

# 生鲜食品中沙门氏菌多重耐药性检测与复合型 I 类整合子的分析

周雨蕾, 李晓芳, 侯温甫, 王宏勋, 周敏\*

(武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023)

**摘要:** 该研究采用纸片扩散法对生鲜食品源沙门氏菌分离株进行耐药表型检测, 玻片凝集法测定血清型, MLST 方法分析其序列型。用 PCR 检测结合序列比对, 对多重耐药沙门氏菌携带的 I 类整合子及其基因盒、ISCR1 及其基因盒进行分析。共筛选出 32 株多重耐药菌株, 多重耐药率为 48.48%。多重耐药株中分为 11 种血清型, 优势血清型为 *S. Thompson* (21.88%) 和 *S. Agona* (18.75%), MLST 的序列分型将多重耐药株分为 15 种 ST 型, 优势序列型为 ST26 (21.88%) 和 ST13 (12.50%)。多重耐药菌株中, I 类整合子的检出率为 43.75% (14/32), 其中有 5 株扩出耐药基因盒, 检出率为 35.71% (5/14); 11 株检出 ISCR1 序列, 检出率为 34.38% (11/32), 其中 4 株扩出耐药基因盒, 检出率为 36.36% (4/11); 同时含有这两种遗传元件 (I 型复合整合子) 的菌株共检测出 9 株, 检出率为 28.13% (9/32), 检出的基因盒大多包含 1~2 种耐药基因, 与耐药表型具有较好的相关性。通过 blast 比对, 发现 28 号菌株中的 I 型复合整合子耐药基因盒与沙门氏菌 Nsa217 质粒和肺炎克雷伯菌的 KP15-2-53 质粒具有同源性。生鲜制品中沙门氏菌耐药性相对严重, 且沙门氏菌多重耐药性与携带的 I 型复合整合子之间具有相关性。

**关键词:** 沙门氏菌; 多重耐药; 基因盒; 复合型 I 类整合子

文章编号: 1673-9078(2022)01-73-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0101

## Detection of Multiple Drug Resistance and Complex Class I Integrons in *Salmonella* in Fresh Food

ZHOU Yulei, LI Xiaofang, HOU Wenfu, WANG Hongxun, ZHOU Min\*

(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** *Salmonella* isolates from fresh food were subjected to resistant phenotype testing using the disk diffusion method, serotyping via slide agglutination, and sequence type analysis via the multilocus sequence typing (MLST) method. Class I integrons, ISCR1, and their gene cassettes in multidrug-resistant *Salmonella* were analyzed via PCR and sequence alignment. A total of 32 multidrug-resistant strains were detected, and the multidrug resistance rate among all strains was 48.48%. The multidrug-resistant strains were divided into 11 serotypes, with *S. Thompson* (21.88%) and *S. Agona* (18.75%) being the dominant serotypes. Using the MLST method, the multidrug-resistant strains were divided into 15 sequence types (STs), with the dominant STs being ST26 (21.88%) and ST13 (12.50%). Among the multidrug-resistant strains, the detection rate of class I integrons was 43.75% (14/32), with drug resistance gene cassettes amplified in five isolates (5/14, detection rate: 35.71%); the detection rate of ISCR1 was 34.38%, (11/32), with drug resistance gene cassettes amplified in four isolates (4/11, detection rate: 36.36%). Both genetic elements (complex class I integron and ISCR1) were present in nine strains (9/32, detection rate: 28.13%). The majority of detected gene cassettes contained one or two drug resistance genes, which correlated well with the resistant phenotypes. Through sequence comparison using BLAST, it was found that the resistance gene cassette of the class I integron in Strain No. 28 was homologous to the Nsa217

引文格式:

周雨蕾, 李晓芳, 侯温甫, 等. 生鲜食品中沙门氏菌多重耐药性检测与复合型 I 类整合子的分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 73-80, +288

ZHOU Yulei, LI Xiaofang, HOU Wenfu, et al. Detection of multiple drug resistance and complex class I integrons in *Salmonella* in fresh food [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 73-80, +288

收稿日期: 2021-9-28

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2016YFD0401202)

作者简介: 周雨蕾 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, Email: 1070020280@qq.com

通讯作者: 周敏 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与安全, Email: mzhou268@163.com

plasmid of *Salmonella* and the KP15-2-53 plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. Our results indicate that the drug resistance of *Salmonella* in fresh food products is relatively strong, and that multidrug resistance in *Salmonella* is related to the complex class I integrons harbored by the strains.

**Key words:** *Salmonella*; multi-drug resistance; gene cassette; complex class I integron

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是一种重要的、血清型繁多的食源性致病菌<sup>[1-2]</sup>, 是全球导致食物中毒的最常见的致病病原体之一, 主要污染包括动物源生鲜食品如鸡蛋、鸡肉、畜制品<sup>[3]</sup>及蔬菜。由于不适当的储存、烹调或交叉污染, 沙门氏菌可以在设备表面及某些食品中存活并繁殖达到引起人类疾病的水平<sup>[4]</sup>。每年约 3 亿人次因感染沙门氏菌而患病, 给食品安全和消费者健康带来严重危害<sup>[5,6]</sup>。近年来, 沙门氏菌的耐药性极其严峻, 耐受的抗菌药物也呈现多样化<sup>[7]</sup>, 多重耐药菌株正在源源不断出现。除自身基因突变, 细菌可通过抗生素耐药基因的水平转移从外部获得抗性, 这也是临床耐药菌株产生的重要途径<sup>[3]</sup>。

