

羊源沙门氏菌耐药性和耐药基因的检测

江萍 关茹飞 夏利宁* 徐志勇

(新疆农业大学 动物医学学院,乌鲁木齐 830052)

摘要 为掌握新疆某养殖场羊源沙门氏菌对常用抗菌药物的耐药情况,并了解其携带部分相关耐药基因的流行现状及 β -内酰胺酶、16S rRNA 甲基化酶和喹诺酮类耐药基因(Plasmid mediated quinolone resistance, PMQR)的共存情况。使用琼脂稀释法对分离的沙门氏菌进行药敏试验,通过 PCR 方法进行 bla_{TEM} 、 bla_{CMY-2} 、 bla_{CTX-M} 、 bla_{LAP-1} 、 bla_{KPC} 、 bla_{OXA} 、 bla_{SHV} 等 β -内酰胺酶和 $armA$ 、 $rmtB$ 等 16S rRNA 甲基化酶及 $qnrA$ 、 $qnrB$ 、 $qnrC$ 、 $qnrD$ 、 $qnrS$ 、 $qepA$ 、 $oqxA$ 、 $oqxB$ 和 $aac(6')-Ib-cr$ 等 PMQR 基因检测,分析阳性菌株携带的基因型与耐药表型之间的关系。结果显示新疆该羊养殖场分离的沙门氏菌对被检的 12 种抗菌药物耐药率超过 80% 的有 6 种。47 株菌携带 bla_{TEM} 基因,34 株菌携带 bla_{OXA} 基因;未检出 $armA$ 和 $rmtB$ 等 16S rRNA 甲基化酶。33 株菌携带 $qnrS$,46 株菌携带 $oqxA$,46 株菌携带 $oqxB$,47 株菌携带 $acc(6')-Ib-cr$ 基因。新疆该养殖羊场分离株耐药现象严重,携带耐药基因以 bla_{TEM} 、 bla_{OXA} 、 $qnrS$ 、 $aac(6')-Ib-cr$ 、 $oqxA$ 和 $oqxB$ 为主,耐药基因型复杂多变、呈多样化发展,应该加强对 β -内酰胺酶及 PMQR 因子的监控。

关键词 沙门氏菌;羊;抗菌药物;耐药基因

中图分类号 S852.61

文章编号 1007-4333(2017)09-0055-09

文献标志码 A

Detection of the antibiotic resistance and related resistance genes of *Salmonella*

JIANG Ping, GUAN Rufe, XIA Lining*, XU Zhiyong

(College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract In order to understand the antibiotic resistance and epidemic status of some resistance genes of *Salmonella* isolated from a sheep farm in Xinjiang, and investigate their coexistences with β -lactamases, 16S rRNA methylation enzyme genes and PMQR, the minimum inhibitory concentrations of *Salmonella* were determined by agar dilution method. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect β -lactamases including bla_{TEM} , bla_{CMY-2} , bla_{CTX-M} , bla_{LAP-1} , bla_{KPC} , bla_{OXA} and bla_{SHV} , 16S rRNA methylation enzyme genes ($armA$ and $rmtB$) and PMQRs ($qnrA$, $qnrB$, $qnrC$, $qnrD$, $qnrS$, $qepA$, $oqxA$, $oqxB$ and $aac(6')-Ib-cr$). The relationship between the genotypes and resistance phenotypes of positive strains were analyzed. The results showed that the resistance rate of *Salmonella* to 6 kinds of antimicrobial drugs was more than 80%. It was found that a total of 47 strains carrying bla_{TEM} gene, 34 strains carrying the gene bla_{OXA} , no 16S rRNA methylase $armA$ and $rmtB$ detected, 33 strains carrying $qnrS$, 46 strains carrying $oqxA$, 46 strains carrying $oqxB$, and 47 strains carrying $acc(6')-Ib-cr$ genes. Strains isolated from the sheep farm displayed high resistance to antimicrobial drugs in Xinjiang. bla_{TEM} , bla_{OXA} , $qnrS$, $aac(6')-Ib-cr$, $oqxA$ and $oqxB$ were mainly detected resistance genes in *Salmonella*. And resistant genotypes were also diversifying and complex suggesting that monitoring β -lactamase enzymes and PMQR factors should be strengthened.

Keywords *Salmonella*; sheep; antimicrobial drugs; resistance gene

收稿日期: 2016-08-19

基金项目: 国家自然科学基金-新疆联合基金项目(U1503185)

