

研究报告



重庆市北碚区宠物源沙门氏菌耐药性监测及 ESBL 和 PMQR 基因检测

王旭东 王凡 周冰倩 杨梅 丁红雷*

西南大学动物医学院动物支原体学实验室 重庆 400715

摘要:【背景】沙门氏菌是一种常见的人兽共患病病原菌。随着饲养宠物的人越来越多, 宠物肠道内沙门氏菌对公共卫⽣的威胁逐渐显现, 但鲜见宠物携带沙门氏菌的流行病学及宠物源沙门氏菌耐药性的报道。【目的】了解重庆市北碚区宠物源沙门氏菌的流行情况, 以及其对常用抗菌药物的敏感性及超广谱 β -内酰胺酶(Extended-Spectrum β -Lactamases, ESBL)基因和质粒介导的喹诺酮耐药(Plasmid-Mediated Quinolone Resistance, PMQR)基因的携带情况。【方法】共采集北碚区宠物粪便样品 1 038 份, 通过样品前增菌、选择性增菌、选择性平板筛选和 PCR 鉴定沙门氏菌特异性 *invA* 基因分离鉴定沙门氏菌; 接着测定了分离菌株对 28 种抗菌药物的敏感性, 检测了 10 种 ESBL 基因和 10 种 PMQR 基因。【结果】共分离到沙门氏菌 41 株, 分离率为 3.95%。这些菌株对磺胺异噁唑、氨苄西林、四环素、多西环素的耐药率都超过 50%, 而且 82.92% 为多重耐药菌株, 对阿米卡星、氧氟沙星、依诺沙星、加替沙星完全敏感; 85.37% 的分离菌携带 ESBL 基因, 以 *bla*_{TEM} 基因最为流行; 46.34% 携带 PMQR 基因, 以 *qnrS* 最为流行; 48.57% 的 ESBL 阳性菌株携带至少一种 PMQR 基因。【结论】北碚区宠物体内的沙门氏菌对一些抗菌药物存在不同程度的耐药性, 而且耐药性可能是通过耐药质粒介导的。

关键词: 宠物, 沙门氏菌, 药物敏感性, 超广谱 β -内酰胺酶, 质粒介导的喹诺酮耐药

Surveillance of antimicrobial resistance and detection of ESBL and PMQR genes in pet-associated *Salmonella* in Beibei District, Chongqing

WANG Xudong WANG Fan ZHOU Bingqian YANG Mei DING Honglei*

Laboratory of Veterinary Mycoplasma, College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Background] *Salmonella* is a common zoonotic pathogen. With the increasing number of pet

Foundation items: Chongqing Technology Innovation and Application Development Project (cstc2019jcsx-msxmX0402); Chongqing Beibei District Application Development Project (2018-28); Chongqing Innovative Talent Training Project for Primary and Middle School (CY190219, CY200214)

*Corresponding author: Tel: 86-23-68366382; E-mail: hongleiding@swu.edu.cn

Received: 23-04-2021; Accepted: 14-05-2021; Published online: 24-06-2021

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项面上项目(cstc2019jcsx-msxmX0402); 重庆市北碚区应用开发计划(2018-28); 重庆市中小学创新人才培养工程项目(CY190219, CY200214)

*通信作者: Tel: 023-68366382; E-mail: hongleiding@swu.edu.cn

收稿日期: 2021-04-23; 接受日期: 2021-05-14; 网络首发日期: 2021-06-24

owners, the threat of *Salmonella* in pet intestines to public health is gradually emerging, but there are few reports on the epidemiology and antimicrobial resistance of pet-associated *Salmonella*. **[Objective]** To investigate the epidemiology, antimicrobial susceptibility to commonly used antimicrobials and the prevalence of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) gene and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes of *Salmonella* isolated from pets in Beibei District, Chongqing. **[Methods]** *Salmonella* was isolated and identified by pre-enrichment, selective enrichment, selective plate screening and amplifying *invA* gene through PCR. Then, the antimicrobial susceptibility of the isolates to 28 antimicrobials was determined, and 10 ESBL genes and 10 PMQR genes were detected. **[Results]** A total of 41 *Salmonella* strains were isolated, the isolation rate was 3.95%. The resistance rates of these strains to sulfamethoxazole, ampicillin, tetracycline, doxycycline were more than 50%, 82.92% of them were multi-drug resistant, and all of isolates were completely sensitive to amikacin, ofloxacin, enoxacin and gatifloxacin. 85.37% of the isolates carried ESBL gene and the *bla*_{TEM} gene was the most popular. 46.34% of the isolates had PMQR genes and *qnrS* was the most popular one. 48.57% of ESBL positive strains carried at least one PMQR gene. **[Conclusion]** The above results demonstrated that pet-associated *Salmonella* in Beibei District were resistant to a variety of antimicrobials, and the drug resistance may be mediated by drug-resistant plasmids.