整合子是一种可移动的 DNA 元件, 包含一个能够整合和表达耐药基因的特异重组系统, 并将耐药基因从一种细菌转移到另一种细菌, 从而导致耐药基因的传播<sup>[8-9]</sup>。I 类整合子是目前最常见且研究最多的整合子<sup>[10]</sup>, 常因嵌入到质粒或者转座子以促进自身在细菌中的扩散<sup>[11]</sup>, 其携带的多种耐药基因盒类型正在不断增加<sup>[12]</sup>。插入序列 (ISs) 是一类最短的可移动元件, 能插入到基因组一个或多个靶位点<sup>[13]</sup>, 并可以转移任何 DNA 片段<sup>[14]</sup>, 其中 ISCR1 常与多种耐药基因相关<sup>[15]</sup>。I 类整合子的 3'保守区 (3'CS) 后连接 ISCR1 及其下游的耐药基因盒形成复合 I 型整合子结构<sup>[16]</sup>, 复合 I 型整合子同时包含有两种遗传元件, 这使其能更容易捕获和传播耐药基因。

此前的研究表明, 复合 I 型整合子阳性分离株对多种抗生素具有显著的耐药性<sup>[17-18]</sup>, 对这一结构的研究非常重要<sup>[19]</sup>, 前期的研究多集中在沙门氏菌临床株, 目前国内外只有少量文献报道食源性沙门氏菌中的复合 I 类整合子。本研究针对 66 株沙门氏菌分离株, 检测其耐药谱、血清型和序列型, 再分析沙门氏菌菌株的复合 I 类整合子和耐药基因盒, 旨在分析复合 I 类整合子在多重耐药菌株中的作用, 为科学指导应用抗生素及沙门氏菌的防控提供数据参考<sup>[20]</sup>。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

菌株: 从湖北武汉和荆州地区各大农贸市场与超市生鲜制品中分离得到的沙门氏菌株共 66 株(禽类来源 51 株、畜类来源 7 株、水产 6 株、其他来源 2 株),

标准质控菌株: 大肠埃希菌 ATCC25922, 大肠杆菌工程菌 DH5 $\alpha$ 。

试剂: 培养基 Luria-Bertani (LB) Agar、Luria-Bertani (LB) Broth、Mueller Hinton Agar (MHA) 和麦康凯琼脂, 北京陆桥技术股份责任公司; DNA 分子标准量 Marker, 博迈德生物技术有限公司; 2 $\times$ Taq Master Mix, 诺唯赞生物技术有限公司; 琼脂糖、GelRed 染料, 上海拜力生物科技有限公司; 抗生素阿莫西林 (Amoxicillin, AML)、氨苄西林 (Ampicillin, AMP)、头孢噻吩 (Cefotaxime, CTX)、头孢呋辛钠 (Cefuroxime sodium, CXM)、氯霉素 (Chloramphenicol, C)、环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP)、萘啶酸 (Nalidixic acid, NA)、诺氟沙星 (Norfloxacin, NOR)、链霉素 (Streptomycin, ST)、庆大霉素 (Gentamicin, CN)、呋喃妥因 (Nitrofurantoin, F)、磺胺复合物 (Sulphonamides compound, S3)、四环素 (Tetracycline, TE) 和沙门氏菌诊断血清 (60 种), 宁波天润生物有限公司; magenten 总 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒, TaKaRa 公司。

### 1.2 仪器与设备

凝胶电泳仪 (DYCP-31DN, BIORAD); 凝胶成像仪 (GelDoc XR+, BIORAD); PCR 仪 (T100, BIORAD)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 药敏检测

按照美国临床实验室标准化协会 (CLSI2016) 推荐的 K-B 纸片法进行 14 种抗生素药敏实验, 以大肠杆菌 ATCC25922 为质控菌株, 结果判定参考 CLSI2016 (表 1), 多重耐药定义为至少对三类抗生素耐药或者中介。

#### 1.3.2 血清型检测

采用玻片凝集法<sup>[21]</sup>进行沙门氏菌血清型分型。

#### 1.3.3 DNA 模板的制备

按照 magenten 总 DNA 提取试剂盒方法提取沙门氏菌总 DNA。

根据收集 0.5~1.0 mL 新鲜制备的菌液, 高速离心后去上清液, 加入 240  $\mu$ L STE、10  $\mu$ L 溶菌酶溶液 (20 mg/mL)、5  $\mu$ L RNA 酶 (100 mg/mL), 37  $^{\circ}$ C 下水浴 10 min; 继续加入 250  $\mu$ L DL 缓冲液、10  $\mu$ L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 移液枪吸打混匀, 65  $^{\circ}$ C 下水浴 30 min; 加入 250  $\mu$ L 无水乙醇, 涡旋混匀 15 s。

表1 抗生素判定标准

Table 1 Standard for antibiotic susceptibility test

| 抗菌药物  |      | 纸片浓度/(μg/片) | 抑菌环直径/mm |        |        | ATCC25922 直径/mm |
|-------|------|-------------|----------|--------|--------|-----------------|
| 中文名称  | 英文简写 |             | 敏感 (S)   | 中介 (I) | 耐药 (R) |                 |
| 阿莫西林  | AML  | 10          | ≥18      | 14~17  | ≤13    | 18~24           |
| 氨苄西林  | AMP  | 10          | ≥17      | 14~16  | ≤13    | 16~22           |
| 头孢噻肟  | CTX  | 30          | ≥23      | 15~22  | ≤14    | 29~35           |
| 头孢呋辛钠 | CXM  | 30          | ≥18      | 15~17  | ≤14    | 20~26           |
| 氯霉素   | C    | 30          | ≥18      | 15~17  | ≤14    | 21~27           |
| 环丙沙星  | CIP  | 5           | ≥21      | 16~20  | ≤15    | 30~40           |
| 萘啶酸   | NA   | 30          | ≥15      | 13~14  | ≤12    | 19~26           |
| 诺氟沙星  | NOR  | 10          | ≥19      | 14~18  | ≤13    | 22~28           |
| 链霉素   | ST   | 10          | ≥17      | 15~16  | ≤14    | 20~25           |
| 庆大霉素  | CN   | 10          | ≥16      | 13~15  | ≤12    | 28~35           |
| 呋喃妥因  | F    | 300         | ≥15      | 12~14  | ≤11    | 12~20           |
| 磺胺复合物 | S3   | 300         | ≥17      | 13~16  | ≤12    | 15~23           |
| 四环素   | TE   | 30          | ≥15      | 12~14  | ≤11    | 18~25           |

