌鲁木齐地区肠炎沙门氏菌和哈瓦那沙门氏菌的耐药性、耐药质粒携

带基因及耐药相关突变基因的研究也鲜有报道。

本文主要对新疆乌鲁木齐地区 2013~2014 年采集分离的 17 株肠炎沙门氏菌和 11 株哈瓦那沙门氏菌的耐药现状及相关耐药基因进行分析，由于每种菌株数量相对较少，由 2 种沙门氏菌的耐药现状及耐药基因分析结果共同为保障食品安全提供数据支撑，为乌鲁木齐地区食源性疾病的监管和控制提供科学数据依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

乌鲁木齐市部分农贸市场内 2013~2014 年采集的 1414 份样品中分离的 17 株肠炎沙门氏菌，11 株哈瓦那沙门氏菌；药敏实验质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922、粪肠球菌 ATCC 29212 以及沙门氏菌标准菌株 *Salmonella* Typhimurium LT2，均由西北农林科技大学食品科学与工程微生物实验室保存。

#### 1.1.2 培养基与试剂

三糖铁琼脂、磺酸盐煌绿增菌液、蛋白胨缓冲液、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂培养基、亚硫酸铋琼脂 (BS)、SS 琼脂培养基、四硫氯化铁孔雀绿肉汤增菌液、XLT4 培养基、Luria-Bertani 琼脂，青岛日水生物技术有限公司；LB 肉汤、尿素琼脂、麦康凯琼脂，北京陆桥技术有限责任公司；沙门氏菌显色培养基、MH 琼脂 (MHA) 培养基，青岛海博生物技术有限责任公司；沙门氏菌属 O 多价抗血清 A-F，宁波天润生物药业有限公司；10×Buffer、DL100 DNA、TaqDNA 聚合酶、dNTPmix 和 DL2000 DNA，购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaTa)。

#### 1.1.3 PCR 扩增用引物

由上海捷锐生物工程有限公司使用 Primer Premier5 软件设计聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增用引物 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*GyrA* 和 *ParC* 基因，合成产物见表 1。

表 1 PCR 扩增用引物

Table 1 The primers for PCR amplification

| 目的基因        | 引物             | 序列(5'-3')            | 退火温度/℃ | 条带大小/bp |
|-------------|----------------|----------------------|--------|---------|
| <i>GyrA</i> | <i>GyrA</i> -F | ACGTACTAGGCAATGACTGG | 56     | 190     |
|             | <i>GyrA</i> -R | AGAAGTCGCCGTCGATAGAA |        |         |
| <i>ParC</i> | <i>ParC</i> -F | CTATGCGATGTCAGAGCTGG | 54     | 270     |
|             | <i>ParC</i> -R | TAACAGCAGCTCGGCGTATT |        |         |
| <i>qnrA</i> | <i>qnrA</i> -F | AGAGGATTTCTCACGCCAGG | 60     | 580     |

转下页

接上页

|             |                |                       |    |     |
|-------------|----------------|-----------------------|----|-----|
|             | <i>qnrA</i> -R | TGCCAGGCACAGATCTTGAC  |    |     |
| <i>qnrB</i> | <i>qnrB</i> -F | GGMATHGAAATTCGCCACTG  | 56 | 460 |
|             | <i>qnrB</i> -R | TTTGCGYGYCCAGTCGAA    |    |     |
| <i>qnrS</i> | <i>qnrS</i> -F | GCAAGTTCATTGAACAGGGT  | 57 | 428 |
|             | <i>qnrS</i> -R | TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG |    |     |

### 1.1.4 抗生素

氨苄西林(AMP)、阿莫西林-克拉维酸(AMC)、头孢曲松(CRO)、头孢西丁(CEF)、氯霉素(CHL)、磺胺甲基异恶唑-甲氧苄啶(SXT)、磺胺二甲异唑(FIS)、甲氧苄啶(TIO)、萘啶酮酸(NAL)和环丙沙星(CIP), 购自美国 Sigma 公司。

