

动物源性沙门菌的血清型、生物被膜形成能力和耐药性分析

孙化露, 姜逸, 李树纯, 陈素娟, 张华, 张晓平, 田艳娜, 吴艳涛, 焦库华, 彭大新*

(扬州大学兽医学院, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

摘要: 本研究旨在探讨动物源性沙门菌的血清型分布、生物被膜形成能力及其耐药性。从不同动物病料中分离细菌, 以 PCR 方法鉴定沙门菌, 结合玻片凝集法和 16S rRNA 序列测定确定沙门菌的血清型和分布, 结晶紫染色定量法检测分离株的生物被膜形成能力, 药敏试验检测分离菌对常用药物的敏感性。结果共分离鉴定出 58 株沙门菌, 包括鸡白痢沙门菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、丙型副伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌、都柏林沙门菌和阿哥那沙门菌等 7 种血清型, 其中鸡群以鸡白痢沙门菌感染为主, 肠炎沙门菌次之; 水禽以鼠伤寒沙门菌感染为主。生物被膜测定结果显示 51.72% 的沙门菌分离株可形成生物被膜, 其中 83.33% 的鼠伤寒沙门菌可形成生物被膜。20 种抗生素(氨基糖苷类、磺胺类、喹诺酮类、林可酰胺类、氯霉素类、青霉素类、四环素类和头孢菌素类)敏感性试验表明所有菌株对林可霉素耐药, 51.72% 对 4 种及其以上抗生素耐药, 并出现了 1 株对所有受试抗生素均耐药的鼠伤寒沙门菌。结果表明鸡白痢沙门菌、鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌是目前在家禽中分离的优势血清型; 同时具有生物被膜形成能力和多重耐药性的沙门菌将对家禽疾病控制和公共卫生带来更大的威胁。

关键词: 沙门菌; 血清型; 生物被膜; 耐药性

中图分类号: S852.612

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)10-1630-09

Analysis of Serotype, Biofilm-forming Ability and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Strains Isolated from Animals

SUN Hua-lu, JIANG Yi, LI Shu-chun, CHEN Su-juan, ZHANG Hua, ZHANG Xiao-ping,
TIAN Yan-na, WU Yan-tao, JIAO Ku-hua, PENG Da-xin*

(College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The objective of this study was to investigate the distribution of serotypes, biofilm-forming ability and antimicrobial resistance of *salmonella* strains isolated from animals. *Salmonella* strains were isolated from diseased animals, identified by PCR combination with slide agglutination test and sequence analysis of 16S rRNA gene. Biofilm-forming ability of the isolates was detected by crystal violet assay, and antimicrobial resistance was determined by antibiotic susceptibility test. Fifty-eight strains were identified as *Salmonella* and belonged to seven subtypes, including Pullorum, Typhimurium, Enteritidis, Paratyphi-C, Paratyphi-B, Dublin and Agona. The chickens were mainly infected by *S. pullorum*, secondly by *S. enteritidis*, whereas the waterfowls were mainly infected by *S. typhimurium*. The results of biofilm formation test showed that 51.72% of the *salmonella* isolates could form biofilm, in which 83.3% of *S. typhimurium* could form biofilm. The susceptibility test of 20 antibiotics (including Aminoglycosides, Sulfonamides, Quinolones, Lincosamides, Amphenicols, Penicillins, Tetracyclines and Cephalo-

收稿日期: 2012-03-01

基金项目: 公益性行业(农业)专项(201003012); 国家自然科学基金(30871872); 国家现代农业产业技术体系(nycytx-41-G07; CARS-41-K08); 青蓝工程(苏教师[2010]27号); 江苏高校优势学科建设工程

作者简介: 孙化露(1986-), 男, 山东枣庄人, 硕士生, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: sdsxcsyzx@163.com

* 通讯作者: 彭大新, 教授, E-mail: daxinpeng@yahoo.com

sporins) revealed that all of the strains were resistant to lincomycin, and 51.72% of them were resistant to four and more than four antimicrobials, in which a strain of *S. typhimurium* displayed a high level of resistance to all test antibiotics. The results indicate that the dominant serotypes of *Salmonella* isolated from poultry are *S. pullorum*, *S. typhimurium* and *S. enteritidis*. The *Salmonella* with both biofilm-forming ability and multiple drug resistance will bring more serious threat to the control of poultry diseases and public health.