第一作者: 江萍, 硕士研究生, E-mail: jp78860@163.com

通讯作者: 夏利宁, 教授, 主要从事兽医药理与毒理学研究, E-mail: xln750530@163.com

沙门氏菌(*Salmonella*)被公认为是全球主要的动物源传染病之一,且位于引发食源性疾病病原菌榜单前列^[1],各国频繁报道其引发食物中毒的事件^[2-3]。据相关报道,在我国养殖业中抗菌药物被大量运用实际生产,动物性食品可成为危害人类的耐药性细菌的“蓄水池”^[5]及耐药基因的“贮存库”^[6]。新疆是我国重要牧区,畜牧业一直是新疆地方经济发展的支柱产业,而养羊业在新疆畜牧业占有举足轻重的地位,目前国内关于猪源和鸡源沙门氏菌耐药性研究报道较多,但鲜见有关羊源沙门氏菌耐药性及耐药基因检测方面的研究报道。本研究拟对新疆地区某养殖场羔羊直肠粪样进行沙门氏菌的分离鉴定,了解该养殖场羔羊携带沙门氏菌的情况,并通过药敏试验掌握该养殖场沙门氏菌的耐药情况,同时对部分相关耐药基因进行检测,探究耐药基因与细菌耐药表型之间的关系,以期今后指导该养殖场临床合理使用常规抗菌药物提供科学依据,减少耐药菌株的数量,降低兽药残留的风险。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2015年12月从新疆石河子周边某羊场存栏量为800只1月龄的胡羊中采集101份肛拭子样品,从中分离出试验用沙门氏菌52株。标准质控菌株为*E. coli* ATCC25922,购于杭州天和微生物试剂有限公司。其中携带 *bla*_{TEM}、*armA*、*rmtB*、*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD* 和 *aac(6')-Ib-cr* 基因的阳性质粒由中国农业大学动物医学学院药理与毒理实验室惠赠,携带 *bla*_{CMY-2}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{LAP-1}、*bla*_{KPC}、*bla*_{OXA}、*bla*_{SHV}、*qnrS*、*qepA*、*oqxA* 和 *oqxB* 基因的阳性质粒由本实验室经过测序鉴定携带上述基因的阳性菌株提取。

麦康凯琼脂、SS琼脂、沙门氏菌显色培养基、三糖铁琼脂、普通肉汤和 Mueller-Hinton(MH)培养基均购于北京奥博星生物技术有限公司。

喹诺酮类:乳酸环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP),含量99.7%;诺氟沙星(Norfloxacin, NOF),含量99.6%;恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR),含量100%。氨基糖苷类:硫酸安普霉素(Apramycin, APR),含量55.8%;卡那霉素(Kanamycin, KANA),含量77.4%;阿米卡星(Amikacin, AMK),含量65.5%;庆大霉素(Gentamicin,

GEN),含量54.6%。 β -内酰胺类:阿莫西林(含量86.6%)/克拉维酸(含量100%)(Amoxicillin/clavulanic acid, A/C);头孢噻呋(Ceftiofur, CEF),含量100%;氨苄西林(Ampicillin, AMP),含量86.5%。四环素类:四环素(Tetracycline, TE),含量95%。酰胺醇类:氟苯尼考(Florfenicol, FFC),含量98%。上述药品均为标准品,购置于中国兽医药品监察所。

1.2 试验方法

1.2.1 沙门氏菌的分离鉴定

将采集好的肛拭子样品放入1 mL灭菌的肉汤EP管中,37℃恒温培养12 h后用接种环划线于SS培养基上,37℃恒温培养12~24 h,挑取平板菌落形态为中间黑色周边无色菌落的疑似沙门氏菌,将其划线于沙门氏菌显色培养基上37℃恒温培养12~24 h,在显色培养基上紫红色菌落初步鉴定为沙门氏菌,挑取单菌落,-20℃保存备用。根据沙门氏的 *invA*^[7] 基因具有高度保守的特性,扩增目的片段大小582 bp^[8],上游引物为 F:5'-AGC CGC TCA GTA TTG AGG AA-3',下游引物为 R:5'-GTT GTA CCG TGG CAT GTC TG-3',鉴定是否为沙门氏菌阳性菌株。

1.2.2 沙门氏菌药敏试验及其判定方法

按照美国临床实验室标准委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute)^[9]推荐的琼脂稀释法,对分离的52株沙门氏菌进行上述12种抗菌药物最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)测定。

1.2.3 DNA的提取

天根生化科技有限公司细菌基因组DNA提取试剂盒。

1.2.4 耐药基因检测

分别扩增主要的 β -内酰胺酶基因包括 *bla*_{TEM}、*bla*_{CMY-2}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{LAP-1}、*bla*_{KPC}、*bla*_{OXA}、*bla*_{SHV} 和16S rRNA甲基化酶基因 *armA*、*rmtB*^[10-13];分别扩增 PMQR 基因包括: *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*qepA*、*oqxA*、*oqxB* 和 *aac(6')-Ib*^[14-17]。上述基因的引物由上海生物工程技术有限公司合成。用 *BstF5I* 酶对 *aac(6')-Ib* 的PCR产物进行酶切,若有 *-cr* 变异存在, *aac(6')-Ib* 丢失 *BstF5I* 酶的酶切位点,通过凝胶电泳图的条带即可判断 *aac(6')-Ib* 是否存在 *-cr* 变异。各PCR反应引物序列和运行参数见表1。

