

2015—2017年新疆动物源鼠伤寒沙门菌耐药性分析

轩慧勇¹ 宋强强¹ 刘雪莲² 宋超慧¹ 徐琦琦¹ 秦蕾¹ 夏利宁^{1*}

(1. 新疆农业大学 动物医学学院, 乌鲁木齐 830052;

2. 北京大北农科技集团股份有限公司, 北京 100192)

摘要 为完善新疆动物源鼠伤寒沙门菌耐药的相关数据,为多重耐药病原菌的防控提供依据,本研究检测了2015—2017年新疆不同动物源鼠伤寒沙门菌的流行情况、耐药特性及耐药基因携带率。对经选择性培养基和特异性PCR鉴定的不同动物源鼠伤寒沙门菌,通过琼脂稀释法进行环丙沙星等12种抗菌药物的最小抑菌浓度测定,同时采用PCR方法测定耐药基因在鼠伤寒沙门菌中的携带情况。结果表明:从不同动物中共分离获得162株鼠伤寒沙门菌,分离率由高到低依次为宠物(犬和猫)、猪、羊、牛和鸡;药敏试验显示,不同动物源鼠伤寒沙门菌对环丙沙星、氨苄西林、四环素和氟苯尼考的耐药率>80.0%,未检出对阿米卡星和磷霉素耐药的耐药菌株。从不同动物源分离的162株鼠伤寒沙门菌中有159株菌为多重耐药菌株,占98.1%;不同动物源鼠伤寒沙门菌多重耐药均以CIP-AMP-TET-FFC-SMZ 5耐谱型为主。经耐药基因分析,不同动物源鼠伤寒沙门菌耐药基因检出率为6.8%~97.4%,未检出 bla_{SHV} 、 $qnrD$ 、 $rmtB$ 和 $mcr-1$ 基因。综上,鼠伤寒沙门菌在新疆不同动物中流行率高,耐药现象严重,多重耐药菌株较多且耐药基因携带率高,部分不同动物源菌株间具有相同的耐药表型和耐药基因型。应加强畜牧业抗菌药物使用的管理制度,进而控制鼠伤寒沙门菌耐药性的发展趋势。

关键词 不同动物源; 鼠伤寒沙门菌; 耐药性; 耐药基因

中图分类号 S859.7

文章编号 1007-4333(2021)02-0088-10

文献标志码 A

Drug resistance of *Salmonella* Typhimurium isolated from animals in Xinjiang, 2015 – 2017

XUAN Huiyong¹, SONG Qiangqiang¹, LIU Xuelian², SONG Chaohui¹, XU Qiqi¹, QIN Lei¹, XIA Lining^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Beijing Dabeinong Technology Group Co. Ltd., Beijing 100192, China)

Abstract In order to investigate the drug resistance of *Salmonella* typhimurium isolates of animal origin and provide the support data for the prevention of multidrug resistant pathogens, the prevalence of *S. typhimurium* isolates, antimicrobial resistance profiles and relevant resistance genes were characterized in Xinjiang, from 2015 to 2017. Selective medium and specific PCR were used to isolate *S. typhimurium* strains. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ciprofloxacin and other 12 antimicrobial agents were determined by Agar dilution method according to CLSI recommendation. Several PCR sets were designated to detect different resistance genes in these isolates. A total of 162 *S. typhimurium* strains were obtained from different animals, and the isolation rate from high to low was pet (dog and cat), pig, sheep, cattle and chicken. The MIC tests showed that resistance rates of ciprofloxacin, ampicillin, tetracycline and florfenicol were more than 80.0%, while no resistant to amikacin and fosfomycin were observed. Among the 162 strains of *S. typhimurium* isolates, 159(98.1%) strains exhibited multi-resistance. The most common resistance profile was CIP-AMP-TET-FFC-SMZ for *S. typhimurium* strains from detected animals. The detection rate of resistance genes of *S. typhimurium* was between 6.8% and 97.4%, bla_{SHV} , $qnrD$, $rmtB$ and $mcr-1$ genes were not detected. In conclusion, the prevalence of *S. typhimurium* in different animals in Xinjiang is very high, and the phenomenon of drug resistance is serious. There are many multi-drug resistant strains and higher carrying rate of drug

收稿日期: 2020-07-03

基金项目: 国家自然科学基金-地区基金项目(31860714), 国家重点研发计划(2017YFE0114400)

第一作者: 轩慧勇, 博士研究生, E-mail: 18935881007@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

resistance gene. Some stains of different animal origin have the same resistance phenotype and drug resistance genotype. The management system of antibiotic use in animal husbandry should be strengthened to control the development trend of drug resistance of *S. typhimurium*.