Key words: *Salmonella*; serotype; biofilm; antimicrobial resistance

沙门菌是一种对人和动物都非常重要的致病菌,它不但可引起多种畜禽疾病,造成全身性败血症和肠炎,还可以作为食源性疾病的病原体,引起人类胃肠炎和食物中毒^[1-2]。目前报道的血清型大约有 2 500 多种,多数属于肠道沙门菌,但不同血清型的沙门菌对不同动物的致病性存在差异。

生物被膜作为细菌在自然界存活的形式之一,是细菌在不利条件下继续生存所形成的一种特殊结构^[3]。沙门菌可形成生物被膜,细菌处于生物被膜状态可增强细菌对抗生素、热应激、消毒剂、pH 和机体免疫力等的抵抗力,这不仅使得沙门菌在动物饲养环境和肉食品加工更易存活,而且可能是造成持续感染的重要原因。

为了控制沙门菌引起的动物疾病,大量的抗菌药物应用于临床的预防和治疗。由于人们长期反复使用抗菌药物,加之用药的不合理,加剧了细菌耐药的严重程度,国内外相关研究已证明沙门菌多重耐药性的存在^[4-5]。本研究的目的旨在从不同发病动物分离沙门菌,测定其血清型、生物被膜形成能力及耐药表型的差异,为人和动物沙门菌的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 麦康凯琼脂培养基、琼脂粉、氯化钠等购自国药集团; YEAST EXTRACT、TRYPTONE 等购自英国 OXOID 公司; 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit、Agarose Gel DNA Purification Kit 购自 TaKaRa 公司; pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司; Hin6I、*Taq* DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、dNTP、 MgCl_2 、 $10 \times$ buffer 购于大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 菌株 鸡白痢沙门菌标准株 C533 和分离株 S6702, 鸡伤寒沙门菌标准株 Sg9, 肠炎沙门菌标准株 C50041 均由本实验室保存。

1.1.3 20 种药敏纸片 阿米卡星、强力霉素、氨苄西林、头孢曲松、新霉素、环丙沙星、头孢氨苄、庆大霉素、头孢唑啉、卡那霉素、青霉素 G、诺氟沙星、四环素、羧苄青霉素、复方新诺明、林可霉素、头孢噻肟、恩诺沙星、氯霉素和氟苯尼考购自杭州微生物试剂有限公司。

1.1.4 沙门菌属诊断血清(59 种) 购自兰州生物制品研究所(产品标准编号: YZB/国 0390-2009); O:12 单因子诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司。

1.1.5 病料 从江苏、山东、安徽、上海等地区送检的发病动物(包括鸡、鹅、鸭、鸽子、鹌鹑、猪等), 无菌采集其肝脏、脾脏、心脏、输卵管等, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.2 方法

1.2.1 病原的分离培养 无菌采集疑似沙门菌病的病料, 接种于麦康凯琼脂培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 ~ 48 h, 挑取白色透明的可疑菌落传一代, 再分别挑取单个菌落接种于普通液体 LB 和固体 LB, 培养 24 ~ 48 h, 获得纯培养物。

1.2.2 革兰氏染色 挑取纯培养后的单个菌落, 常规方法进行革兰氏染色, 高倍镜下观察细菌形态。

1.2.3 PCR 鉴定沙门菌 煮沸裂解法提取分离菌株的基因组 DNA, 扩增其 *invA* 基因片段(Forward primer: $5'$ -GTGAAATTATCGCCACGTTTCGG - GCAA-3'; Reverse primer: $5'$ -TCATCGCACCGT-CAAAGGAACC-3'), 预期条带大小 284 bp^[6]。PCR 扩增得到的片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下拍照。

1.2.4 血清型鉴定

1.2.4.1 玻片凝集试验: 按常规方法对分离的细菌进行玻片凝集试验, 先用沙门菌 A~F 群 O 抗原多价血清和 H 抗原多价血清检测, 再用 O 抗原和 H 抗原单因子血清分别鉴定。

1.2.4.2 PCR-RFLP 法鉴别鸡白痢与鸡伤寒沙门菌: 对于抗原模式相同的鸡白痢和鸡伤寒沙门菌, 按

参考文献的方法进行鉴别^[7]。

1.2.4.3 16S rRNA 测序:采用煮沸裂解法制备细菌基因组 DNA,根据 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 说明,用 Forward Primer 和 Reverse Primer 扩增其 16S rRNA 基因,阳性条带切胶回收,连接到 pGEM-T Easy Vector,按分子克隆所述的方法连接、转化,小量提取^[8],阳性质粒送南京金斯特科技有限公司进行测序。将测定的序列在 NCBI 网站进行 BLAST 搜索比对,进一步确定细菌种属(包括血清型),采用 MegAlign 软件进行菌株同源性分析^[9]。从 NCBI 网站下载参考株的 16S rRNA 序列:*S. pullorum* str. S09629, GU183553.1; *S. typhimurium* str. UK-1, CP002614.1; *S. typhimurium* str. NCTC 8391, Z49264.1; *S. enteritidis* str. CQ0709, FJ465088.1; *S. enteritidis* str. E6, EU118106.1; *S. paratyphi-C* str. C10, EU118099.1; *S. paratyphi-B* str. SPB7, NC_010102.1; *S. dublin* str. 57920, AF227868.1; *S. agona* str. SL483, NC_011149.1。以 Mega 4 软件绘制遗传进化树。