表 1 PCR 引物序列和反应运行参数

Table 1 Primer sequences and parameters of PCR reaction

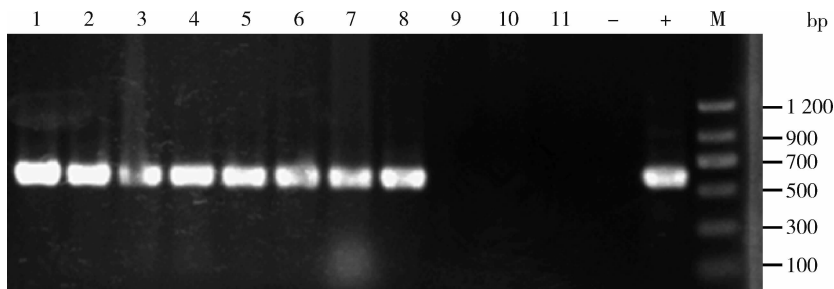
目的基因 Target gene	引物 Primer	序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature	参考文献 Reference
<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{SHV}-F</i>	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	55	[10]
	<i>bla_{SHV}-R</i>	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA		
<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{TEM}-F</i>	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	50	[10]
	<i>bla_{TEM}-R</i>	ACGCTCACCGGCTCCAGATTT		
<i>bla_{CMY-2}</i>	<i>bla_{CMY-2}-F</i>	ACAGCCTCTTTCTCCACATT	57	[11]
	<i>bla_{CMY-2}-R</i>	ATTGCTCTTCGTAATCATT		
<i>armA</i>	<i>armA-F</i>	GGGTVTTACTATTCTGCCTAT	50	[11]
	<i>armA-R</i>	ATTCCCTTCTCCTTTCCAG		
<i>rmtB</i>	<i>rmtB-F</i>	TTTCTGCGGGCGATGTAA	58	[11]
	<i>rmtB-R</i>	AGTTCTGTTCGATGGTCTTT		
<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{KPC}-F</i>	CGAACCATTTCGCTAAACTCG	55	[11]
	<i>bla_{KPC}-R</i>	CTCGCTGTACTTGTATCCTTG		
<i>bla_{OXA}</i>	<i>bla_{OXA}-F</i>	TTTTCTGTTGTTTGGGTTTC	58	[12]
	<i>bla_{OXA}-R</i>	TTTCTTGGCTTTTATGGTTG		
<i>qnrA</i>	<i>qnrA-F</i>	TCAGCAAGAGGATTTCTCA	48	[14]
	<i>qnrA-R</i>	GGCAGCACTATTACTCCCA		
<i>qnrB</i>	<i>qnrB-F</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	53	[15]
	<i>qnrB-R</i>	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
<i>qnrC</i>	<i>qnrC-F</i>	GGGTTGTACATTTATTGAATC	50	[16]
	<i>qnrC-R</i>	TCCACTTTACGAGGTTCT		
<i>qnrD</i>	<i>qnrD-F</i>	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	55	[17]
	<i>qnrD-R</i>	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS-F</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA	55	[15]
	<i>qnrS-R</i>	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
<i>oqxA</i>	<i>oqxA-F</i>	CTCGGCGCGATGATGCT	57	[18]
	<i>oqxA-R</i>	CCACTCTTCACGGGAGACGA		
<i>oqxB</i>	<i>oqxB-F</i>	TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC	64	[18]
	<i>oqxB-R</i>	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA		
<i>qepA</i>	<i>qepA-F</i>	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	60	[19]
	<i>qepA-R</i>	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG		
<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-F</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	55	[20]
	<i>aac(6')-Ib-R</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGT		

2 结果与分析

2.1 羊源沙门氏菌分离鉴定

对采集 101 份羔羊粪便进行沙门氏菌初步分离

鉴定,通过沙门菌显色培养基及 PCR 方法进行分子生物学鉴定,部分 PCR 鉴定结果如图 1 所示。共分离出试验菌株 52 株,分离率为 51.5%。



1~11,羊源疑似沙门氏菌;+,阳性对照;M,DNA marker;- ,阴性对照。

1-11,suspected *Salmonella* isolated from sheep;+,positive control;M,DNA marker;- ,negative control.

图 1 疑似沙门氏菌 PCR 鉴定结果

Fig. 1 PCR identification results of suspected *Salmonella*

2.2 羊源沙门氏菌对被检 12 种抗菌药物耐药情况

分离的沙门氏菌对被检 12 种抗菌药物表现出不同程度的耐药(表 2):被检的喹诺酮类药物中,沙门氏菌对诺氟沙星耐药性较严重(45/52,86.5%);被检氨基糖类药物中;对卡那霉素(44/52,84.6%)和阿莫西林/克拉维酸钾(43/52,82.7%)耐药性较

严重;被检测的 β -内酰胺酶类药物中,对阿莫西林/克拉维酸(43/52,82.7%)和氨苄西林(42/52,80.8%)耐药较严重;对四环素(47/52,90.4%)和氟苯尼考(48/52,92.3%)耐药较严重。试验菌对恩诺沙星的中介率较高,仅对 12 种抗菌药物中的阿米卡星和头孢噻呋敏感。

表 2 羊源沙门氏菌对 12 种抗菌药物耐药情况

Table 2 Resistance rates of *Salmonella* isolated from sheep to 12 antimicrobial drugs %