Keywords: pet, *Salmonella*, antimicrobial sensitivity, ESBL, PMQR

沙门氏菌是一种重要的人兽共患病病原菌,目前已经报道 2 600 多个血清型^[1],其非宿主适应性血清型能造成人和多种动物发病。随着我国全面建成小康社会并向社会主义现代化强国迈进,人们的生活水平有了极大提高,饲养宠物逐渐成为人们日常生活的一部分,伴侣动物与人的关系越来越密切,这给公共卫生带来了挑战。沙门氏菌是宠物的一种肠道常在菌,人与宠物密切接触时就有可能感染宠物携带的沙门氏菌。人在机体免疫力下降或免疫功能不健全时,体内的宠物源沙门氏菌可能引起发病^[2-3],如果是耐药菌,则会增加治疗时间和成本,甚至无药可用。因此,加强宠物源沙门氏菌的耐药性监测、阐明宠物源沙门氏菌携带的主要耐药基因,可以对宠物沙门氏菌病用药提供参考,还能对人类感染宠物源耐药沙门氏菌提供预警。

本研究对重庆市北碚区宠物源沙门氏菌进行了流行病学调查,并测定了分离菌株对部分抗菌药物的敏感性,检测了超广谱 β -内酰胺酶(Extended-Spectrum β -Lactamases, ESBL)基因和质粒介导的喹诺酮耐药(Plasmid-Mediated Quinolone Resistance, PMQR)基因,以期对北碚区宠物沙门氏菌病和人感染宠物源沙门氏菌发病后的用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

大肠杆菌 ATCC[®]*25922 和沙门氏菌 CQRC4PS002 由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

缓冲蛋白胨水(BPW)、Muller-Hinton 琼脂,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB),广东环凯微生物科技有限公司;沙门氏菌显色培养基,上海欣中生物工程有限公司;2×San Taq PCR Mix,生工生物工程(上海)股份有限公司;DNA 小量回收试剂盒,广州美基生物科技有限公司;DL2000 DNA Marker,北京擎科新业生物技术有限公司;药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司。PCR 仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.3 样品采集与前处理

用无菌棉签在宠物肛门处刮取少量粪便,置于 2 mL BPW 液体中。含粪便的 BPW 液体立即置于 4 °C 冷藏,并在 48 h 内运回实验室处理。共在 10 家宠物门诊部或宠物医院采集就诊或寄养宠物的粪便 719 份,采集家养健康宠物粪便 319 份。含样品的 BPW 培养基于 37 °C 静置培养 18–24 h,取 300 μ L 加入 3 mL TTB, 42 °C、180 r/min 培养

16–24 h, 培养的菌液划线于沙门氏菌显色平板, 37 °C 培养 16–24 h。从平板上挑取紫色菌落进行菌落 PCR 鉴定。

1.4 沙门氏菌的菌落 PCR 鉴定

根据 GenBank 中公布的沙门氏菌 *invA* 基因序列, 用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 *invA*-F (5'-GAAATTATCGCCACGTTTCGGGCA-3')和 *invA*-R (5'-TCATCGCACCGTCAAAGGA-3')。引物由重庆擎科新业生物技术有限公司合成。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共 30 个循环; 72 °C 6 min。沙门氏菌 CQRC4PS002 为阳性对照。

1.5 药物敏感性试验

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)抗菌药物敏感性试验标准^[4], 采用 K-B 纸片法对沙门氏菌