1.2.5 生物被膜测定 采用结晶紫染色定量法进行^[10],细菌过夜培养后 1:10 稀释于 TSB 培养基中,100 μ L 接种于 96 孔聚苯乙烯 U 型细胞培养

板,28 $^{\circ}$ C 静置培养 48 h,弃去上清,结晶紫染色,用酒精:丙酮=3:1 的溶液溶解后测 OD_{550 nm} 值,重复 3 次取平均值。

1.2.6 药敏试验 采用 K-B 琼脂扩散法进行,按 CLSI 2009 版的标准进行结果判定^[11]。

2 结果

2.1 沙门菌的初步鉴定

对在麦康凯上生长为白色透明、革兰氏染色阴性、形态为短杆状的细菌进一步培养,煮沸裂解法制备模板,扩增其 *invA* 基因,共筛选出 58 株沙门菌,它们均可扩增出 284 bp 左右的条带(图 1)。将它们分别命名为 S001~S058。

2.2 血清型鉴定

玻片凝集试验显示 58 株沙门菌分离株中,分属于 B、C1 和 D1 3 个群别的 7 种不同血清型,其中鸡白痢/鸡伤寒沙门菌 25 株,鼠伤寒沙门菌 18 株,肠炎沙门菌 8 株,丙型副伤寒沙门菌 2 株,乙型副伤寒沙门菌 2 株,都柏林沙门菌 2 株,阿哥那沙门菌 1 株(表 1)。

表 1 沙门菌分离株的来源、血清型及生物被膜形成能力的测定

Table 1 The source, serotype and biofilm-forming ability of *Salmonella* isolates

菌株 Strain	来源 Source	O 抗原 O antigen	H 抗原 H antigen	血清型 Serotype	结晶紫染色(OD _{550 nm}) Staining with Crystal Violet
S001	鸭 Duck	1, 9, 12	g, p	<i>S. dublin</i>	+ (0.70 \pm 0.14)
S002	鹅 Goose	1, 4, 5	b	<i>S. paratyphi-B</i>	+ (1.14 \pm 0.25)
S003	鸡 Chicken	1, 4, 5	b	<i>S. paratyphi-B</i>	- (0.12 \pm 0.04)
S004	鸡 Chicken	1, 4, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.11 \pm 0.03)
S005	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.13 \pm 0.05)
S006	鹅 Goose	1, 4, 5, 9, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.87 \pm 0.18)
S007	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.11 \pm 0.04)
S008	鸡 Chicken	1, 4, 7, 9	C	<i>S. paratyphi-C</i>	- (0.11 \pm 0.04)
S009	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.13 \pm 0.05)
S010	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.10 \pm 0.02)
S011	鸡 Chicken	1, 9, 12	g, m	<i>S. enteritidis</i>	+ (0.99 \pm 0.13)
S012	鸡 Chicken	1, 9, 12	g, m	<i>S. enteritidis</i>	+ (0.92 \pm 0.20)
S013	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.11 \pm 0.01)
S014	鹅 Goose	1, 4, 9, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.32 \pm 0.02)
S015	鸭 Duck	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.74 \pm 0.12)
S016	鸭 Duck	1, 4, 9, 12	g, m	<i>S. enteritidis</i>	+ (0.68 \pm 0.04)
S017	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.12 \pm 0.01)
S018	猪 Pig	1, 4, 5, 9	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (1.11 \pm 0.15)

(续表 1 Continued)