表2 I类整合子及 ISCR1 引物信息

Table 2 I integron and ISCR1 primer information

| 移动元件             | 基因              | 引物 (5'→3')                 | 序列大小/bp | Tm/°C | 参考                       |
|------------------|-----------------|----------------------------|---------|-------|--------------------------|
| class I integron | <i>qacEΔ1-F</i> | F: ATCGCAATAGTTGGCGAAGT    | 800     | 54    | 周蓉 <sup>[10]</sup>       |
|                  | <i>Sull-B</i>   | R: GCAAGGCGGAAACCCGCGCC    |         |       |                          |
|                  | <i>intI1</i>    | F: TGTCCACTGGGTTCGTGCCT    | 707     | 56    | The study                |
|                  |                 | R: GCTTCGTGATGCCTGCTTGTT   |         |       |                          |
|                  | <i>5'-CS</i>    | F: GGCATCCAAGCAGCAAG       | Random  | 54.5  | Lévesque <sup>[22]</sup> |
|                  | <i>3'-CS</i>    | R: AAGCAGACTTGACCTGA       |         |       |                          |
| ISCR1            | <i>orf513</i>   | F: CCAACAAGAATTCAACGACCTCC | 586     | 54    | The study                |
|                  |                 | R: CAACCACGTATTCTCGGCATC   |         |       |                          |
|                  | <i>513BF</i>    | F: CGCCGCACTGACTCC         | Random  | 55    | 任焯 <sup>[23]</sup>       |
|                  | <i>qacEΔ1-B</i> | R: CAAGCTTTTGCCATGAAGC     |         |       |                          |

将溶液移至 spin column 管中, 10000 r/min 离心 1 min, 弃滤液; 加入 500 μL GW1 缓冲液, 8000 r/min 离心 1 min, 弃滤液; 继续加入 650 μL GW2 缓冲液, 8000 r/min 离心 1 min, 弃滤液; 12000 r/min 下离心 2 min, 弃收集管, 套上灭菌后的 1.5 mL 离心管, 往 spin column 管中加入 50 μL Buffer AE, 静置 10 min, 12000 r/min 离心 2 min; 回收滤液得到总 DNA, 于 -20 °C 下保存。

### 1.3.4 MLST 分型

根据 PubMLST 数据库 (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>) 推荐的七个管家基因扩增引物和扩增条件, 以多重耐药沙门氏菌总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物送华大基因测序公司双向测序, 将序列上传至 MLST 沙门氏菌数据库中, 与数据库中原有的等位基因型序列进行比对, 得到每个看家基

因的基因型编号, 将其组合后得到对应的序列型 (sequence type, ST)。

### 1.3.5 基因盒扩增

#### 1.3.5.1 引物设计

针对 I 类整合子与 ISCR1 区段, 利用 Primer 5 设计扩增引物, 检测 I 类整合子和 ISCR1 两端的保守区域。含有 I 类整合子与 ISCR1 元件的分离株, 对其基因盒 CS 可变区进行 PCR 扩增, 检测其中的耐药基因。引物序列见表 2。

#### 1.3.5.2 PCR 反应及检测

PCR 反应体系: 0.5 μL 总 DNA 为模板, 前后引物各 0.5 μL, 2×Taq Master Mix DNA 聚合酶 12.5 μL, 用蒸馏水补足至 25 μL。

PCR 反应条件: 预变性 94 °C, 5 min; 变性 94 °C, 时间 30 s; 退火时间 30 s; 延伸 72 °C, 时间 2 min;

最后延伸 5 min。采用含有 superGel 染料的琼脂糖进行 PCR 产物的凝胶电泳,再利用凝胶成像系统检测相应目标基因的扩增条带。

### 1.3.6 基因盒片段的克隆与测序分析

扩增片段的纯化:采用 TaKaRa 普通琼脂糖凝胶(离心柱型)DNA 回收试剂盒 DNA 片段回收,将 PCR 目的产物纯化。将凝胶回收的 PCR 产物与 pMD-19T 载体体外连接,连接体系总体积 10 μL: PCR 纯化产物 4.5 μL, pMD-19T 0.5 μL, Solution I (2×) 5 μL; 在 4 °C 条件下过夜连接。参考文献进行质粒载体的转化<sup>[6]</sup>, 宿主菌为 DH5α, 将培养到对数生长期的菌液送测序公司测序, 利用 NCBI 数据库对序列进行分析, 确定耐药基因盒阵列。