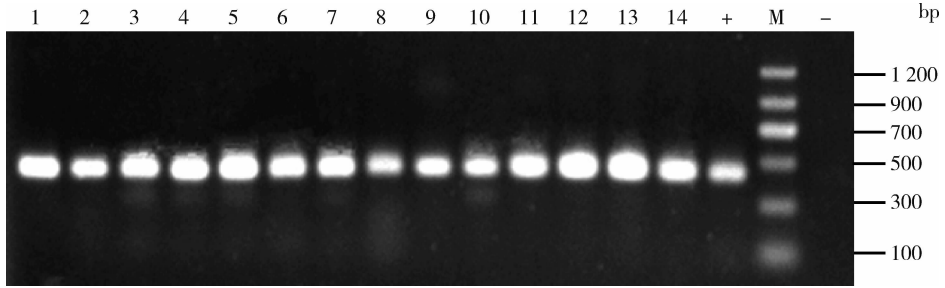
抗菌药物 Drug	敏感率 Sensitive ratio	中介率 Intermediary ratio	耐药率 Resistance ratio
环丙沙星 CIP	7.7	30.8	61.5
诺氟沙星 NOF	11.6	1.9	86.5
恩诺沙星 ENR	11.6	86.5	1.9
安普霉素 APR	98.1	0	1.9
卡那霉素 KANA	13.5	1.9	84.6
阿米卡星 AMK	100.0	0	0
庆大霉素 GEN	98.1	0	1.9
阿莫西林/克拉维酸钾 A/C	11.5	5.8	82.7
头孢噻呋 CEF	100.0	0	0
氨苄西林 AMP	19.2	0	80.8
四环素 TE	9.6	0	90.4
氟苯尼考 FFC	7.7	0	92.3

2.3 羊源沙门氏菌耐药基因扩增结果

2.3.1 β-内酰胺酶和 16S rRNA 甲基化酶基因检测情况

对 52 株沙门氏菌进行 *bla*_{TEM}、*bla*_{CMY-2}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{LAP-1}、*bla*_{KPC}、*bla*_{OXA}、*bla*_{SHV} 和 16S rRNA 甲基化酶

基因 *armA*、*rmtB* 检测(图 2 和图 3),携带 β-内酰胺酶类耐药基因有 47 株,其中 47 株菌(90.4%,47/52)携带 *bla*_{TEM} 基因,34 株菌(65.4%,34/52)携带 *bla*_{OXA} 基因;未检出 16S rRNA 甲基化酶基因 *armA* 和 *rmtB*。
*bla*_{TEM} 和 *bla*_{OXA} 检测目的片段大小与预期结果一致。

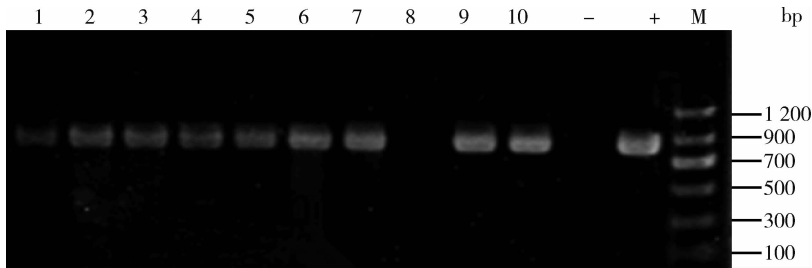


1~14,羊源菌 *bla*_{TEM} 阳性条带;+,阳性对照;- ,阴性对照;M,DNA marker.

1-14, *bla*_{TEM} positive band of strains from sheep;+, positive control;- ,negative control;M,DNA marker.

图 2 羊源菌 *bla*_{TEM} 基因扩增结果

Fig. 2 *bla*_{TEM} PCR amplification of strains from sheep



1~10,羊源菌 *bla*_{OXA} 阳性条带;+,阳性对照;- ,阴性对照;M,DNA marker.

1-10, *bla*_{OXA} positive band of strains from sheep;+, positive control;- ,negative control;M,DNA marker.

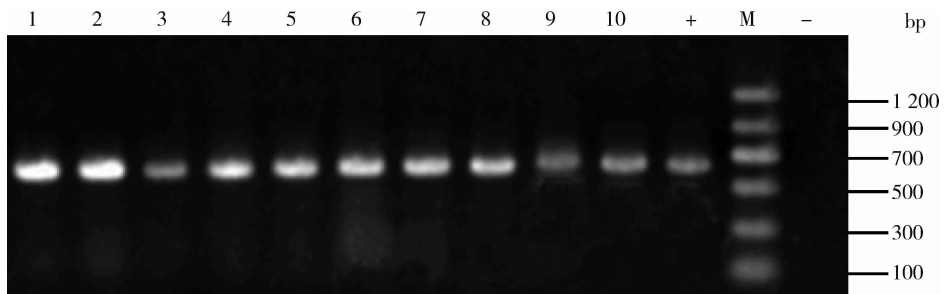
图 3 羊源菌 *bla*_{OXA} 基因扩增结果

Fig. 3 *bla*_{OXA} PCR amplification of strains from sheep

2.3.2 PMQR 因子检测情况

对 52 株沙门氏菌进行 PMQR 基因 (*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*qepA*、*oqxA*、*oqxB* 和 *aac* (6')-*Ib-cr*) 检测,结果发现 47 株沙门氏菌携带