### 1.1.5 主要仪器与设备

超净工作台, 青岛海尔特特种电器有限公司; 高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 鼓风干燥箱宝康电器设备有限公司; 三用恒温水箱, 常州中捷实验仪器制造有限公司; -30℃低温冰箱、-80℃超低温冰箱, 日本三洋株式会社; 漩涡振荡器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 分析天平, 上海民桥精密科学仪器有限公司; 磁力加热搅拌器, 美国 Fisher 公司; 超纯水器德国 Eppendorf 公司; 高速台式离心机, 上海飞鸽; 隔水式培养箱, 江苏东鹏仪器制造有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 物药敏实验

按照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的琼脂稀释法测定抗生素的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 按照 CLSI 标准判读结果对经分离鉴定的沙门氏菌进行耐药表型确定及耐药性检测<sup>[17]</sup>。使用大肠埃希菌 ATCC25922 和粪肠球菌 ATCC29212 作为药敏测定的质控菌株。

### 1.2.2 PCR 检测相关耐药基因

#### 1.2.2.1 DNA 模板制备

在 LB 平板上用无菌棉签擦拭培养 24 h 适量的新鲜沙门氏菌, 将其均匀洗涤于无菌生理盐水中制成菌悬液麦氏浊度标准为 0.5, 于 1.5 mL 的无菌离心管中放入取菌悬液 800 μL, 100℃左右加热煮沸 10 min,

13200 r/min 离心 5~8 min 后, 小心吸取上清液, 留作备用。

#### 1.2.2.2 PCR 反应

将 25 μL PCR 混合反应体系所需的 13.25 μL 水、0.25 μL 上游引物、0.25 μL 下游引物、1.5 μL MgCl<sub>2</sub>、2.5 μL 10×PCR Buffer、2.0 μL dDTP、0.25 μL 的 Taq 酶和 5 μL DNA 模板依次加入置于冰浴上的无菌 PCR 管中, 13200 r/min 离心 5~8 min 混匀后, 设置 PCR 扩增反应条件为 1 个循环, 94℃预变性 10 min; 35 个循环, 94℃变性 1 min, 60℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min; 最后 72℃延伸 10 min。扩增用引物 DNA 溶解温度的不同会改变退火温度, 扩增过程的退火温度应由不同基因相应的引物序列来确定(表 1)。PCR 产物检测: PCR 扩增之后取出 8 μL 产物, 加入 2 μL 上样缓冲液混匀, 于 1%的琼脂糖凝胶上点样, 100 V 电泳 30 min, 电泳后用凝胶成像系统照相并观察结果<sup>[18]</sup>。

#### 1.2.2.3 DNA 序列确定

扩增得到的 *GyrA* 和 *ParC* 基因产物在低温条件下送至上海桑尼生物科技有限公司, 纯化后测序。

#### 1.2.2.4 *GyrA* 和 *ParC* 基因突变点的确定

采用基因库在线比对软件 BLAST 程序将测定得到的 *GyrA* 和 *ParC* 基因 DNA 序列输入基因库进行对比, 确定标准菌株 *SalmonellaTyphimurium* LT2 的上述 DNA 序列与基因库序列完全吻合后, 分析比对供试菌株相应的 DNA 序列, 确定突变点和相应的氨基酸突变种类。

## 2 结果与讨论

### 2.1 肠炎沙门氏菌耐药及耐药基因分析

#### 2.1.1 肠炎沙门氏菌对供试抗生素的药敏性

表 2 肠炎沙门氏菌耐药检测结果

Table 2 Detection results of drug resistance of *Salmonella enteritidis*

| 抗生素  | 耐药折点 | 耐药数(耐药率/%) | 中介耐药数(中介耐药率/%) | 敏感数(敏感率/%) |
|------|------|------------|----------------|------------|
| 萘啶酮酸 | ≥ 32 | 16 (94.1)  | 0              | 1 (5.9)    |
| 环丙沙星 | ≥ 4  | 0          | 0              | 17 (100)   |
| 头孢西丁 | ≥ 32 | 0          | 0              | 17 (100)   |
| 头孢曲松 | ≥ 64 | 3 (17.6)   | 10 (58.8)      | 4 (23.6)   |