## 2 结果与讨论

### 2.1 药敏检测结果

表 3 66 株沙门氏菌分离株的药敏检测结果

Table 3 Antimicrobial susceptibility test results of 66 *Salmonella*

| 抗生素   | isolates      |               |               |
|-------|---------------|---------------|---------------|
|       | 分离株/%         |               |               |
|       | 敏感            | 中介            | 耐药            |
| 阿莫西林  | 25/66 (37.88) | 0             | 41/66 (62.12) |
| 氨苄西林  | 25/66 (37.88) | 0             | 41/66 (62.12) |
| 头孢吡辛钠 | 53/66 (80.30) | 3/66 (4.55)   | 10/66 (15.15) |
| 头孢噻肟  | 48/66 (72.73) | 2/66 (3.03)   | 6/66 (9.09)   |
| 氯霉素   | 35/66 (53.03) | 2/66 (3.03)   | 29/66 (43.94) |
| 萘啶酸   | 12/66 (18.18) | 9/66 (13.64)  | 45/66 (68.18) |
| 诺氟沙星  | 63/66 (95.45) | 1/66 (1.52)   | 2/66 (3.03)   |
| 环丙沙星  | 63/66 (95.45) | 1/66 (1.52)   | 2/66 (3.03)   |
| 链霉素   | 4/66 (6.06)   | 19/66 (28.79) | 43/66 (65.15) |
| 呋喃妥因  | 65/66 (98.48) | 0             | 1/66 (1.52)   |
| 庆大霉素  | 56/66 (84.85) | 0             | 10/66 (15.15) |
| 磺胺复合物 | 10/66 (15.15) | 2/66 (3.03)   | 54/66 (81.82) |
| 四环素   | 16/66 (24.24) | 1/66 (1.52)   | 49/66 (74.24) |

对 66 株沙门氏菌分离株进行了药敏检测, 结果发现对磺胺复合物耐药率最高 (81.82%), 其次为四环素 (74.24%)、萘啶酸 (68.18%)、链霉素 (65.15%)、阿莫西林 (62.12%)、氨苄西林 (62.12%) 和氯霉素 (43.94%), 沙门氏菌分离株对头孢吡辛钠 (15.15%)、庆大霉素 (15.15%)、头孢噻肟 (9.09%)、环丙沙星 (3.03%) 和诺氟沙星 (3.03%) 的耐药率较低, 仅一株菌 (1.51%) 对呋喃妥因耐药 (表 3)。多重耐药菌株为 32 株, 多重耐药率为 48.48% (表 5), 与印广浩<sup>[25]</sup>从扬州农贸市场分离的猪源沙门氏菌的多重耐药

率 (25%) 相比偏高, 但与廖成水等<sup>[26]</sup>2015 年报道的鸡源沙门氏菌多重耐药率 (96.94%) 相比, 本实验中沙门氏菌分离株多重耐药率较低。

### 2.2 血清型及 MLST 型检测结果

本次分离的 32 株多重耐药菌株分为 11 种不同血清型, 其中 *S. Thompson* 及 *S. Agona* 是优势血清型, 分离率分别为 21.88% 和 18.75%。*S. Takoradi*、*S. Typhimurium*、*S. Kentucky*、*S. Derby* 均占 9.38%, 其它 5 种血清型包含的菌株数均在 2 株及以下 (表 5)。相比其它血清型, 优势血清型 *S. Thompson* 分离株对头孢菌素类、磺胺类抗生素的耐药率达到 100%, 这表明 *S. Thompson* 可能因为较高的耐药性而在本地区成为流行血清型。这个结果与美国、尼日利亚和英国等地区的报道不同, 他们的研究表明肉制品中沙门氏菌分离株最常见的血清型为 *S. Typhimurium*<sup>[27-28]</sup>。

表 4 32 株多重耐药沙门氏菌分离株血清型的分布

Table 4 Distribution of 32 multi-drug resistance *Salmonella* isolates serovars

| 血清型                   | 菌株数/%        | 沙门氏菌分离株样品来源/% |             |
|-----------------------|--------------|---------------|-------------|
|                       |              | 禽类(n=26)      | 畜类(n=6)     |
| <i>S. Thompson</i>    | 7/32 (21.88) | 7/26 (26.92)  | 0           |
| <i>S. Agona</i>       | 6/32 (18.75) | 6/26 (23.08)  | 0           |
| <i>S. Takoradi</i>    | 3/32 (9.38)  | 3/26 (11.54)  | 0           |
| <i>S. Typhimurium</i> | 3/32 (9.38)  | 1/26 (3.85)   | 2/6 (33.33) |
| <i>S. Kentucky</i>    | 3/32 (9.38)  | 3/26 (11.54)  | 0           |
| <i>S. Derby</i>       | 3/32 (9.38)  | 1/26 (3.85)   | 2/6 (33.33) |
| <i>S. Enteritidis</i> | 2/32 (6.25)  | 2/26 (7.69)   | 0           |
| <i>S. London</i>      | 2/32 (6.25)  | 1/26 (3.85)   | 1/6 (16.67) |
| <i>S. Indiana</i>     | 1/32 (3.13)  | 1/26 (3.85)   | 0           |
| <i>S. ParatyphiA</i>  | 1/32 (3.13)  | 0             | 1/6 (16.67) |
| Not detected          | 1/32 (3.13)  | 1/26 (3.85)   | 0           |
| 总计                    | 32 (100)     | 26 (81.25)    | 6 (18.75)   |

32 株沙门氏菌中分为 15 种 ST 型, 其中有 3 株为新的 ST 型(表 5), 其中 ST26 是最主要的序列型(7/32, 21.88%), 其次为 ST13 (4/32, 12.50%), ST541 及 ST314 (9.38%, 3/32)。优势血清型均在禽类来源中检测出, 这说明沙门氏菌血清型可能具有宿主差异性, 不同血清型沙门氏菌有不同的宿主范围。将本次试验 ST 分型结果与血清型结果比较可知, MLST 的 15 种序列型与 11 种血清型结果之间关系密切, 符合率达 31/32 (96.88%), 未对应的为一株血清型未确定的粗糙型沙门氏菌分离株。表明相同血清型基本对应固定的 ST 型<sup>[1]</sup>。