菌株	来源	O 抗原	H 抗原	血清型	结晶紫染色(OD _{550 nm})
Strain	Source	O antigen	H antigen	Serotype	Staining with Crystal Violet
S019	猪 Pig	4, 12	f, g, s	<i>S. agona</i>	- (0.12 ± 0.01)
S020	猪 Pig	1, 9, 12	g, p	<i>S. dublin</i>	- (0.12 ± 0.01)
S021	鸽 Pigeon	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	- (0.15 ± 0.04)
S022	鸽 Pigeon	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	- (0.13 ± 0.03)
S023	鹅 Goose	7	t, m, c	<i>S. paratyphi-C</i>	- (0.12 ± 0.01)
S024	猪 Pig	4, 6, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (1.03 ± 0.13)
S025	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.11 ± 0.04)
S026	鸡 Chicken	1, 4, 9, 12	g, m	<i>S. enteritidis</i>	- (0.13 ± 0.04)
S027	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.11 ± 0.02)
S028	鸡 Chicken	1, 4, 5	I	<i>S. typhimurium</i>	- (0.13 ± 0.04)
S029	鸡 Chicken	1, 4, 9, 12,	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.14 ± 0.01)
S030	鸡 Chicken	1, 4, 9, 12,	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.14 ± 0.02)
S031	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.12 ± 0.05)
S032	鹅 Goose	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.76 ± 0.07)
S033	鹅 Goose	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.90 ± 0.14)
S034	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.11 ± 0.05)
S035	鸡 Chicken	1, 9, 12	g, m	<i>S. enteritidis</i>	+ (0.93 ± 0.12)
S036	鸡 Chicken	1, 9, 12	g, m	<i>S. enteritidis</i>	+ (0.84 ± 0.18)
S037	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.10 ± 0.03)
S038	鸡 Chicken	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	+ (1.13 ± 0.15)
S039	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	+ (0.72 ± 0.11)
S040	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	+ (1.19 ± 0.14)
S041	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	+ (1.11 ± 0.08)
S042	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.14 ± 0.02)
S043	鸭 Duck	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.72 ± 0.18)
S044	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	+ (1.40 ± 0.19)
S045	鹅 Goose	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (1.02 ± 0.09)
S046	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	+ (1.67 ± 0.18)
S047	鸭 Duck	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.79 ± 0.15)
S048	鹧鸪 Partridge	1, 9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.14 ± 0.02)
S049	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	+ (0.23 ± 0.05)
S050	鹅 Goose	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.27 ± 0.08)
S051	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.11 ± 0.01)
S052	鸡 Chicken	9, 12	/	<i>S. pullorum</i>	- (0.13 ± 0.06)
S053	鹅 Goose	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (1.13 ± 0.24)
S054	鹅 Goose	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (1.10 ± 0.23)
S055	鸡 Chicken	9, 12	g, m	<i>S. enteritidis</i>	+ (0.92 ± 0.10)
S056	鸡 Chicken	1, 9, 12	g, m	<i>S. enteritidis</i>	- (0.12 ± 0.06)
S057	鹅 Goose	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (1.19 ± 0.23)
S058	鹅 Goose	4, 5, 12	I	<i>S. typhimurium</i>	+ (0.94 ± 0.20)

+. 可形成生物被膜; -. 不能形成生物被膜

+. Form biofilm; -. Can not form biofilm

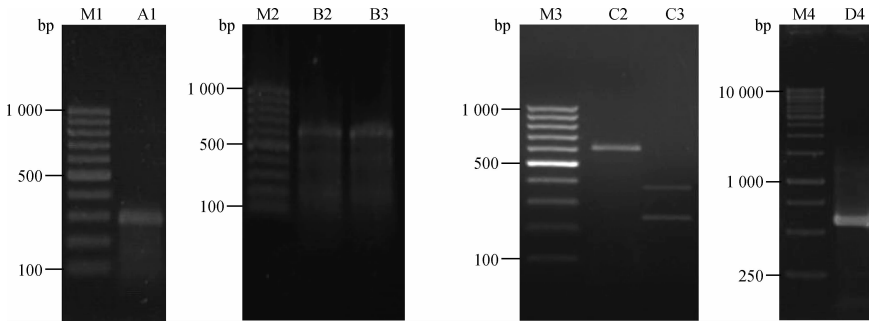
对于抗原模式相同的鸡白痢和鸡伤寒沙门菌, 采用 PCR-RFLP 法鉴别, 2 种细菌均可扩增出 600 bp 大小的 *fliC* 基因片段, PCR 产物经 *Hin6 I* 酶切后, 鸡白痢沙门菌仍为 600 bp 片段, 而伤寒沙门菌则被切为 235 和 365 bp 2 个片段(图 1), PCR-RFLP 结果表明所有的鸡白痢/鸡伤寒沙门菌分离株均为鸡白痢沙门菌。

2.3 16S rRNA 序列分析

用试剂盒引物可扩增出 1 条约 500 bp 的条带(图 1)。16S rRNA 基因测序结果显示, 58 株分离菌的同源性为 97.5%~100.0%, BLAST 搜索与沙门菌同源性最高。遗传进化树显示, 7 个血清型的菌株可包括在 4 个血清型级类群中, Pullorum 组中包括鸡白痢沙门菌 23 株, 乙型副伤寒、丙型副伤寒、都柏林和肠炎沙门菌各 1 株, 鼠伤寒沙门菌 4 株; Enteritidis 组