PMQR 因子,其中:有 33 株菌(63.4%,33/52)携带 *qnrS*,46 株菌(88.5%,46/52)携带 *oqxA*,46 株菌(88.5%,46/52)携带 *oqxB*,47 株菌(90.4%,47/52)携带 *acc* (6')-*Ib-cr* 基因。电泳检测结果见图 4~图 7,



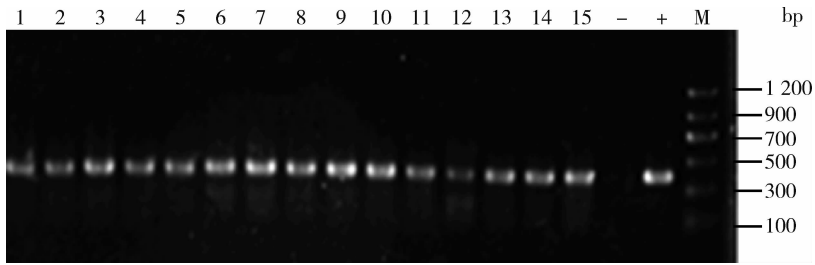
1~10,羊源菌 *qnrS* 阳性条带;+,阳性对照;- ,阴性对照;M,DNA marker.

1-10, *qnrS* positive band of strains from sheep;+, positive control;- ,negative control;M,DNA marker.

图 4 羊源菌 *qnrS* 基因扩增结果

Fig. 4 *qnrS* PCR amplification of strains from sheep

仅检测出 *qnrS*、*oqxA*、*oqxB* 和 *aac(6')-Ib*，*aac(6')-Ib* 的 PCR 产物不能被 *BstF5I* 酶切
aac(6')-Ib，检测目的片段大小与预期结果一致。（图 8）。

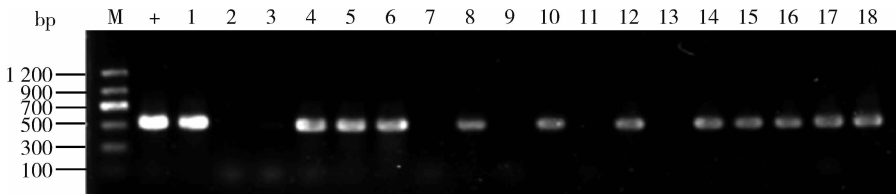


1~15, 羊源菌 *oqxA* 阳性条带; +, 阳性对照; -, 阴性对照; M, DNA marker.

1-15, *oqxA* positive band of strains from sheep; +, positive control; -, negative control; M, DNA marker.

图 5 羊源菌 *oqxA* 基因扩增结果

Fig. 5 *oqxA* PCR amplification of strains from sheep

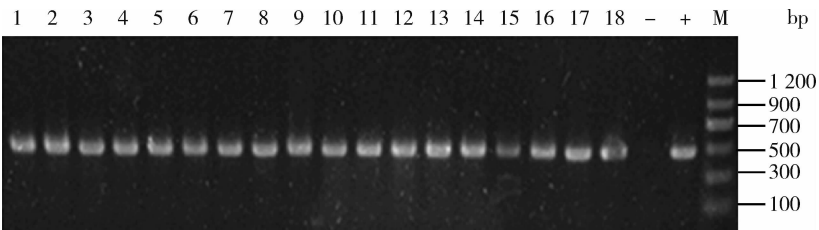


1~18, 羊源菌 *oqxB* 阳性条带; +, 阳性对照; M, DNA marker.

1-18, *oqxB* positive band of strains from sheep; +, positive control; M, DNA marker.

图 6 羊源菌 *oqxB* 基因扩增结果

Fig. 6 *oqxB* PCR amplification of strains from sheep

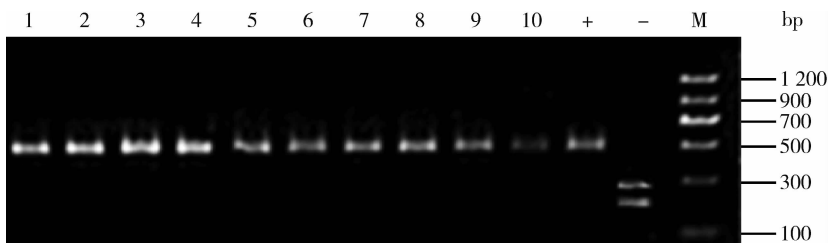


1~18, 羊源菌 *acc(6')-Ib* 阳性条带; +, 阳性对照; -, 阴性对照; M, DNA marker.

1-18, *acc(6')-Ib* positive band of strains from sheep; +, positive control; -, negative control; M, DNA marker.

图 7 羊源菌 *acc(6')-Ib* 基因扩增结果

Fig. 7 *acc(6')-Ib* PCR amplification of strains from sheep



1~10, 部分菌 *BstF5I* 单酶切条带; M, DNA marker; -, 阴性对照; +, 阳性对照。

1-10, section *BstF5I* single enzyme bands; M, DNA marker; -, negative control; +, positive control.