表 5 32 株多重耐药菌株特征及耐药基因盒信息

Table 5 Information of 32 multi-drug resistant strains and gene-cassette

| 菌株编号 | 来源 | 血清型            | ST 型 | 耐药表型                              | 中介表型       | I 类整合子 | CS 区基因盒                   | ISCR1 | ISCR1 区基因盒  |
|------|----|----------------|------|-----------------------------------|------------|--------|---------------------------|-------|---|
| 1    | 麻鸭 | S. Thompson    | 26   | AML.AMP.S3.TE                     | NA         | +      | <i>dfrA12-orfF-aadA2</i>  | +     | /   |
| 2    | 鸡肉 | S. Thompson    | 26   | AML.AMP.S3.TE                     | CXM.NA.ST  | +      | /                         | -     | /   |
| 3    | 鸡肉 | S. Thompson    | 26   | AML.AMP.S3.F                      | CXM.NA     | -      |                           | +     | /   |
| 4    | 麻鸭 | S. Thompson    | 26   | AML.AMP.S3.TE                     | CXM.NA.ST  | +      | /                         | +     | /   |
| 5    | 鸡肉 | S. Thompson    | 26   | AML.AMP.CXM.C.CN.S3.TE            | CTX.ST     | +      | <i>dfr17-aadA5</i>        | +     | /   |
| 6    | 鸡蛋 | S. Thompson    | 26   | AML.AMP.S3.ST                     |            | +      | /                         | +     | /   |
| 7    | 鸡蛋 | S. Thompson    | 26   | AML.AMP.S3.F                      | ST         | +      | /                         | +     | /   |
| 8    | 鸡肉 | S. Agona       | 13   | AML.AMP.ST.S3.TE.                 |            | -      |                           | -     |   |
| 9    | 鸡肉 | S. Agona       | 13   | AML.AMP.ST.S3.TE.                 | NA         | -      |                           | -     |   |
| 10   | 鸡肉 | S. Agona       | 13   | C.NA.ST                           |            | -      |                           | -     |   |
| 11   | 鸡肉 | S. Agona       | 13   | C.NA.S3.ST                        |            | -      |                           | -     |   |
| 12   | 鸡肉 | S. Agona       | New5 | C.NA.ST                           |            | -      |                           | -     |   |
| 13   | 鸡肉 | S. Agona       | New6 | C.NA.ST                           |            | -      |                           | -     |   |
| 14   | 鸡肉 | S. Takoradi    | 541  | C.ST.S3.TE                        |            | -      |                           | -     |   |
| 15   | 鸡肉 | S. Takoradi    | 541  | C.ST.S3.TE.                       | NA         | -      |                           | -     |   |
| 16   | 鸡肉 | S.Takoradi     | 541  | C.ST.S3.                          | TE         | -      |                           | -     |   |
| 17   | 猪肉 | S. Typhimurium | 19   | AML.AMP.C.NA.CN.F.S3.TE           | CIP.NOR.ST | +      | <i>dfrA12-orfF-aadA21</i> | -     |   |
| 18   | 鸡肉 | S. Typhimurium | 1682 | AML.AMP.S3.TE.                    |            |        |                           | -     |   |
| 19   | 牛肉 | S. Typhimurium | new1 | AML.AMP.C.ST.S3.TE                |            | +      | <i>aadA2</i>              | -     |   |
| 20   | 鸡肉 | S. Kentucky    | 314  | C.S3.TE. NA.ST                    |            | +      | /                         | +     | <i>ISCR1-qnrB2-yghA_1-yghA_3-qnrB1-PSF_2-qacEΔ1</i> |
| 21   | 鸡肉 | S. Kentucky    | 314  | C.S3.TE                           | NA.ST      | +      | /                         | +     | <i>ISCR1-qnrB2-yghA_1-PSF_2-qnrB1-yghA_3-qacEΔ1</i> |
| 22   | 鸡肉 | S. Kentucky    | 314  | C.S3.NA.ST                        |            | -      |                           | -     |   |
| 23   | 鸡肉 | S. Derby       | 20   | NA.ST.S3.TE                       |            | -      |                           | -     |   |
| 24   | 猪肉 | S. Derby       | 40   | C.TE.NA.S3                        |            | -      |                           | -     |   |
| 25   | 猪肉 | S. Derby       | 40   | C.TE.NA.ST                        |            | -      |                           | -     |   |
| 26   | 鸭蛋 | S. Enteritidis | 11   | AML.AMP.NA.CN                     |            | +      | /                         | -     |   |
| 27   | 鸡肉 | S. Enteritidis | 11   | AML.AMP.NA.ST.S3                  |            | +      | /                         | -     |   |
| 28   | 猪肉 | S. London      | 155  | AML.AMP.C.ST.S3.TE                | NA         | +      | <i>aacA4C-arr-3-dfr2</i>  | +     | <i>ISCR1-qnrB2-yghA_1-qnrB1-qacEΔ1</i>              |
| 29   | 鸡肉 | S. London      | 155  | AML.AMP.C.S.CN.S3.TE              |            | +      | /                         | +     | <i>ISCR1-qnrB2-yghA_1-PSF_2-qnrB1-yghA_3-qacEΔ1</i> |
| 30   | 麻鸭 | S. Indiana     | 17   | AML.AMP.CXM.C.CIP.NA.NOR.ST.CN.S3 | CTX.TE     | -      |                           | +     | /   |
| 31   | 牛肉 | S. Paratyphi A | 463  | S3.TE                             | NA         | -      |                           | -     |   |
| 32   | 鸡肉 | Not detected   | 463  | AML.AMP.C.NA.TE                   |            | -      |                           | -     |   |