由表 2 可知, 肠炎沙门氏菌对萘啶酮酸的耐药率为 94.1%, 环丙沙星未产生耐药, 表现为 100%敏感; 肠炎沙门氏菌未对头孢西丁产生耐药, 表现为 100%敏感, 对头孢曲松的耐药率为 17.6%, 但对头孢曲松具有较高的中介耐药率, 中介耐药率为 58.8%, 敏感率为 23.6%。

### 2.1.2 肠炎沙门氏菌相关耐药基因检测

表 3 突变基因检测结果

**Table 3 The detection results of mutant gene**

| 检测基因 | 突变位点     | 突变数量 | 突变率/% |
|------|----------|------|-------|
| GyrA | Gly75Phe | 1    | 5.9   |
|      | Asp87Val | 2    | 11.8  |
|      | Asp87Asn | 2    | 11.8  |
|      | Asp87Tyr | 12   | 70.6  |
| ParC | -        | 0    | 0     |

注: 表中, 氨基酸表示的符号意义为: Phe (苯丙氨酸), 缬氨酸 (Val), Asp (天冬氨酸), Tyr (酪氨酸), Gly (甘氨酸), Asn (天冬酰胺)。



图 1 GyrA 基因的 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis map of GyrA gene

注: 泳道 1~22 表示 GyrA 基因扩增产物; 泳道 M 表示 2000 bp DNA Ladder; 泳道 S 表示阳性对照。

17 株肠炎沙门氏菌耐药突变基因检测结果如表 3 所示, 结果表明 17 株肠炎沙门氏菌均为 GyrA 基因突变菌株, 未产生 ParC 基因突变, 其中 GyrA 突变位点检测结果为 Gly75Phe、Asp87Val、Asp87Asn 和 Asp87Tyr 被检出率为 5.9%、11.8%、11.8%和 70.6%。

表 5 哈瓦那沙门氏菌耐药检测结果

Table 5 Detection results of drug resistance of Salmonella havana

| 抗生素                | 耐药折点   | 耐药数(耐药率/%) | 中介耐药数(耐药率/%) | 敏感数(敏感率/%) |
|--------------------|--------|------------|--------------|------------|
| 氨苄西林 (AMP)         | R≥32   | 0          | 0            | 11(100)    |
| 阿莫西林/克拉维酸 (AMC)    | R≥32   | 0          | 0            | 11(100)    |
| 氯霉素 (CHL)          | R≥32   | 7(63.6)    | 4(36.4)      | 0          |
| 甲氧苄啶 (TIO)         | R≥16   | 11(100)    | 0            | 0          |
| 磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶 (SXT) | R≥4/76 | 2(18.2)    | 0            | 9(81.8)    |
| 磺胺二甲异唑 (FIS)       | R≥512  | 4(36.4)    | 0            | 7(63.6)    |
| 萘啶酮酸 (NAL)         | R≥32   | 1(9.1)     | 0            | 10(90.9)   |
| 环丙沙星 (CIP)         | R≥4    | 0          | 3(27.3)      | 8(72.7)    |
| 头孢西丁 (CEF)         | R≥32   | 1(9.1)     | 0            | 10(90.9)   |
| 头孢曲松 (CRO)         | R≥4    | 0          | 2(18.2)      | 9(81.8)    |

图 1 结果显示 GyrA 基因的 DNA 大小为 190 bp。

表 4 耐药相关质粒基因检出结果

Table 4 Detection results of drug resistance related plasmids

| 检测基因 | 检出数量 | 检出率/% |
|------|------|-------|
| qnrA | 0    | 0     |
| qnrB | 11   | 64.7  |
| qnrS | 0    | 0     |

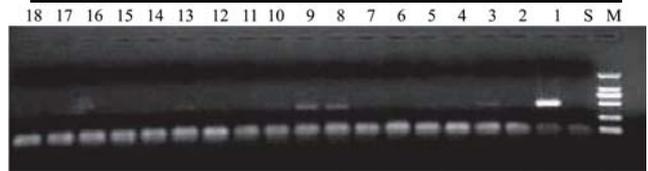


图 2 qnrB 基因的 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis map of qnrB gene