图 8 *aac(6')-Ib* 的 *BstF5I* 酶切

Fig. 8 *aac(6')-Ib* of *BstF5I* digestion

2.4 羊源沙门氏菌携带耐药基因共存情况

分离的羊源菌株中存在 11 种共存基因类型。共存基因主要以 *bla*_{TEM}、*bla*_{OXA}、*qnrS*、

aac(6′)-*Ib-cr*、*oqxA* 和 *oqxB* 组合,或者以 *bla*_{TEM}、*bla*_{OXA}、*qnrS*、*aac*(6′)-*Ib-cr*、*oqxA* 和 *oqxB* 组合为主(表 3)。

表 3 耐药基因共存情况

Table 3 Coexistence resistance genes

基因型 Genotype	菌株数 No. of strains	百分率/% Rate
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>qnrS</i> + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i> + <i>oqxA</i> + <i>oqxB</i>	24	46.2
<i>bla</i> _{TEM} + <i>qnrS</i> + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i> + <i>oqxA</i> + <i>oqxB</i>	7	13.5
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i> + <i>oqxA</i> + <i>oqxB</i>	6	11.5
<i>bla</i> _{TEM}	5	9.6
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i> + <i>oqxA</i> + <i>oqxB</i>	3	5.8
<i>bla</i> _{TEM} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i> + <i>oqxA</i> + <i>oqxB</i>	3	5.8
<i>qnrS</i> + <i>oqxA</i> + <i>oqxB</i>	2	3.8
<i>bla</i> _{TEM} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i>	1	1.9
<i>bla</i> _{TEM} + <i>qnrS</i> + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i> + <i>oqxA</i> + <i>oqxB</i>	1	1.9

3 讨论与结论

3.1 羊源沙门氏菌耐药结果

从耐药测定结果可以看出,该养殖场分离的沙门氏菌耐药情况严重,其中:对被检的氟苯尼考的耐药率达 92.3%(48/52);对四环素的耐药率达 90.4%(47/52);对被检的 12 种药物耐药率超过 80%的药物有 6 种包括氟苯尼考、四环素、诺氟沙星、卡那霉素、氨苄西林和阿莫西林/克拉维酸。该养殖场对已经耐药的药物在治疗疾病时应慎重选择,尽量避免使用此类药物,降低耐该种药物的耐药率上升的风险。本研究结果与四川省王晶晶等^[21]报道的分离 25 株山羊源沙门氏菌对 15 种抗菌药物中 14 种产生耐药的的结果以及林纯居等^[22]报道的食源性沙门氏菌对被检 20 种抗菌药物中 95.6%的菌株对 3 种以上的药物耐药的的结果相似。从耐药谱型来看,分离的羊源沙门菌存在 6 种耐药谱,主要以环丙沙星-诺氟沙星-四环素-卡那霉素-氨苄西林-阿莫西林/克拉维酸-氟苯尼考为主,耐药谱广且多样,说明养殖场细菌耐药情况严重且呈现多样性发展,因此养殖场在使用上述抗菌药物进行临床治疗疾病时应慎重选择。

3.2 羊源沙门氏菌携带耐药基因

细菌产生耐药性与细菌自身结构特性、生存环

境、耐药性基因相互传递及药物的常规使用情况等因素有关,其中细菌对药物的耐药趋势与其携带的耐药基因也有很大关系^[23]。本研究通过对部分耐药基因检测,发现新疆羊源沙门氏菌携带 *bla*_{TEM}、*bla*_{OXA}、*qnrS*、*aac*(6′)-*Ib-cr*、*oqxA* 和 *oqxB* 这 6 种耐药基因,主要以 *bla*_{TEM}、*aac*(6′)-*Ib-cr*、*oqxA* 和 *oqxB* 为主。其中 *bla*_{TEM} 为 β-内酰胺酶类主要检出基因型,携带率为 90.4%,与 xia 等^[11]报道的对山东猪场猪源大肠杆菌 *bla*_{TEM} 携带率 98.5%;与南海辰等^[24]报道的对新疆羊源大肠杆菌 *bla*_{TEM} 携带率为 100%的结果相似,说明在肠杆菌科中 *bla*_{TEM} 是 β-内酰胺酶类主要检出的基因。PMQR 因子检测结果显示:该养殖场主要以携带 *qnrS*、*aac*(6′)-*Ib-cr*、*oqxA* 和 *oqxB* 这 4 种耐药基因,其中 *aac*(6′)-*Ib-cr* 在 PMQR 中检出率最高,达 90.4%。与夏绪进等^[25]对新疆昌吉地区大肠杆菌检测相比,检出的 PMQR 基因类型一致,但检出结果存在差异。*qnrS* 检出率 1.0%~63.2%;其次为 *aac*(6′)-*Ib-cr* 检出率 0.2%~90.0%;*oqxA* 的检出率 29.3%~46.3%;*oqxB* 的检出率 29.3%~45.5%;与之相比,*qnrS*(63.4%)和 *aac*(6′)-*Ib-cr*(90.4%)的检出率相近,但 *oqxA*(88.5%)和 *oqxB*(88.5%)的检出率明显高于上述结果^[24]。分析其原因,可能由于各个地区经济发展不同,用药背景不同,致使耐药菌株

