

研究报告

鹤鹑源鼠伤寒沙门氏菌的分离鉴定与耐药性分析

吴静一^{#1}, 王聪^{#2}, 李新国², 王海地¹, 焦奥¹, 陈宝昌¹, 董悦欣¹, 陆彦^{*1}

1 北京农学院 动物类国家级实验教学示范中心, 北京 102206

2 中牧实业股份有限公司, 北京 100070

吴静一, 王聪, 李新国, 王海地, 焦奥, 陈宝昌, 董悦欣, 陆彦. 鹤鹑源鼠伤寒沙门氏菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 599-611.

WU Jingyi, WANG Cong, LI Xinguo, WANG Haidi, JIAO Ao, CHEN Baochang, DONG Yuexin, LU Yan. Isolation, identification, and drug resistance analysis of *Salmonella* Typhimurium from quails[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 599-611.

摘要:【背景】在鹤鹑养殖过程中, 抗菌药物和消毒剂的不规范使用加剧了耐药菌株在动物、场所和食品之间的相互传播, 因此, 掌握致病菌株在养殖动物中的耐药状况至关重要。【目的】检测北京周边地区鹤鹑蛋源致病菌株的耐药特征和耐药基因的流行情况。【方法】在天津市武清区部分鹤鹑养殖场采集鹤鹑泄殖腔粪便、鹤鹑蛋表、养殖环境和鹤鹑饮水的样品, 通过细菌分离培养、菌落形态观察、染色镜检、生化鉴定、血清分型、沙门氏菌 *invA* 基因序列测定等方法对分离菌株进行鉴定。同时进行小鼠攻毒试验, 测定小鼠半数致死量(median lethal dose, LD_{50})。再通过药敏试验和 PCR 方法对分离菌的耐药表型、耐药基因及毒力基因进行检测。【结果】分离菌株菌落颜色、镜检形态和生化试验结果符合沙门氏菌特性, 沙门氏菌 *invA* 基因序列测定与鼠伤寒沙门氏菌参考株相似度为 99.44%, 鉴定为鼠伤寒沙门氏菌, 血清型为 1,4,[5],[12]:i:1,2。该菌株对小鼠有致病作用, 小鼠 LD_{50} 为 2.10×10^7 CFU/mL; 药敏试验结果显示该菌株对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢噻唑、链霉素、磺胺甲噁唑、磺胺异噁唑、诺氟沙星、环丙沙星表现耐药, 对头孢唑林等 10 种抗菌药物敏感; 对阳离子表面活性剂和过氧化物类消毒剂的抗性增加; 菌株携带 *bla*_{TEM} 等 4 种耐药基因及 *mogA* 等 13 种毒力基因。【结论】从鹤鹑养殖场分离得到一株致病性鼠伤寒沙门氏菌, 具有多重耐药特性并携带多种毒力基因。试验结果为鹤鹑源沙门氏菌的危害评估和防控措施制定提供了参考。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌; 细菌鉴定; 抗菌药物; 消毒剂; 耐药性

资助项目: 中牧实业股份有限公司农业农村部重点实验室资助项目(2022122)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Key Laboratory Project of Ministry of Agriculture and Rural Affairs for China Animal Husbandry Industry Limited Company (2022122).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: luyan98@163.com

Received: 2023-05-30; Accepted: 2023-09-28; Published online: 2023-11-17

Isolation, identification, and drug resistance analysis of *Salmonella* Typhimurium from quails

WU Jingyi^{#1}, WANG Cong^{#2}, LI Xinguo², WANG Haidi¹, JIAO Ao¹, CHEN Baochang¹, DONG Yuexin¹, LU Yan^{*1}

1 National Experimental Teaching Demonstration Center for Animals, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

2 China Animal Husbandry Industry Limited Company, Beijing 100070, China

Abstract: [Background] The irregular use of antimicrobials and disinfectants in quail breeding has exacerbated the spread of drug-resistant strains between animals, premises, and food. So it is important to understand the drug-resistant status of pathogenic strains of farmed animals. **[Objective]** To detect the drug resistance characteristics and the prevalence of drug resistance genes in the pathogenic strains derived from quail eggs in the quail farms around Beijing. **[Methods]** The samples of quail cloacal feces, quail egg surface, breeding environment, and quail drinking water were collected from some quail farms in Wuqing District, Tianjin. A strain was isolated and identified by colony morphology observation, staining microscopy, and biochemical tests. Serotyping and *invA* sequencing were carried out for this strain. Furthermore, the mouse challenge test was performed to determine the median lethal dose (LD_{50}), and the drug susceptibility test and PCR were employed to detect the drug resistance phenotypes and genes and the virulence genes of the isolates. **[Results]** The colony color, microscopic morphology, and biochemical properties of the isolates were consistent with those of *Salmonella*. The *invA* sequencing results showed that the strain had 99.44% homology with the reference strain of *Salmonella* Typhimurium, and thus it was identified as *S. Typhimurium*, with the serotype being 1,4,[5],[12]:i:1,2. The strain had pathogenic effect on mouse, with the LD_{50} of 2.10×10^7 CFU/mL. It was resistant to ampicillin, amoxicillin/clavulanate, ceftiofur, streptomycin, sulfamethoxazole, sulfafurazole, norfloxacin, and ciprofloxacin and sensitive to ten antibiotics such as cefazolin. The strain presented enhanced resistance to cationic surfactants and peroxide disinfectants. It carried four resistance genes such as *bla*_{TEM} and thirteen virulence genes such as *mogA*. **[Conclusion]** A pathogenic *Salmonella* Typhimurium strain was isolated from a quail farm. It has multi-drug resistance and carries multiple virulence genes. The results provide a reference not only for the hazard assessment but also for the formulation of prevention and control measures of *Salmonella* from quails.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium; bacterial identification; antimicrobial agents; disinfectant; drug resistance