注: 泳道 1~18 表示 qnrB 基因扩增产物; 泳道 M 表示 100 bp DNA Ladder; 泳道 S 表示阳性对照。

由图 2 可知, 通过 PCR 扩增基因产物进行电泳后得 qnrB 基因的 DNA 大小为 469 bp。由表 4 结果可知, 17 株肠炎沙门氏菌中 11 株检测出 qnrB, 检出率为 64.7%, 而 qnrA 和 qnrS 未检出。

## 2.2 哈瓦那沙门氏菌耐药及耐药基因分析

### 2.2.1 哈瓦那沙门氏菌对供试抗生素的药敏性

11 株哈瓦那沙门氏菌耐药结果如表 5 所示, 哈瓦那沙门氏菌对甲氧苄啶、氯霉素、磺胺二甲异唑、磺胺甲基异恶唑-甲氧苄啶、萘啶酮酸和头孢西丁的耐药率为 100%、63.6%、36.4%、18.2%、9.1%和 9.1%; 对青霉素类药物氨苄西林(AMP), 阿莫西林-克拉维酸 (AMC)未产生耐药, 均表现为敏感, 敏感率为 100%; 对喹诺酮类药物环丙沙星的产生中介耐药, 耐药率为 27.3%, 但具有较高的敏感性, 敏感率为 72.7%; 对头孢类药物头孢曲松的中介耐药率为 18.2%, 敏感率为 81.8%。

注：表中“R”表示耐药；“I”表示中介耐药；“S”表示敏感。

## 2.2.2 肠炎沙门氏菌相关耐药基因检测

表 6 突变基因检测结果

**Table 6 The detection results of mutant gene**

| 检测基因        | 检出数量 | 检出率/% |
|-------------|------|-------|
| <i>GyrA</i> | 0    | 0     |
| <i>ParC</i> | 11   | 100   |

表 7 耐药相关质粒基因检出结果

**Table 7 Detection results of drug resistance related plasmids**

| 检测基因        | 检出数量 | 检出率/% |
|-------------|------|-------|
| <i>qnrA</i> | 0    | 0     |
| <i>qnrB</i> | 1    | 9.1   |
| <i>qnrS</i> | 1    | 9.1   |

M S 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

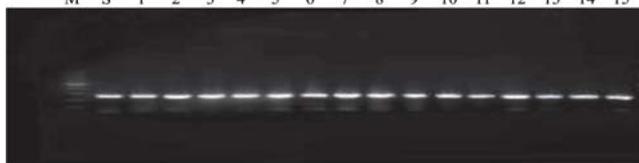


图 3 *ParC* 基因的 PCR 扩增产物电泳图谱

**Fig.3 Electrophoresis map of *ParC* gene**

注：泳道 1~15 表示 *ParC* 基因扩增产物；泳道 M 表示 100 bp DNA Ladder；泳道 S 表示阳性对照。

M S 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



图 4 *qnrS* 基因的 PCR 扩增产物电泳图谱

**Fig.4 Electrophoresis map of *qnrS* gene**

注：泳道 1~16 表示 *qnrS* 基因扩增产物；泳道 M 表示 2000 bp DNA Ladder；泳道 S 表示阳性对照。

突变基因检测结果由表 6 可知，11 株哈瓦那沙门氏菌均为 *ParC* 基因突变菌株，突变率为 100%，未检出 *GyrA* 突变菌株，图 3 结果显示 *ParC* 基因的 DNA 大小为 270 bp。耐药相关质粒基因检测结果由表 7 可知，*qnrB* 和 *qnrS* 菌株分别检出 1 株，检出率为 9.1%，图 2 和 4 为电泳得到的 DNA 大小分别为 469、428 bp 的 *qnrB* 和 *qnrS* 基因。