携带基因型也可能存在差异,本研究发现该养殖场分离的沙门氏菌以携带 *bla*_{TEM}、*aac*(6′)-*Ib-cr*、*oqx*A 和 *oqx*B 为主,因此,该养殖场在饲养中应避免或者减少使用该类抗菌药物。有关动物源细菌耐药性研究发现耐药菌株可通过多种途径传播给人类^[26];耐药基因不仅可以位于染色体上还可能位于可移动元件上,耐药菌株可在动物和人类病原菌之间相互转移和传播^[27],增加治疗动物疾病的困难,同时也给人类的健康安全带来风险。

3.3 羊源沙门氏菌携带耐药基因与耐药表型之间的关系

通过对分离菌株携带的耐药基因与耐药表型检测结果的比较发现,细菌耐药表型和携带耐药基因存在一定的关系,未携带被检耐药基因的耐药菌株也可能存在其他未检测或未知的耐药基因,以及不同的耐药机制。耐药菌株可通过移动元件将耐药基因传递给敏感菌株,也可能通过克隆传播传递耐药基因,一旦细菌获得耐药基因可导致特定药物临床治疗效果不佳、危害公共安全。了解其耐药机制也有助于防控耐药菌株。研究报道显示携带 PMQR 因子的阳性菌株与含有 β-内酰胺酶类基因的菌株传播与流行显著相关,其中携带 PMQR 因子的阳性菌株中检出 β-内酰胺酶类耐药基因的发生率达到 60%~80%,甚至在某些地区的检出率更高^[28]。在 *E. coli* 中 PMQR 的耐药机制与染色体介导的耐药机制具有协同作用,由 β-内酰胺酶、16S rRNA 甲基化酶基因及 PMQR 因子的存在可促使 *E. coli* 染色体发生高水平耐药突变^[29],沙门氏菌作为肠杆菌科的一员,也可能存在该类现象。细菌耐药现象日趋严重,在长期药物选择的压力下是细菌产生耐药的主要原因,细菌携带耐药基因存在相互传播的风险。因此,有必要加强对沙门氏菌中携带 PMQR 因子、β-内酰胺酶及 16S rRNA 甲基化酶的监测及防控措施的研究。

本研究发现沙门氏菌对被检药物耐药现象严重,以 *bla*_{TEM}、*bla*_{OXA}、*qnr*S、*aac*(6′)-*Ib-cr*、*oqx*A 和 *oqx*B 耐药基因为主,耐药基因型复杂多变、呈多样化发展,应加强对 β-内酰胺酶及 PMQR 因子的监控。

参考文献 References

[1] 曹正花,谭艾娟,吕世明,王雄,杜国琴. 贵州省猪源沙门氏菌对

β-内酰胺类药耐药性及耐药基因分析[J]. 中国畜牧兽医, 2016,43(7):1737-1742

Cao Z H, Tan A J, Lv S M, Wang X, Du G Q. Analysis of drug resistance and resistant genes of *Salmonella* to β-lactams antimicrobial agents isolated from pigs in Guizhou Province [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(7):1737-1742 (in Chinese)

[2] 侯雪娇,韦平. 国内外动物源食品安全动态[J]. 广西畜牧兽医, 2014,30(1):50-52

Hou X J, Wei P. Domestic and foreign animal origin food safety [J]. *Guangxi Journal of Animal Husbandry and Veterinary*, 2014,30(1):50-52 (in Chinese)

[3] Fearnley E, Raupach J, Lagala F, Cameron S. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146(3):219-227

[4] Majowicz S E, Musto J, Scallan E, Angulo F J, Kirk M, O'Brien S J, Jones T F, Fazil A, Hoekstra R M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2010,50(6):882-889

[5] 刘冬香,刘书亮,王印,张晓利,居华,张兴. 四川省动物性食品中金黄色葡萄球菌的分离鉴定及污染分析[J]. 食品科学, 2009,30(8):251-254

Liu D X, Liu S L, Wang Y, Zhang X L, Ju H, Zhang X. Isolation, identification and contamination analysis of *Staphylococcus aureus* in animal food in Sichuan [J]. *Food Science*, 2009,30(8):251-254 (in Chinese)

[6] Zou L K, Wang H N, Zeng B, Zhang A Y, Li J N, Li X T, Tian G B, Wei K, Zhou Y S, Xu C W, Yang Z R. Phenotypic and genotypic characterization of β-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from swine[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011,149(1/2):139-146

[7] Shanmugasamy M, Velayutham T, Rajeswar J. *InoA* genespecific PCR for detection of *Salmonella* from boilers[J]. *Veterinary World*, 2011,4(12):562-564

[8] 李琳. 沙门氏菌环丙沙星耐药性诱导及其耐药分子机制研究[D]. 北京:中国农业大学,2008

Li L. Studies on induction and molecular mechanisms of ciprofloxacin-resistant *Salmonella*[D]. Beijing:China Agricultural University,2008 (in Chinese)