临床分离株进行药物敏感性试验。以大肠杆菌 ATCC®*25922 作为质控菌株。

1.6 PMQR 与 ESBL 基因检测与分型

将分离的沙门氏菌接种 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 摇床培养 8 h, 取 1 mL 菌液 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清; 加入 1 mL ddH₂O, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 重复该步骤一次; 加入 100 μL ddH₂O, 105 °C 处理 10 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清作为 DNA 模板。用 2×San Taq PCR Mix 扩增 ESBL 的 *bla*_{TEM}^[5]、*bla*_{CTX-M}^[6]、*bla*_{SHV}^[5]、*bla*_{OXA-1}^[7]、*bla*_{OXA-2}^[7]、*bla*_{OXA-10}^[7]、*bla*_{PSE}^[8]、*bla*_{PER}^[8]、*bla*_{GES}^[9]、*bla*_{VEB}^[9]基因和 PMQR 的 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*qnrVC*、*aac*(6')-Ib-cr、*oqx*A、*oqx*B、*qepA* 基因(表 1)。PCR 反应体系: 2×San Taq PCR Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 10.5 μL。

表 1 PCR 扩增 PMQR 基因所用引物及相关参数

Table 1 Primers and parameters for amplification of PMQR genes by PCR

目的基因 Target gene	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	扩增长度 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516	60
	<i>qnrA</i> -R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> -F	GGCATTGAAATTCGCCACTG	263	61
	<i>qnrB</i> -R	TTTGCTGCTCGCCAGTCGAA		
<i>qnrC</i>	<i>qnrC</i> -F	GGGTTGTACATTATTGAATCG	307	55
	<i>qnrC</i> -R	CACCTACCCATTATTTTCA		
<i>qnrD</i>	<i>qnrD</i> -F	CGAGATCAATTTACGGGGAATAG	596	61
	<i>qnrD</i> -R	ACACCTAAACTCTCAACAAGCTGAA		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F	ATGGAAAYCTACMRTCAYACATATCG	641	60
	<i>qnrS</i> -R	YTAGTCAGGAWAAACAACAATACCCA		
<i>qnrVC</i>	<i>qnrVC</i> 136-F	AATCAAAGCAATTATATAATCAAGTGAAC	650	55
	<i>qnrVC</i> 136-R	TTAGTCAGGAACAATGATTACCC	657	55
	<i>qnr457VC</i> -F	ATGGATAAAACAGACCAGTTATATGTA		
	<i>qnr457VC</i> -R	TTAGTCAGGAATACTATTAAACCTAAT		
<i>aac</i> (6')-Ib-cr	<i>aac</i> (6')-Ib-cr-F	CGCAAAAACAAAGTTAGGCATCA	571	61
	<i>aac</i> (6')-Ib-cr-R	CTCGAATGCCTGGCGTGT		
<i>oqx</i> A	<i>oqx</i> A-F	ATGAGCCTGCAAAAAACCTGG	1 176	60
	<i>oqx</i> A-R	TCAGTTAAGGGTGGCGCTGG		
<i>oqx</i> B	<i>oqx</i> B-F	ACCAACACGCCGAATACCG	737	63
	<i>oqx</i> B-R	TGCTGGAAGCTGAGATCCGT		
<i>qepA</i>	<i>qepA</i> -F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	217	60
	<i>qepA</i> -R	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG		

2 结果与分析

2.1 菌株分离情况

从 1 038 份宠物粪便中分离到沙门氏菌 41 株, 分离率为 3.95% (表 2)。其中, 在 10 家宠物医院采集的 719 份粪便中分离到 27 株, 分离率为 3.76%; 在健康宠物采集的 319 份粪便中分离到 14 株, 分离率为 4.39%。从不同的宠物种类来看, 在 686 份犬粪便中分离到 26 株, 分离率为 3.79%; 在 326 份猫粪便中分离到 9 株, 分离率为 2.76%; 在 6 份乌龟粪便中均分离到沙门氏菌; 在 19 份鹦鹉粪便和 1 份刺猬粪便中没有分离到沙门氏菌。