注：“-”代表未检测到整合子及 ISCR1 序列；“+”表示为检测到整合子及 ISCR1 序列；“/”表示检测为空基因盒。AML: 阿莫西林; AMP: 氨苄西林; CXM: 头孢吡辛钠; CTX: 头孢噻肟; C: 氯霉素; NA: 萘啶酸; NOR: 诺氟沙星; CIP: 环丙沙星; ST: 链霉素; CN: 庆大霉素; F: 呋喃妥因; S3: 磺胺复合物; TE: 四环素。中介及耐药表型由表 1 确定, ST 为序列型。

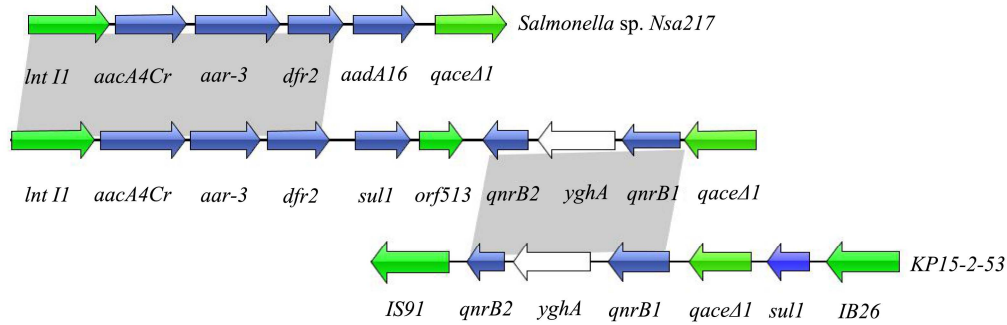


图1 复合整合子侧翼区比较图

Fig.1 Comparison diagram of compound wing area of whole box

注：箭头表示开放阅读框的位置和方向，绿色为转移元件，蓝色表示耐药基因，白色表示未表征蛋白。

### 2.3 复合整合子检测

#### 2.3.1 I类整合子检测

以32株多重耐药沙门氏菌分离株的总DNA作为模板，利用PCR方法扩增I类整合酶基因 *intI1* 和末端消毒剂基因 *qacEΔ1-sul1*。结果发现，在32株沙门氏菌分离株中，有14株扩增到 *intI1* 基因片段和 *qacEΔ1-sul1* 基因片段，检出率为43.75%（表5）。本实验在多重耐药沙门氏菌中I类整合子的检出率和国外 Ahmed 等<sup>[29]</sup>报道的食源性多重耐药沙门氏菌I类整合子的阳性率（57.45%）相当，但明显低于国内杨丹<sup>[30]</sup>报道的藏鸡多重耐药沙门氏菌I类整合子检出率（95.12%），表明整合子在不同区域或不同来源的多重耐药菌株中有差异。

对确定包含I类整合子的菌株进行可变区耐药基因盒的检测。在14株I类整合子阳性菌株中，有9株扩增到150 bp的特异性片段，测序后发现为空基因盒。在另外的5株分离株中，分别扩增到0.9 kb、1.7 kb、1.9 kb、2.2 kb 和 2.3 kb 的特异性片段，检出率为35.71%（5/14）。经克隆、测序和序列分析，发现这5株分别含有五种不同基因盒（表5），其阵列分别为 *aadA2*（0.9 kb, n=1）、*aacA4C-arr-3-dfr2*（1.7 kb, n=1）、*dfrA12-orfF-aadA2*（1.9 kb, n=1）*dfrA12-orfF-aadA21*（2.2 kb, n=1）、*dfr17-aadA5*（2.3 kb, n=1）。其中 *aadA2*、*aadA4C* 和 *aadA21* 是氨基糖苷类抗生素耐药基因，*dfr2*、*dfrA12* 和 *dfr17* 是磺胺类抗生素耐药基因。含有I类整合子的菌株基本表现出相应的耐药性，Meng 等人<sup>[31]</sup>研究也表明I类整合子的存在与沙门氏菌耐药性之间存在一定的相关性。

#### 2.3.2 ISCR 元件检测结果

以32株沙门氏菌分离株的总DNA为模板，利用PCR方法在11株中扩增到ISCR1元件(*orf513*基因)，检出率为34.38%（11/32）。利用 *513BF* 作为上游引物，消毒剂基因 *qacEΔ1* 前端序列做下游引物，通过PCR

检测 ISCR1 元件中的耐药基因盒。结果发现，在11株ISCR1元件阳性菌株中有4株扩增出2700 bp左右的片段，检出率为36.36%（4/11），经克隆、测序和序列分析发现，4个基因盒中有3种基因排列方式：*qnrB2-yghA-1-PSF-2-qnrB1-yghA-3*（n=1）、*qnrB2-yghA-1-yghA-3-qnrB1-PSF-2*（n=2）、*qnrB1-yghA-1-qnrB6*（n=1）。其中 *qnrB1*、*qnrB2* 为喹诺酮类抗生素耐药基因，*PSF-2* 为噬菌体休克蛋白F，*yghA-1* 和 *yghA-3* 为未表征的氧化还原酶基因。本实验中4株菌株的ISCR1耐药基因盒都包含有 *qnrB*，其中3株对萘啶酸（NA）表现为耐药或中介，仅1株对萘啶酸表现为敏感。黄建芳等<sup>[32]</sup>发现ISCR1阳性菌株常与 *qnrA1* 共同传播。Toleman 等人<sup>[33]</sup>研究中报道ISCR1中的耐药基因盒主要包括喹诺酮耐药基因 *qnr* 以及β-内酰胺类耐药基因，且耐药基因盒基因与耐药表型具有较强相关性。