[9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement [S]. *Clinical and Laboratory Standards Institute Documents M100-S22*. CLSI,2012

[10] Monstein H J, Ostholm-Balkhed A, Nilsson M V, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson L E. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae* [J]. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2007,115(12):1400-1408

[11] Xia L N, Tao X Q, Shen J Z, Dai L, Wang Y, Chen X, Wu C M. 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 Pathog Diseases*, 2011,8(12):1241-1248

- [12] Poirel L, Cattoir V, Soares A, Soussy C J, Nordmann P. Novel ambler class a β -lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(2): 631-637
- [13] Lim K T, Yeo C C, Yasin R M, Balan G, Thong K L. Characterization of multidrug-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Malaysian hospitals[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58(11): 1463-1469
- [14] Guerra B, Helmuth R, Thomas K, Beutlich J, Jahn S, Schroeter A. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Salmonella* spp isolates from reptiles in Germany [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(9): 2043-2045
- [15] Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park C H, Jacoby G, Barrett T J, Medalla F, Chiller T M, Hooper D C. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica* [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43(3): 297-304
- [16] Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 1892-1897
- [17] Cavaco L M, Hasman H, Xia S, Aarestrup F M. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(2): 603-608
- [18] Rodríguez-Martínez J M, Díaz de Alba P, Briaies A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez Baño J, Martínez-Martínez L, Pascualá. Contribution of *oqxAB* efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(1): 68-73
- [19] 夏利宁. 不同来源喹诺酮耐药大肠杆菌耐药基因的流行性调查及其传播机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2010
Xia L N. Molecular epidemiology of resistance genes among quinolone-resistance *Escherichia coli* from different sources and molecular mechanism of transmission [D]. Beijing: China Agricultural University, 2010 (in Chinese)
- [20] Park C H, Robicsek A, Jacoby G A, Sahm D, Hooper D C. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(11): 3953-3955
- [21] 王晶晶, 夏宾雁, 岳华, 汤承. 四川省部分地区山羊沙门氏菌健康带菌率及耐药性调查[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(2): 472-477
Wang J J, Xia B Y, Yue H, Tang C. Prevalence and resistance analysis of *Salmonella* clinical healthy goats in Sichuan Province [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 42(2): 472-477 (in Chinese)
- [22] 林居纯, 覃春红, 赖婧, 舒刚, 吴聪明. 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 J C, Tan C H, Lai J, Shu G, Wu C M. 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 (in Chinese)
- [23] 刘芳萍, 赵玉林, 李昌文, 刘立新, 李睿, 罗鹏志, 卢斯亮, 张秀英. 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 F P, Zhao Y L, Li C W, Liu L X, Li R, Luo P Z, Lu S L, Zhang X Y. 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 (in Chinese)
- [24] 南海辰, 底丽娜, 夏利宁. 新疆多源喹诺酮类耐药大肠杆菌耐药基因检测及分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(20): 4096-4108.
Nan H C, Di L N, Xia L N. Detection and analysis of resistance genes in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates from different livestock in Xinjiang [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(20): 4096-4108 (in Chinese)
- [25] 夏绪进, 程伟华, 夏利宁, 苏战强, 林亚军. 新疆昌吉地区猪源喹诺酮耐药大肠杆菌 PMQR 因子检测及分析[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(4): 95-101.
Xia X J, Cheng W H, Xia L N, Su Z Q, Lin Y J. Detection and analysis of PMQR determinants in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates from swine in Xinjiang Changji area [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2016, 21(4): 95-101 (in Chinese)
- [26] 刘贵深, 于涛. 食源性沙门氏菌耐药性及质粒介导喹诺酮耐药基因检测[J]. 生物技术通报, 2014(8): 202-207.
Liu G S, Yu T. Study on antimicrobial resistance and plasmid-mediated quinolone resistance of foodborne *Salmonella* isolates [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(8): 202-207 (in Chinese)
- [27] 戴建华, 吴植, 袁维峰. 禽源致病性沙门氏菌耐药表型与耐药基因的分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(4): 245-248
Dai J H, Wu Z, Yuan W F. Analysis of resistant phenotypes and resistant genes of pathogenic *Salmonella* from avian [J]. *Chinese animal husbandry and veterinary medicine*, 2014, 41(4): 245-248 (in Chinese)
- [28] 陈聪. 40 株 PMQR 基因阳性大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中 ESBLs 流行特征的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013
Chen C. The epidemic features of ESBLs in PMQR genes positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2013 (in Chinese)
- [29] 李德喜, 刘建华, 张素梅, 李新生, 陈玉霞, 杜向党, 胡功政, 苑丽. 猪源大肠杆菌质粒和染色体介导的喹诺酮类药的耐药机制[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(9): 1262-1265.
Li D X, Liu J H, Zhang S M, Li X S, Chen Y X, Du X D, Hu G Z, Yuan L. Mechanism of plasmid-and chromosome-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from pigs [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 31(9): 1262-1265 (in Chinese)