2.2 药物敏感性结果

药物敏感性试验结果见表 3。分离菌株对磺胺异噁唑的耐药率最高(78.05%), 其次为氨苄西林(75.61%), 对 2 种四环素类药物的耐药率也超过 50%; 对阿米卡星、氧氟沙星、依诺沙星、加替沙星完全敏感, 对头孢西丁、头孢曲松、头孢吡肟、庆大霉素、诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星的耐药率较低, 不超过 10%。从不同动物来源的菌株来看, 犬源菌株对磺胺异噁唑(92.31%)、氨苄西林(84.62%)、四环素(65.38%)、多西环素(65.38%)、链霉素(61.54%)、复方新诺明(53.85%)、甲氧苄啶(53.85%)的耐药率超过 50%, 对头孢曲松、头孢吡肟、阿米卡星、诺氟沙星、氧氟沙星、依诺沙星、加替沙星完全敏感; 猫源菌株对氨苄西

林(77.78%)、磺胺异噁唑(66.67%)的耐药率较高, 对头孢吡肟、庆大霉素、阿米卡星、恩诺沙星、氧氟沙星、依诺沙星、加替沙星完全敏感。

34 株分离菌为多重耐药菌株(表 4), 即有 82.92%的菌株对 3 类及以上抗菌药物耐药, 其中三重耐药和五重耐药的菌株各有 6 株, 四重耐药菌有 20 株, 2 株菌为六重耐药菌。犬源沙门氏菌的多重耐药菌株比例最高, 为 96.15%; 猫源沙门氏菌的多重耐药菌株所占比例为 77.78%; 分离自乌龟的沙门氏菌 33.33%为多重耐药菌株。

如图 1 所示, 不同的沙门氏菌分离株对抗菌药物的敏感程度存在差异。其中, 24 株菌对 6 种及以上药物耐药; 7 株菌对 10 种及以上药物耐药; 1 株分离自乌龟的沙门氏菌对 20 种药物耐药, 而另 1 株乌龟来源的菌株对所有药物敏感。

2.3 耐药基因检测及分型

在所有的临床分离株中, 有 6 株犬源菌株不携带 ESBL 基因, 其中 4 株对第三代头孢菌素头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶和四代头孢菌素头孢吡肟及氨曲南敏感, 表型和基因型完全相配; 2 株分离菌对头孢噻肟耐药, 可能这 2 个菌株携带其他 β -内酰胺类药物耐药基因。其余 35 株(85.37%)沙门氏菌均携带至少一种 ESBL 基因, 包括: 28 株携带 *bla*_{TEM} 基因, 3 株携带 *bla*_{CTX-M} 基因, 14 株携带 *bla*_{SHV} 基因, 18 株携带 *bla*_{OXA-2} 基因, 没有菌株携

表 2 宠物源沙门氏菌在不同宠物的分离情况

Table 2 Prevalence of pet-associated *Salmonella* isolated from different pets

宠物 Pet	就诊或寄养宠物 Hospitaled or foster pets			健康宠物 Health pets			合计 Total		
	采样数量	分离菌株数	分离率	采样数量	分离菌株数	分离率	采样数量	分离菌株数	分离率
	Number of samples	Number of <i>Salmonella</i>	Isolation rate (%)	Number of samples	Number of <i>Salmonella</i>	Isolation rate (%)	Number of samples	Number of <i>Salmonella</i>	Isolation rate (%)
犬 Dog	494	21	4.25	192	5	2.60	686	26	3.79
猫 Cat	224	6	2.68	102	3	2.94	326	9	2.76
乌龟 Tortoise	0	0	0	6	6	100	6	6	100
鹦鹉 Parrot	1	0	0	18	0	0	19	0	0
刺猬 Hedgehog	0	0	0	1	0	0	1	0	0
合计 Total	719	27	3.76	319	14	4.39	1 038	41	3.95

表 3 宠物源沙门氏菌对不同抗菌药物的耐药菌株数及耐药率(%)

Table 3 The number and resistance rate (%) of pet-associated *Salmonella* isolates to different antimicrobials