包括了肠炎沙门菌 6 株,鼠伤寒沙门菌 7 株,都柏林和鸡白痢沙门菌各 1 株;Typhimurium 组包括鼠伤寒

沙门菌 6 株,乙型副伤寒 1 株;而 Agona 独成一组,与 1 株鼠伤寒沙门菌同源性高(图 2)。



M1、M2、M3. 100 bp ladder; M4. 1 kb ladder; A1. *invA* 基因; B2、B3. *S. pullorum* 和 *S. gallinarum* 的 *fliC* 基因; C2、C3. *S. pullorum* 和 *S. gallinarum* 的 *Hin6 I* + *fliC* 基因; D4. 16S rRNA 基因

图 1 *invA* 基因、*fliC* 基因和 16S rRNA 基因的扩增及 *fliC* 基因扩增产物的 RFLP 图谱

Fig. 1 Amplification of *invA* gene, *fliC* gene and 16S rRNA gene and RFLP profiles of *fliC* gene PCR products with endonuclease *Hin6 I*

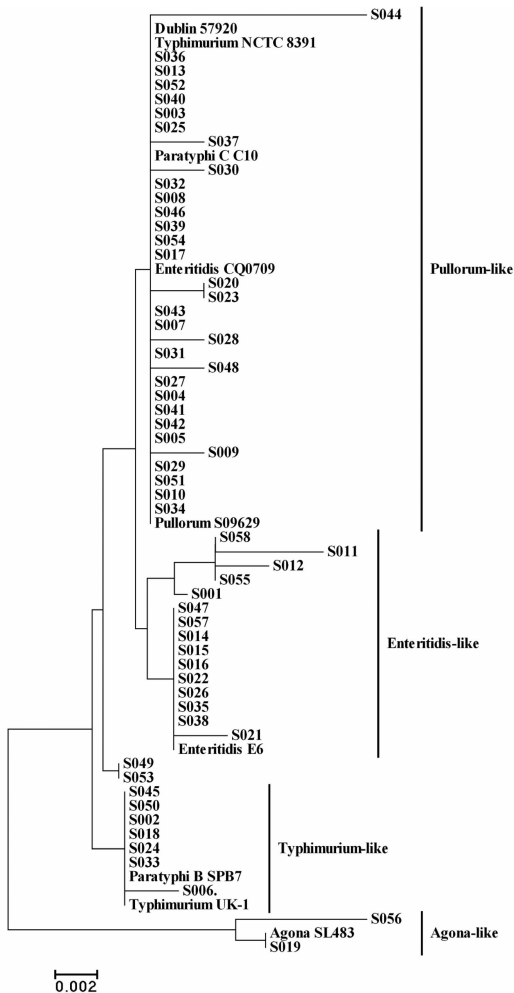


图 2 沙门菌 16S rRNA 基因进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of *Salmonella* isolates

2.4 生物被膜测定

用结晶紫染色定量法测定生物被膜,结果显示,阳性对照肠炎沙门菌 C50041 和鸡白痢沙门菌 S6702 的 $OD_{550\text{ nm}}$ 值分别为 1.02 ± 0.09 和 1.28 ± 0.13 ,阴性对照的 $OD_{550\text{ nm}}$ 值为 0.13 ± 0.06 ;与阴性对照相比,30 株沙门菌分离株能形成生物被膜 [$(0.23 \pm 0.05) \sim (1.40 \pm 0.19)$, $P < 0.05$],占分离菌总数的 51.72%;所有的沙门菌分离株中,鼠伤寒沙门菌形成生物被膜的比例最高,达 83.33%(表 1、表 2)。

2.5 药敏试验及多重耐药分析

2.5.1 药敏试验结果 在 20 种受试药敏片中,所有菌株对林可霉素耐药,51.72%的菌株对强力霉素耐药,36.21%的菌株对四环素耐药,29.31%的菌株对复方新诺明耐药,25.86%的菌株对庆大霉素和卡那霉素耐药,但多数菌株对阿米卡星、诺氟沙星、环丙沙星和头孢类抗生素敏感(表 3)。

2.5.2 多重耐药情况 在 58 株沙门菌分离株中,同时对 4 种受试药物耐药的菌株有 14 株,5~9 耐的 12 株,11~15 耐的 3 株,20 耐的 1 株(为鼠伤寒沙门菌),耐药 4 种及其以上共 30 株,多重耐药率达 51.72%。在 25 株鸡白痢沙门菌分离株中,有 17 株耐药 4 种及其以上,多重耐药率达 68.00%,表现了很高比例的多重耐药性(表 2、图 3)。