Keywords different animal origin; *Salmonella typhimurium*; drug resistance; drug resistance genes

鼠伤寒沙门菌是重要的人兽共患肠道致病菌,同时也是临床常见的非伤寒沙门菌致病血清型^[1],对动物和人的感染率和致病力都很高。在抗菌药物的选择压力下,多重耐药(Multi-drug resistance, MDR)鼠伤寒沙门菌的检出率迅速增加并呈全球化扩散,在欧美和亚非等世界各地广泛传播^[2-3]。Kijima等^[4]、Porter等^[5]和Wang等^[6]均报道鼠伤寒沙门菌的耐药率有逐年上升趋势,耐药问题已成为公共安全卫生领域的核心问题之一。耐药基因的携带是耐药菌株产生耐药的主要原因之一,耐药基因可位于细菌的染色体上或质粒上,在人和动物的肠道内通过水平方式和垂直方式进行耐药基因/质粒等的传递,造就超级细菌^[7],还可以通过医院、养殖场的废水及动物和人的排泄物排放至环境造成污染,由此带来的耐药问题和食品安全问题也越来越严重。而有关新疆动物源鼠伤寒沙门菌的耐药情况鲜见报道,鼠伤寒沙门菌在新疆多种动物中的分布及基因携带情况尚不明确。

本研究以新疆地区2015—2017年3年内分离的宠物源(犬和猫)、鸡源、牛源、羊源和猪源鼠伤寒沙门菌为研究对象,分离不同动物源的鼠伤寒沙门菌,旨在了解不同动物源鼠伤寒沙门菌的流行情况、耐药性以及耐药基因携带情况,对耐药株的防控具有重要意义,同时为深入了解鼠伤寒沙门菌的多重耐药机制提供材料和基础数据。

1 材料与方法

1.1 质控菌株和试验用沙门菌

大肠埃希标准质控菌(ATCC25922)购自天和微生物试剂有限公司(杭州);试验用沙门菌来源于新疆农业大学动物医学学院药理实验室2015—2017年期间分离鉴定并保存的不同动物源沙门菌。菌株背景:2015年乌鲁木齐宠物源(犬和猫)沙门菌39株;2016年伊犁地区猪源沙门菌38株、牛源沙门菌99株和鸡源沙门菌62株;2016年焉耆地区猪源沙门菌27株、牛源沙门菌62株、鸡源沙门菌85株和羊源沙门菌17株;2017年石河子地区采集猪源沙门菌81株。共有不同动物源沙门菌510份,从中

鉴定获得的鼠伤寒沙门菌用于试验。

1.2 培养基及试剂

氯化镁孔雀绿增菌液(Rappaport-Vassiliadis Medium, MM)、MH(Mueller-Hinton)培养基、SS琼脂和沙门显色培养基均购自奥博星生物技术有限公司(北京);甘油和50×TE缓冲液购自生工生物工程(上海)股份有限公司;2 000 DNA Maker购自天根生化科技(北京)有限公司;BstF5I酶购自NEB公司;2×Taq PCR Master Mix、琼脂糖和核酸染料均购自天根生化科技有限公司(北京)。

1.3 沙门菌的复苏及模板的制备

对本实验室通过沙门显色培养基分离鉴定后得到的菌株进一步通过PCR扩增检测携带*invA*基因^[8]的沙门菌进行复苏,并进行模板的制备。方法为:挑取沙门菌单菌落于1 mL MH肉汤中,37℃ 200 rpm过夜培养,吸取200 μL菌液1 3000 g离心1 min弃上清;加500 μL 1×TE缓冲液重悬,13 000 g离心1 min弃上清;加200 μL 1×TE缓冲液重悬,沸水煮2 min,冰浴2 min;13 000 g离心5 min,取50~60 μL上清即DNA模板,-20℃保存备用。

1.4 沙门菌的血清型鉴定

根据沙门菌血清型特异性基因进行鼠伤寒沙门菌血清学鉴定,检出*spy*基因的沙门菌即为鼠伤寒沙门菌^[9],引物均根据文献由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表1。PCR扩增产物经测序比对,相似性>96%判定为该菌株的鉴定结果。

1.5 药敏试验

采用美国临床实验室标准化委员会(CLSI)发布的M100-S26抗微生物抗菌药物敏感性试验的执行标准^[10],运用琼脂稀释法进行12种抗菌药物最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MICs)的测定,依照CLSI2017版执行标准判定结果。测试药物包括临床常用抗菌药物以及部分备选抗菌药物:环丙沙星(CIP)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、氨苄西林(AMP)、头孢噻唑(CEF)、头孢曲松(CRO)、亚胺培南(IPM)、四环素(TET)、氟苯尼考(FFC)、多粘菌素(CL)、磺胺异恶唑(SMZ)和磷霉素(FOS)。

