

印第安纳沙门氏菌对氯霉素类药物耐药性分析

陆彦¹ 晏志勋¹ 赵红玉² 侯晓林¹ 吴国娟^{1*}

(1. 北京农学院 动物科学技术学院 北京 102206)

(2. 中国科学院生物物理研究所 北京 100101)

摘要: 【目的】调查鸡源沙门氏菌对氯霉素类药物的耐药特征和相关耐药基因的流行情况。【方法】从山东省部分地区鸡孵化场、养殖场、屠宰场分离样品进行沙门氏菌鉴定和药物敏感性试验;设计引物,对氯霉素类药物的耐药基因进行 PCR 扩增和序列分析。

【结果】试验分离到印第安纳沙门氏菌,分离率为23.28%。孵化场、养殖场、屠宰场印第安纳沙门氏菌对氯霉素耐药率分别为50.00%、83.33%和 93.30%,对氟苯尼考耐药率为83.33%、100%和100%,对甲砒霉素耐药率为63%、65%和77%。在 80 株氯霉素类耐药菌株中,54 株检测到 *catA1* 基因,74 株检测到 *floR* 基因,5 株检测到 *cmlA* 基因。【结论】不同来源印第安纳沙门氏菌对氯霉素类药物耐药率存在差异,*catA1* 和 *floR* 基因广泛存在于耐药菌株中。

关键词: 沙门氏菌,药敏试验,氯霉素类药物,耐药基因

Resistance analysis of *Salmonella* Indiana to the chlmpenicols

LU Yan¹ YAN Zhi-Xun¹ ZHAO Hong-Yu² HOU Xiao-Lin¹ WU Guo-Juan^{1*}

(1. Beijing University of Agriculture, Animal Science and Technology College, Beijing 102206, China)

(2. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] To investigate the characteristics of chloramphenicols resistance and

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31201949, 31172362); 北京市人才强教深化计划; 北京农学院 2012 年度科研质量提高经费资助项目(No. GJB2012003, PXM2012_014207_000010)

*通讯作者: Tel: 86-10-80796702; 信箱: wgj9288@sina.com

收稿日期: 2013-03-05; 接受日期: 2013-05-09

the prevalence of resistance genes in *Salmonella* Indiana from chicken. **[Methods]** The samples were isolated from chicken hatcheries, farms and slaughterhouses in Shandong Province. The isolates were identified and tested the drug susceptibility, designing primers for the resistance genes of chloramphenicols in strains were detected by PCR and sequence analysis. **[Results]** The results showed that the isolation rate of *Salmonella* Indiana was 23.28%. The resistance rates of *Salmonella* Indiana from hatcheries, farms, slaughterhouses to chloramphenicol were 50%, 83.33%, 93.30%, florfenicol were 83.33%, 100%, 100%, thiamphenicol were 63%, 65%, 77% respectively. In 80 chloramphenicols resistant strains, 54 strains had detected *catA1* gene, 74 strains had detected *floR* gene, and the 5 strains had detected *cmlA* gene. **[Conclusion]** These results indicated that the resistance rates of *Salmonella* Indiana to chloramphenicols were different from hatcheries, farms and slaughterhouses. The *catA1* gene and *floR* gene were widely existed in chloramphenicols resistant strains.

Keywords: *Salmonella* Indiana, Drug susceptibility testing, Chlmphenicols, Resistance genes

沙门氏菌是一种无芽孢、无荚膜的革兰氏阴性杆菌^[1],多数血清型的沙门氏菌对人和动物有致病性。同时,沙门氏菌病也是鸡场中高发的细菌性疾病^[2],对养鸡业造成极大的危害。氯霉素类药物是广谱抗生素,特别对沙门氏菌和大肠杆菌等革兰氏阴性菌有较强的抑菌作用。因此,氯霉素类药物在临床上广泛使用及滥用导致沙门氏菌产生耐药性。廖成水等^[3]报道致病性沙门氏菌对氯霉素耐药率高达76.9%,美国Elmadena等^[4]报道沙门氏菌对氯霉素的耐药率达到98.4%。监测数据表明,致病性沙门氏菌耐药问题已成为全球关注的热点^[5-6],国内沙门氏菌对不同种类抗菌药物耐药率的研究比较普遍^[7],但主要针对氯霉素类药物耐药的相关研究还较少,本实验主要研究沙门氏菌对氯霉素类药物的耐药特征,开展致病性沙门氏菌携带氯霉素耐药基因的检测,从而了解耐药性的产生和传播途径。为指导兽医临床合理选择和使用氯霉素类药物,控制耐药性的传播提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和药品

从山东省部分地区(临沂、烟台、泰安和邹平

地区)的鸡孵化场(120)、养殖场(120)和屠宰场(136)共采集376个样品,在中国山东省农科院畜牧所分离沙门氏菌,北京农学院兽医药理研究室保存。鸡白痢沙门氏菌标准株C79-13、大肠杆菌ATC25922和氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考标准品购自中国兽医药品监察所;营养肉汤、MH肉汤购自北京奥博星生物技术有限公司;科玛嘉沙门氏菌显色培养基购自郑州博赛生物技术研究院。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离、鉴定和血清分型:从中国山东省不同地区鸡孵化场、养殖场和屠宰场采集鸡肉鸡肠内容物样品,菌株的分离和鉴定按照Cui等^[8]所述方法进行。样品在37℃无菌亚硒酸盐胱氨酸培养液中培养24h,将培养液划线接种沙门氏菌显色培养基,培养24h后观察菌落形态特征,紫色边缘整齐的单个菌落判定为疑似沙门氏菌。菌株纯化培养后通过PCR方法检测*invA*基因^[9],阳性菌株确认为沙门氏菌。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血清型鉴定,根据Kauffmann-White抗原表检索沙门氏菌血清型。鸡白痢沙门氏菌标准菌株CVCC533和鼠伤寒沙门氏菌标准

菌株 CVCC541 为阳性对照, 生理盐水为阴性对照。

1.2.2 药物敏感性试验: 采用美国临床实验室标准委员会(CLSI)^[10-11]推荐的微量肉汤稀释法对分离株进行 3 种氯霉素类药物(氯霉素、氟苯尼考和甲砒霉素)的 MIC 值测定, 每种药物做 3 个平行对照。以大肠杆菌ATC25922 作为质控菌株, 结果判定参照 CLSI 标准。

1.2.3 耐药基因的检测与序列分析: 采用煮沸法提取细菌 DNA 模板, 参照 GenBank 中登录的耐药基因序列及相关文献[12-13], 设计氯霉素类耐药基因引物(表 1), 扩增氯霉素类耐药基因。PCR 反应体系总体积为 20 μ L, 包括模板 DNA 1 μ L, 10 nmol/L 的上下游引物各 1 μ L, 双蒸水 7 μ L 和 2 \times PCR Mix 10 μ L。PCR 产物使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳后回收纯化耐药基因的 PCR 产物, 测序后与 GenBank 中的相应耐药基因序列进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定

从山东省部分地区鸡孵化场、养殖场、屠宰场 3 个来源376 个样品中分离出 80 株印第安纳沙门氏菌, 分离率为 21.28%。印第安纳沙门氏菌在屠宰场中分离率最高为22.06% (30 株); 养殖场中分离率为21.67% (26 株); 孵化场中分离率为 20.00% (24 株), 见表 2。

2.2 药敏试验

从表 3 可以看出, 分离株对氟苯尼考的耐药率高达 95%, 对氯霉素和甲砒霉素的耐药率分别为 76.25%和 71.25%。并且, 不同场所分离的印第安纳沙门氏菌的耐药率存在较大差异, 其中孵化场、养殖场、屠宰场中印第安纳沙门氏菌对氯霉素耐药率分别为50.00%、83.33%和93.30%, 对氟苯尼考耐药率为83.33%、100%和100%; 对甲砒霉素耐药率为 63%、65%和77%, 见图 1。

表 1 耐药基因 PCR 扩增引物				
Table 1 Primer sequences of resistance gene of <i>Salmonella</i>				
抗生素种类	耐药基因	引物序列	序列	大小
Antibiotic type	Resistance genes	Primer sequence (5'→3')	Accession No.	Size (bp)
Chloramphenicols	<i>catA1</i>	CATTACCCGACGCACTTT TATCACTTATTAGGCGTAGCAC	VOO622	952
	<i>catA2</i>	GAACACTTTGCCCTTTATCGTC TCCTGCTGAAACTTTGCCATCGT	X53796	482
	<i>catA3</i>	TGZTGAGTTGAGAATGGCGATA GAGAGCGGCAATAACAGTCTA	XO7848	358
	<i>cmlA</i>	GCGGGCTATCTTTGCGTTTC AAGTAGACTGCCGTGACCGTTCC	M64556	665
	<i>floR</i>	TCCTGAACACGACGCCCGCTAT TCACCGCCAATGTCCCGACGAT	AJ251806	962

表 2 不同来源沙门氏菌分离率				
Table 2 Percentage of <i>Salmonella</i> isolated from different sources				
菌株来源 Source of strains (No.)	血清型 Serotype	菌株数 Isolates	分离率 Separation rate (%)	
Hatchery (120)	<i>Salmonella</i> Indiana	24	20.00	
Farms (120)	<i>Salmonella</i> Indiana	26	21.67	
Slaughterhouse (136)	<i>Salmonella</i> Indiana	30	22.06	