沙门氏菌(*Salmonella*)为革兰氏阴性、兼性厌氧、无芽孢的小杆菌,已发现超过2 600多种血清型,其中绝大部分血清型对动物和人类具有致病性,是重要的人畜共患病原菌^[1]。沙门

氏菌可通过水平和垂直方式进行传播,不仅可以引起不同阶段的鹌鹑发病,还可通过污染环境和蛋表、禽肉等引起人类食物中毒。鼠伤寒沙门氏菌亚种 1,4,5,12:i:-是从人类和动物中感

染发病率最强的血清型之一^[2]。国内对鹌鹑源鼠伤寒沙门氏菌相关的研究报道并不多。为防治沙门氏菌的感染,养殖场常选用阳离子表面活性剂、酚类、季铵盐类等消毒剂和不同种类的抗菌药物来抑制病原体的增殖和传播。然而药物的不合理使用会加快耐药菌株产生,造成鹌鹑养殖场致病菌株的传播难以控制,危害鹌鹑养殖业发展。因此需要加强对鹌鹑源沙门氏菌耐药性和致病性的调研,为合理使用抗菌药物与消毒剂提供指导。

本试验从北京周边地区的鹌鹑养殖场采集样本,进行鼠伤寒沙门氏菌的分离鉴定、药物敏感性试验、耐药基因及毒力基因筛查,旨在为合理使用抗菌药物及消毒剂防控沙门氏菌提供依据,为鹌鹑源食品安全提供保障。

1 材料

1.1 样品及菌株来源

使用灭菌棉拭子采集天津市武清区旧县村鹌鹑养殖场鹌鹑泄殖腔、鹌鹑蛋表、饲养笼具、饮用水源及发病死亡的鹌鹑盲肠样品,低温保存,送实验室检测。阳性对照菌株印第安纳沙门氏菌 357 由山东省肉鸡养殖场鉴定并保存。标准菌株大肠杆菌 ATCC 25922 和鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 购自中国兽医药品监察所。

1.2 主要试剂和仪器

亚硒酸盐胱氨酸(selenite cystine, SC)增菌液、宁波天润 60 种沙门氏菌属诊断血清、Mueller-Hinton (MH)肉汤培养基、三糖铁培养基、枸橼酸盐培养基、科玛嘉沙门氏菌显色培养基购自北京奥博星生物技术有限公司;氨苄西林、头孢唑啉、庆大霉素、四环素、氯霉素、诺氟沙星、环丙沙星和多黏菌素等购自中国兽医药品监察所;DL2000 DNA Marker 购自艾科瑞生物科技有限公司;2×*Taq* PCR Master Mix II

购自天根生化科技有限公司。恒温培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;PCR 仪、Gel Doc 2000 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.3 试验动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明小鼠(Kunming mice, KM) (体重 18–22 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司,获得北京农学院实验动物福利与伦理委员会批准(BUA2023100)。

2 方法

2.1 细菌的分离培养与鉴定

2.1.1 细菌分离培养、革兰氏染色及生化试验

将采集鹌鹑泄殖腔、鹌鹑蛋表、饲养笼具、饮用水源及盲肠样品的灭菌棉拭子置于 SC 增菌液, 37 °C 恒温培养箱培养 18 h。然后划线接种于科玛嘉沙门氏菌显色培养基于 37 °C 恒温培养, 24 h 后观察菌落形态。挑取浅紫红色边缘整齐的单菌落进行革兰氏染色镜检; 同时挑单菌落接种于生化反应管, 37 °C 孵育 24–48 h 后观察试验结果。

2.1.2 血清分型

采用宁波天润 60 种沙门氏菌属诊断血清, 通过玻片凝集法进行血清型鉴定, 设生理盐水为对照。根据 Huffman-White scheme 抗原表检索沙门氏菌血清型。

2.1.3 沙门氏菌 *invA* 基因序列测定

参照 GenBank M90846 鼠伤寒沙门氏菌 *invA* 基因序列设计引物, 上游引物序列为 5'-AGCCGCTCAGTATTGAGGAA-3', 下游引物序列为 5'-GTTGTACCGTGGCATGTCTG-3', 预计扩增片段大小为 582 bp。同时以禽源印第安纳沙门氏菌 357 为阳性对照, 纯水为阴性对照。PCR 反应体系(20 μL): 2×*Taq* PCR Master Mix II 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, DNA

模板 1 μL , ddH₂O 8 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测后将目标条带切胶回收后测序, 将测序结果通过 NCBI 进行相似性比对。

2.2 致病性试验

将分离纯培养并鉴定后的沙门氏菌接种于 MH 肉汤培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 24 h。按平板菌落计数法测定菌液浓度。取 70 只体重在 18–22 g 的 SPF 级 KM 小鼠, 随机分为 7 组, 每组 10 只。按培养菌液原液及 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 倍稀释菌液设置 5 个攻毒试验组, 试验组小鼠腹腔注射 0.5 mL/只, 对照组小鼠腹腔注射无菌生理盐水 0.5 mL/只, 空白组不做处理。接种后隔离饲养, 每日定时观察小鼠精神状态, 记录发病和死亡情况, 无菌剖检死亡小鼠, 对肝、脾等实质器官进行细菌分离。将累积死亡率和剂量对数做相关性分析, 根据累积法公式计算 LD_{50} [3]。

$$r=(m-n)/(a-b)$$

$$\lg LD_{50}=r(50-b)+n$$

式中, a 为大于 50% 的死亡率, m 为其对应的剂量对数, b 为小于 50% 的死亡率, n 为其对应的剂量对数。

2.3 抗菌药物与消毒剂药物敏感性检测

2.3.1 消毒剂稀释液制备

将消毒剂分为六类: 阳离子表面活性剂: 月苄三甲氯铵(benzyltrimethylammonium chloride)和丹尼尔免洗手消毒液(Daniell)、酚类: 滴露(Drip)、含氯消毒剂: 敌特(Dite)、季铵盐类: 新洁尔灭(Benzlkonium)、卤素类: 84 消毒液、过氧化物类: 杜邦卫可(Du Pontvik)。以上 7 种消毒剂用 MH 肉汤培养基按照产品说明书要求比例进行稀释备用。