## 2.3 讨论

沙门氏菌是目前最常见的食源性致病菌，就我国而言，沙门氏菌每年导致我国大约会有 3 亿人因感染而患病，沙门氏菌引起的疾病达到我国食源性疾病总数的 70%~80%<sup>[19]</sup>。因此，为了治疗沙门氏菌性疾病，

大量的抗生素药物开始被使用，这样就使沙门氏菌对许多抗生素药物产生耐药性，从检测结果上来看，17 株肠炎沙门氏菌对萘啶酮酸的耐药率高达 94.1%，对环丙沙星未产生耐药，敏感率为 100%，说明 17 株肠炎沙门氏菌对一代喹诺酮类具有较高的耐药性，对三代喹诺酮类药物未产生耐药，这与林居纯等<sup>[20]</sup>研究的食源沙门氏菌对喹诺酮类药物的耐药结果相符合。研究结果显示 17 株肠炎沙门氏菌对头孢类药物的头孢西丁未产生耐药，敏感率为 100%，对头孢曲松的耐药率较低为 17.6%，但中介耐药率较高为 58.8%，在后期使用头孢曲松抗生素时应当予以关注，减缓头孢曲松药物的耐药性增高。11 株哈瓦那沙门氏菌的耐药情况显示对甲氧苄啶、氯霉素、磺胺二甲异唑、磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶、萘啶酮酸、头孢西丁的耐药率为 100%、63.6%、36.4%、18.2%、9.1%和 9.1%，表明对酰胺醇类药物具有较高的耐药性，此类药物应当在实际的用药过程中予以减少，适当开发新药；对青霉素类药物氨苄西林(AMP)，阿莫西林/克拉维酸(AMC)未产生耐药，均表现为敏感，敏感率为 100%，说明青霉素类药物可以很好地抑制哈瓦那沙门氏菌，应当对此类药物予以关注；对喹诺酮类药物环丙沙星具有较高的敏感性，敏感率为 72.7%，中介耐药率为 27.3%；对头孢类药物头孢曲松的中介耐药率为 18.2%，敏感率为 81.8%。与 Thung T Y, Wouafo M 等人<sup>[21,22]</sup>的研究结果相比较，本研究中哈瓦那沙门氏菌的耐药比例偏高，肠炎沙门氏菌的耐药比例相对较低。本研究中肠炎沙门氏菌对一代喹诺酮类药物具有较高的耐药性高达 94.1%，未对三代喹诺酮类药物产生耐药，对头孢类药物头孢西丁表现为 100%敏感；哈瓦那沙门氏菌对甲氧苄啶表现为 100%耐药，对青霉素类药物氨苄西林(AMP)，阿莫西林/克拉维酸(AMC)未产生耐药，均表现为敏感，敏感率为 100%。沙门氏菌的耐药的产生与地域存在一定的关系，因此本研究的结果与国际上一些学者的研究结果相比存在一定的差异性。17 株肠炎沙门氏菌和 11 株哈瓦那沙门氏菌的耐药结果与杨保伟<sup>[23]</sup>等的研究结果相符合，这为乌鲁木齐监管和防控食源性疾病提供了重要的参考依据。

干扰沙门氏菌 DNA 复制从而具有杀菌作用是喹诺酮类药物的对沙门氏菌的主要作用机制，其作用的靶位点是 DNA 促旋酶和 DNA 解旋酶(拓扑异构酶)，两个靶位点中任何一个靶位受到抑制，沙门氏菌的生长都会受到影响，最终导致死亡。DNA 复制与转录过程中形成的 DNA-促旋酶(*GyrA*)或 DNA-拓扑异构酶 IV(*ParC*)复合物可与通过细菌膜通透屏障后的喹