表1 本研究所用的引物信息

Table 1 Primer sequences information used in the study

基因 Gene	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度/°C Annealing temperature	片段大小/ bp Size
<i>spy</i>	<i>spy-F</i>	TTGTTCACTTTTTACCCCTGAA	60	401
	<i>spy-R</i>	CCCTGACAGCCGTTAGATATT		
<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{TEM}-F</i>	TCGCCGATACACTATTCTCAGAATGA	50	445
	<i>bla_{TEM}-R</i>	ACGCTCACCGGCTCCAGATTT		
<i>bla_{CMY-2}</i>	<i>bla_{CMY-2}-F</i>	ACAGCCTCTTTCTCCACATT	55	545
	<i>bla_{CMY-2}-R</i>	ATTGCCTCTTCGTAACCTCATT		
<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{SHV}-F</i>	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	55	747
	<i>bla_{SHV}-R</i>	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA		
<i>qnrD</i>	<i>qnrD-F</i>	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	55	468
	<i>qnrD-R</i>	AACAAGCTGAAGCGCTG		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS-F</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA	65	512
	<i>qnrS-R</i>	TAAATTGGCACCTGTAGGC		
<i>oqxB</i>	<i>oqxB-F</i>	TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC	51	619
	<i>oqxB-R</i>	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA		
<i>oqxA</i>	<i>oqxA-F</i>	CTCGGCGCGATGATGCT	57	393
	<i>oqxA-R</i>	CCACTCTTCACGGGAGACGA		
<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-F</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	55	482
	<i>aac(6')-Ib-R</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>tetA</i>	<i>tetA-F</i>	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	55	210
	<i>tetA-R</i>	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
<i>tetB</i>	<i>tetB-F</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	55	659
	<i>tetB-R</i>	GTAATGGGCCAATAACACCG		
<i>rmtB</i>	<i>rmtB-F</i>	TTTCTGCGGGCGATGTAA	58	612
	<i>rmtB-R</i>	AGTTCTGTTCCGATGGTCTTT		
<i>aadA2</i>	<i>aadA2-F</i>	CGGTGACCATCGAAATTTTCG	54	250
	<i>aadA2-R</i>	CTATAGCGCGGAGCGTCTCGC		
<i>ant(3'')-Ia</i>	<i>ant(3'')-Ia-F</i>	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC	58	526
	<i>ant(3'')-Ia-R</i>	ATTGCCAGTCGGCAGCG		
<i>floR</i>	<i>folR-F</i>	CTTTGTCGCTTCCGTCTACTT	60	125
	<i>folR-R</i>	AACTGAAAAGGCCGTAGATGAC		
<i>sull</i>	<i>sull-F</i>	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC	60	433
	<i>sull-R</i>	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC		
<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1-F</i>	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	58	320
	<i>mcr-1-R</i>	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG		

1.6 耐药基因检测

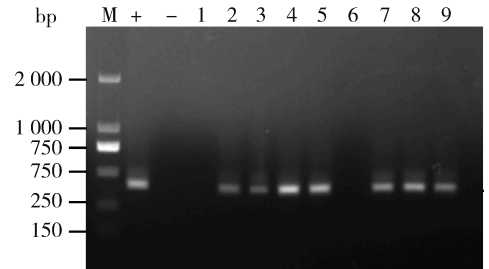
对分离鉴定的鼠伤寒沙门菌进行 β -内酰胺酶基因 (*bla*_{TEM}、*bla*_{CMY-2} 和 *bla*_{SHV})、氟喹诺酮耐药 (Plasmid mediated fluoroquinolone resistant, PMQR) 基因 (*qnrD*、*qnrS*、*oqxA*、*oqxB* 和 *aac(6')-Ib*)、四环素类耐药基因 (*tetA* 和 *tetB*)、氨基糖苷类耐药基因 (*rmtB*、*aadA2* 和 *ant(3'')-Ia*)、酰胺醇类耐药基因 (*floR*)、磺胺类耐药基因 (*sulI*) 和多肽类耐药基因 (*mcr-1*) 的检测^[11-14]。用 *BstF5I* 酶进行酶切已检出 *aac(6')-Ib* 基因的 PCR 产物, 如果存在 *-cr* 突变, *aac(6')-Ib* 基因因失去 *BstF5I* 酶的限制性位点不能被切开。

2 结果与分析

2.1 不同动物源鼠伤寒沙门菌的分离鉴定

510 份不同动物源沙门菌, 经 PCR 扩增检测 *spy* 基因后得到 162 株鼠伤寒沙门菌, 分离率为 31.8%。图 1 为部分 *spy* 基因 PCR 检测结果。不同动物源鼠伤寒沙门菌的分离率如下: 2015 年乌鲁木齐鼠伤寒沙门菌的分离率为 100.0%(39/39); 2016 年伊犁地区猪源、牛源和鸡源鼠伤寒沙门菌的分离率依次为 0%(0/38)、1.0%(1/99) 和 1.6%(1/62); 2016

年焉耆地区猪源、牛源、鸡源和羊源鼠伤寒沙门菌的分离率依次为 40.7%(11/27)、48.4%(30/62)、10.6%(9/85) 和 47.1%(8/17); 2017 年石河子猪源鼠伤寒沙门菌的分离率为 77.8%(63/81) (表 2)。



1~9: 试验菌株; M: DNA Marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照
1-9: Test strains, M: DNA Marker, +: Positive control, -: Negative control

图 1 部分鼠伤寒沙门菌 *spy* 基因检测

Fig. 1 PCR identification of *spy* gene in some *S. typhimurium*

对分离结果采用卡方检验进行统计学分析, 结果显示, 宠物源分离率显著高于其他动物源 ($P < 0.05$), 羊源和猪源分离率无统计学差异 ($P > 0.05$), 鸡源分离率最低 (表 2)。

表 2 动物源鼠伤寒沙门菌的分离情况

Table 2 Isolation of *S. typhimurium* of animal origin

来源 Source	沙门菌分离率/%(分离数/采样数) <i>Salmonella</i> isolation rate (Number of isolates/samples)	鼠伤寒沙门菌分离率/% <i>S. typhimurium</i> isolation rate
宠物源(犬、猫)Pet	39.0(39/100)	100.0(39/39)a
羊源 Sheep	8.5(17/200)	47.1(8/17)b
猪源 Pig	24.3(146/600)	50.7(74/146)b
牛源 Cattle	53.7(161/300)	19.3(31/161)c
鸡源 Chicken	24.5(147/600)	6.8(10/147)d
总计 Total	28.3(510/1 800)	31.8(162/510)

注: 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Note: Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$); The same letters indicate insignificant differences ($P > 0.05$).