2.3.2 微量稀释法

对分离的沙门氏菌菌株进行 18 种临床常

用抗菌药物和 7 种消毒剂的 MIC 值的测定, 分别以大肠杆菌 ATCC 25922、沙门氏菌 ATCC 14028 作为抗菌药物与消毒剂药敏试验质控菌株, 结果判定参照 2019 年美国临床实验室标准委员会标准(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI2019) (<https://clsi.org/standards/>)。采用倍比稀释法将消毒剂稀释液和抗菌药物原液分别用 MHB 培养基稀释成 10 个梯度, 每孔 100 μL , 依次加至 96 孔板。用 MHB 培养基将测试菌株原菌液稀释至 0.5 麦氏浊度, 在每排前 10 孔各加入 100 μL 。每种药物做 3 个平行, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h, 观察不同稀释梯度下各孔细菌生长情况, 以抑制细菌生长的药物最高稀释度作为该测试药物最小抑菌浓度(MIC)。

2.4 抗菌药物与消毒剂耐药基因检测

2.4.1 DNA 模板提取

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取鼠伤寒沙门氏菌基因组 DNA, 以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。

2.4.2 引物设计与合成

由生工生物工程(上海)股份有限公司分别合成抗菌药物(表 1)、消毒剂(表 2)相关耐药基因引物 37 种 [4–5], 沙门氏菌毒力基因(表 3)相关引物 13 种 [6]。

2.4.3 耐药基因的 PCR 检测

选取本试验已鉴定菌株, 以禽源印第安纳沙门氏菌 357 为阳性对照、纯水为阴性对照。PCR 反应体系(20 μL): 2 \times Taq PCR Master Mix II 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 8 μL 。 β -内酰胺类、四环素类药物相关耐药基因的 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。氨基糖苷类药物相关耐药基因的 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

表 1 抗菌药物相关耐药基因 PCR 反应引物

Table 1 Primers for PCR reaction of antimicrobial drug-associated resistance genes

Drug classification	Drug resistance gene	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
Fluoroquinolones	<i>qnrA</i>	F: TTCAGCAAGAGGATTTCTCA R: GGCAGCACTATTACTCCCAA	628
	<i>qnrB</i>	F: CCTGAGCGGCACTGAATTTAT R: GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA	409
	<i>qnrS</i>	F: CAATCATACATATCGGCACC R: TCAGGATAAACAACAATACCC	642
	<i>qnrlike</i>	F: AGCCGCTCAGTATTGAGGAA R: GTTGTACCGTGGCATGTCTG	657
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482
β-lactam	<i>bla_{TEM}</i>	F: CAGCGGTAAGATCCTTGAGA R: ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	643
	<i>bla_{NDM-1}</i>	F: CCAGCTCGCACC GAATGT R: GATCAGGCAGCCACCAAAA	475
	<i>bla_{PSE}</i>	F: CGTATAGGTGTTTCCGTTCT R: GATCCGCAATGTTCCATC	571
	<i>bla_{OXA}</i>	F: TCACTTTCAAGATCGCA R: GTGTTAGAGGTGA	591
	<i>bla_{TEM-1}</i>	F: CGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAG R: ATGGGGGATCATGTAACTCGCC	979
	<i>bla_{SHV}</i>	F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC R: GATTTGCTGATTTGCTCGG	796
	<i>bla_{CTX-M}</i>	F: CGTTTTGCGATGTGCAG R: ACCGCGATATCGTTGGT	550
	<i>bla_{VIM-1}</i>	F: AGTGGTGAGTATCCGACAG R: ATGAAAGTGCGTGGAGAC	260
	<i>bla_{VIM-2}</i>	F: ATGTTCAAACTTTTGAGTAAG R: AGCCTGTTCCCATGTAC	801
Aminoglycosides	<i>strA</i>	F: CGACTTCTTACCGGACGAGGAC R: ACAGGTTGCGAAACGTGCCAAT	422
	<i>aadA1</i>	F: TTTGCTGGTTACGGTGAC R: GCTCCATTGCCCAGTCG	497
	<i>aacC2</i>	F: ACCCTACGAGGAGACTCTGAATG R: CCAAGCATCGGCATCTCATA	384
	<i>aacC4</i>	F: ATGACCTTGCGATGCTCTATG R: CGAATGCCTGGCGTGTTT	486
Tetracycline	<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210

(待续)

(续表 1)

Drug classification	Drug resistance gene	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
Chloramphenicol	<i>tetB</i>	F: CAGTGCTGTTGTTGTCATTAA R: GCTTGAATACTGAGTGTTAA	571
	<i>tetC</i>	F: CTTGAGAGCCTTCAACCCAG R: ATGGTCGTCATCTACCTGCC	418
	<i>tetD</i>	F: GCAAACCATTACGGCATTCT R: GATAAGCTGCGCGGTAAAAA	546
	<i>tetG</i>	F: GCTCGGTGGTATCTCTGCTC R: CAAAGCCCCCTTGCTTGTTAC	550
	<i>catA1</i>	F: CATTCACCCGACGCACTTT R: TATCACTTATTCAGGCGTAGCAC	952
	<i>catA2</i>	F: GAACACTTTGCCCTTTATCGTC R: TCCTGCTGAACTTTGCCATCGT	482
	<i>catA3</i>	F: TGATGAGTTGAGAATGGCGATA R: GAGAGCGGCAATAACAGTCTA	358
	<i>catI</i>	F: AACCAGACCGTTTCAGCTGGAT R: CCTGCCACTCATCGCAGTA	550
	<i>floR</i>	F: TCCTGAACACGACGCCCCGCTAT R: TCACCGCCAATGTCCCGACGAT	962
	<i>mcr-1</i>	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTC R: CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309