抗菌药物种类 Antimicrobial categories	抗菌药物 Antimicrobials	犬源 Dog-associated	猫源 Cat-associated	乌龟源 Tortoise-associated	合计 Total isolates (%)
青霉素类 Penicillins	氨苄西林 Ampicillin	22 (84.62)	7 (77.78)	2 (33.33)	31 (75.61)
	头孢菌素类 Cephalosporins	3 (11.54)	2 (22.22)	1 (16.67)	6 (14.63)
	头孢唑啉 Cefazolin	6 (23.08)	3 (33.33)	1 (16.67)	10 (24.39)
	头孢西丁 Cefoxitin	2 (7.69)	1 (11.11)	0	3 (7.32)
	头孢噻肟 Cefotaxime	4 (15.38)	2 (22.22)	2 (33.33)	8 (19.51)
	头孢曲松 Ceftriaxone	0	2 (22.22)	1 (16.67)	3 (7.32)
	头孢他啶 Ceftazidime	2 (7.69)	1 (11.11)	2 (33.33)	5 (12.20)
	头孢吡肟 Cefepime	0	0	1 (16.67)	1 (2.44)
	碳青霉烯类 Carbapenems	2 (7.69)	4 (44.44)	2 (33.33)	8 (19.51)
单环内酰胺类 Monobactams	氨曲南 Aztreonam	2 (7.69)	2 (22.22)	2 (33.33)	6 (14.63)
氨基糖苷类 Aminoglycosides	链霉素 Streptomycin	16 (61.54)	1 (11.11)	1 (16.67)	18 (43.90)
	卡那霉素 Kanamycin	3 (11.54)	2 (22.22)	2 (33.33)	7 (17.07)
	庆大霉素 Gentamicin	2 (7.69)	0	1 (16.67)	3 (7.32)
	阿米卡星 Amikacin	0	0	0	0
	四环素类 Tetracyclines	17 (65.38)	4 (44.44)	3 (50.00)	24 (58.54)
	多西环素 Doxycycline	17 (65.38)	4 (44.44)	3 (50.00)	24 (58.54)
酰胺醇类 Phenicol	氯霉素 Chloramphenicol	10 (38.46)	4 (44.44)	2 (33.33)	16 (39.02)
	氟苯尼考 Florfenicol	11 (42.31)	4 (44.44)	1 (16.67)	16 (39.02)
喹诺酮类 Quinolones	萘啶酸 Nalidixic acid	8 (30.77)	3 (33.33)	0	11 (26.83)
	诺氟沙星 Norfloxacin	0	1 (11.11)	0	1 (2.44)
	环丙沙星 Ciprofloxacin	1 (3.85)	1 (11.11)	1 (16.67)	3 (7.32)
	恩诺沙星 Enrofloxacin	1 (3.85)	0	1 (16.67)	2 (4.88)
	氧氟沙星 Ofloxacin	0	0	0	0
	依诺沙星 Enoxacin	0	0	0	0
	加替沙星 Gatifloxacin	0	0	0	0
	磺胺类 Sulfonamides	14 (53.85)	4 (44.44)	2 (33.33)	20 (48.78)
	甲氧苄啶 Trimethoprim	14 (53.85)	3 (33.33)	2 (33.33)	19 (46.34)
	磺胺异噁唑 Sulfamethoxazole	24 (92.31)	6 (66.67)	2 (33.33)	32 (78.05)

表 4 沙门氏菌分离株对不同种类抗菌药物的耐药菌株数及比例(%)

Table 4 The number and ratio (%) of *Salmonella* isolates resistant to different categories of antimicrobials

不同种类抗菌药物数量 Number of antimicrobial categories	犬源 Dog-associated	猫源 Cat-associated	乌龟源 Tortoise-associated	合计 Total isolates (%)
0	0	0	1 (16.67)	1 (2.44)
1	1 (3.85)	2 (22.22)	2 (33.33)	5 (12.20)
2	0	0	1 (16.67)	1 (2.44)
3	4 (15.38)	2 (22.22)	0	6 (14.63)
4	16 (61.54)	4 (44.44)	0	20 (48.78)
5	4 (15.38)	1 (11.11)	1 (16.67)	6 (14.63)
6	1 (3.85)	0	1 (16.67)	2 (4.88)
合计 Total	26	9	6	41