2.2 动物源鼠伤寒沙门菌耐药及多重耐药情况

不同动物源鼠伤寒沙门菌对被检测的抗菌药物呈现高耐药和高敏感结果 (表 3), 耐药率从高到低

依次为宠物源, 羊源, 猪源, 牛源和鸡源。不同动物源鼠伤寒沙门菌对磺胺异恶唑的耐药率均为 100.0%, 对环丙沙星、氨苄西林、四环素和氟苯尼考

的耐药率超过 80.0%；其中，以宠物源鼠伤寒沙门菌耐药谱最宽，对被检测的 12 种抗菌药物中的 9 种抗菌药物耐药，羊源鼠伤寒沙门菌对其中 7 种抗菌药物耐药，其余动物源鼠伤寒沙门菌都对其中 5 种抗菌药物耐药；仅宠物源鼠伤寒沙门菌对头孢曲松和亚

胺培南各检出 1 株耐药菌株，对多粘菌素检出 2 株耐药菌株，其余动物源鼠伤寒沙门菌均对头孢曲松、亚胺培南和多粘菌素高度敏感，无耐药菌株检出；除猪源鼠伤寒沙门菌对庆大霉素检出 3 株耐药菌株外，其余动物源鼠伤寒沙门菌对庆大霉素无耐药菌株检出。

表 3 动物源鼠伤寒沙门菌对 12 种抗菌药物的耐药率

Table 3 Resistance rate of *S. typhimurium* from animals to 12 antimicrobial agents

%

药物 Drugs	宠物源(犬和猫) Pet	羊源 Sheep	猪源 Pig	牛源 Cattle	鸡源 Chicken
环丙沙星 CIP	100.0(39/39)	87.5(7/8)	94.6(70/74)	96.8(30/31)	80.0(8/10)
阿米卡星 AMK	0	0	0	0	0
庆大霉素 GEN	0	0	4.1(3/74)	0	0
氨苄西林 AMP	100.0(39/39)	100.0(8/8)	94.6(70/74)	93.5(29/31)	80.0(8/10)
头孢噻呋 CEF	2.6(1/39)	0	21.6(16/74)	0	0
头孢曲松 CRO	2.6(1/39)	0	0	0	0
亚胺培南 IPM	2.6(1/39)	0	0	0	0
四环素 TET	100.0(39/39)	100.0(8/8)	98.6(73/74)	96.8(30/31)	80.0(8/10)
氟苯尼考 FFC	94.9(37/39)	100.0(8/8)	97.3(72/74)	96.8(30/31)	80.0(8/10)
多粘菌素 CL	5.1(2/39)	0	0	0	0
磺胺异恶唑 SMZ	100.0(39/39)	100.0(8/8)	100.0(74/74)	100.0(31/31)	100.0(10/10)
磷霉素 FOS	0	0	0	0	0

注：括号内的数字表示耐药菌株数/菌株总数。

Note: Numbers in brackets indicate number of resistant trains/total numbers of strains.

162 株动物源鼠伤寒沙门菌多重耐药在 0~9 耐有分布，3 耐及 3 耐以上菌株占 98.1% (159/162)。不同动物源鼠伤寒沙门菌多重耐药均以 5 耐为主（宠物源 5 耐占 94.8%、牛源 5 耐占 93.6%、羊源 5 耐占 87.4%、鸡源 5 耐占 80.0%、猪源 5 耐占 71.5%）（表 4）。

162 株动物源鼠伤寒沙门菌共有 12 种耐药谱型，不同动物源鼠伤寒沙门菌耐药谱型均以 5 耐谱型 CIP-AMP-TET-FFC-SMZ 为主，且宠物源（94.8%）、牛源（93.6%）和羊源（87.5%）的 5 耐谱型菌株数达 85.0% 以上；以猪源鼠伤寒沙门菌耐药谱型最多，共有 7 种谱型，宠物源鼠伤寒沙门菌和牛源鼠伤寒沙门菌各有 3 种耐药谱型，而羊源和鸡源鼠伤寒沙门菌各有 2 种耐药谱型（表 5）。

2.3 动物源鼠伤寒沙门菌耐药基因检测

不同动物源鼠伤寒沙门菌均检出 β -内酰胺酶基

因、四环素基因、氨基糖苷类基因、酰胺醇类基因和磺胺类基因。除猪源菌以携带 β -内酰胺酶基因 *bla*_{CMY-2} (93.2%) 为主外，其余动物源菌以携带 *bla*_{TEM} 基因为主，*bla*_{TEM} 基因检出率在 60.0% 以上；不同动物源鼠伤寒沙门菌四环素耐药基因均以携带 *tetB* 基因为主，检出率高达 80.0% 以上，仅在猪源鼠伤寒沙门菌中检出 *tetA* (5.4%) 基因；不同动物源鼠伤寒沙门菌 PMQR 因子均以携带 *oqxA*、*oqxB* 和 *aac(6')-Ib-cr* 基因为主，检出率达 50.0% 以上，且 *aac(6)-Ib* 基因均存在 *-cr* 突变，仅在宠物源菌中检出 *qnrS* (97.4%) 基因。此外，不同动物源鼠伤寒沙门菌氨基糖苷类耐药基因以携带 *aadA2* 和 *ant(3'')-Ia* 为主，检出率达 60.0% 以上，对酰胺醇类耐药基因 *floR* 和磺胺类耐药基因 *sul1* 的检出率也在 50.0% 以上，不同动物源鼠伤寒沙门菌均未检出多肽类耐药基因 *mcr-1*（表 6）。