表 2 消毒剂耐药基因检测引物

Table 2 Primers for detection of disinfectant resistance genes

Gene	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
<i>qacA/B</i>	F: TCCTTTTAATGCTGGCTTATACC R: AGCCATACCTGCTCCAACTA	220
<i>qacEΔ1</i>	F: TAGCGAGGGCTTTACTAAGC R: ATTCAGAATGCCGAACACCG	300
<i>qacJ</i>	F: CTTATATTTAGTAATAGCG R: GATCCAAAAACGTTAAGA	239
<i>qacC</i>	F: GGCTTTTCAAAATTTATACCATCCT R: ATGCGATGTTCCGAAAATGT	249
<i>intI1</i>	F: ACGAGCGCAAGGTTTGGT R: GAAAGGTCTGGTCATACATG	565
<i>qacG</i>	F: CAACAGAAATAATCGGAACT R: TACATTTAAGAGCACTACA	275
<i>tehA</i>	F: ATGCAGAGCGATAAAGTGCTC R: TGGACTGTATCTGCCGACAG	436
<i>merA</i>	F: GACCAGCCGCAGTTCGTCTA R: GCAGCASGAAAGCTGCTTCA	462

表 3 毒力基因检测引物

Table 3 Primers for virulence gene detection

Virulence gene species	Gene	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
Virulence related genes	<i>mogA</i>	F: ATTGGCTTAGTTTCTATCTCCG R: CCTTCCAGCGTTTCTTTGA	419
	<i>sseL</i>	F: GCCCCTTCCAGATTACTTTATATG R: TGCTTAATATATTTTCTTTGGTGG	268
	<i>mgtC</i>	F: CGACGATCATTATTCTTTGC R: GACCGAACCTAACCCCTGT	200
	<i>araB</i>	F: AGGTAGACGTGCCGATGACTT R: CGAATGCGATGTTTGTGCT	588
	<i>invA</i>	F: GTGAAATTATGGCCACGTTGGGCAA R: TCATCGCACCGTCAAGGAACC	284
	<i>bcfA</i>	F: CTTTGGCGGAATGTTGTC R: CTGGCTGGTCTGAGTATCG	235
Plasmid virulence genes	<i>spvA</i>	F: GCTAACTGTCGGGCAAAG R: GGACAATGGCACGAACCT	432
	<i>spvB</i>	F: CCTGATGTTCCACCACTTTC R: ATGCCTTATCTGGCGATGT	590
	<i>spvC</i>	F: AAGGTCGTTCAACAAGCC R: CATTTCAACCACCATCACG	252
	<i>spvD</i>	F: CCCCTGATGATGAGAAGT R: ACAGTGGGATTAGACAGC	316
Enterotoxin	<i>stn</i>	F: CAACCAGATAGTAAAGACCG R: ATTAGCGTAGAGGCAAAAGA	234
Flagellum	<i>fliC</i>	F: CTCTTCCGGTCTGCGTATC R: CCAAGACCATTAGCCGAG	537
Pili	<i>fimA</i>	F: AGACCGCCAGCAAATTAGTGT R: TGACCTCTACTATTGCGAGTCTG	321

氯霉素类药物相关耐药基因的 PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 59 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。消毒剂相关抗性基因的 PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测分析。

2.5 毒力基因检测

取本试验已鉴定菌株, 以禽源印第安纳沙门氏菌 357 为阳性对照、纯水为阴性对照。PCR 反应体系(50 μL): 2×Rapid Taq Master Mix 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, DNA 模板 1 μL,

ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, 33 个循环; 72 °C 5 min, 用 1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

3 结果与分析

3.1 菌株的分离培养与鉴定结果

3.1.1 细菌分离培养及革兰氏染色结果

取经 SC 增菌后的样本划线培养接种沙门氏菌显色培养基, 结果可以看到浅紫色小菌落。革兰氏染色镜检结果为革兰氏阴性小短杆菌, 如图 1 所示。

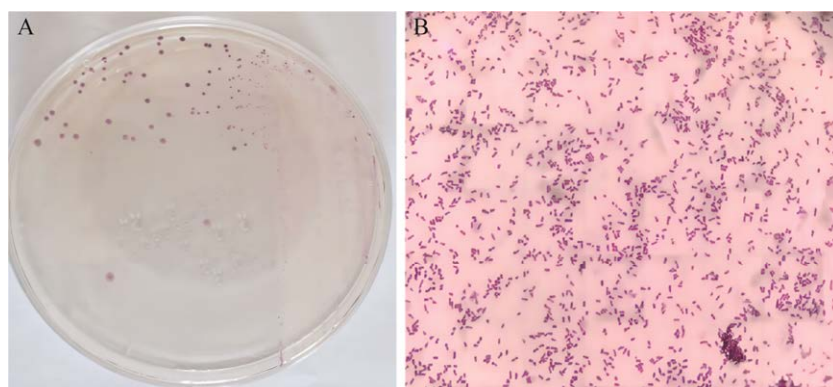


图1 菌落形态及革兰氏染色结果 A: 沙门氏菌显色培养基. B: 革兰氏染色镜检(100×)

Figure 1 Colony morphology and Gram staining results. A: *Salmonella* chromogenic medium. B: Gram staining microscopy (100×).