#### 2.3.3 复合整合子菌株的耐药及基因盒同源性分析

同时含有这两种遗传元件（I型复合整合子）的菌株共检测到9株，检出率为28.13%（9/32）。其中，包含I型复合整合子元件且均含有耐药基因盒的只有第28号菌株（表5），其表现出对β-内酰胺类（阿莫西林和氨苄西林）、苯丙醇类（氯霉素）、氨基糖苷类（链霉素）、磺胺复合物和四环素五大类6种抗生素的耐药性，对喹诺酮类（萘啶酸）表现出耐药中介。Cheng 等<sup>[34]</sup>和 Xia 等<sup>[35]</sup>的研究也表明，同时携带I类整合子和ISCR1两种遗传元件的沙门氏菌比携带单一元件的沙门氏菌表现出更强的耐药性。

对28号菌株基因盒和侧翼序列进行同源性分析<sup>[36]</sup>，结果如图1，I类整合子的基因盒 *aacA4C-arr-3-dfr2* 与来自中国某医院临床分离沙门氏菌 Nsa217<sup>[37]</sup>质粒（KR338349）的基因盒相似，在 Nsa217 质粒耐药基因盒的下游还含有一个完整的氨基糖苷类耐药基因 *aadA16*，以及一个消毒剂基因

*qaceA1*, 说明 I 类整合子可能可以介导临床和食品分离株之间的耐药基因的传播。而 ISCR1 基因盒阵列 *qnrB2-yghA\_1-qnrB6* 通过同源性比对, 则与肺炎克雷伯菌 KP15-2-53<sup>[38]</sup>质粒 (MN480461.1) 中一段序列相同, KP15-2-53 质粒基因盒上下游分别有一个 IS91 和 IS26, 说明其具有较强的传播能力, 有利于耐药基因在不同菌株之间进行水平转移。

### 3 结论

本试验中, 66 株生鲜食品来源沙门氏菌分离株对磺胺复合物、四环素、萘啶酸、链霉素、阿莫西林、氨苄西林的耐药率均较高, 且耐 3 种及以上抗生素的菌株占 48.49%, 对 6 种以上抗生素耐药的菌株占 7.58%。32 株多重耐药株中分为 11 种血清型, 优势血清型为 *S. Thompson* 和 *S. Agona*, MLST 的序列分型将多重耐药株分为 15 种 ST 型, 优势序列型为 ST26、ST13。试验中仅携带一种遗传基因元件 (I 类整合子或 ISCR1 元件) 的沙门氏菌中, 对抗生素耐药的类型最多涉及到四类。携带 ISCR1 元件的菌株均表现出对 3 种以上的抗生素的耐药性, 且对阿莫西林、氨苄西林、头孢唑啉、氯霉素、庆大霉素、诺氟沙星、磺胺复合物和四环素的耐药率差异显著。本试验中一株携带 I 型复合整合子的菌株耐药性极强, 对五大类 6 种抗生素表现为耐药, 且耐药基因盒基因与耐药表型表现出较强的相关性, 耐药基因盒与沙门氏菌 Nsa217 质粒和肺炎克雷伯菌的 KP15-2-53 质粒分别具有同源性, 表明其传播能力较强。研究沙门氏菌分离株的特征及其中复合整合子的流行状况, 将有助于阐明耐药基因的传播机制, 对食源性致病菌进行风险评估, 降低或防止食品安全事件的发生。

### 参考文献

- [1] 方婷子.沙门氏菌耐药质粒的筛查与特征分析[D].上海:上海交通大学,2014  
FANG Tingzi. Screening and characterization of antibiotic-resistant plasmids in *Salmonella* [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2014
- [2] 陈玲,张菊梅,杨小鹃,等.沙门氏菌分型研究进展[J].微生物学通报,2016,43(3):648-654  
CHEN Ling, ZHANG Jumei, YANG Xiaojuan, et al. Advances in *Salmonella* subtyping review [J]. Microbiology Bulletin, 2016, 43(3): 648-654
- [3] Mahmoud B S M. *Salmonella* - A dangerous food-borne pathogen [J]. In Tech, 2012
- [4] Finn S, Condell O, McClure P, et al. Mechanisms of survival,

- responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments [J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 331
- [5] World Health Organization. Overcoming Antimicrobial Resistance: World Health Organization Report on Infectious Diseases [M]. Publication Code: WHO/CDC/2000
- [6] 刘思洁,赵薇,孙景昱,等.2014~2015 年吉林省食源性致病菌监测结果分析[J].食品安全质量检测学报,2018,9(4):947-950  
LIU Sijie, ZHAO Wei, SUN Jingyu, et al. Monitoring and analysis for food-borne pathogens in Jilin province during 2014~2015 [J] Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(4): 947-950
- [7] Yang B, Zhao H, Cui S, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* enterica in dried milk-related infant foods in Shaanxi, China [J]. American Dairy Science Association, 2014, 97: 6754-6760
- [8] 殴都-吾吐那生. I 类整合子介导粪肠球菌多重耐药性的研究[D].石河子:石河子大学,2016  
OUDU Wutunasheng. The study on multiple drug resistance of *Enterococcus faecalis* with the mediation of class I integron [D]. Shihezi: Shihezi University, 2016
- [9] Xiaofeng M, Zengfeng Z, Keting L, et al. Antibiotic susceptibility and molecular screening of class I integron in *Salmonella* isolates recovered from retail raw chicken carcasses in China [J]. Microbial Drug Resistance, 2017, 11: 230-235
- [10] 周蓉,李琳,苏健裕,等.食源性沙门氏菌第 I 类整合子检测及其耐药基因盒分析[J].食品工业科技,2014,35(1):279-282  
ZHOU Rong, LI Lin, SU Jianyu, et al. Detection of class I integron from foodborne *Salmonella* and analysis on the drug resistance gene cassettes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(1): 279-282
- [11] 陈雯瑶.基于 IS26 与 I 型整合子的沙门氏菌多药耐药机制 [D].上海:上海交通大学,2014  
CHEN Wenyao. Mechanism of multidrug resistance based on IS26 and class I integrons in *Salmonella* [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2014
- [12] Gonzalez G, Mella S, Zemelman R. Integrons and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials [J]. Revista Medica Chile, 2004, 132: 619-626
- [13] Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 725-774
- [14] 鲁玉侠,郭祀远,石磊.新型耐药基因传播元件:ISCR[J].中国抗生素杂志,2008,12:705-709

- LU Yuxia, GUO Siyuan, SHI Lei. Novel spread element of antibiotic resistance genes: ISCR [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2008, 12: 705-709
- [15] 吴奎海. 临床分离非发酵 G-杆菌 I 类整合子及 ISCR1 的结构研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2011
- WU Kuihai. Study on class I integron and ISCR1 in non-fermenting gram-negative bacilli from clinical specimens [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2011
- [16] Sohn S G, Lee J J, Song J S, et al. Nomenclature of ISCR1 elements capable of mobilizing antibiotic resistance genes present in complex class I integrons [J]. The Journal of Microbiology, 2009, 47(4): 514-516
- [17] Wannaprasat W, P Padungtod, R Chuanchuen. Class I integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans [J]. Int. J. Antimicrob Agents, 2011, 37: 457-461
- [18] P Gisele, Y Agers, F M Aarestrup, et al. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58: 305-309
- [19] 储雯雯, 刘周, 李昕, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 I 类整合子及 ISCR1 与细菌耐药性的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2018, 8: 2386-2389
- CHU Wenwen, LIU Zhou, LI Xin, et al. Correlation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* class I integrons, ISCR1 and drug resistance [J]. Medical Laboratory Science and Clinics, 2018, 8: 2386-2389
- [20] Jong A D, Smet A, Ludwig C, et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from healthy pigs and chickens (2008-2011) [J]. Veterinary Microbiology, 2014, 171(3-4): 298-306
- [21] Jo C, 孙淑滨. 应用协同凝集法鉴定沙门氏菌 O 抗原[D]. 微生物学免疫学译刊, 1985, 1: 59-60
- Jo C, SUN Shubin. Application of collaborative agglutination method to identify *Salmonella* O antigen [J]. Translated Journal of Microbiology and Immunology, 1985, 1: 59-60
- [22] Lévesque C, Piché L, Larose C. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes [J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 1995, 39(1): 185-191
- [23] 任焯. 水环境耐药细菌中 qnr 基因、ISCR1 元件和新型 dfb 基因的研究[D]. 济南: 山东大学, 2013
- REN Ye. Research of qnr gene, ISCR1 element and new dihydrofolate reductase gene in resistance bacteria from aquatic environment [D]. Jinan: Shandong University, 2013
- [24] ED-dra A, Filali F R, Karraouan B, et al. Prevalence, molecular and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from sausages in Meknes, Morocco [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 105: 340-345
- [25] 印广浩. 扬州地区部分屠宰场、农贸市场和动物医院猪源沙门菌分离鉴定、耐药性分析及致病性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2016
- YIN Guanghao. Identification, drug-resistance analysis and the virulence study of *Salmonella* spp. isolated from am slaughterhouse, retail markets and an animal hospital in Yangzhou area [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016
- [26] 廖成水, 程相朝, 张春杰, 等. 鸡源致病性沙门氏菌新近分离株的耐药性与耐药基因[J]. 中国兽医科学, 2011, 7: 751-755
- LIAO Chengshui, CHENG Xiangzhao, ZHANG Chunjie, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes of pathogenic *Salmonella* recently isolated from chicken [J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 7: 751-755
- [27] Agada G O A, Abdullahi I O, Aminu M. Prevalence and antibiotic resistance profile of *Salmonella* isolates from commercial poultry and poultry farm-handlers in Jos, Plateau State, Nigeria [J]. British Microbiology Research Journal, 2014, 4(4): 462-479
- [28] Martelli F, Birch C, Davies R H. Observations on the distribution and control of *Salmonella* in commercial duck hatcheries in the UK [J]. Avian Pathology Journal of the W.v.p.a, 2016, 45(2): 261
- [29] Ahmed A M, Shimamoto T, Shimamoto T. Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 189(189): 39-44
- [30] 杨丹. 四川甘孜州藏鸡沙门氏菌的分离鉴定、耐药基因及可移动遗传元件的检测[D]. 成都: 四川农业大学, 2016
- YANG Dan. Isolation, identification, resistance genes and mobile genetic elements detection of *Salmonella* from Tibetan chicken in Ganzi, Sichuan [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2016
- [31] Meng X, Zhang Z, Li K, et al. Antibiotic susceptibility and molecular screening of class i integron in *Salmonella* isolates recovered from retail raw chicken carcasses in China [J]. Microbial Drug Resistance, 2016, 23(2): 230