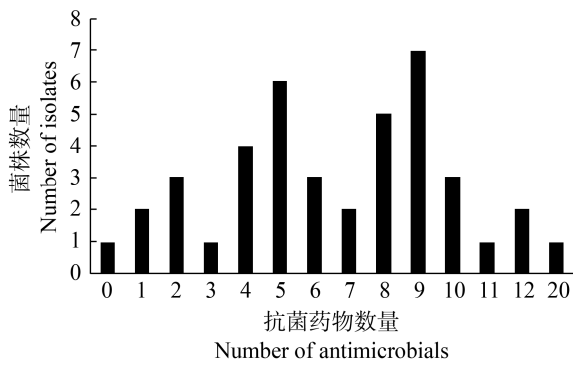


图 1 不同耐药情况的沙门氏菌数
Figure 1 *Salmonella* number with different drug resistance

带 *bla*_{OXA-1}、*bla*_{OXA-10}、*bla*_{PSE}、*bla*_{PER}、*bla*_{GES}、*bla*_{VEB} 基因(表 5)。携带单个 ESBL 基因的菌株有 15 株, 其中 11 株只携带 *bla*_{TEM} 基因; 携带 2 个 ESBL 基因的菌株有 13 株, 优势组合形式为 TEM+OXA-2, 共有 5 株菌; 携带 3 个 ESBL 基因的菌株有 6 株, 5 株为 TEM+SHV+OXA-2 形式; 1 株以 TEM+CTX-M+SHV+OXA-2 形式携带 4 个 ESBL 基因(表 5)。

另外, 在所有的临床分离株中, 共有 6 株菌对氟喹诺酮类药物耐药, 但在 19 株(46.34%)菌中检测到 PMQR 基因, 包括 *qnrA*、*qnrB*、*qnrD*、*qnrS*、*oqxB*、*aac(6')-Ib-cr*, 未检测到 *qnrC*、*qnrV*、*oqxA*、

表 5 ESBL、PMQR 在沙门氏菌分离株中的分布
Table 5 Distribution of ESBL and PMQR in *Salmonella* isolates

ESBL	PMQR	犬源菌株数 Number of dog-associated isolates	猫源菌株数 Number of cat-associated isolates	乌龟源菌株数 Number of tortoise-associated isolates
TEM		6		
TEM	<i>qnrB</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	2		
TEM	<i>qnrS</i>		3	
TEM+CTX-M			1	
TEM+CTX-M+SHV+OXA-2	<i>qnrS</i>			1
TEM+CTX-M+OXA-2			1	
TEM+SHV				2
TEM+SHV	<i>qnrB</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	2		
TEM+SHV+OXA-2		1		1
TEM+SHV+OXA-2	<i>qnrA</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>		1	
TEM+SHV+OXA-2	<i>qnrS</i>	2		
TEM+OXA-2			1	1
TEM+OXA-2	<i>qnrB</i>	1		
TEM+OXA-2	<i>qnrD</i>		1	
TEM+OXA-2	<i>qnrS</i>		1	
SHV		1		
SHV+OXA-2				1
SHV+OXA-2	<i>qnrB</i>	1		
SHV+OXA-2	<i>qnrS</i>	1		
OXA-2		2		
OXA-2	<i>qnrS</i> + <i>oqxB</i>	1		
	<i>qnrB</i>	1		
	<i>qnrS</i>	1		
		4		

qepA 基因; 1 株猫源菌株携带 *qnrA* 基因, 7 株犬源菌株携带 *qnrB* 基因, 1 株猫源菌株携带 *qnrD* 基因, 10 株菌携带 *qnrS* 基因, 1 株犬源菌株携带 *oqx*B 基因, 5 株菌携带 *aac(6')-Ib-cr* 基因; 大多数菌株仅携带一个 PMQR 基因, 包括 3 个携带 *qnrB* 的菌株、9 个携带 *qnrS* 的菌株、1 个携带 *qnrD* 的菌株, 4 个菌株的 PMQR 基因形式为 *qnrB+aac(6')-Ib-cr*, 1 个菌株的 PMQR 基因形式为 *qnrA+aac(6')-Ib-cr*, 1 个菌株的 PMQR 基因形式为 *qnrS+oqx*B (表 5)。

ESBL 基因往往可与 PMQR 基因同时存在于一个质粒, 在 ESBL 阳性菌株中, 48.57% 的菌株 (17 株) 同时有 PMQR 基因, *bla_{TEM}+qnrS* 为优势组合, 共有 3 株菌。各有 1 株菌仅携带 *qnrB* 或 *qnrS* 基因而不携带 ESBL 基因。有 4 株犬源菌株不携带任何 ESBL 和 PMQR 基因, 同时也对所有三、四代头孢菌素类及氟喹诺酮类药物和氨曲南敏感, 占犬源菌株的 15.38%。