3.1.2 菌株的生化培养特性

将分离菌接种各种生化反应管,结果该菌株能发酵葡萄糖和甘露醇,不发酵乳糖和蔗糖;MR 试验、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶等试验阳性;吲哚试验、V-P 试验、精氨酸双水解酶等试验均为阴性;三糖铁试验斜面产酸,底层产碱,产气符合沙门氏菌生化特征。结合细菌形态观察和生化鉴定结果初步判定分离菌为沙门氏菌。

3.1.3 血清型鉴定结果

采用宁波天润 60 种沙门氏菌属诊断血清,通过玻片凝集法对沙门氏菌进行的凝集试验结果呈阳性,根据 Huffman-White scheme 抗原表检索试验菌株血清型为 1,4,[5],[12]:i:l,2,符合鼠伤寒沙门氏菌血清型。

3.1.4 沙门氏菌 *invA* 基因序列测定结果

invA 基因序列测定结果显示,分离菌株在属水平上鉴定为沙门氏菌,目的片段为 582 bp,见图 2。将测序结果通过 NCBI 进行同源性比对,分离菌株 *invA* 基因序列测定与鼠伤寒沙门氏菌参考株 *invA* 基因相似度为 99.44%,结合血清学鉴定结果判定分离菌株为鼠伤寒沙门氏菌。

3.2 致病性试验结果

实验组 KM 小鼠接种鼠伤寒沙门氏菌后 24 h 内出现死亡,表现为精神沉郁、被毛松乱、食欲下降、眼角有分泌物、腹泻、肛周粪染。剖检可见肝脏淤血出血,胃内膨胀鼓气,肠道严重水肿并伴有出血症状。从肝、脾等实质器官可分离出沙门氏菌,经生化和血清学鉴定与接种的鹤鹑源沙门氏菌一致。对照组未表现任何异常症状,剖检无肉眼可见病理变化。平板培养计数菌液浓度为 5.6×10^8 CFU/mL,对 KM 小鼠的 LD_{50} 为 2.10×10^7 CFU/mL (表 4)。累积

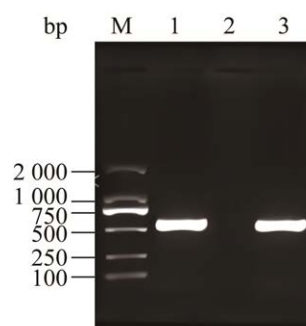


图2 沙门氏菌 *invA* 基因序列测定结果 M: DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: *invA* 基因
Figure 2 *invA* gene sequence of *Salmonella*. M: DNA Marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3: *invA* gene.

死亡率和剂量对数做相关性分析得到回归方程 $Y=-122.343+23.820X$, 相关系数 $R=0.966$ 。

3.3 抗菌药物和消毒剂的耐药性试验结果

分离菌对 18 种抗菌药物敏感性试验结果见表 5。MIC 试验判定结果分别以敏感(S)和耐药(R)两种形式记录。由表 5 可知, 鼠伤寒沙门

氏菌株对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢噻呋、链霉素、磺胺甲噁唑、磺胺异噁唑、诺氟沙星、环丙沙星 8 种抗菌药物耐药。

分离菌株对消毒剂药物敏感性试验结果见表 6。由表 6 可知, 鼠伤寒沙门氏菌的最高 MIC 为 125.00 $\mu\text{g/mL}$, 最低 MIC 为 2.34 $\mu\text{g/mL}$ 。其中

表 4 累积法计算鼠伤寒沙门氏菌感染 KM 小鼠 48 h LD_{50}

Table 4 Cumulative method to calculate LD_{50} of KM mouse infected with *Salmonella* Typhimurium at 48 h

Dose (CFU/mL)	Logarithmic dose (CFU/mL)	Test animal numbers	Dead numbers	Alive numbers	Total dead numbers	Total alive numbers	Percent mortality (%)
5.6×10^8	8.75	10	8	2	18	2	90.00
5.6×10^7	7.75	10	6	4	10	6	62.50
5.6×10^6	6.75	10	3	7	4	13	23.50
5.6×10^5	5.75	10	1	9	1	22	4.30
5.6×10^4	4.75	10	0	10	0	32	0
Normal saline	—	10	0	10	0	—	—
Control group	—	10	0	10	0	—	—

—: No data.

表 5 沙门氏菌对 18 种抗菌药物敏感性试验结果

Table 5 Test results of *Salmonella* susceptibility to 18 antibacterial agents

Drug classification	Medicines vocabularies	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	Break point ($\mu\text{g/mL}$)	Result
Penicillin	Ampicillin	64	0.50–512.00	≥ 32	R
	Amoxicillin/Clavulanate	16	0.50–256.00	≥ 16	R
Cephalosporin	Ceftiofur	8	0.13–64.00	≥ 1	R
	Cephazolin	16	0.50–256.00	≥ 32	S
Chloramphenicol	Chloramphenicol	0.5	0.25–128.00	≥ 32	S
	Florfenicol	1	0.50–256.00	≥ 4	S
Macrolide	Azithromycin	0.25	0.25–128.00	≥ 32	S
Aminoglycosides	Gentamycin	0.50	0.25–128.00	≥ 16	S
	Amikacin	2	0.25–128.00	≥ 64	S
	Streptomycin	16	0.50–256.00	≥ 16	R
	Kanamycin	2	0.50–256.00	≥ 16	S
Tetracycline	Doxycycline	2	2.00–64.00	≥ 16	S
	Tetracycline hydrochloride	2	1.00–1 024.00	≥ 16	S
Sulfamido	Sulfamethoxazole	512	1.00–1 024.00	≥ 512	R
	Sulfaisodazole	1 024	1.00–1 024.00	≥ 512	R
Quinolone	Norfloxacin	2	0.06–64.00	≥ 0.06	R
	Ciprofloxacin	2	0.01–8.00	≥ 1	R
Polymyxin	Colistin sulfate	1.35	0.16–86.52	≥ 16	S

S: 敏感; R: 耐药

S: Sensitive; R: Resistance.