表 4 动物源鼠伤寒沙门菌多重耐药率

Table 4 Multidrug resistance rate of *Salmonella* Typhimurium isolated from animals

%

来源 Source	1 耐 1-resistance	2 耐 2-resistance	3 耐 3-resistance	4 耐 4-resistance	5 耐 5-resistance
宠物源(犬、猫) Pet	0	0	0	2.6(1/39)	94.8(37/39)
羊源 Sheep	0	0	0	12.5(1/8)	87.5(7/8)
牛源 Cattle	0	0	6.4(2/31)	0	93.6(29/31)
猪源 Pig	1.4(1/74)	0	2.7(2/74)	2	71.5(53/74)
鸡源 Chicken	20.0(2/10)	0	0	0	0
总和 Total	1.9(3/162)	0	2.5(4/162)	2.5(4/162)	77.8(126/162)

来源 Source	6 耐 6-resistance	7 耐 7-resistance	8 耐 8-resistance	9 耐 9-resistance
宠物源(犬、猫) Pet	0	0	0	0
羊源 Sheep	0	0	0	0
牛源 Cattle	21.6(16/74)	0	0	0
猪源 Pig	0	0	80.0(8/10)	0
鸡源 Chicken	9.9(16/162)	0	4.9(8/162)	0.5(1/162)
总和 Total	0	0	0	1.2(2/162)

注：括号内的数字表示多重耐药菌株数/菌株总数；1 耐是指对被检测的的其中一种抗菌药物耐药；2 耐是指对被检测的的 2 种抗菌药物同时耐药；3 耐至 9 耐以此类推。

Note: Numbers in brackets indicate number of multi-drug resistant trains/total number of strains; 1 resistance means that resistance to one of the antibiotics tested; 2 resistance refers to the simultaneous resistance of two antibiotics tested; 3 resistance to 9 resistance and so on.

表 5 动物源鼠伤寒沙门菌耐药谱型

Table 5 Drug resistance spectrum of *S.* Typhimurium isolated from animals

动物源(株) Animal origin	耐药谱型 Drug resistance spectrum	菌株数/株 Number of bacteria	多重耐药 Multidrug resistance	百分率/% Percentage
宠物源(犬、猫) Pet	CIP-AMP-TET-SMZ	1	4 耐	2.6
	CIP-AMP-TET-FFC-SMZ	37	5 耐	94.8
	CIP-AMP-CEF-CRO-IPM-TET-FFC-CL-SMZ	1	9 耐	2.6
羊源 Sheep	AMP-TET-FFC-SMZ	1	4 耐	12.5
	CIP-AMP-TET-FFC-SMZ	7	5 耐	87.5
	TET-FFC-SMZ	1	3 耐	3.2
牛源 Cattle	CIP-TET-SMZ	1	3 耐	3.2
	CIP-AMP-TET-FFC-SMZ	29	5 耐	93.6
	SMZ	1	1 耐	1.4
	TET-FFC-SMZ	2	3 耐	2.7
猪源 Pig	CIP-TET-FFC-SMZ	1	4 耐	1.4
	CIP-AMP-TET-SMZ	1	4 耐	1.4
	CIP-AMP-TET-FFC-SMZ	53	5 耐	71.5
	CIP-GEN-AMP-TET-FFC-SMZ	2	6 耐	2.7
鸡源 Chicken	CIP-AMP-CEF-TET-FFC-SMZ	14	6 耐	18.9
	SMZ	2	1 耐	20.0
	CIP-AMP-TET-FFC-SMZ	8	5 耐	80.0