诺酮类药物相结合,导致酶的结构构象发生改变,从而使DNA-拓扑异构酶IV与DNA分子分离,还能够有效阻止DNA交叉复制进而减缓细菌的生长,最终导致细菌的死亡<sup>[24,25]</sup>。目前已报道与沙门氏菌的喹诺酮类药物耐药性有关的靶基因突变位点有: *GyrA* 的突变包括: 75位 Gly 突变为 Phe、72位 Asp 突变为 Gly、73位 Val 突变为 Ile、82位 Asp 突变为 Asn、83位 Ser 突变为 Ala/Tyr/Phe、98位 Leu 突变为 Val、114位 Met 突变为 Leu、87位 Asp 突变为 Val/Asn/Tyr、121位 Arg 突变为 Cys、131位 Ala 突变为 Gly、139位 Ala 突变为 Ser; *ParC* 的突变包括: 57位 Thr 突变为 Ser、66位 Thr 突变为 Ile、80位 Ser 突变为 Arg<sup>[26]</sup>。本研究中17株肠炎沙门氏菌 *GyrA* 基因突变,突变类型为1株 Gly75Phe、2株 Asp87Val、2株 Asp87Asn、12株 Asp87Tyr,常见的突变类型为 Asp87Tyr,即87位天冬氨酸突变为酪氨酸;11株哈瓦那沙门氏菌均为 *ParC* 基因突变,突变类型均为 Thr57ser,即57位的苏氨酸突变为丝氨酸,这些突变类型符合已有的相关报道,被许多研究者所证明<sup>[27,28]</sup>。本研究中17株 *GyrA* 突变的肠炎沙门氏菌对喹诺酮类药物萘啶酮酸的耐药率高达94.1%,对环丙沙星表现为100%敏感;11株 *ParC* 突变的哈瓦那沙门氏菌对喹诺酮类药物萘啶酮酸的耐药率为9.1%,敏感率90.9%,对环丙沙星未产生耐药,但具有27.3%的中介耐药率和72.7%的敏感率,其造成耐药的原因可能是由于抗生素的过度使用以及多种抗生素的交叉使用,造成沙门氏菌对抗生素的耐药性增加,本试验中肠炎和哈瓦那沙门氏菌对抗生素的耐药率结果与林居纯等的研究结果相符合<sup>[20]</sup>。说明肠炎沙门氏菌和哈瓦那沙门氏菌耐药决定区突变基因 *GyrA* 和 *ParC* 在一定程度上会影响沙门氏菌喹诺酮类药物的耐药机制,具体的耐药机制机理需要进一步研究。

沙门氏菌对喹诺酮类抗生素的质粒介导编码基因主要有 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qepA*、*oqxA*、*oqxB* 和 *acc(6)-Ib-cr*。本研究中沙门氏菌检出的是质粒介导耐药机制中存在五肽重复序列蛋白基因 *qnr*,未检出其他编码基因。*qnr* 是一种质粒介导水平传播的喹诺酮类耐药基因。沙门氏菌对一代喹诺酮的耐药情况与携带耐药基因的相关质粒基因的检出与否存在一定关系<sup>[29-31]</sup>,本研究中17株肠炎沙门氏菌有11株检测出 *qnrB* 基因,对一代喹诺酮类药物萘啶酮酸产生抗性的有16株,耐药率高达94.1%,说明并不是所有的耐药菌株都能检出喹诺酮类耐药基因 *qnr*;11株哈瓦那沙门氏菌 *qnrB*、*qnrS* 检出率均为9.1%,分别检出1株,对一代喹诺酮类药物萘啶酮酸产生耐药的有1株,耐药

率为9.1%。这说明,携带耐药基因的相关质粒在一定程度上可以导致沙门氏菌对一代喹诺酮类药物产生抗性,相关影响机理需要进一步深化研究。

### 3 结论

本研究结果表明,17株肠炎沙门氏菌和11株哈瓦那沙门氏菌对常用抗生素药物的耐药情况较为严重,并且进一步分析了相关耐药基因的情况。研究新疆乌鲁木齐市2种沙门氏菌的药敏性、相关耐药质粒基因及耐药突变基因,有助于保障食品安全,采取合理的干预措施从食物链的源头和动物性食品生产中合理用药,减少和防止沙门氏菌耐药性的产生。同时,也为乌鲁木齐地区更好地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重要依据。