表 6 沙门氏菌对消毒剂药物敏感性试验结果

Table 6 Test results of *Salmonella* susceptibility to disinfectants ($\mu\text{g/mL}$)

Disinfectant name	ATCC 14028	<i>S. Typhimurium</i>
Benzyltrimethylammonium chloride (10%)	1.95	62.50
AnLixiao (10%)	12.50	6.25
Daniel (0.45%)	3.90	125.00
Drip (5%)	31.25	31.25
Dite (1%)	62.50	62.50
Benzlkonium (25%)	4.69	2.34
Du pontvik (1%)	≤ 0.50	100.00
84 (1%)	< 200	< 200

对月苳三甲氯铵的 MIC 值上升到 $62.50 \mu\text{g/mL}$, 对安立消的 MIC 值下降为 $6.25 \mu\text{g/mL}$, 对丹尼尔上升到 $125 \mu\text{g/mL}$, 对新洁尔灭的 MIC 值下降为 $2.34 \mu\text{g/mL}$, 对杜邦卫可的 MIC 值上升为 $100 \mu\text{g/mL}$, 对 84 消毒液的抗性无明显变化。本试验结果表明, 鼠伤寒沙门氏菌对月苳三甲氯铵溶液、丹尼尔、杜邦卫可的抗性增加, 在临床上使用此类消毒药要相应增加浓度才能取得较好的消毒效果。

3.4 耐药基因的 PCR 扩增结果

本试验分离菌株对 18 种抗菌药物及六类消毒剂的耐药基因结果显示, 该菌株携带 *bla*_{TEM}、*tetC*、*qacA/B* 和 *strA* 耐药基因, 扩增目的片段大小分别为 643、418、220 和 422 bp, 未检出其他相关耐药基因, 结果见图 3。

3.5 毒力基因检测结果

由图 4 可知, 本试验分离的鼠伤寒沙门氏菌携带 *mogA*、*mgtC*、*araB*、*invA*、*bcfA*、*spvA*、*spvB*、*spvD*、*stn*、*fliC*、*flimA*、*sseL* 和 *spvC* 共 13 种相关毒力基因, 目的片段大小分别为 419、200、588、284、235、432、590、316、234、537、321、268 和 252 bp。

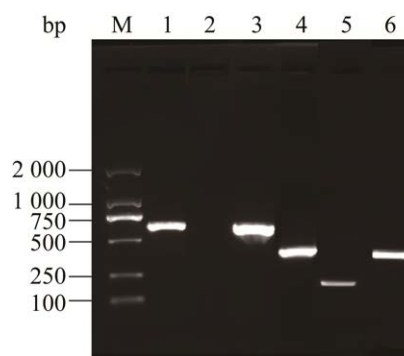


图 3 部分耐药基因阳性菌株的 PCR 扩增产物电泳结果 M: DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: *bla*_{TEM} 基因试验菌株; 4: *tetC* 基因试验菌株; 5: *qacA/B* 基因试验菌株; 6: *strA* 基因试验菌株

Figure 3 Electrophoretic results of PCR amplification products of some drug-resistant gene-positive strains. M: DNA Marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3: *bla*_{TEM} gene test strain; 4: *tetC* gene test strain; 5: *qacA/B* gene test strain; 6: *strA* gene test strain.



图 4 鹤鹑源鼠伤寒沙门氏菌毒力基因扩增结果 M: DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3-15: 分别为 *mogA*、*mgtC*、*araB*、*invA*、*bcfA*、*spvA*、*spvB*、*spvD*、*stn*、*fliC*、*flimA*、*sseL* 和 *spvC* 基因

Figure 4 Results of virulence gene amplification of *Salmonella Typhimurium* derived from quails. M: DNA Marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3-15: *mogA*, *mgtC*, *araB*, *invA*, *bcfA*, *spvA*, *spvB*, *spvD*, *stn*, *fliC*, *flimA*, *sseL* and *spvC* genes, respectively.

4 讨论与结论

人畜共患的鼠伤寒沙门氏菌近年来在国内外报道的多重耐药问题比较严重。2012 年以来意大利分离的鼠伤寒沙门氏菌株 60% 为多重耐药菌株^[7]。姚素霞等^[8]在山西省食源性疾病监测中发现鼠伤寒沙门氏菌占比 34.31%，对环丙沙星、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、氯霉素、庆大霉素的耐药率高于肠炎沙门氏菌。本试验从鹤鹑源分离的鼠伤寒沙门氏菌表现出多重耐药特征，对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢噻吩、链霉素、磺胺甲噁唑、磺胺异噁唑、诺氟沙星、环丙沙星耐药。我们前期调查结果表明，国内动物源沙门氏菌的多重耐药率已达 67%，部分血清型沙门氏菌株可耐受 17 种抗菌药物^[9]，因此对人畜共患沙门氏菌的耐药情况调查及防控尤为重要。