3 讨论与结论

沙门氏菌是我国流行最严重、造成发病人数最多的人兽共患病病原菌。宠物作为沙门氏菌的重要宿主, 其导致人类感染的威胁应引起重视, 特别是近十年来我国宠物饲养数量的迅速扩大及宠物老龄化导致的用药量增加造成体内耐药菌株增多, 使耐药沙门氏菌对公共卫生的威胁不容忽视^[10]。重庆市北碚区宠物体内沙门氏菌的携带率在 4% 左右, 与在乌鲁木齐^[11]、徐州^[12]两地的研究相比分离率较低, 但与合肥的研究结果^[13]较为相似。

在北碚区分离的沙门氏菌对抗菌药物的耐药率较其他地区低^[11-13], 但多重耐药菌株比例较高, 多重耐药菌株占分离菌株数的 82.92%, 而且已经出现了五重、六重耐药的情况。本研究分离的菌株对氨苄西林、链霉素、四环素类、酰胺醇类和磺胺

类药物耐药较为严重。其原因可能有 3 点: (1) 如氨苄西林、头孢唑啉、头孢噻肟、磺胺类药物等是宠物发病时常用的治疗药物, 在宠物使用抗菌药物过程中体内的沙门氏菌获得耐药。(2) 我国在可食用动物中使用抗菌药物较多, 如经常使用青霉素类抗生素、氟苯尼考等。由于人们购买、食用、丢弃动物性食品以及这些动物粪便在环境中的散播, 宠物在外出时接触环境中的可食用动物源沙门氏菌, 这些沙门氏菌的耐药基因是在宠物疾病诊疗中不常使用的抗菌药物的耐药基因。(3) 宠物诊疗过程中的人药兽用等不规范用药造成碳青霉烯类和单环内酰胺类药物耐药。

本研究分离的菌株中 85.37% 的菌株检测到携带耐 β -内酰胺类的 ESBL 基因, 特别是 *bla_{TEM}* 基因在分离菌株中广泛存在, 这与 β -内酰胺类药物在宠物疾病诊疗中的大量使用密切相关。一项在泰国的研究^[14]也显示, 犬、猫分离的沙门氏菌 *bla_{TEM}* 基因检出率高达 40%, 这与我们的研究结果相似; 但这些菌株不携带 *bla_{SHV}* 基因, 却有 2 株携带 *bla_{PSE}* 基因。在我国的相关研究中, 猪源和鸡源沙门氏菌中 *bla_{CTX-M}* 基因的检出比例较高^[15-17]。本研究中 *bla_{TEM}* 为 ESBL 优势基因, 这与可食用动物中 ESBL 基因类型有较大差异。

同一质粒可同时携带 PMQR 基因与 ESBL 基因, 因此, 很大一部分 ESBL 基因阳性菌株往往也携带 PMQR 基因^[15]。在我们的研究中, 48.57% 的 ESBL 基因阳性菌株也是 PMQR 基因阳性, 但 PMQR 基因的携带率较 ESBL 基因的携带率低, 这和分离菌株对 β -内酰胺类药物和氟喹诺酮类药物的耐药情况趋势相同, 其中 *qnrS* 的流行率最高。这一结果也与泰国的研究结果相似, 在该研究中, 除了 *qnrS*, 未检测到其他 PMQR 基因^[14]。在本研究中, 携带 PMQR 基因的菌株数量高于耐氟喹诺酮类药物菌株数量, 这可能与 ESBL 基因的大量存在相关, 但 PMQR 基因能低水平传播对氟喹诺酮

药物的耐药,并通过导致染色体基因突变进一步促进对氟喹诺酮类药物的高水平耐药^[18]。因此,虽然重庆市北碚区宠物源沙门氏菌对氟喹诺酮类药物的耐药水平较低,但其潜在的对氟喹诺酮类药物的高水平耐药潜力不容忽视。

本研究在重庆市北碚区采集的 1 038 份宠物粪便样品中分离到沙门氏菌 41 株,这些分离菌对磺胺异噁唑、氨苄西林、四环素、多西环素的耐药率较高,而且大部分菌株为多重耐药菌株;分离的菌株大部分携带 ESBL 基因,以 *bla*_{TEM} 最为流行;大约 50% 的菌株携带 PMQR 基因。上述结果表明在重庆市北碚区宠物体内的沙门氏菌存在耐药菌株,特别是多重耐药菌株,其耐药性的产生与耐药质粒的存在关系较为密切。