表6 不同动物源鼠伤寒沙门菌耐药基因检测率

基因类别 Gene category	目的基因 Objective gene	Detection of drug resistance genes of <i>S. typhimurium</i> from different animal sources					%
		宠物源 Pet	羊源 Sheep	牛源 Cattle	猪源 Pig	鸡源 Chicken	
β-内酰胺酶 β-lactamase	<i>bla_{TEM}</i>	97.4(38/39)	62.5(5/8)	93.5(29/31)	6.8(5/74)	80.0(8/10)	
	<i>bla_{CMY-2}</i>	—	—	—	93.2(69/74)	—	
	<i>bla_{SHV}</i>	—	—	—	—	—	
四环素类 Tetracyclines	<i>tetA</i>	—	—	—	5.4(4/74)	—	
	<i>tetB</i>	97.4(38/39)	100.0(8/8)	96.8(30/31)	93.2(69/74)	80.0(8/10)	
PMQR 因子 PMQR	<i>qnrD</i>	—	—	—	—	—	
	<i>qnrS</i>	97.4(38/39)	—	—	—	—	
	<i>oqxA</i>	94.9(37/39)	62.5(5/8)	90.3(28/31)	93.2(69/74)	80.0(8/10)	
	<i>oqxB</i>	94.9(37/39)	62.5(5/8)	93.5(29/31)	93.2(69/74)	80.0(8/10)	
	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	97.4(38/39)	50.0(4/8)	93.5(29/31)	93.2(69/74)	70.0(7/10)	
氨基糖苷类 Aminoglyco- sides	<i>rmlB</i>	—	—	—	—	—	
	<i>aadA2</i>	94.9(37/39)	62.5(5/8)	93.5(29/31)	93.2(69/74)	80.0(8/10)	
	<i>ant(3)-Ia</i>	97.4(38/39)	62.5(5/8)	93.5(29/31)	93.2(69/74)	80.0(8/10)	
酰胺醇类 Amphenicols	<i>floR</i>	97.4(38/39)	50.0(4/8)	90.3(28/31)	98.6(70/74)	70.0(7/10)	
	<i>sulI</i>	97.4(38/39)	62.5(5/8)	93.5(29/31)	98.6(70/74)	80.0(8/10)	
多肽类 Polypeptides	<i>mcr1</i>	—	—	—	—	—	

注：“—”代表未检出；括号内的数字表示基因检出数/菌株总数。

Note: “—” means no detection, Numbers in brackets indicate number of gene detected/total number of straining.

4 讨 论

沙门菌是人畜共患病和食物中毒的主要食源性病原菌之一,除在自然界中分布极广外,鸡、鸭、猪、牛、羊等家禽和家畜动物肠道也广泛分布,给养殖业和食品安全造成潜在危害^[15]。鼠伤寒沙门菌是食源性沙门菌的优势血清型,如广西、河北、河南和广东等都有报道^[16]。本研究分离结果显示,不同动物源鼠伤寒沙门菌的整体分离率为31.8%,其中,以宠物源鼠伤寒沙门菌的分离率最高,达100.0%,羊源和猪源鼠伤寒沙门菌的分离率也达到47.0%以上。本研究从不同动物源中均分离出鼠伤寒沙门菌,说明鼠伤寒沙门菌在自然界中宿主广泛,若从蛋肉产品中检出耐药鼠伤寒沙门菌,则会存在安全隐患。此外,耐药鼠伤寒沙门菌可在人和动物之间通过食物链甚至是与宠物亲密接触时进行传递,为保障公共卫生安全,应加强耐药鼠伤寒沙门菌的监测。

本研究对新疆地区不同动物源分离的鼠伤寒沙门菌药敏试验结果显示,新疆地区鼠伤寒沙门菌耐药现象十分严重,以宠物源鼠伤寒沙门菌耐药谱最宽,对被检测的9种抗菌药物耐药,但对头孢噻唑、头孢曲松和亚胺培南均检出1株耐药株,可能是宠物主人擅自对宠物使用人用药物或不按疗程给宠物用药造成的。不同动物源鼠伤寒沙门菌对被检测的抗菌药物磺胺异恶唑的耐药率高达100.0%,与张增峰^[17]报道的上海市零售肉中和环境中鼠伤寒沙门菌的耐药结果一致,但耐药率高于夏宇飞等^[18]报道的湖南地区猪源及鸡源对磺胺异恶唑的耐药率(60.0%~70.0%),药敏结果显示出不同地区以及不同动物源由于使用抗菌药物的种类和剂量的差异,其耐药结果也相差较大^[17-18]。此外,不同动物源鼠伤寒沙门菌对环丙沙星、氨苄西林、四环素和氟苯尼考的耐药率高达80.0%以上,耐药率与罗学辉等^[19]报道的河水、食品及食源性疾病患者中鼠伤寒沙门菌耐药结果一致,分析原因可能是以上几种药物性价比高,容易获得,长期不合理的使用甚至滥用,导致高水平耐药菌株的出现。鼠伤寒沙门菌对庆大霉素、头孢噻唑、头孢曲松和多粘菌素的耐药率处于较低的水平,耐药率在2.6%~5.1%,可作为治疗细菌性疾病的备选药物,但由于鼠伤寒沙门菌要较其他血清型的沙门菌更易产生耐药性^[15],因此在治疗时要注意药物的使用频率和剂量,降低耐药

菌的产生率。

多重耐药结果显示,不同动物源鼠伤寒沙门菌多重耐药率达98.0%以上,与段瑶等^[20]报道的畜禽鼠伤寒沙门菌多重耐药率(90.44%)基本一致,本研究中以5耐菌株占比最高,达77.8%,8耐及以上耐药菌株占比达10.4%,多重耐药结果显示出新疆不同动物源鼠伤寒沙门菌对临床使用的很多抗菌药物已普遍产生耐药性,不仅耐药率高,并且对抗菌药物的交叉耐药现象严重,进而增加多重耐药菌的感染率。不同动物源鼠伤寒沙门菌共有12种耐药谱型,以猪源耐药谱型最多,有7种耐药谱型,分析原因是相对于其他动物,猪养殖基本趋于规模化,养殖过程中猪只更易感染细菌性疾病。此外,养殖场为了避免猪只患病,也可能会饲喂含有抗菌药物的饲料,故而猪只使用抗菌药物的频率和种类较其他动物多,因此猪源鼠伤寒沙门菌具有较宽的耐药谱型。本研究中不同动物源多重耐药优势表型为CIP-AMP-TET-FFC-SMZ,耐药谱宽,多重耐药严重。四环素、氟苯尼考和磺胺异恶唑都是长期使用在动物养殖过程中的药物,该耐药谱型的形成与这些抗菌药物的使用密切相关。此外,鼠伤寒沙门菌在用药的环境中,部分菌株通过染色体的局部抑制基因突变,抑制孔蛋白表达,进而使抗菌药物无法进入菌体内,也是沙门菌在长期进化过程中产生耐药性的原因^[21]。

细菌携带耐药基因是其耐药性产生和传播的主要原因之一。本研究对七大类16种耐药基因检测结果显示,不同动物源鼠伤寒沙门菌除对多肽类耐药基因未检出外,对其他六类被检测的抗菌药物的耐药基因均有检出,除猪源鼠伤寒沙门菌对 bla_{TEM} 和 $tetA$ 基因的检出率为6.8%和5.4%以外,不同动物源鼠伤寒沙门菌对其余检出的耐药基因的检出率高达50.0%以上,本研究耐药结果显示出新疆不同动物源鼠伤寒沙门菌耐药基因携带率很高。值得注意的是,鼠伤寒沙门菌对 β -内酰胺类药物耐药主要是由于产生 β -内酰胺酶,并以 bla_{TEM} 型、 bla_{CTX-M} 型、 bla_{OXA} 型和 bla_{SHV} 型较为常见^[21],本研究结果显示,宠物源、羊源和鸡源鼠伤寒沙门菌均以携带 bla_{TEM} 型为主,该耐药基因的检出率在62.5%以上,但猪源鼠伤寒沙门菌却以携带 bla_{CMY-2} 型为主,虽然都是介导对 β -内酰胺类药物的耐药,但不同动物源主要携带的耐药基因却不同。此外, bla_{TEM} 基因可以在不同菌株间进行水平传播和垂直传播,而携带 bla_{TEM} 基因的阳性菌株通常都带有多重耐药,给多

重耐药菌的防控造成巨大压力^[22]。此外,本试验发现耐药表型与耐药基因型不完全正相关,如羊源鼠伤寒沙门菌对酰胺醇类和磺胺类的耐药率高达100.0%,但相关耐药基因 *floR* 和 *sul1* 的检出率为50.0%~62.5%。耐药基因的位置、表达情况及不同耐药基因之间的相互作用会影响细菌对抗菌药物的耐药性,具体机制有待进一步研究。新疆地广人稀,故监测范围有限,且样本数量和样本收集年限有限,不能十分全面反映出新疆近年来不同动物源鼠伤寒沙门菌的耐药情况。应在全疆范围内加大对鼠伤寒沙门菌菌株的监测,进而提供更全面的结果。

综上,新疆不同动物源耐药鼠伤寒沙门菌分布广泛,对环丙沙星、氨苄西林、四环素、氟苯尼考和磺胺异恶唑等常用抗菌药物高度耐药,可根据药敏结果选用头孢噻唑和庆大霉素等敏感性较高的抗菌药物来提高疗效。不同动物源鼠伤寒沙门菌多重耐药严重,具有相同耐药谱型,且耐药基因携带率高,存在克隆传播的风险。为更全面掌握新疆动物源性鼠伤寒沙门菌的耐药情况,应对鼠伤寒耐药沙门菌进行长期监测,实现实验室和流行病学相结合的监测模式,进而更好的保护动物和人类健康。

参考文献 References

[1] 邱玉锋, 陈建辉, 黄梦颖, 杨劲松, 林杰, 陈爱平. 福建省鼠伤寒沙门菌 β -内酰胺耐药表型及 ESBLs 耐药基因分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(10): 944-949
Qiu Y F, Chen J H, Huang M Y, Yang J S, Lin J, Chen A P. Analysis on the relationship between lactam resistance phenotype and ESBLs resistance gene of *Salmonella* typhimurium in Fujian, China [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2019, 35(10): 944-949 (in Chinese)

[2] Peng M F, Salaheen S, Buchanan R L, Biswas D. Alterations of *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium antibiotic resistance under environmental pressure [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(19): e01173-18

[3] Ammar A M, Abdeen E E, Abo-Shama U H, Fekry E, Kotb Elmahallawy E. Molecular characterization of virulence and antibiotic resistance genes among *Salmonella* Serovars isolated from broilers in Egypt[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2019, 68(2): 188-195

[4] Kijima M, Shirakawa T, Uchiyama M, Kawanishi M, Ozawa M, Koike R. Trends in the serovar and antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella* Enterica from cattle and pigs between 2002 and 2016 in Japan[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 127(6): 1869-1875

[5] Porter S, Strain S A J, Bagdonaite G, McDowell S W, Bronckaers T, Sherrey M, Devine P, Pascual-Linaza A V, Spence N, Porter R, Guelbenzu-Gonzalo M, Davies R H, Lahuerta-Marin A. Trends in *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance in pigs and poultry in Northern Ireland between 1997 and 2016[J]. *Veterinary Record*, 2020, 186(5): 156

[6] Wang X C, Biswas S, Paudyal N, Pan H, Li X L, Fang W H, Yue M. Antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 985

[7] 罗铭, 谭冬梅, 瞿聪, 梁炎, 高海惠, 蒋宁. 禽、畜养殖场分离的优势血清型沙门菌耐药性和分子分型分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(1): 116-119
Luo M, Tan D M, Qu C, Liang Y, Gao H H, Jiang N. Drug resistance and molecular typing of predominant serotypes of *Salmonella* identified in poultry and livestock farms [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2020, 30(1): 116-119 (in Chinese)

[8] Heymans R, Vila A, van Heerwaarden C A M, Jansen C C C, Castelijin G A A, van der Voort M, Biesta-Peters E G. Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0206316

[9] 吴晓君. 华东地区沙门菌的流行病学调查及鼠伤寒沙门菌基因缺失弱毒疫苗的研制[D]. 扬州: 扬州大学, 2018
Wu X J. Epidemiological investigation of *Salmonella* in Eastern China and development of gene deletion attenuated vaccine of *Salmonella* typhimurium[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2018 (in Chinese)

[10] M100-S26. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; CLSI document twenty-six informational supplement[S]. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2016.

[11] 林亚军. 新疆不同地区动物源沙门氏菌耐药基因检测及 MLST 分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2018
Lin Y J. Detection of drug resistance genes and MLST analysis of *Salmonella* from different regions of Xinjiang[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2018 (in Chinese)

[12] 江萍. 新疆动物源沙门氏菌耐药性及 MLST 分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2017
Jiang P. Drug resistance and analysis of MLST of *Salmonella* from animals in Xinjiang[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2017 (in Chinese)

[13] Jiang H, Cheng H, Liang Y, Yu S T, Yu T, Fang J H, Zhu C. Diverse mobile genetic elements and conjugal transfer ability of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* isolates from *penaeus vannamei* and pork from large markets in Zhejiang, China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1787

- [14] Rebelo A R, Bortolaia V, Kjeldgaard J S, Pedersen S K, Leekitcharoenphon P, Hansen I M, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl J A, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier S A, Escobar C D F, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A, Hendriksen R S. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes [J]. *European Communicable Disease Bulletin*, 2018, 23(6): 17-00672
- [15] Proroga Y T R, Mancusi A, Peruzy M F, Carullo M R, Montone A M I, Fulgione A, Capuano F. Characterization of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant 1,4,[5], 12:i:- isolated from different sources [J]. *Folia Microbiologica*, 2019, 64(6): 711-718
- [16] 郑林, 祝令伟, 郭学军, 陈萍. 沙门氏菌主要流行血清型耐药性的研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(6): 8-12
Zheng L, Zhu L W, Guo X J, Chen P. Research progress of antimicrobial resistance of major epidemic serotypes of *Salmonella* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(6): 8-12 (in Chinese)
- [17] 张增峰. 上海市临床鼠伤寒沙门氏菌耐药性和食品载体溯源研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016
Zhang Z F. Antibiotic resistance and food vehicle of *Salmonella* Typhimurium in human infections in Shanghai, China [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016 (in Chinese)
- [18] 夏宇飞, 周汝顺, 黎满香. 湖南地区猪源和鸡源沙门氏菌的分离鉴定与耐药性分析 [J]. *湖南农业科学*, 2019(7): 4-8
Xia Y F, Zhou R S, Li M X. Isolation, identification and drug resistance of *Salmonella* from swine and chicken in Hunan [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2019(7): 4-8 (in Chinese)
- [19] 罗学辉, 黄邵军, 张建群, 杨元斌. 余姚市鼠伤寒沙门菌耐药性分析 [J]. *预防医学*, 2019, 31(5): 484-487
Luo X H, Huang S J, Zhang J Q, Yang Y B. Drug resistance of *Salmonella* Typhimurium in Yuyou [J]. *Preventive Medicine*, 2019, 31(5): 484-487 (in Chinese)
- [20] 段瑶, 李杰, 阚飙, 闫梅英. 2006—2016年我国畜禽动物源性沙门菌血清型分布及其耐药特征 [J]. *疾病监测*, 2019, 34(4): 296-302
Duan Y, Li J, Kan B, Yan M Y. Serotype distribution and drug resistance characteristics of livestock-borne *Salmonella* in China, 2006—2016 [J]. *Disease Surveillance*, 2019, 34(4): 296-302 (in Chinese)
- [21] 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]. 雅安: 四川农业大学, 2016
Yang D. Isolation, identification, resistance genes and mobile genetic elements detection of *Salmonella* from tibetan chicken in Ganzi, Sichuan [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [22] 申永秀, 周丽萍, 王艳, 王超, 巢国祥, 张小荣, 吴艳涛. 不同来源沙门氏菌耐药性及相关性研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2018(7): 1513-1517
Shen Y X, Zhou L P, Wang Y, Wang C, Chao G X, Zhang X R, Wu Y T. Antimicrobial resistance and correlation of *Salmonella* from different sources [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2018(7): 1513-1517 (in Chinese)

责任编辑: 秦梅