沙门氏菌对 β -内酰胺类抗生素的主要耐药机制由 β -内酰胺酶介导，通过水解大多数青霉素类、头孢菌素类和单环 β -内酰胺类抗生素的活性基团，使沙门氏菌对 β -内酰胺类抗生素产生耐药性^[10]。本试验鼠伤寒沙门氏菌分离株以 *bla*_{TEM} 和 *tetC* 耐药基因检出为主，与靳浩展等^[11]研究报道屠宰场沙门氏菌 β -内酰胺类耐药基因 *bla*_{TEM} 检出情况一致。Tian 等^[12]研究显示 44 株大肠杆菌中四环素类耐药基因检出率最高的是 *tetC*，与本试验结果相符，但与侯雪娇等^[13]食源性沙门氏菌的主要检出类型 *tetA* 不一致。原因可能是当地鹤鹑养殖场对 β -内酰胺类和四环素类抗生素的长期不规范使用，筛选出 *bla*_{TEM} 和 *tetC* 耐药基因在菌株间传播并导致菌株对相关药物的耐受。四环素类抗菌药物的耐药机制是以 *tetC* 基因介导的主动外排为主，本试验检出四环素类耐药基因 *tetC*，但菌株却未对四环素类抗生素产生耐药，这种情况与 Kariuki 等^[14]

发现不耐药的菌株携带耐药基因的现象一致。

Long 等^[15]研究表明，鸡蛋生产链中沙门氏菌对苯扎氯铵、苯扎溴铵和氯化十六烷基吡啶有较高水平的耐药性，且鼠伤寒沙门氏菌对季铵盐类消毒剂的抗性比其他血清型更强。本试验分离的鹤鹑源鼠伤寒沙门氏菌对月苳三甲氯铵溶液、丹尼尔、杜邦卫可表现出抗性增加，可能与菌株携带主动外排泵基因 *qacA/B* 相关。鼠伤寒沙门氏菌在与消毒剂相互作用过程中可通过生物膜降低细菌膜表面的消毒剂浓度。能够促进消毒剂外排的有 MFS 家族，该外排泵包括 LmrS、MdeA、MdrL、NorA、NorB、QacA 和 QacB，其中由质粒介导的消毒剂抗性基因 *qacA/B* 编码的外排泵蛋白可排出双胍类和季铵盐类消毒剂^[16]。李双等^[17]在西安地区的调查结果显示携带有消毒剂抗性基因 *qacA/B* 的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)达 7.2%；Miyazaki 等^[18]在 74 例 MRSA 携带消毒药抗性基因调查中发现 80% 的菌株存在 *qacA/B* 基因；Yang 等^[19]研究显示鼠伤寒沙门氏菌对苯扎氯铵和三氯生具有 AcrAB-TolC 外排泵的外排作用，且部分细菌的抗生素与消毒剂抗性之间存在相关性。将铜绿假单胞菌暴露于高浓度的苯扎氯铵中导致 *pmrB* 突变，进而使其对多黏菌素 B 和其他抗生素的耐受性更高^[20]；Condell 等^[21]将沙门氏菌暴露于亚抑制浓度消毒剂(三氯生、氯己定和苯扎氯铵)后，发现菌株对 3 种消毒剂的耐受性均有不同程度的增加。本试验鹤鹑源鼠伤寒沙门氏菌携带 *qacA/B* 基因可通过表达多重耐药蛋白而介导细菌对部分消毒剂抗性增加，甚至诱导鼠伤寒沙门氏菌对 β -内酰胺类、四环素类抗生素和其他抗菌药物产生耐药性。如果鼠伤寒沙门氏菌长期暴露于低剂量消毒剂中可以增加外排泵基因 *acrB* 过表达，菌株胞膜通透性降低，从而促进菌株逐渐产生对

多种抗菌药物的耐药性。

本试验分离的鼠伤寒沙门氏菌携带 *mogA*、*mgtC*、*araB*、*invA*、*bcfA*、*sseL*、*spvA*、*spvB*、*spvC*、*spvD*、*stn*、*fliC* 和 *flimA* 共 13 种相关毒力基因，与徐爱霞^[22]对死亡鸭胚中分离的沙门氏菌携带 14 种毒力基因结果，以及刘青霄^[23]在芦花鸡鸡胚分离的沙门氏菌携带 *spvC*、*befA* 等 11 种毒力基因结果基本一致。本试验结果提示北京周边地区的鹌鹑养殖场中鼠伤寒沙门氏菌的侵袭力与致病性较强，具有多重耐药特征，对部分消毒剂耐受，可引起人畜感染，需注意控制和防范。