表 2 沙门分离菌血清型、生物被膜形成能力及耐药性汇总

Table 2 The summary of serotype, biofilm-forming ability and antibiotics resistance of the *Salmonella* isolates

血清型 Serotype	来源(菌株数) Source (Strain number)						总计 Total	分离菌的生物	耐药 4 种及其以上/ Multiple drug resistance ≥4 antimicrobials
	鸡 Chicken	鸽 Pigeon	猪 Pig	鸭 Duck	鹅 Goose	鹌鹑 Partridge		膜形成能力/% Number of isolates with biofilm-forming ability	
鸡白痢沙门菌 <i>S. pullorum</i>	24	0	0	0	0	1	25	7 (28.00)	17 (68.00)
鼠伤寒沙门菌 <i>S. typhimurium</i>	1	2	2	3	10	0	18	15 (83.33)	5 (27.77)
肠炎沙门菌 <i>S. enteritidis</i>	7	0	0	1	0	0	8	6 (75.00)	3 (37.50)
乙型副伤寒沙门菌 <i>S. paratyphi-B</i>	1	0	0	0	1	0	2	1 (50.00)	2 (100.00)
丙型副伤寒沙门菌 <i>S. paratyphi-C</i>	1	0	0	0	1	0	2	0 (0.00)	1 (50.00)
都柏林沙门菌 <i>S. dublin</i>	0	0	1	1	0	0	2	1 (50.00)	2 (100.00)
阿哥那沙门菌 <i>S. agona</i>	0	0	1	0	0	0	1	0 (0.00)	0 (0.00)
总计 Total	34	2	4	5	12	1	58	30 (51.72)	30 (51.72)

表 3 沙门分离菌的药敏试验结果

Table 3 The results of the antibiotic susceptibility test

抗生素类 Antibiotics	敏感 Sensitive		中介 Mesomerism		耐药 Resistance	
	细菌数 Numbers	比率/% Rate	细菌数 Numbers	比率/% Rate	细菌数 Numbers	比率/% Rate
氨基糖苷类 Aminoglycosides						
阿米卡星 Amikacin	57	98.28	0	0.00	1	1.72
新霉素 Neomycin	43	74.14	12	20.69	3	5.17
庆大霉素 Gentamicin	43	74.14	0	0.00	15	25.86
卡那霉素 Kanamycin	42	72.41	1	1.72	15	25.86
磺胺类 Sulfonamides						
复方新诺明 Chemitrim	0	0.00	41	70.69	17	29.31
喹诺酮类 Quinolones						
环丙沙星 Ciprofloxacin	52	89.66	4	6.90	2	3.45
诺氟沙星 Norfloxacin	53	91.38	1	1.72	4	6.90
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	17.24	39	67.24	9	15.52
林可胺类 Lincosamides						
林可霉素 Lincomycin	0	0.00	0	0.00	58	100.00
氯霉素类 Amphenicols						
氯霉素 Chloramphenicol	52	89.66	1	1.72	5	8.62
氟苯尼考 Florfenicol	53	91.38	0	0.00	5	8.62
青霉素类 Penicillins						
氨苄西林 Ampicillin	41	70.69	2	3.45	15	25.86
青霉素 G Penicillin G	30	51.72	10	17.24	18	31.03
羧苄青霉素 Carbenicillin	36	62.07	8	13.79	14	24.14
四环素类 Tetracyclines						
强力霉素 Doxycycline	12	20.69	16	27.59	30	51.72
四环素 Tetracycline	8	13.79	29	50.00	21	36.21
头孢菌素类 Cephalosporins						
头孢曲松 Ceftriaxone	55	94.83	1	1.72	2	3.45
头孢氨苄 Cefalexin	55	94.83	0	0.00	3	5.17
头孢唑林 Cefazolin	55	94.83	0	0.00	3	5.17
头孢噻肟 Cefotaxime	54	93.10	1	1.72	3	5.17

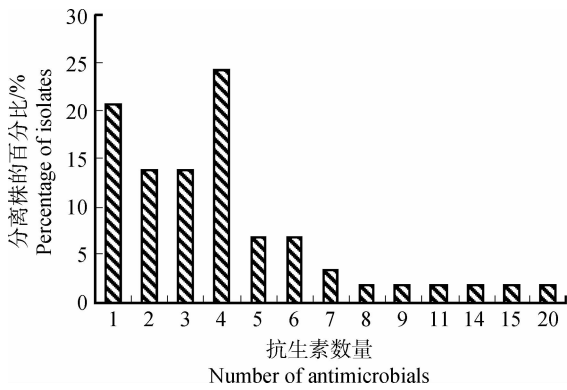


图3 58株沙门分离菌对20种抗菌药的多重耐药谱
Fig. 3 Multi-resistance profiles of 58 *Salmonella* isolates to 20 antimicrobial agents