### 参考文献

- [1] Schuchat A, Tappero J, Blandford J. Global health and the US centers for disease control and prevention [J]. *The Lancet*, 2014, 384: 98-101
- [2] 杨保伟,张秀丽,曲东,等.2007-2008 陕西部分零售畜禽肉沙门氏菌血清型和基因型[J].*微生物学报*,2010,50(5):654-660  
YANG Bao-wei, ZHANG Xiu-li, QU Dong, et al. Shaanxi part retail livestock and poultry meat *Salmonella* serotype and genotype in 2007-2008 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(5): 654-660
- [3] Cossu A, Witolowsily R D, Levin R E. Fat removal with hydrolyzed corn starch for real-time qPCR detection of *Salmonella enterica* in ground beef in 4.5 hours without enrichment [J]. *Food Control*, 2014, 46: 475-479
- [4] 杨保伟,盛敏,席美丽,等.食源性沙门氏菌耐药性检测及相关质粒[J].*微生物学报*,2008,48(8):1006-1012  
YANG Bao-wei, SHENG Min, XI Mei-li, et al. Foodborne *Salmonella* resistance testing and related plasmid [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(8): 1006-1012
- [5] 郝宏珊,杨保伟,师俊玲,等.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[J].*微生物学报*,2011,51(10):1413-1420  
HAO Hong-shan, YANG Bao-wei, SHI Jun-ling, et al. Chicken *Salmonella* source of quinolone and fluoroquinolone antibiotic drug resistance situation and related genes [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(10): 1413-1420
- [6] 尹明远,张晓燕,艾乃吐拉,等.2010-2012 年新疆乌鲁木齐地区零售生肉中沙门菌污染情况调查[J].*中国食品卫生志*,2014,26(2):172-175

- YIN Ming-yuan, ZHANG Xiao-yan, Ainaitula, et al. Investigation of *Salmonella* contamination in retail meats in Urumqi, Xinjiang in 2010-2012 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(2): 172-175
- [7] 唐攀,崔恩慧,刘万华,等.鸡源沙门菌 PFGE 分型及耐药性研究[J].动物医学进展,2013,11:1-5
- TANG Pan, CUI En-hui, LIU Wan-hua, et al. Study on PFGE typing and drug resistance of chicken *Salmonella* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 11: 1-5
- [8] Crump J A, Medalla F M, Joyce K W, et al. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: national antimicrobial resistance monitoring system, 1996 to 2007 [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(3): 1148-1154
- [9] 邹立扣,蒲妍君,杨莉,等.四川省猪肉源大肠杆菌和沙门氏菌的分离与耐药性分析[J].食品科学,2012,33(13):202-206
- ZOU Li-kou, PU Yan-jun, YANG Li, et al. Isolation and drug resistance analysis of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in pork from Sichuan Province [J]. Food Science, 2012, 33(13): 202-206
- [10] 刘芳萍,王德宁,李昌文,等.鸡源沙门氏菌耐药性的分析及毒力基因的检测[J].中国兽医科学,2013,12:1236-1239
- LIU Fang-ping, WANG De-ning, LI Chang-wen, et al. Analysis of antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chickens and detection of virulence genes of isolates [J]. Chinese Veterinary Science, 2013, 12: 1236-1239
- [11] 马婧嘉,施春雷,李可,等.沙门氏菌耐药谱及质粒耐药基因的筛查[J].中国食品学报,2014,14(4):184-190
- MA Jing-jia, SHI Chun-lei, LI Ke, et al. *Salmonella* resistant spectrum and plasmid resistance gene screening [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(4): 184-190
- [12] Wang H, Ye K, Wei X, et al. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China [J]. Food Control, 2013, 33(2): 378-384
- [13] 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
- WANG Xiao-quan, JIAO Xin-an, LIU Xiao-wen, et al. Food-borne and anthropogenic *Salmonella* multiple drug resistance study in parts of Jiangsu [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(2): 221-227
- [14] 杨保伟,曲东,申进玲,等.陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因[J].微生物学报,2010,50(6):788-796
- YANG Bao-wei, QU Dong, SHEN Jin-ling, et al. Foodborne *Salmonella* resistance and related genes in Shaanxi [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(6): 788-796
- [15] 杜雄伟,李叶,王晓辉,等.沙门氏菌耐药机制的研究进展[J].江苏农业科学,2010,6(29):487-490
- DU Xiong-wei, LI Ye, WANG Xiao-hui, et al. Research progress of *Salmonella* resistance mechanisms [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010, 6(29): 487-490
- [16] Yan H, Li L, Jahangir M A, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143(3): 230-234
- [17] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA 2010
- [18] 朱冬梅,彭珍,刘书亮,等.肉鸡屠宰加工过程中沙门氏菌的污染情况及其耐药性分析[J].食品科学,2014,35(17):214-219
- ZHU Dong-mei, PENG Zhen, LIU Shu-liang, et al. Contamination and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* spp. from broiler slaughter and processing chain [J]. Food Science, 2014, 35(17): 214-219
- [19] Yin M, Yang B, Wu Y, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica*, serovar in retail meats in market place in Uighur, Xinjiang, China[J]. Food Control, 2016, 64 (6): 165-172
- [20] 林居纯,覃春红,赖婧,等.食品动物源沙门氏菌质粒介导喹诺酮类耐药基因的检测与分析[J].畜牧兽医学报,2012, 43(5):803-809
- LIN Ju-chun, TAN Chun-hong, LAI Jing, et al. Detection and analysis of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Salmonella* isolates from food animals [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2012, 43(5): 803-809
- [21] Thung T Y, Mahyudin N A, Basri D F, et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia [J]. Poultry Science, 2016, 95(8): 1888-1893
- [22] Wouafo M, Nzouankeu A, Kinack J A, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes in chickens from retail markets in Yaounde (Cameroon) [J]. Microbial Drug Resistance, 2010, 16(2): 171-176
- [23] 杨保伟,申进玲,席美丽,等.2007-2008年西安地区鸡肉源沙门氏菌相关特性分析[J].食品科学,2011,32(19):130-136
- YANG Bao-wei, SHEN Jin-ling, XI Mei-li, et al.

- Antibacterial susceptibility and subtypes of *Salmonella* isolates from retail chicken in Xi'an in 2007-2008 [J]. Food Science, 2011, 32(19): 130-136
- [24] Dallal M M S, Doyle M P, Rezadehbashi M, et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran [J]. Food Control, 2010, 21(4): 388-392
- [25] Jin H, Ji H K, Jong H P, et al. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry [J]. The Veterinary Journal, 2011, 189(3): 306-311
- [26] Eaves D J, Randall L, Gray D T, et al. Prevalence of mutation within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(10): 4012-4015
- [27] 曾振灵,林居纯. 氟喹诺酮类药物耐药性的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2005, 30(1): 11-15  
ZENG Zhen-ling, LIN Ju-chun. Research progress of fluoroquinolone drugs resistance [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science, 2005, 30(1): 11-15
- [28] Corinna K, Sonja F, Anno D J, et al. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(1): 18-22
- [29] 王明华. *qnr* 介导细菌对喹诺酮类耐药机制的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010  
WANG Ming-hua. Research of *qnr* mediated bacteria on quinolone resistance mechanism [D]. Shanghai: Fudan University, 2010
- [30] 吴浩天,武运,尹明远,等. *Salmonella hadar* 对喹诺酮类药物耐药性及其耐药基因分析[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 150-155  
WU Hao-tian, WU Yun, YIN Ming-yuan, et al. Quinolone resistance and related genes in *Salmonella hadar* [J]. Food Science, 2016, 37(17): 150-155
- [31] 刘芳萍,赵玉林,李昌文,等. 鸡源性沙门氏菌耐药基因检测与耐药相关性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(8): 627-630  
LIU Fang-ping, ZHAO Yu-lin, LI Chang-wen, et al. Drug resistance gene detection and the resistance correlation analysis in *Salmonella* isolated from chickens [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(8): 627-630