REFERENCES

- [1] 刘理慧, 储锦华, 隋雨欣, 陈杨, 程古月. 沙门氏菌中主要毒力因子的研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(9): 72-83.
LIU LH, CHU JH, SUI YX, CHEN Y, CHENG GY. Research progress of main virulence factors in *Salmonella*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(9): 72-83 (in Chinese).
- [2] 黄秀梅, 张倩, 盖文燕, 曲志娜, 李晨阳, 赵思俊, 赵建梅, 赵格, 李月华, 王玉东, 王君玮, 王娟. 山东地区屠宰场猪肉污染沙门氏菌菌株毒力基因筛查与 ERIC-PCR 分型[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(8): 697-702.
HUANG XM, ZHANG Q, GAI WY, QU ZN, LI CY, ZHAO SJ, ZHAO JM, ZHAO G, LI YH, WANG YD, WANG JW, WANG J. Virulence gene screening and ERIC-PCR typing of *Salmonella* strains from pork contaminated slaughterhouses in Shandong[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2018, 34(8): 697-702 (in Chinese).
- [3] 董雪红, 田敏, 季策, 马文元, 张庆华. 两种 LD_{50} 计算方法对副溶血性弧菌毒力的比较研究[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(1): 86-96.
DONG XH, TIAN M, JI C, MA WY, ZHANG QH. The comparative study on the LD_{50} to evaluate the virulence of *Vibrio parahaemolyticus* using two calculation methods[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(1): 86-96 (in Chinese).
- [4] MC CARLIE S, BOUCHER CE, BRAGG RR. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance[J]. Drug Resistance Updates, 2020, 48: 100672.
- [5] 陆彦, 武岩, 赵红玉, 候晓林, 吴国娟. 鸡源印第安纳沙门菌多重耐药性分析[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(9): 1496-1500.
LU Y, WU Y, ZHAO HY, HOU XL, WU GJ. Analysis of multi-drug resistant of *Salmonella* Indiana from chicken[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(9): 1496-1500 (in Chinese).
- [6] XIA LN, TAO XQ, SHEN JZ, DAI L, WANG Y, CHEN X, WU CM. A survey of β -lactamase and 16S rRNA methylase genes among fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates and their horizontal transmission in Shandong, China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(12): 1241-1248.
- [7] LUCARELLI C, DIONISI AM, FILETICI E, OWCZAREK S, LUZZI I, VILLA L. Nucleotide sequence of the chromosomal region conferring multidrug resistance (R-type ASSuT) in *Salmonella* Typhimurium and monophasic *Salmonella* Typhimurium strains[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(1): 111-114.
- [8] 姚素霞, 郝瑞娥, 王洋, 张秋香, 杨红霞, 韩吉婷, 秦文彦. 2014-2017 年山西省沙门氏菌分子分型及耐药性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(9): 815-820.
YAO SX, HAO RE, WANG Y, ZHANG QX, YANG HX, HAN JT, QIN WY. Analysis of antimicrobial susceptibility and molecular typing of *Salmonella* in Shanxi Province during 2014-2017[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2021, 37(9): 815-820 (in Chinese).
- [9] 王凯, 林亚军, 王舒丰, 李淑娴, 向志宇, 夏利宁. 新疆焉耆县不同动物源耐药沙门氏菌的 MLST 分析[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(6): 111-122.
WANG K, LIN YJ, WANG SF, LI SX, XIANG ZY, XIA LN. MLST analysis of *Salmonella* isolates from different animal sources in Yanqi County of Xinjiang[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(6): 111-122 (in Chinese).
- [10] SAITO S, KOORI Y, OHSAKI Y, OSAKA S, OANA K, NAGANO Y, ARAKAWA Y, NAGANO N. Third-generation cephalosporin-resistant non-typhoidal *Salmonella* isolated from human feces in Japan[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2017, 70(3): 301-304.
- [11] 靳浩展, 李亮, 魏琦麟, 韩依辛, 徐志宏, 康桦华, 向蓉. 屠宰场沙门氏菌耐药性分析和毒力基因检测[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(10): 3943-3952.
JIN HZ, LI L, WEI QL, HAN YX, XU ZH, KANG HH,

- XIANG R. Drug resistance analysis and virulence gene detection of *Salmonella* in slaughterhouses[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(10): 3943-3952 (in Chinese).
- [12] TIAN YQ, GU D, WANG F, LIU BW, LI JW, KANG XL, MENG C, JIAO XN, PAN ZM. Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. from a pig farm in Shanghai, China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2021, 18(7): 477-488.
- [13] 侯雪娇, 吴科敏, 莫国东, 刘书宏, 言天久, 焦鹏涛, 韦平. 食源性沙门氏菌耐药表型与耐药基因的研究[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 166-170.
- HOU XJ, WU KM, MO GD, LIU SH, YAN TJ, JIAO PT, WEI P. Evaluation of drug-resistant phenotypes and genes in foodborne *Salmonella* isolates[J]. Food Science, 2016, 37(19): 166-170 (in Chinese).
- [14] KARIUKI S, GORDON MA, FEASEY N, PARRY CM. Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease[J]. Vaccine, 2015, 33(3): C21-C29.
- [15] LONG M, LAI H, DENG W, ZHOU K, LI B, LIU S, FAN L, WANG H, ZOU L. Disinfectant susceptibility of different *Salmonella* serotypes isolated from chicken and egg production chains[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(3): 672-681.
- [16] TONG CY, HU H, CHEN G, LI ZY, LI AF, ZHANG JY. Disinfectant resistance in bacteria: mechanisms, spread, and resolution strategies[J]. Environmental Research, 2021, 195: 110897.
- [17] 李双, 李武平, 刘冰, 孙惠英, 宋向阳, 闫沛, 白艳玲, 王蕾. 西安市 MRSA 耐消毒剂基因 *qacA/B* 的检测[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(9): 1716-1718, 1724.
- LI S, LI WP, LIU B, SUN HY, SONG XY, YAN P, BAI YL, WANG L. An investigation of disinfectant-resistant gene *qacA/B* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Xi'an's hospital[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(9): 1716-1718, 1724 (in Chinese).
- [18] MIYAZAKI NHT, ABREU AO, MARIN VA, REZENDE CA, MORAES MT, VILLAS BÔAS MHS. The presence of *qacA/B* gene in Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 2007, 102(4): 539-540.
- [19] YANG SZ, WU GY, LONG M, DENG WW, WANG HN, ZOU LK. Antibiotic and disinfectant resistance of *Salmonella* isolated from egg production chains[J]. Yi Chuan=Hereditas, 2016, 38(10): 948-956.
- [20] KIM M, WEIGAND MR, OH S, HATT JK, KRISHNAN R, TEZEL U, PAVLOSTATHIS SG, KONSTANTINIDIS KT. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(17): e01201-18.
- [21] CONDELL O, IVERSEN C, COONEY S, POWER KA, WALSH C, BURGESS C, FANNING S. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(9): 3087-3097.
- [22] 徐爱霞. 鸭胚源沙门氏菌的分离鉴定与毒力基因检测及分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2021.
- XU AX. Isolation and identification of *Salmonella* from duck embryo and detection and analysis of virulence genes[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [23] 刘青霄. 芦花鸡鸡胚源沙门氏菌的分离鉴定及其耐药与毒力相关基因分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2020.
- LIU QX. Isolation and identification of *Salmonella* from Luhua chicken embryo and analysis of drug resistance and virulence related genes[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese).