

学校代码: 10564
分 类 号: S855.1

学 号: 2015307374
密 级:



華南農業大學

硕 士 学 位 论 文

广东省农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌流行特征
和耐药性研究

张 丽 娜

第一指导教师: 廖明 教授

第二指导教师:

学 院 名 称: 兽医学院

专业学位类别: 兽医硕士

领 域:

答辩委员会主席:

中国 广州

2018 年 6 月

华南农业大学

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名：_____ 日期：_____

导师签名：_____ 日期：_____

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属华南农业大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许学位论文被查阅（除在保密期内的保密论文外）；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以允许采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

本学位论文属于：

☐ 保密，在_____年解密后适用本授权书。

☐ 不保密。

学位论文全文电子版提交后：

☐ 同意在校园网上发布，供校内师生和与学校有共享协议的单位浏览。

(请在以上相应方框内打“√”)

本人签名：_____ 日期：_____

导师签名：_____ 日期：_____

摘 要

沙门菌 (*Salmonella*) 是一种重要的食源性致病菌, 可通过动物及食物链向人传播, 对人类健康和畜禽生产造成了严重危害, 也对公共卫生安全问题造成了极大的影响。广东是中国南方经济发达省份, 其畜牧业生产和畜禽产品消费居全国前列, 畜禽产品的安全直接关系到消费者健康。但有关广东省农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌的流行特征和耐药性研究数据缺乏, 给本省鸡肉和猪肉中沙门菌的防控以及人沙门菌病的预防带来了很大的困难。因此, 本研究旨在了解广东省农贸市场鸡肉和猪肉中的沙门菌流行情况, 血清型分布、耐药性、以及 ESBLs 基因型等特征, 为畜禽养殖过程中抗生素的合理使用提供指导, 也为预防和控制沙门菌提供了理论依据。同时对鸡肉中常见血清型沙门菌进行了喹诺酮类抗生素耐药基因携带情况检测和 PFGE 分子分型等研究, 为监测耐药基因流行情况提供最新数据, 也为耐药机制深入研究打下基础。获得以下主要结果:

本研究在 2016 年至 2017 年期间从广东省 (广州, 深圳, 河源, 韶关, 佛山及云浮) 农贸市场共采集 903 份样本 (包括 475 份鸡肉及 428 份猪肉), 从中分离到沙门菌 615 株, 总阳性率为 68.1%。其中鸡肉 302 株 (阳性率 63.6%), 猪肉 313 株 (阳性率 73.1%)。615 株沙门菌共鉴定出 38 种血清型, 并且鸡肉和猪肉样品之间的血清型差异大。其中鸡肉中鉴定出 27 种血清型, 常见血清型为阿贡纳 (55 株, 18.2%)、科瓦利斯 (45 株, 14.9%)、肯塔基 (38 株, 12.6%) 和姆班达卡 (32 株, 10.6%); 猪肉中鉴定出 25 种血清型, 常见血清型为鼠伤寒 (78 株, 24.9%), 罗森 (67 株, 21.4%)、德比 (66 株, 21.1%) 和伦敦 (48 株, 15.3%)。

耐药性检测发现, 总体耐药率最高的为磺胺复合物 (76.1%), 其次为四环素 (75.3%)、氨苄西林 (48.0%) 和氧氟沙星 (44.7%) 等; 所有沙门菌分离株对头孢吡肟、头孢他啶、阿米卡星和阿莫西林/克拉维酸的耐药率分别为 2.8%、2.3%、1.3% 和 1.1%。值得关注的是, 检测到临床上治疗细菌感染性疾病的“最后一线”药物多粘菌素 B (2.0%) 和亚胺培南 (0.5%) 耐药。菌株多重耐药率达 77.1%, 共得到 61 种不同的耐药谱, 鸡肉沙门菌分离株 (81.1%) 中多重耐药率高于猪肉 (73.2%) ($P < 0.05$)。不同血清型沙门菌的耐药情况有所差异。ESBLs 基因型检测发现, *bla*_{OXA-1} 是主要的 ESBLs 基因 (9 / 21, 42.9%), 其次是 *bla*_{CTX-M-55} (5 / 21, 23.8%)。

本研究检测了鸡肉中常见血清型沙门菌对介导喹诺酮耐药性的喹诺酮类耐药决

定区 (QRDR) 突变情况和质粒介导喹诺酮耐药基因 (PMQR) 携带情况, 结果显示 138 株沙门菌 PMQR 基因总检出率为 83.3%, *qnrS*、*aac(6')-Ib-cr*、*qnrB*、*qnrA*、*oqxAB* 和 *qnrD* 的检出率分别为 71.0%、21.7%、18.1%、2.9%、1.4% 和 0.7%。阿贡纳和科瓦利斯沙门菌检测出的 PMQR 因子中以 *qnrS* 基因为主, 肯塔基沙门菌中以 *aac (6')-Ib-cr* 为主。阿贡纳、科瓦利斯和肯塔基这三种血清型沙门菌中的 *gyrA* 和 *parC* 的 QRDR 基因中检测到 40 个氨基酸突变。一些突变仅存在某种血清型上, 如 *gyrA* 基因中 Asp87Tyr 突变仅发生于科瓦利斯沙门菌上; Ser83Phe 和 Asp87Asn 突变发生于肯塔基沙门菌上; *parC* 基因中 Ser80Ile 突变也仅发生于肯塔基沙门菌。

采用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型方法研究沙门菌源性关系, 相同血清型菌株经 PFGE 分型后, 55 株阿贡纳沙门菌共呈现出 44 种不同的 PFGE 基因型, 45 株科瓦利斯沙门菌共呈现出 34 种不同的 PFGE 基因型, 38 株肯塔基沙门菌共呈现出 29 个不同的 PFGE 基因型。PFGE 结果显示不同时间和地点分离到的相同血清型沙门菌呈现出相同或不同的基因型。

本研究结果表明, 广东省农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌污染严重, 血清型复杂多样并且耐药性及多重耐药性非常普遍。提示应增强管理部门和生产部门食品安全意识, 加强食品安全全程监管和执法力度以及严格控制抗生素使用。

关键词: 沙门菌; 流行; 耐药性; 耐药基因; PFGE

Study on the Epidemic Characteristics and Antibiotic Resistance of *Salmonella* among Chicken and Pork meats at the Farmer's Market in Guangdong

Zhang Lina

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, P.R. China)

Abstract

Salmonella is an important foodborne pathogen that can be transmitted to humans through animal and food chains, causing serious harm to human health and livestock and poultry production. It also has a great impact on public health security issues. Guangdong is an economically developed province in southern China. Its livestock production and consumption rank among the top in the country. The safety of livestock and poultry products is directly related to consumer health. However, the lack of data on the prevalence and resistance of *Salmonella* in chicken and pork meats in Guangdong farmers' market, which has brought great difficulties to the prevention and control of *Salmonella* in chicken and pork, and the prevention of *Salmonellosis* in humans.

Therefore, this study aims to understand the prevalence of *Salmonella* in chicken and pork meat in Guangdong farmer's market, serotypes distribution, antimicrobial resistance, and ESBLs genotypes, providing guidance for the rational use of antibiotics in livestock and poultry breeding, and also provides a theoretical basis for the prevention and control of *Salmonella*. At the same time, the quinolone antibiotics and PFGE molecular typing in *Salmonella* common serotypes of chicken were studied, which provides the latest data for monitoring the prevalence of resistance genes and laying the foundation for the study of in-depth resistance mechanisms. Get the following main results:

From 2016-2017, a total of 903 livestock and poultry meat samples (including 475 chicken and 428 pork) were collected from the retail markets in Guangdong (including Guangzhou, Shenzhen, Heyuan, Shaoguan, Foshan and Yunfu), and 615 strains of *Salmonella* were identified, the total isolated rate was 68.1%. Among them, 302 were

chicken (63.6% of isolates) and 313 were pork (73.1% of isolates). A total of 38 serotypes were identified in 615 strains of *Salmonella*, and the serotypes differed significantly between chicken and pork samples. 27 serotypes were identified in chicken, the common serotypes were Agona (55 strains, 18.2%), Corvallis (45 strains, 14.9%), Kentucky (38 strains, 12.6%) and Mbandaka (32 strains, 10.6%); 25 serotypes were identified in pork, common serotypes were Typhimurium (78 strains, 24.9%), Rissen (67 strains, 21.4%), Derby (66 strains, 21.1%) and London (48, 15.3%).

The antibiotic susceptibility tests show that high antibiotic resistance rates were found in sulfisoxazole (76.1%), tetracycline (75.3%), ampicillin (48.0%), ofloxacin (44.7%). All *Salmonella* isolates were sensitive to cefepime (2.8%), ceftazidime (2.3%), amikacin (1.3%) and amoxicillin/clavulanic acid (1.1%). Of note, the "last-line" drugs polymyxin B (2.0%) and imipenem (0.5%), which are clinically used to treat bacterial infectious diseases have been detected. The multidrug resistance rate of the strain was 77.1%, and 61 different drug resistance spectra were obtained. The detection rate of multidrug resistance in *Salmonella* isolates (81.1%) was significantly higher than that in pork (73.2%) ($P < 0.05$). The resistance rates of different serotypes of *Salmonella* differ greatly. ESBLs genotype detection revealed that *bla*_{OXA-1} was the dominant ESBLs gene (9/21, 42.9%), followed by *bla*_{CTX-M-55} (5/21, 23.8%).

This study examined the prevalence of quinolone-resistant QRDR mutations and the PMQR mediated by dominant serotype *Salmonella* in chicken, the results showed that the total detection rate of *Salmonella* PMQR gene in 138 strains was 83.3%. The detection rates of *qnrS*, *aac*(6')-Ib-cr, *qnrB*, *qnrA*, *oqxAB*, and *qnrD* were 71.0%, 21.7%, 18.1%, 2.9%, 1.4%, and 0.7%, respectively. The *qnrS* gene was the dominant PMQR detected by *S. Agona* and *S. Corvallis*; *aac*(6')-Ib-cr is the main *S. Kentucky*. 40 amino acid mutation was detected in the QRDR genes of *gyrA* and *parC* in three serotypes of *S. Corvallis*, and *S. Kentucky*. Some mutations only exist in certain serotypes. For example, the Asp87Tyr mutation in the *gyrA* gene only occurs in *S. Corvallis*; the mutations of Ser83Phe and Asp87Asn occurred in *S. Kentucky*; the Ser80Ile mutation in the *parC* gene also occurs only in *S. Kentucky*.

After PFGE typing of the same serotype strain, a total of 44 different PFGE genotypes

were detected in 55 of *S. Agona*; 34 different PFGE genotypes in 45 of *S. Corvallis*; 38 of *S. Kentucky* exhibited 23 different PFGE genotypes. The PFGE results showed that the same serotype *Salmonella* isolated at different times and locations exhibited the same or different genotypes.

The results of this study show that the chicken and pork of *Salmonella* contamination in Guangdong farmer's market is serious, the serotypes are complex and diverse, and antimicrobial resistance and multidrug resistance are very common. It is suggested that the food safety awareness of the management department and the production department should be enhanced, and the whole process of supervision and enforcement of food safety should be strengthened and strict control of antibiotic use.

Keywords: *Salmonella*; Prevalence; Antimicrobial resistance; Resistance genes; PFGE

英文缩略词表 (Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文名称
ATCC	American type culture collection	美国菌种保藏中心
bp	Base pair	碱基对
BPW	Buffered Peptone Water	缓冲蛋白胨水
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	美国临床实验室标准化协会
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	三磷酸脱氧核糖核苷
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ESBLs	Extended-Spectrum-beta-Lactamases	超广谱 β -内酰胺酶
HE	Hekton enteric agar	HE 培养基
MH	Mueller Hinton	水解酪蛋白
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物技术中心
OD	Optical Density	光密度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸缓冲液
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis	脉冲场凝胶电泳
PMQR	Plasmid-Mediated-Quinolone-Resistance	质粒介导喹诺酮类药物耐药
QepA	Quinolone Efflux Pump	喹诺酮类外排泵
Qnr	Quinolone Resistance Determinant	喹诺酮耐药因子
QRDR	Quinolone-resistant Determining Region	喹诺酮耐药决定区
RV	Rappaport-Vassiliadis	RV 肉汤
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TSA	TSA Agar	胰蛋白胨大豆琼脂
TSI	Triple Sugar Iron Agar	三糖铁琼脂
TTB	Tetrathionate Broth	四硫磺酸盐煌绿增菌液
SC	Selenite Cystine Broth	亚硒酸盐胱氨酸增菌液
XLD	Xylose Lysine Desoxycholate Medium	木糖赖氨酸脱氧胆酸钠培养基
XLT4	XLT4 Agar	木糖-赖氨酸-硫酸四癸酸钠琼脂

目 录

第一章 前言	1
1.1 沙门菌概述	1
1.2 畜禽肉中沙门菌污染现状	1
1.3 畜禽肉中不同血清型沙门菌耐药性现状	2
1.4 沙门菌耐药机制	4
1.4.1 沙门菌对 β -内酰胺类抗生素耐药机制	4
1.4.2 沙门菌对喹诺酮类抗生素耐药机制	4
1.5 沙门菌脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型	6
1.6 研究目的及意义	7
第二章 农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌分离鉴定和耐药性分析	8
2.1 引言	8
2.2 材料与方法	8
2.2.1 试验材料	8
2.2.1.1 样品来源	8
2.2.1.2 标准菌株	10
2.2.1.3 培养基	10
2.2.1.4 主要试剂	10
2.2.1.5 主要仪器和设备	10
2.2.1.6 药敏纸片	10
2.2.2 试验方法	11
2.2.2.1 样品的采集和处理方法	11
2.2.2.2 沙门菌分离鉴定方法	11
2.2.2.3 沙门菌 DNA 的提取	12
2.2.2.4 沙门菌的 PCR 鉴定	12
2.2.2.5 沙门菌的保存与复苏	13
2.2.2.6 沙门菌的血清型鉴定	13
2.2.2.7 药物敏感性试验	14
2.2.2.8 产 ESBLs 沙门菌的筛选	15

2.2.2.9 ESBLs 相关基因的检测及序列测定	16
2.3 试验结果及分析	18
2.3.1 沙门菌分离鉴定	18
2.3.2 不同采样地区鸡肉和猪肉中沙门菌阳性率	18
2.3.3 沙门菌血清型鉴定	20
2.3.3.1 鸡肉和猪肉中沙门菌的血清型分布	20
2.3.3.2 各采样地区鸡肉和猪肉中沙门菌的血清型分布	22
2.3.4 耐药性试验	29
2.3.4.1 鸡肉和猪肉中沙门菌对抗生素的耐药性	29
2.3.4.2 鸡肉和猪肉中沙门菌的多重耐药率	31
2.3.4.3 鸡肉和猪肉中不同血清型沙门菌的耐药性	38
2.3.4.4 不同血清型沙门菌的多重耐药率	41
2.3.5 产 ESBLs 沙门菌的筛选及相关基因的检测	42
2.3.5.1 产 ESBLs 沙门菌的筛选	42
2.3.5.2 ESBLs 相关基因的检测及亚型分布	42
2.4 结论与讨论	46
2.4.1 沙门菌在鸡肉和猪肉产品中流行现状	46
2.4.2 沙门菌在鸡肉和猪肉产品中血清型分布	47
2.4.3 沙门菌在动物源性产品中耐药特点	48
2.4.4 ESBLs 流行情况	49
第三章 鸡肉中常见血清型沙门菌喹诺酮类耐药基因检测和 PFGE 分子分型	50
3.1 引言	50
3.2 材料与方法	50
3.2.1 试验材料	50
3.2.1.1 样品来源	50
3.2.1.2 培养基	50
3.2.1.3 抗生素	51
3.2.1.4 主要试剂	51
3.2.1.5 主要仪器设备	51
3.2.2 试验方法	51

3.2.2.1 沙门菌的复苏	51
3.2.2.2 药物敏感性试验	51
3.2.2.3 喹诺酮类耐药基因的检测	51
3.2.2.4 PFGE（脉冲场凝胶电泳）分型	54
3.3 试验结果及分析	56
3.3.1 常见血清型沙门菌喹诺酮类抗生素耐药性	56
3.3.2 沙门菌（氟）喹诺酮类抗生素耐药基因检测	56
3.3.2.1 沙门菌 PMQR（质粒介导的喹诺酮耐药）基因检测	56
3.3.2.2 沙门菌 QRDR（喹诺酮耐药性决定区）突变检测	58
3.3.3 常见血清型沙门菌 PFGE 分型	60
3.3.3.1 阿贡纳沙门菌 PFGE 分型	60
3.3.3.2 科瓦利斯沙门菌 PFGE 分型	62
3.3.3.3 肯塔基沙门菌 PFGE 分型	64
3.4 结论与讨论	66
第四章 全文总结	69
致谢	70
参考文献	71
附录	83

第一章 前言

1.1 沙门菌概述

沙门菌属 (*genus*) 是肠杆菌科的重要成员之一, 是涵盖众多血清型的革兰氏阴性杆菌。沙门菌菌体大小为 $(0.7\sim1.5)\mu\text{m}\times(2.0\sim5.0)\mu\text{m}$, 间有形成短丝状体, 一般不产生芽孢, 也无荚膜。除鸡伤寒沙门菌 (*Gallinarum*) 和鸡白痢沙门菌 (*Pullorum*) 外, 绝大部分的沙门菌都有周身鞭毛、能运动, 大多数也具有菌毛。沙门菌为需氧及兼性厌氧菌, 在一般琼脂培养基上生长良好, 其适宜的培养温度为 37°C , pH 为 $7.4\sim7.6$ (杨晓林, 2014)。在发酵葡萄糖、麦芽糖、甘露醇和山梨醇中, 大多数沙门菌能产气 (除鸡伤寒沙门菌和鸡白痢沙门菌外)。沙门菌还可发酵 L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、D-甘露糖、D-木糖和海藻糖。不分解乳糖、蔗糖和侧金盏花醇, 不凝集牛乳, 不产生靛基质, 不分解尿素 (pH7.2)。除鸡沙门菌和伤寒沙门菌外, 均具有鸟氨酸脱羧酶; 除甲型副伤寒沙门菌外, 均具备赖氨酸脱羧酶; 大多数菌株具备精氨酸双水解酶的活性。绝大多数菌株不可在 KCN 肉汤中生长。多数菌株能产生 H_2S , 甲基红试验为阳性, 并能在西蒙氏柠檬酸盐琼脂上生长。绝大多数菌株能被 *Felix O-I* 噬菌体裂解。沙门菌可存活于人、温血和冷血动物体内, 并广泛存在于食品和外界环境中, 对人和许多种动物均有致病性, 可导致伤寒、胃肠炎、肠热病和败血症 4 种病症。

沙门菌属包括邦戈尔沙门菌 (*S. bongori*) 和肠道沙门菌 (*S. enterica*) 两个种, 肠道沙门菌又可进一步分为 6 个亚种: 肠道亚种 (*subsp. enterica*)、萨拉姆亚种 (*subsp. salamae*)、亚利桑那亚种 (*subsp. arizonae*)、双相亚利桑那亚种 (*subsp. diarizonae*)、浩敦亚种 (*subsp. houtenae*) 以及因迪卡亚种 (*subsp. indica*) (任行星, 2016)。沙门菌具有 O (菌体)、H (鞭毛)、K (荚膜抗原, 又称 Vi) 和菌毛 4 种抗原。O 和 H 抗原是主要抗原, 是构成沙门菌血清型鉴定的物质基础 (饶星等, 2008)。根据鞭毛蛋白 (H) 和脂多糖 O 抗原结构的差异, 沙门菌可分为不同的血清型, 到目前为止已有 2 600 多种血清型, 几乎涵盖了所有对人和动物具有致病性的各种血清型菌株 (Guibourdenche *et al.*, 2010)。

1.2 畜禽肉中沙门菌污染现状

沙门菌引起食物中毒是全球性的, 通常排细菌性食物中毒的前列 (韩喜荣等, 2007)。我国约有 70%~80% 的食源性疾病暴发是由沙门菌引起的, 其中 90% 的食物中毒与摄入受污染的畜禽肉及其相关制品有关 (Wang *et al.*, 2007)。肠炎沙门菌 (36.9%)

在我国人和家禽沙门菌感染中位居前列。畜禽和动物源性食品构成了食源性沙门菌的主要来源，是沙门菌研究的重点之一（李昱辰，2014）。

近年来我国关于畜禽肉沙门菌的研究逐渐增多，各地报道的畜禽肉沙门菌污染率也各不同。Huang 等人报道佛山市禽肉沙门菌检出率为 18.85%（黄瑞伦等，2012）。Wang 等报道，徐州市生鲜鸡肉沙门菌检出率 10.75%（王路梅等，2012）。Zhao 等在 2011-2012 年共检测 240 份整鸡，阳性率为 33.75%；其中现宰杀活鸡检出阳性率为 30%；冷冻鸡检出阳性率为 35%；冷藏鸡检出阳性率最高为 40.0%（赵飞，2013）。Li 等对安徽省合肥进行调查，发现生猪体表样品及胴体样品检出率分别为 24.2%和 17.0%（李郁，2006）。Hou 等随机抽取四川省猪肉生产链中屠宰场胴体肉样进行沙门菌污染状况调查，发现屠宰场胴体污染率为 10.71%，其中常见血清型为德比沙门菌、鼠伤寒沙门菌（侯小刚等，2013）。Lai 等人对山东动物源性产品调查发现，鸡肉中沙门菌的阳性率为 19.8%，猪肉中沙门菌的阳性率为 7.2%；常见血清型是肠炎、印第安纳和德比（Lai *et al.*, 2014）。Li 等人在 2010 年 8 月至 2012 年 12 月期间于江苏省四个城市 20 个市场收集了猪肉样本 1096 份，沙门菌检出率为 14.1%，血清型鉴定结果表明，猪肉源沙门菌中最常见的血清型为德比和鼠伤寒沙门菌（Li *et al.*, 2014）。Truong 等人在 2007 年至 2009 年期间，在越南北部三个省（巴尼，哈尼和哈特）共收集了 586 份零售肉类样品（318 份猪肉和 268 份鸡肉），发现鸡肉中沙门菌的阳性率为 42.9%；猪肉中沙门菌的阳性率为 39.6%，常见血清型沙门菌为鸭和婴儿（Truong *et al.*, 2012）。

以上研究表明，畜禽产品，特别是鸡肉和猪肉被认为是沙门菌传播的主要贮库，所以加强监控动物源性食品（Jackson *et al.*, 2013）。

1.3 畜禽肉中不同血清型沙门菌耐药性现状

随着抗生素在临床上的广泛应用，细菌对抗生素的耐药问题也日趋严重，其耐药水平越来越高，出现了多重耐药菌株，给人类和动植物的健康造成极大的危害，细菌耐药性问题已经成为全球关注的一个热点（王晓泉，2007）。

对食品来源沙门菌菌株中抗生素耐药性的调查已在全球各个国家开展。对沙门菌的耐药性调查结果显示，不同血清型的沙门菌耐药性有所不同（印广浩，2016）。Singh 等人 and Yildirim 等人报道 100%的鼠伤寒沙门菌都是多重耐药菌（Singh *et al.*, 2010; Yildirim *et al.*, 2011）。而根据 Thong 等人报道从马来西亚食品中分离出的所有鼠伤寒沙门菌都表现出至少对一种抗生素的抗性，并且 78.9%具有多重耐药性（Thong *et al.*,

2011)。哈达尔沙门菌是另一种从食品中分离出来并经常表现出多重耐药性的血清型。由 Dallal 等人 and Yildirim 等人分离的此种血清型的所有菌株均显示多重耐药 (Dallal *et al.*, 2010; Yildirim *et al.*, 2011)。Bouchrif 等人 Thong 等人也报道了 100% 的哈达尔沙门菌对抗生素有抗性, 其中多重耐药率分别为 50% 和 28.6% (Bouchrif *et al.*, 2009; Thong *et al.*, 2011)。Aslam 等人, Maka 等人 and Zewdu 等人在哈达尔沙门菌分离株中也检测到相似的高水平耐药性, 耐药率分别有 96.4%, 85.7% 和 83.3% (Aslam *et al.*, 2012; Maka *et al.*, 2015; Zewdu *et al.*, 2009)。由 Zewdu 等人研究结果显示婴儿沙门菌这种血清型的所有菌株均是多重耐药 (Zewdu *et al.*, 2009)。Yildirim 等人发现所有婴儿沙门菌对一种或多种抗生素具有抗性, 其中 90% 具有多重耐药性 (Yildirim *et al.*, 2011)。相反, Bouchrif 等人报道在婴儿沙门菌分离株中, 只有 16% 是耐药的 (Bouchrif *et al.*, 2009)。尽管肠炎沙门菌被认为是普遍敏感的, 但近年来也已经发生了变化。Maka 等人进行的研究显示, 波兰零售食品中耐药肠炎沙门菌分离株的频率增加 (Maka *et al.*, 2015; Maka *et al.*, 2014; Maka *et al.*, 2010)。在 2004 年至 2007 年间分离的菌株中, 总体耐药率为 13.6% (多重耐药性为 7%) (Maka *et al.*, 2010)。然而, 从 2008 年至 2012 年的分离株中, 这一血清型菌株的数值上升到 54% (多重抗药性为 5%), 而在食用菌株以外的菌株中, 这一数值上升到 43.7% (6.7% 多重抗药性) (Maka *et al.*, 2015)。这些结果与奥地利 Mayrhofer 等人的结果相似, 36% 的肠炎沙门菌分离株耐药 (Mayrhofer *et al.*, 2004)。Alvarez-Fernandez 等人报道, 从零售家禽分离出的所有肠炎沙门菌均具有多重耐药性 (Alvarez-Fernandez *et al.*, 2012)。在不同国家 (如韩国, 土耳其) 进行的研究表明, 家禽已成为多重耐药沙门菌的主要储库, 这表明可能难以实现禽源菌株引起的沙门菌病的成功抗菌治疗 (Yildirim *et al.*, 2011)。从食物中分离出的纽波特沙门菌通常也具有高度耐药性 (Alvarez-Fernandez *et al.*, 2012; Maka *et al.*, 2014; Thong *et al.*, 2011; Yildirim *et al.*, 2011)。然而 Little 等人 and Zewdu 等人报道, 该血清型的所有沙门菌分离株均对所有测试的抗菌剂敏感 (Little *et al.*, 2008)。在美国和加拿大, 海德堡沙门菌是从零售肉类中分离出来的主要血清型之一。Zhao 等人发现 67% 的该血清型分离株对至少一种抗微生物剂具有抗性, 16.4% 对至少五种具有抗性 (Zhao *et al.*, 2008)。Aslam 等人报道, 在加拿大零售肉类中分离的海德堡沙门菌中, 80.6% 的耐药率, 45% 显示多重耐药谱 (Aslam *et al.*, 2012)。

由此可见, 动物源食品中不同血清型沙门菌也需进一步研究。

1.4 沙门菌耐药机制

1.4.1 沙门菌对 β -内酰胺类抗生素耐药机制

β -内酰胺酶在青霉素被广泛用于治疗之前是普遍存在的，这表明这些酶是抵制环境中其他物种细菌或真菌产生的抗微生物物质的机制。

β -内酰胺类抗生素的耐药机制主要有：产生 β -内酰胺酶；青霉素结合蛋白（PBP）的作用位点改变或产生新的对 β -内酰胺类抗生素不敏感的 PBP；革兰阴性细菌外膜通透性降低和主动外排系统将抗生素泵出胞外（刘萍，2014）。PBPs 改变是革兰阳性菌耐 β -内酰胺类抗生素的最主要机制， β -内酰胺酶是革兰阴性杆菌耐 β -内酰胺类抗生素的最普遍的机制。

1965 年，Datta 和 Kontomichalou 描述了一种质粒编码的 β -内酰胺酶，发现于一个名为 Temoneira 的希腊分离的大肠杆菌中，并命名为 TEM-1（Datta *et al.*, 1965）。在几年内，TEM-1 已经在代表不同细菌家族的许多物种中广泛存在。SHV-1 是另一种常见的质粒编码的 β -内酰胺酶（Bradford, 2001）。在许多肠杆菌科中发现的染色体 *ampC* 基因通常以低水平表达并且在 β -内酰胺暴露的应答中是可诱导的。沙门菌自然是 AmpC⁻，但 *ampC* 基因可能发生在传染性质粒上（Jacoby, 2009; Philippon *et al.*, 2002）。抗生素使用的增加和新化合物的引入已经导致 β -内酰胺酶新形式的出现。20 世纪 80 年代，头孢菌素被用于治疗由革兰氏阴性细菌引起的感染。这些新的 β -内酰胺类抗生素的使用导致出现产生广谱 β -内酰胺酶（ESBLs）的耐药菌株。ESBLs 能够水解青霉素，头孢菌素和单环胺，并且可以被 β -内酰胺抑制剂所抑制（钟运华等，2008）。*bla_{SHV}*，*bla_{TEM}*，*bla_{CTX}*，*bla_{CMY}* 和 *bla_{OXA}* 等基因负责沙门菌中的 ESBL 介导的耐药性（Bradford, 2001; Winokur *et al.*, 2000）。许多研究调查了从人类感染（包括沙门菌）中分离出的革兰氏阴性菌中不同 β -内酰胺酶的发生。关于动物性食品分离物中描述这些酶的报道少，仅有少数涉及沙门菌来自食物分离物（Wasyl *et al.*, 2012; Winokur *et al.*, 2000）。在一些国家，产 ESBL 沙门菌尚未在食品中发现，但它们在食用动物中的出现使得它们最终可能与食品样品有关。在 *bla* 基因中，从食物中分离出的沙门菌中最常报道 *bla_{TEM}* 的存在。然而，其他基因如 *bla_{CTX-M}* 和 *bla_{CMY-2}* 也已被发现。

1.4.2 沙门菌对喹诺酮类抗生素耐药机制

喹诺酮类药物（Fluoroquinolones, FQs）是近代化学合成抗感染药物中发展最为迅速的，其具有抗菌活性强、抗菌谱广、体内分布广等优点，因此成为人和动物

临床应用最广泛的药物之一。

沙门菌对喹诺酮类药物产生耐药性可以通过改变细胞膜和增加外排泵的表达来降低。喹诺酮类机制分为四类：局部阻遏物基因的突变；全球调控基因中的突变；转运蛋白基因启动子区域的突变；转运蛋白基因上游的插入元件(Piddock *et al.*, 2000)。主要作用机制是喹诺酮耐药决定区(quinolone-resistant determining region, QRDR)的基因突变；编码组成 DNA 促旋酶的 A 亚单位和 B 亚单位及 *parC* 和 *parE* 亚单位组成拓扑异构酶 IV，其中任一亚基的基因发生突变均可引起喹诺酮类药物的耐药性(谭艳等, 2004)。在所有的突变类型中，以 *gyrA* 的突变为主；*gyrA* 双突变仅发生在喹诺酮类高度耐药的菌株中，因为 *gyrA* 上的 83 和 87 位的氨基酸在提供喹诺酮类的结合位点时具有重要的作用(马国正, 2006)。这些突变引起氨基酸替换，修饰靶位 DNA 螺旋酶(*gyrA*, *gyrB*)和拓扑异构酶 IV(*parC*, *parE*)，并使它们不易与喹诺酮类抗生素结合。靶标酶中的氨基酸替换导致 MIC 值的增加可能取决于沙门菌血清型。

以下改变是最常报道的：*GyrA*-Ser83→Phe(对于萘啶酸，MIC =256μg/ mL，对于环丙沙星，MIC =0.25-2μg/ mL)，*Asp87*→Gly, Tyr (256-512μg/ mL 萘啶酸，环丙沙星的 MIC =0.12-0.5μg/ mL)；*ParC* - Ser80→Ile, Arg。*GyrB* 的变化在许多调查中都没有发现(Chen *et al.*, 2007；Fabrega *et al.*, 2008)。Martinez-Martinez 等人报道了一种新的质粒介导的喹诺酮耐药(PMQR)机制来治疗萘啶酸，环丙沙星和其他氟喹诺酮类药物；该机制基于保护喹诺酮靶标(Martinez-Martinez *et al.*, 1998)。至此，已经描述了许多相关的 *qnr* 基因，即 *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* 和 *qnrS*(Cavaco *et al.*, 2009；Jacoby *et al.*, 2008；Nordmann *et al.*, 2005)。在每个家族中也有许多变体，它们之间的差异与氨基酸取代有关，例如 QnrB1, QnrB7 和 QnrB17(Jacoby *et al.*, 2008)。Qnr 基因通常位于携带多种抗性决定簇的质粒上，特别是那些含有编码超广谱 β-内酰胺酶(ESBL)基因的质粒(Nordmann *et al.*, 2005)。Qnr 基因和编码广谱或 AmpC 型 β-内酰胺酶的基因通常存在于相同的质粒中(Robicsek *et al.*, 2006)。对环丙沙星耐药的另一种机制是产生修饰的氨基糖苷类乙酰转移酶(*AAC(6')-Ib-cr*)，通过酶促修饰降低该化合物的活性(Robicsek *et al.*, 2006)。属于 AcrAB-TolC 外排泵的周质蛋白 AcrAB 的过量产生也可以引起外排物介导耐药性，这导致多重抗生素耐药(MAR)表型(Giraud *et al.*, 2000)。Baucheron 等人报道鼠伤寒沙门菌 DT104 的氟喹诺酮耐药性高度依赖于 AcrAB-TolC 外排系统(Baucheron *et al.*, 2004)。在从猪上分离的大

肠杆菌中发现了赋予抗生素喹乙醇抗性的接合质粒，耐药机制被确定为多重耐药外排泵 *OqxAB* (Hansen *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2003) (Hansen *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2003) (Hansen *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2003) (Hansen *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2003)。另一个外排泵 *QepA* 是从日本住院患者的尿样中分离出的大肠杆菌中得到。它被编码在一个赋予对氨基糖苷类，氟喹诺酮类和广谱 β -内酰胺类多重耐药性的质粒上 (Yamane *et al.*, 2007)。

目前，所发现的与氟喹诺酮类药物耐药性有关的主动外排系统均为多重抗生素耐药泵 (夏培元, 2001)。细菌外膜蛋白通透性的改变和细菌主动外排系统亢进，可非特异性地将药物主动地由细胞内排至细胞外。

1.5 沙门菌脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型

PFGE 在 1984 年首次被描述，然而在 90 年代被用于沙门菌 (Threlfall *et al.*, 1990)，该方法的发展成熟为监测控制沙门菌的流行提供了有力工具，对于细菌性传染病监测、追踪、溯源等暴发调查有非常重要的意义 (Wattiau *et al.*, 2011)。这种方法成功实现了脉冲网络 PFGE 数据库的开发，该数据库自 1996 年以来在美国和欧洲存储了超过 350,000 种超过 500 种血清型的 PFGE 模式 (Zou *et al.*, 2013)，被公认为研究沙门菌的“黄金标准” (Ribot *et al.*, 2006; Swaminathan *et al.*, 2001)。

PFGE 方法包括用限制性酶即 *XbaI*, *SpeI*, *NotI* 切割细菌基因组，所述限制性酶识别染色体 DNA 上的几个位点，随机切割并产生 10 至 30 个范围为 10 至 800kb 的 10 至 30 个限制性片段。这些大片段的 DNA 不能通过常规的电泳分离，但是 PFGE 中的电场定向被周期性地修改，允许高达 2 兆碱基的片段被不同大小有效地分开 (Fang *et al.*, 2010; Foley *et al.*, 2006)。作为用于正常化的通用分子量标准，来自肠炎沙门菌布伦登卢普血清型 (H9812) 的 DNA 对照用作 PFGE 指纹标准，允许与数种用于数种细菌病原体的数据库进行比较 (Hunter *et al.*, 2005)。目前，PFGE 技术在沙门菌病的监测防控中应用广泛，适应于某一国家或各个国家间沙门菌调查的分型研究，对某些地区的沙门菌感染进行溯源，建立人类沙门菌感染与接触动物和进食污染食物之间的联系，为沙门菌感染的疫情控制和政策制定提供可靠的流行病学依据 (张代涛等, 2009)。虽然由于 PFGE 设备仪器昂贵、操作复杂、所需时间长等原因在一定程度上限制了其推广应用，但由于其分辨率高、重复性好、易于标准化等，PFGE 目前仍然是细菌分型的主要方法之一，对细菌性传染病的流行病学研究具有重要意义 (张代涛

等，2009）。

1.6 研究目的及意义

本研究以 2016 年至 2017 年间广东省部分地区（包括广州市、深圳市、河源市、韶关市、佛山市、云浮市）农贸市场随机采集的鸡肉和猪肉中沙门菌分离株为研究对象，主要目的是调查农贸市场鸡肉和猪肉中的沙门菌流行情况，并研究流行菌株的基本特性（包括血清型、耐药性、ESBLs 基因型），以便有效的掌握有关食品污染信息和沙门菌的流行病学及药敏特性数据，为畜禽养殖过程中抗生素的合理使用提供指导，并为后续研究沙门菌引起的公共卫生安全和食品安全问题提供数据支持。同时对鸡肉中常见血清型沙门菌进行喹诺酮类抗生素耐药基因携带情况检测和 PFGE 分型研究，为监测不同血清型沙门菌喹诺酮类抗生素耐药基因流行情况提供最新数据，也为不同血清型沙门菌喹诺酮类抗生素耐药机制的深入研究提供数据基础。

第二章 农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌分离鉴定和耐药性分析

2.1 引言

沙门菌是一种全球食源性致病菌 (Scallan *et al.*, 2011)。到目前为止, 全世界范围内沙门菌中已识别出 2 600 多种血清型, 几乎所有的沙门菌都可引起人类和动物的疾病 (Guibourdenche *et al.*, 2010)。中国约有 70%至 80%的食源性疾病暴发是由沙门菌引起的 (Wang *et al.*, 2007)。鸡肉和猪肉被认为是沙门菌传播的主要储库 (Jackson *et al.*, 2013; Vo *et al.*, 2006)。近年来有研究表明, 由于动物饲养过程中长期添加抗生素使其耐药性明显增加, 并发现多重耐药沙门菌可通过食物链对人类构成严重威胁 (Barza, 2002; Lai *et al.*, 2014)。

广东是中国南方经济发达省份, 属亚热带地区; 其畜牧业生产和消费居全国前列, 高温多湿的气候条件适合许多食源性致病菌的扩散传播。自 2009 年以来, 广东省疾病预防控制中心 (GDCDC) 建立了针对人类非伤寒沙门菌 (NTS) 的实验室监测 (Deng *et al.*, 2012), 主要监测各医院沙门菌的流行情况。但有关广东省鸡肉和猪肉中沙门菌流行特征和耐药性研究数据缺乏, 给本省畜禽肉沙门菌的防控以及人沙门菌病的预防带来了很大的困难。

本研究的主要目的是调查广东省部分地区 (包括广州市、深圳市、河源市、韶关市、佛山市、云浮市) 农贸市场鸡肉和猪肉中的沙门菌流行情况, 并研究流行菌株的基本特性 (包括血清型、耐药性、ESBLs 基因型), 以更有效的掌握有关食品污染信息和沙门菌的流行病学及耐药性数据, 为畜禽养殖过程中抗生素的合理使用提供指导, 并为后续研究沙门菌引起的公共卫生安全和食品安全问题提供数据支持。

2.2 材料与方法

2.2.1 试验材料

2.2.1.1 样品来源

于 2016 年至 2017 年期间, 根据影响鸡肉和猪肉的多种因素, 包括地理位置差异、规模大小、人口密度以及畜牧业发展程度等选择粤东南西北中 (广州市、深圳市、河源市、韶关市、佛山市、云浮市) 进行调查, 随机采集农贸市场销售的生鲜鸡肉和猪肉样品共 903 份, 其中鸡肉样品 475 份, 猪肉样品 428 份。本研究采样地理位置如图 2-1 所示。采样原则如下: 鸡肉类型 (即全鸡和分割鸡), 猪肉类型 (即分割猪肉); 每个市区每月挑选 3 个农贸市场采集样品, 其中广州市每月按照 5 个不同区域 (包括

天河区、海珠区、白云区、越秀区、荔湾区）采集样品。具体样品来源情况见表 2-1。



图 2-1 本研究样品来源地理位置

• 表 2-1 鸡肉和猪肉样品来源情况（单位：份）

采样地区	鸡肉	猪肉	总计
广州市	165	198	363
深圳市	104	49	153
河源市	49	40	89
韶关市	61	52	113
佛山市	46	45	91
云浮市	50	44	94
合计	475	428	903

2.2.1.2 标准菌株

大肠杆菌质控菌株 ATCC 25922，鼠伤寒沙门菌标准株 ATCC 14028，肠炎沙门菌标准株 CICC 21482 均购自中国兽医药品监察所。

2.2.1.3 培养基

缓冲蛋白胨水（BPW）、四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌液、氯化镁-孔雀绿（RVS）增菌液、木糖赖氨酸脱氧胆盐（XLD）琼脂均为美国 Becton Dickinson 公司产品；亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液、HE 琼脂、亚硫酸铋（BS）琼脂均为青岛海博生物技术有限责任公司产品；XLT4 琼脂、LB 营养琼脂、LB 肉汤、胰蛋白胨大豆琼脂（TSA）、水解酪蛋白（MH）琼脂、三糖铁琼脂（TSI）、尿素琼脂（Urea）、半固体营养琼脂均为广东环凯微生物科技有限公司产品；沙门菌属显色培养基为法国科马嘉公司产品。

2.2.1.4 主要试剂

沙门菌属 128 种诊断血清为宁波天润生物药业有限公司产品；API – 20 E 生化鉴定试剂盒为法国梅里埃公司产品；0.1%煌绿，20%碘液均为青岛海博生物技术有限责任公司产品；DNA Marker DL1000、rTaq DNA 聚合酶（Premix Taq）均为日本 TaKaRa 公司产品；Goldview 核酸染料、脱脂奶粉购自天根生化科技有限公司；Goldview 核酸染料为美国 Biotium 公司产品；氯化钠、NaOH 为美国 Sigma 公司产品。

2.2.1.5 主要仪器和设备

YJ-1450 超净工作台（苏州净化设备厂）；QHZ-98A/QHZ-98B 全温振荡培养箱（太仓市华美生化仪器厂）；SHP-250 生化培养箱（上海精宏实验设备有限公司）；SYN-K 电热恒温水浴锅（北京长风仪器厂）；Elix100 纯净水装置（美国 Millipore 公司）；5424R 高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；PTC-200 PCR 扩增仪（美国 MJ ReSearch 公司）；JY2001 电子天平（上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂）；CHB-202 比浊仪（法国 BioMerieux 公司）；SBD-50 水浴摇床（美国 MJ ReSearch 公司）；SIGMA1-14 台式离心机（德国 Sigma 公司）；MLS-3780 高温蒸汽灭菌锅（日本 Sanyo 公司）；Gel Doc XR 凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）；Power Pac universalTM 核酸电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）。

2.2.1.6 药敏纸片

本研究所用的药敏纸片（英国 OXOID 公司）购自广州市迪景微生物科技有限公司。ESBLs 药敏片为杭州滨和微生物试剂有限公司产品。18 种抗生素的药敏纸片分别为：

β-内酰胺类：氨苄西林（AMP，10 μg）、阿莫西林/克拉维酸（AMC，30 μg）、头孢噻肟（CTX，30 μg）、头孢他啶（CAZ，30 μg）、头孢吡肟（FEP，5 μg）；氨基糖苷类：庆大霉素（GEN，10 μg）、链霉素（STR，10 μg）、阿米卡星（AMK，30 μg）；磺胺类：复方新诺明（SXT，23.75/1.25 μg）、磺胺复合物（S3，300 μg）；喹诺酮类：萘啶酸（NAL，30 μg）、氧氟沙星（OFX，5 μg）、环丙沙星（CIP，5 μg）；氯霉素类：氟苯尼考（FFC，30 μg）、氯霉素（CHL，30 μg）；碳青霉烯类：亚胺培南（IPM，10 μg）；粘菌素类：多粘菌素 B（PB，300 IU）；四环素类：四环素（TET，30 μg）。

ESBLs 药敏片：头孢噻肟（CTX，30 μg），头孢噻肟/克拉维酸（30 μg/10 μg）片和头孢他啶（CAZ，30 μg），头孢他啶/克拉维酸（30 μg/10 μg）。

2.2.2 试验方法

2.2.2.1 样品的采集和处理方法

按照中华人民共和国国家标准 GB/T 4789.1-2010 食品卫生微生物学检验总则中规定进行。农贸市场随机购买样品（鸡肉和猪肉）250 g 左右将其放置无菌采样袋中于低温保存箱或常温条件运送到实验室进行预处理。样品从采集到送至实验室时间尽量在 8 h 以内。

2.2.2.2 沙门菌分离鉴定方法

按照中华人民共和国国家标准 GB/T 4789.4-2010 食品微生物学检验沙门菌检验中规定进行，具体检验程序如图 2-2 所示。

将鸡肉和猪肉样品按 400 mL/kg 加入灭菌 BPW 洗涤 2 min，将洗涤后 BPW 置于 37℃ 摇床中以 100 r/min 预增菌振荡 6 h~8 h。再将培养过的预增菌液体移取 1 mL 转移至 10 mL TTB 内，于 42℃ ±1℃ 培养 18 h~24 h 进行选择增菌。再取 1 mL 转移至 10 mL SC 内，于 36℃ ±1℃ 增菌培养 18 h~24 h。再分别用 10 μL 接种环取 TTB 和 SC 中增菌液划线接种于 XLT4 琼脂平板和 XLD 琼脂平板（或 HE 琼脂平板、沙门菌属显色培养基平板）于 36℃ ±1℃ 分别培养 24 h~48 h，观察各个平板上生长的菌落。沙门菌在 XLT4 琼脂平板或者 XLD 琼脂平板上典型形态为黑色圆形边缘透明菌落，或者无色透明菌落。

挑 2 个以上典型的疑似沙门菌菌落，接种三糖铁琼脂、营养琼脂平板和赖氨酸脱羧酶试验培养基进行生化鉴定或按照 API 20 E 生化鉴定试剂盒说明进行鉴定。

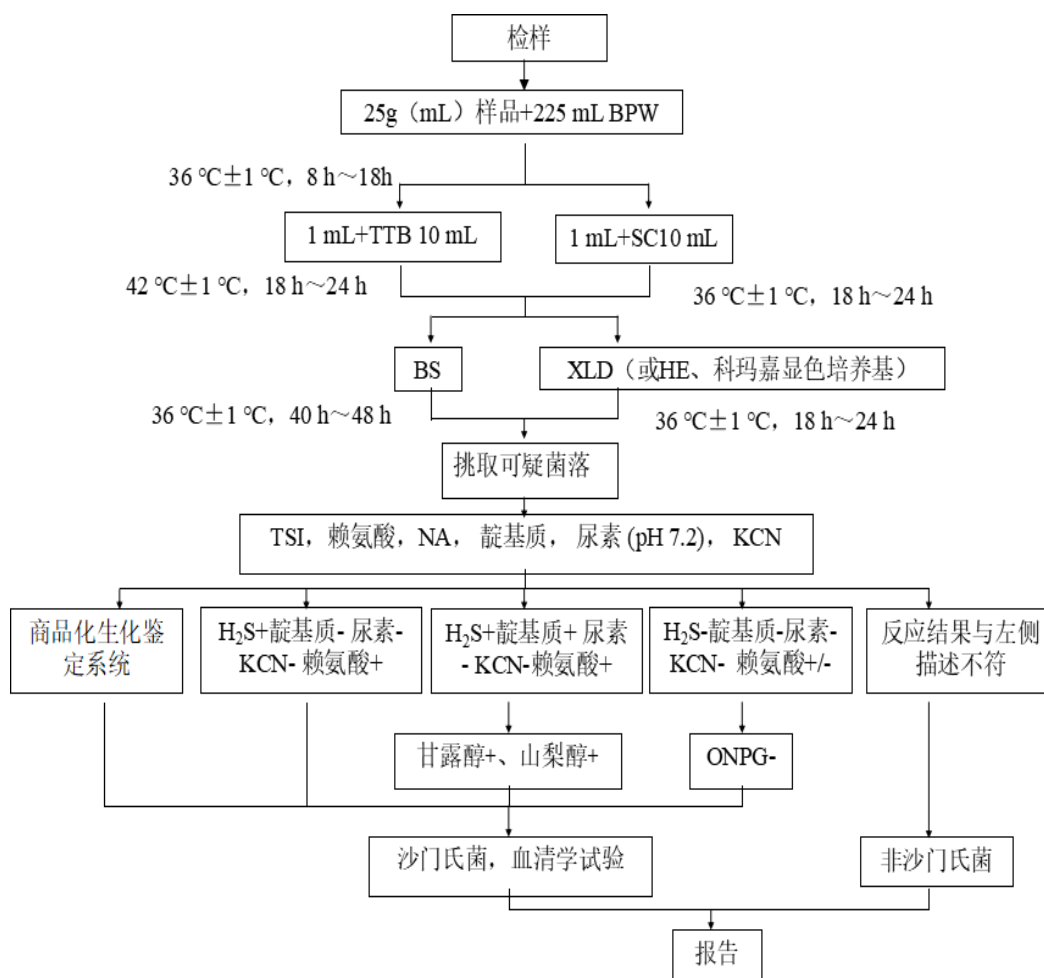


图 2-2 沙门菌分离鉴定方法

2.2.2.3 沙门菌 DNA 的提取

将典型的疑似菌落置于 LB 肉汤 37℃ 培养 12 h~18 h; 取 1 mL 菌液加入 1.5 mL 离心管中, 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 用 1 mL 无菌去离子水悬浮沉淀后, 离心 10 min, 弃上清液。加入 200 μL 无菌去离子水悬浮混匀, 置于沸水中煮沸 20 min; 再迅速冰浴 10 min, 涡旋振荡混匀, 再以 12000 r/min 离心 3 min, 其上清液即为模板, -20℃ 保存备用。

2.2.2.4 沙门菌的 PCR 鉴定

根据文献 (Yang *et al.*, 2010) 报道, 选用沙门菌侵袭蛋白 A (invasion protein A, inv A) 基因为扩增对象的特异性引物, 由广州艾基生物技术有限公司合成, 引物序列见表 2-2。按照表 2-3 的反应体系进行 PCR 鉴定, 同时设置阴阳性对照。

表 2-2 沙门菌鉴定引物序列

目的基因	引物名称	引物序列 (5'-3')	产物大小
<i>invA</i>	JsalM-F	TCGCACCGTCAAAGGAACCGTAAAGC	331bp
	JsalM-R	GCATTATCGATCAGTACCAGCCGTCT	

注：表中 F 代表上游引物；R 代表下游引物

表 2-3 PCR 扩增体系

试剂	用量 (μL)
Premix Ex Taq	12.5
模板 DNA	2
引物 JsalM-UP (10 μmol)	1
引物 JsalM-LOW (10 μmol)	1
无菌水	8.5
总体积	25

PCR 反应程序：94℃ 预变性 7 min，94℃ 变性 1 min，55℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1 min，34 个循环，72℃ 延伸 5 min，PCR 产物 4℃ 保存。

PCR 产物分析：以 DNA Marker DL1000 作为分子质量标准，取 5 μL 电泳产物，以 150 V 电压电泳 20 min 后，进行凝胶紫外成像系统观察并拍照和结果分析。若出现与阳性对照一样 331 bp 大小的目的片段，且阴性对照无，则说明该菌株是沙门菌。

2.2.2.5 沙门菌的保存与复苏

保存：将纯化并确定为沙门菌的菌落密集划线于 LB 营养琼脂平板上，培养 16 h~18 h 后，向琼脂板中加入 3 mL 40% 的甘油 LB 肉汤，用无菌刮菌棒将菌落从琼脂板上刮下来混匀在甘油肉汤中，吸取 1 mL 分装于保菌管中，于 -20℃ 冰箱保存。

复苏：将冻存的沙门菌化冻后直接接种于 LB 琼脂平板中，37℃ 温箱培养 14 h~18 h。

2.2.2.6 沙门菌的血清型鉴定

血清型鉴定方法按照宁波天润生物药业有限公司提供的沙门菌诊断血清操作步骤和说明进行。

2.2.2.7 药物敏感性试验

使用 Kirby-Bauer 纸片扩散法对沙门菌分离株进行药物敏感性试验，并根据 CLSI（美国临床实验室标准化委员会）推荐的操作规程对结果进行解释。使用大肠杆菌 ATCC 25922 作为质控菌株。药敏实验判定标准见表 2-4。

用接种环挑取 LB 琼脂平板上形态相同的单菌落，移至 1~1.5 mL MH 肉汤中；置 37℃ 培养至菌液浓度达到或超过比浊管浓度（一般需 4~5 小时，浓度约 $1-2 \times 10^8$ CFU/ml）；用生理盐水或肉汤校正菌液浓度，调节细菌悬液使其达到 0.5 麦氏单位；用无菌棉拭子蘸取菌液，均匀涂布于 MH 培养基表面；用无菌镊子分别夹取含有不同抗生素的纸片，贴在已涂布细菌的平板表面；纸片若与培养基接触，不可再移动。将培养基于 37℃ 培养 16 h~18 h；用游标卡尺测量质控菌株的抑菌环直径；若在 CLSI 规定的药敏范围内，再测量各药敏片的抑菌环直径，并根据抑菌圈直径判定敏感、中敏或耐药。

表 2-4 药敏纸片种类及判定标准

类别	中文名	缩写	判定标准(mm)		
			耐药	中敏	敏感
青霉素类	氨苄西林	AMP	≤13	14-16	≥17
	阿莫西林/克拉维酸	AMC	≤13	14-17	≥18
头孢类	头孢噻肟	CTX	≤19	20-22	≥23
	头孢他啶	CAZ	≤17	18-20	≥21
	头孢吡肟	FEP	≤14	15-17	≥18
氨基糖甙类	庆大霉素	GEN	≤12	13-14	≥15
	链霉素	STR	≤11	12-14	≥15
	阿米卡星	AMK	≤14	15-19	≥17
磺胺类	复方新诺明	SXT	≤10	11-15	≥16
	磺胺复合物	S3	≤12	13-16	≥17
喹诺酮类	萘啶酸	NAL	≤13	14-18	≥19
	氧氟沙星	OFX	≤12	13-15	≥16
	环丙沙星	CIP	≤20	21-30	≥31
氯霉素类	氟苯尼考	FFC	≤14	15-19	≥20
	氯霉素	CHL	≤12	13-17	≥18
碳青霉烯类	亚胺培南	IPM	≤19	20-22	≥23
粘菌素类	多粘菌素 B	PB	≤12	13-19	≥20
四环素类	四环素	TET	≤11	12-14	≥15

2.2.2.8 产 ESBLs 沙门菌的筛选

按照双纸片协同试验 (Emery, Weymouth, 1997) 和 CLSI 推荐的方法进行操作和判读, 以大肠杆菌 ATCC 25922 作阴性对照。

初筛试验: 将待测菌株均匀涂布于 MH 琼脂平板; 贴头孢他啶和头孢噻肟药敏片置 37℃ 温箱培养 16 h~18 h; 当两个药物的抑菌圈直径满足以下任一条件: 即头孢他啶 ≤ 22 mm, 头孢噻肟 ≤ 27 mm, 则判定为疑似产 ESBLs 的菌株。但需进一步作确