3 讨论

3.1 沙门菌血清型分析

沙门菌目前报道的血清型有2500种以上,中国已报道了292种不同的血清型,分属于35个O群^[12-13]。本研究从发病动物中分离的58株沙门菌,分属于B、C1和D13个群别,7种血清型。在血清型鉴定过程中,尽管有些菌株属于同一血清型,但其表面的O抗原较大的差异;而在使用16S rRNA基因分析进行分类时,同一血清型的菌株呈类聚性,也可能与不同血清型的菌株之间具有相同的遗传进化起源,如鼠伤寒沙门菌除分布在Typhimurium组中,还分布于Enteritidis组和Pullorum组中。由于16S rRNA基因比较保守,片段较短,其结果不能作为血清型鉴定的唯一依据,沙门菌血清型的确定还需结合诊断血清的鉴定结果。但该方法可以分析菌株间的遗传进化关系,在实际应用过程中可集合使用血清型鉴定和16S rRNA基因分析方法。有研究表明,在动物、人类和环境中的沙门菌血清型主要是肠炎沙门菌^[14-16],而本研究表明不同动物中分离的优势血清型不一样,鸡群以鸡白痢沙门菌感染为主,肠炎沙门菌次之;水禽以鼠伤寒沙门菌感染为主。

乙型和丙型副伤寒沙门菌可造成人类食物中毒,是引起肠热症的重要病原体^[17]。近年来,在人类中这2种副伤寒的发病率在中国呈上升趋势^[18],但其病原很少对动物致病。本研究从鹅和鸡上分离到这2种细菌,说明家禽可能会是这两种副伤寒沙门菌的带菌者,在人类公共卫生学上具有重要意义。

3.2 沙门菌生物被膜形成能力调查

细菌在自然界多数是以生物被膜状态而不是以浮游状态生长的^[19]。沙门菌生物被膜的形成是造成其在自然界持续感染的重要原因之一。有研究表明,大约65%的人类细菌感染与生物被膜有关^[20]。因此,对生物被膜的研究日益受到人们的关注。本研究检测发现有51.72%的细菌能形成生物被膜,在所有分离的沙门菌的血清型中,鼠伤寒沙门菌最易形成生物被膜,且水禽中分离的13株鼠伤寒沙门菌都能形成生物被膜。鼠伤寒沙门菌在水禽成为优势血清型可能与其易形成生物被膜而很难被清除有关。

3.3 沙门菌耐药性分析

近年来,通过对各个国家沙门菌的监测发现,越来越多的沙门菌成为多重耐药菌^[21-24]。如何减少细菌的耐药性,并减少细菌耐药性通过食物链的传播,是目前值得关注的问题。所分离的沙门菌对四环素、强力霉素、青霉素、氨苄西林和磺胺类药物(复方新诺明)耐药率较高,与Cui等^[25]、Molla等^[26]的研究结果基本一致,可能与这些抗生素在临床广泛使用有关。头孢氨苄、头孢唑林和头孢曲松、头孢噻肟分别为第一代和第三代头孢菌素药,因为使用频率低,所以沙门菌对它们仍较为敏感。虽然氯霉素已禁止使用多年,但仍存在一定比例沙门菌耐药株,说明耐药性的消失是长期的过程。58株沙门菌分离菌存在多重耐药现象,在20种受试药敏片中,51.72%的细菌耐4种及其以上的药物,有4株细菌耐10种以上的药物,其中1株对所有20种受试药敏片耐药,成为超级耐药菌,这可能与猪的寿命较长而长期轮流用药有关^[27]。耐药菌的出现已经成为一个重要的公共卫生问题^[28]。

58株沙门菌分离菌中,既能形成生物被膜又能耐4种及其以上药物的沙门菌共有11株(18.97%)。而Hu等^[29]的研究结果表明,细菌在生物膜状态能显著提高细菌对抗生素、消毒剂等的抵抗力,因此,具有这两种特性的沙门菌会增强细菌的耐药性和传播性,给动物的疾病控制和人类食品安全造成更大的威胁。

4 结论

鸡白痢沙门菌、鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌是目下在家禽中分离的优势血清型;51.72%的沙门菌分离株可形成生物被膜,并且还有51.72%的菌株对4种及其以上的抗生素耐药,同时具有生物被

膜形成能力和多重耐药性的沙门菌将对家禽疾病控制和公共卫生带来更大的威胁。

参考文献:

- [1] NESBITT A, RAVEL A, MURRY R, et al. Integrated surveillance and potential sources of *Salmonella Enteritidis* in human cases in Canada from 2003 to 2009 [J]. *Epidemiol Infect*, 2012, 140 (10): 1757-1772.
- [2] SEVERI E, BOOTH L, JOHNSON S, et al. Large outbreak of *Salmonella Enteritidis* PT8 in Portsmouth, UK, associated with a restaurant[J]. *Epidemiol Infect*, 2011, 14: 1-9.
- [3] 丁莉莎, 王 瑶. 鞭毛介导的运动性与细菌生物膜的相互关系[J]. *微生物学报*, 2009, 49(4): 417-422.
- [4] 杨保伟, 曲 东, 申进玲, 等. 陕西食源性沙门氏菌耐药及相关基因[J]. *微生物学报*, 2010, 50(6): 788-796.
- [5] SU L H, CHIU C H, CHU C, et al. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella serotypes*: a global challenge[J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 39(4): 546-551.
- [6] UPADHYAY B P, UTRARACHKIJ F, THONGSHOUB J, et al. Detection of *Salmonella invA* gene in shrimp enrichment culture by polymerase chain reaction [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2010, 41(2): 426-435.
- [7] 徐耀辉, 焦新安, 胡青海, 等. 鸡白痢和鸡伤寒沙门菌的 PCR-RFLP 分子鉴别[J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2005, 26(1): 1-4.
- [8] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 等译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1-99.
- [9] ENNAHAR S, CAI Y, FUJITA Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S Ribosomal DNA analysis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 444-451.
- [10] LU Y, DONG H, CHEN S, et al. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Pullorum strains[J]. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5 (17), 2428-2437.
- [11] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [S]. Nineteenth Informational Supplement, 2009, M100-S19.
- [12] 张 燕, 朱 超. 我国沙门氏菌病和菌型分布概况 [J]. *现代预防医学*, 2002, 29(3): 400-401.
- [13] 彭海滨, 吴德峰, 孔繁德, 等. 我国沙门菌污染分布概况[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2006, 29(2): 125-128.
- [14] TAVECHIO A T, FERNANDES S A, NEVES B C, et al. Changing patterns of *Salmonella serovars*: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil [J]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1996, 38(5): 315-322.
- [15] SANTOS D M S, BERCHIERI JUNIOR A, FERNANDES S A, et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas[J]. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2000, 20(1): 39-42.
- [16] KANASHIRO A M I, STOPPA G F Z, CARDOSO A L S P, et al. Serovars of *Salmonella spp.* isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004[J]. *Bra J Poultry Sci*, 2005, 7(3): 195-198.
- [17] ROLAND K L, TINGE S A, KOCHI S K, et al. Reactogenicity and immunogenicity of live attenuated *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi A* enteric fever vaccine candidates[J]. *Vaccine*, 2010, 28(21): 3679-3687.
- [18] JIN Y. Enteric fever in south China: Guangxi province[J]. *J Infect Developing Countries*, 2008, 2 (4): 283-288.
- [19] HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(2): 95-108.
- [20] CHICUREL M. Bacterial biofilm and infections. slimebusters [J]. *Nature*, 2000, 408 (6810): 284-286.
- [21] CHIU C H, WU T L, SU L H, et al. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype choleraesuis[J]. *New Engl J Med*, 2002, 346(6): 413-419.
- [22] GLYNN MK, BOPP C, DEWITT W, et al. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States[J]. *New Engl J Med*, 1998, 338(19): 1333-1338.
- [23] GUERRA B, SOTO S M, ARGÜELLES J M, et al. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] [J]. *Antimicrob Agents Chemothe*, 2001, 45(4): 1305-1308.

- [24] SZYCH J, CIEŚLIK A, PACIOREK J, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999 [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 18(1): 37-42.
- [25] CUI S H, GE B L, ZHENG J, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* Serovars in organic chickens from Maryland retail stores [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(7): 4108-4111.
- [26] MOLLA B, MIKO A, PRIES K, et al. Class 1 integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin in Ethiopia [J]. *Acta Tropica*, 2007, 103(2): 142-149.
- [27] 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.
- [28] CHEN S, ZHAO S H, WHITE D G, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 1-7.
- [29] HU Q H, HAN X G, ZHOU X J, et al. Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer* [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 144: 429-436.

(编辑 白永平)

寻找可育骡子

内蒙古赛科星繁育生物技术股份有限公司研发部现面向全国寻找具有繁育能力的骡子(公、母都需要),有知情者请与本公司联系,必有重谢。

联系人: 赵高平

联系电话: 13624714308

E-mail: gaopingzhao@126.com