表 3 80 株沙门氏菌对氯霉素类药物的最小抑菌浓度
Table 3 MIC of 80 *Salmonella* isolates to the chloramphenicols

药物 Drugs	评定标准 Assessment standards			实验结果 Results		
	R Resistance (%)	I Intermediary (%)	S Sensitive (%)	R Resistance (%)	I Intermediary (%)	S Sensitive (%)
Chloromycetin	≥32	8-32	≤8	76.25 (60/80)	1.25 (1/80)	1.25 (1/80)
Florfenicol	≥16	4-16	≤4	95.00 (76/80)	0	5.00 (4/80)
Thiamphenicol	≥32	8-32	≤8	71.25 (57/80)	23.75 (19/80)	5.00 (4/80)

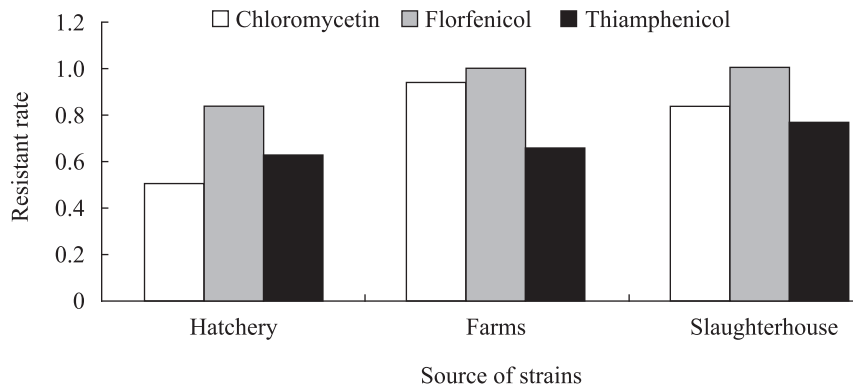


图 1 不同来源印第安纳沙门氏菌对氯霉素类药物的耐药率
Fig. 1 The resistance rates of *Salmonella Indiana* to chloramphenicols from different places

2.3 耐药基因的检测

在 80 株氯霉素类药物耐药的菌株中, 有 54 株扩增出约 950 bp 的片段, 经过测序分析与 *catA1* 基因同源性为 100%, 阳性率为 67.5%; 有 74 株扩增出约 960 bp 的片段, 经测序和同源性分析后为 *floR* 基因, 阳性率为 92.5%; 5 株扩增出约 660 bp 的片段, 经测序和同源性分析后为 *cmlA* 基因, 阳性率为 6.25%; 没有检测到 *catA2*、*catA3* 基因, 见表 4。

3 讨论

本实验从山东省不同地区鸡孵化场、养殖场和屠宰场分离出 80 株印第安纳沙门氏菌, 菌株来源于不同日龄的肉鸡, 具有多样性和代表性。每份样品分离一株沙门氏菌, 避免了相同克隆菌株的干扰, 能够更全面的代表不同来源沙门氏菌流行情况。本次分离出 150 株沙门氏菌, 总分离率为 39.89%, 比薛俊龙等^[14]在山西省鸡沙门氏

表 4 耐药菌株中耐药基因的阳性率
Table 4 Positive rate of resistance genes in resistant strains

药物 Drugs	耐药菌株数 Number of resistant strains	耐药基因 Resistance genes	阳性菌株数 No. of positive strains	阳性率 Positive rate (%)
Chloramphenicols	80	<i>catA1</i>	54	67.50
		<i>floR</i>	74	92.50
		<i>cmlA</i>	5	6.25

菌病流行病学调查中分离率 53.33% 略低。印第安纳沙门氏菌分离出 80 株, 分离率为 21.28%, 比吴云凤等^[15]报道的分离率要高, 说明印第安纳沙门氏菌在山东省不同地区养鸡业中流行。

实验结果显示, 从孵化场、养殖场和屠宰场分离出的印第安纳沙门氏菌对氟苯尼考、甲砒霉素的耐药率依次升高, 说明随着鸡日龄和接触药物的增加, 耐药率依次上升。但对氯霉素的耐药率养殖场最高达到 93.33%, 原因是在饲养期间为了预防家禽疾病而大量使用了氯霉素。印第安纳沙门氏菌对氯霉素、氟苯尼考、甲砒霉素的耐药率分别为 76.25%、95%、71.25%, 比马孟根等^[16]检测 30 株沙门氏菌对氨基糖苷类、氯霉素类、四环素类进行耐药性试验中, 氯霉素类中沙门氏菌对氯霉素、氟苯尼考、甲砒霉素的耐药率为 56%、20%、33.3% 的结果要高, 其原因可能与不同地区的用药情况有密切关系, 提示抗菌药物的合理使用至关重要。

一般细菌对抗生素的耐药机制主要是由耐药基因直接编码蛋白或基因作用位点发生突变^[17], 而沙门氏菌对氯霉素类药物产生耐药性的机制有两种: 一是通过 *cat* 基因调控合成乙酰化转移酶使氯霉素和甲砒霉素转化为无抗菌活性的代谢产物; 另一种机制与细菌的主动外排作用有关, 包括 *cmlA* 和 *floR* 基因。我国对致病性沙门氏菌中氨基糖苷类、四环素类、磺胺类和氯霉素类耐药基因的 PCR 检测研究已有报道^[18-19], 本研究中, 耐药基因 *floR* 的检出率较高为 92.5%, *catA1* 基因检出率为 67.5%, 基因 *cmlA* 检出率较低为 6.25%, 而 *catA2*、*catA3* 基因没有检出, 廖成水等^[3]检测了 98 株沙门氏菌对氯霉素的耐药基因, 其中 7 株检测到 *catA1*, 检出率为 7.14%, 明显与本实验的结果不同, 这表明场所不同, 分离出的菌株可能不同, 使得耐药基因的流行和分布情况也不尽相同。在耐药基因的检测中发现有少数

没有检测到耐药基因 *catA2*、*catA3* 的菌株也有耐药性, 虽然部分菌株表现出耐药, 但未能检测到相应的耐药基因, 这可能是因为该菌株含有其他耐药基因或存在其他耐药机制^[20], 需进一步研究。

4 结论

细菌耐药问题已经成为一个世界性的难题, 研究山东省印第安纳沙门氏菌的耐药特征及导致耐药产生的相关基因, 有助于从食物链的源头采取合理的干预措施, 对养殖业的合理用药提供参考, 有利于减少和防止沙门氏菌对氯霉素类药物耐药性的产生, 保障食品安全。同时, 也对进一步了解印第安纳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提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 张程程, 赵玉林, 周琼, 等. 鸡源致病性沙门氏菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2012, 46(5): 11-13.
- [2] 黄嫫, 刘卫国, 马飞, 等. 沙门氏菌病的防控[J]. 畜牧与饲料学, 2010, 31(11): 163-165.
- [3] 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, 41(07): 751-755.
- [4] Elamadiena MM, El Hussein AA, Muckle CA, et al. Antimicrobial susceptibility and multi-drug resistance of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovars in Sudan[J]. Tropical Animal Health and Production, 2013, 45(5): 1113-1118.
- [5] 朱力军. 动物大肠杆菌的耐药变化趋势[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(2): 16-18.
- [6] 周贵民, 张军民. 我国细菌耐药性监测应注意的几个问题[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(10): 5-6.
- [7] 杨保伟, 盛敏, 孟江洪, 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.
- [8] Cui S, Zheng J, Meng J. An improved method for rapid isolation of *Salmonella* from chicken carcasses[J]. Journal of Food Safety, 2006, 26(1): 49–61.
- [9] Wang MY, Xu MH, Pan HW, et al. Establishment and preliminary application of LAMP *invA* gene assay for rapid detection of *Salmonella*[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18: 23–26.
- [10] CLSI M100-S17, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement[S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
- [11] CLSI M31-A3, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard-Third Edition[S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [12] Chen S, Zhao S, White DG, et al. Characterization of multiple-antimicrobial resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 1–7.
- [13] Yan L, Cong MW, Guo JW, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from chicken in China[J]. Food Borne Pathogens and Disease, 2011, 8(1): 45–53.
- [14] 薛俊龙, 田林君, 张国权, 等. 山西省鸡沙门氏菌病流行病学调查分析[J]. 山西农业科学, 2010, 38(9): 58–62.
- [15] 吴云凤, 袁宝君, 乔昕, 等. 肉鸡胴体中沙门氏菌的分离鉴定及多重耐药谱研究[J]. 南京医科大学学报, 2012, 32(1): 125–128.
- [16] 马孟根, 王红宁, 余勇, 等. 猪源致病性沙门氏菌耐药基因的分析[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(1): 65–70.
- [17] 魏秀丽, 陈杖榴. 沙门氏菌耐药株 *gyrA* 基因和 *parC* 基因突变特征分析[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(9): 6–8.
- [18] 王新, 郝宏删, 孟江红, 等. 鸡肉源沙门氏菌对喹诺酮和氟喹诺酮类抗生素耐药状及相关基因[J]. 微生物学报, 2011, 51(10): 1413–1420.
- [19] 潘志明, 焦新安, 刘文博, 等. 鸡白痢沙门氏的耐药性检测研究[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(4): 377–383.
- [20] 邓树轩, 程安春. 沙门氏菌耐药机制研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(23): 7205–7207.