致谢: 西南大学附属中学王芊兮、余梓熠、张予乐 3 位同学参与了部分试验,冉秋霞、张兵娟老师为样品采集提供了较多帮助,在此致谢。

REFERENCES

- [1] Stevens MP, Humphrey TJ, Maskell DJ. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2009, 364(1530): 2709-2723
- [2] Sato Y, Mori T, Koyama T, Nagase H. *Salmonella* Virchow infection in an infant transmitted by household dogs[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2000, 62(7): 767-769
- [3] Anderson TC, Marsden-Haug N, Morris JF, Culpepper W, Bessette N, Adams JK, Bidol S, Meyer S, Schmitz J, Erdman MM, et al. Multistate outbreak of human *Salmonella typhimurium* infections linked to pet hedgehogs—United States, 2011-2013[J]. Zoonoses and Public Health, 2017, 64(4): 290-298
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015
- [5] Chen S, Zhao SH, White DG, Schroeder CM, Lu R, Yang HC, McDermott PF, Ayers S, Meng JH. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 1-7
- [6] Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae*[J]. APMIS, 2007, 115(12): 1400-1408
- [7] Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan JE, Raney P, Tenover FC. Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46(12): 3829-3836
- [8] Qiao J, Zhang Q, Alali WQ, Wang JW, Meng LY, Xiao YP, Yang H, Chen S, Cui SH, Yang BW. Characterization of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Salmonella* in retail raw chicken carcasses[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 248: 72-81
- [9] Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(3): 490-495
- [10] Walther B, Tedin K, Lübke-Becker A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 200: 71-78
- [11] Xuan HY, Lin YJ, Gao C, Wumaierjiang-Yahefu, Xia LN. Detection of drug resistance and resistant genes of *Salmonella* and *Staphylococcus* from pet dog[J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2019, 47(3): 14-20 (in Chinese)
轩慧勇, 林亚军, 高超, 吾买尔江·牙合甫, 夏利宁. 宠物犬源沙门氏菌和葡萄球菌耐药性及耐药基因检测[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(3): 14-20
- [12] Wei LL, Yang C, Shao WF, Sun TZ, Wang JY, Zhou ZK, Chen CF, Zhu AH, Pan ZM. Prevalence and drug resistance of *Salmonella* in dogs and cats in Xuzhou, China[J]. Journal of Veterinary Research, 2020, 64(2): 263-268
- [13] Chen CR, Zhou NN, Han MM, Wei JZ, Sun P, Li Y. Antimicrobial resistance and PFGE molecular typing of *Salmonella* isolated from pet dog and dog food[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(7): 544-549 (in Chinese)
陈传荣, 周妮妮, 韩敏敏, 魏建忠, 孙裴, 李郁. 宠物犬及犬粮源沙门氏菌的耐药性分析及 PFGE 分型[J]. 中国

预防兽医学报, 2017, 39(7): 544-549

- [14] Srisanga S, Angkititrakul S, Sringam P, Le Ho PT, T Vo AT, Chuanchuen R. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes of *Salmonella enterica* isolated from pet dogs and cats[J]. Journal of Veterinary Science, 2017, 18(3): 273-281
- [15] Zhang WH, Lin XY, Xu L, Gu XX, Yang L, Li W, Ren SQ, Liu YH, Zeng ZL, Jiang HX. CTX-M-27 producing *Salmonella enterica* serotypes typhimurium and Indiana are prevalent among food-producing animals in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 436
- [16] Wang W, Zhao L, Hu YJ, Dottorini T, Fanning S, Xu J, Li FQ. Epidemiological study on prevalence, serovar diversity, multidrug resistance, and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases of *Salmonella* spp. from patients with diarrhea, food of animal origin, and pets in several provinces of China[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(7): e00092-20
- [17] Zhang CZ, Ding XM, Lin XL, Sun RY, Lu YW, Cai RM, Webber MA, Ding HZ, Jiang HX. The emergence of chromosomally located *bla*_{CTX-M-55} in *Salmonella* from foodborne animals in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1268
- [18] Xu GF, An W, Wang HD, Zhang XY. Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang Province, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1103