证试验。

确证试验：将待测菌株制成浊度为 0.5 麦氏单位的菌悬液，均匀涂布于 MH 琼脂平板；分别贴头孢他啶和头孢他啶克拉维酸及头孢噻肟和头孢噻肟/克拉维酸两组纸片，37℃ 培养 16 h~18 h；测量各纸片的抑菌环直径，若两个中任何一个药物，加克拉维酸后与不加克拉维酸的抑菌环直径的值 ≥ 5 mm 时，说明该菌株产生 ESBLs 酶。

2.2.2.9 ESBLs 相关基因的检测及序列测定

通过 PCR 和 DNA 测序进一步证实 ESBLs 基因型的沙门菌分离株。参考文献中报道的 ESBLs 编码基因鉴定引物，由广州艾基生物技术有限公司合成，引物序列见表 2-5。检测 ESBLs 基因包括 *bla*_{TEM}，*bla*_{CTX-M}，*bla*_{CMY}，*bla*_{OXA}，*bla*_{PSE} 和 *bla*_{SHV}。

表 2-5 ESBLs 基因 PCR 扩增序列

目的基因	引物	引物序列 (5'-3')	产物	参考文献
<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{TEM} -F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	964 bp	(Qiao <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> _{TEM} -R	ACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M} -F	GAGTTTCCCCATTCCGTTTC	909 bp	(Qiao <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> _{CTX-M} -R	CAGAATAAGGAATCCCATGGTT		
<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{CMY} -F	GCCTCTTTCTCCACGTTTGCT	1065 bp	(Qiao <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> _{CMY} -R	AGCCGGGTTAGGATAGCTTT		
<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{OXA} -F	ACCAGATTCAACTTTCAA	590 bp	(Qiao <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> _{OXA} -R	TCTTGGCTTTTATGCTTG		
<i>bla</i> _{PSE}	<i>bla</i> _{PSE} -F	AATGGCAATCAGCGCTTCCC	598 bp	(Qiao <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> _{PSE} -R	GGGGCTTGATGCTCACTACA		
<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{SHV} -F	CCAGCAGGATCTGGTGGACTAC	231 bp	(Nguyen <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> _{SHV} -R	CCGGGAAGCGCCTCAT		

注：表中 F 代表上游引物；R 代表下游引物

根据表 2-5 的序列合成引物，以沙门菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增，同时设置阴性对照。PCR 扩增体系见表 2-6，反应程序见表 2-7。

表 2-6 ESBLs 基因检测 PCR 反应体系

试剂	用量 (μL)
Premix Ex Taq	12.5
模板 DNA	1
上游引物 (20 μmol)	1
下游引物 (20 μmol)	1
无菌水	9.5
总体积	25

表 2-7 ESBLs 基因检测 PCR 扩增条件

基因	PCR 反应条件				
	预变性	扩增 (35 个循环)			终延伸
<i>bla_{TEM}</i>	94℃, 5min	(94℃, 30s)	(54℃, 30s)	(72℃, 30s)	72℃, 10min
<i>bla_{CTX-M}</i>	94℃, 5min	(94℃, 30s)	(54℃, 30s)	(72℃, 30s)	72℃, 10min
<i>bla_{CMY}</i>	94℃, 5min	(94℃, 30s)	(54℃, 30s)	(72℃, 30s)	72℃, 10min
<i>bla_{OXA}</i>	94℃, 5min	(94℃, 30s)	(55℃, 30s)	(72℃, 30s)	72℃, 10min
<i>bla_{PSE}</i>	94℃, 5min	(94℃, 30s)	(58℃, 30s)	(72℃, 30s)	72℃, 10min
<i>bla_{SHV}</i>	95℃, 5min	(95℃, 30s)	(60℃, 90s)	(72℃, 90s)	68℃, 10min

PCR 产物用溴化乙锭染色, 用 1%琼脂糖凝胶电泳后在紫外灯下观察, 选取扩增结果为阳性的产物进行回收, 按照说明书进行产物回收和纯化操作 (Omega)。回收的片段经核酸蛋白分析仪测定核酸浓度后, 连接 pMD19-T 载体 (TaKaRa), 连接后的产物再转化至感受态细胞 (天根生物), 最后挑选阳性菌落进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定为阳性的菌液送至上海生工生物技术有限公司进行测序。测序结果通过 DNASTar 软件进行拼接, 拼接后的序列使用 NCBI GenBank 在线 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行分析和比对 ESBLs 编码基因片段。

2.3 试验结果及分析

2.3.1 沙门菌分离鉴定

本研究从 XLT4 和 XLD 培养基上挑取疑似沙门菌菌落，通过 API 生化鉴定得到阳性沙门菌后（见图 2-3），再使用 PCR 技术对沙门菌分离株 *invA* 基因进行扩增，在 331 bp 左右出现特异性条带且阴阳性对照无误，则确定为沙门菌菌株，PCR 结果如图 2-4 所示。



图 2-3 沙门菌 API 生化鉴定结果

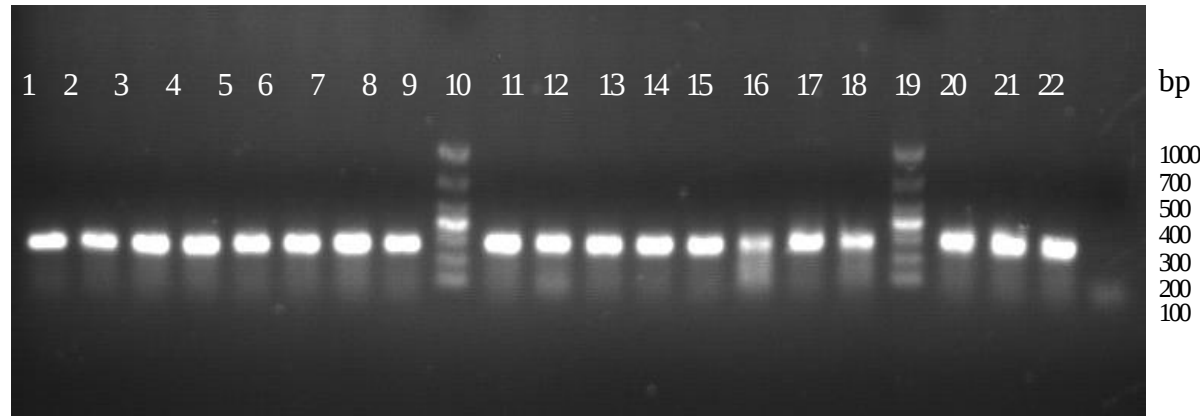


图 2-4 沙门菌 PCR 鉴定结果

图中：泳道 9 和 18 为 1000bp DNA Marker，泳道 1~8；10~17；19~20 为疑似沙门菌 PCR 扩增结果，泳道 21 为阳性对照，泳道 22 为阴性对照。

从所采集的 903 份鸡肉和猪肉样品中分离到沙门菌 615 株，总阳性率为 68.1%。其中包括鸡肉 302 株（阳性率 63.6%），猪肉 313 株（阳性率 73.1%）。

2.3.2 不同采样地区鸡肉和猪肉中沙门菌阳性率

不同采样地区鸡肉和猪肉中沙门菌阳性率如表 2-8 所示。

表 2-8 不同采样地区鸡肉和猪肉中沙门菌阳性率

地区	鸡肉			猪肉			总计(%)
	样品数	阳性数	阳性率(%)	样品数	阳性数	阳性率(%)	
广州	165	101	61.2	198	147	74.2	68.3
深圳	104	72	69.2	49	41	83.7	73.9
河源	49	28	57.1	40	25	62.5	60.0
韶关	61	55	90.2	52	43	82.7	86.7
佛山	46	13	28.3	45	27	60.0	44.0
云浮	50	33	66.0	44	30	68.2	67.0
总计	475	302	63.6	428	313	73.1	68.1

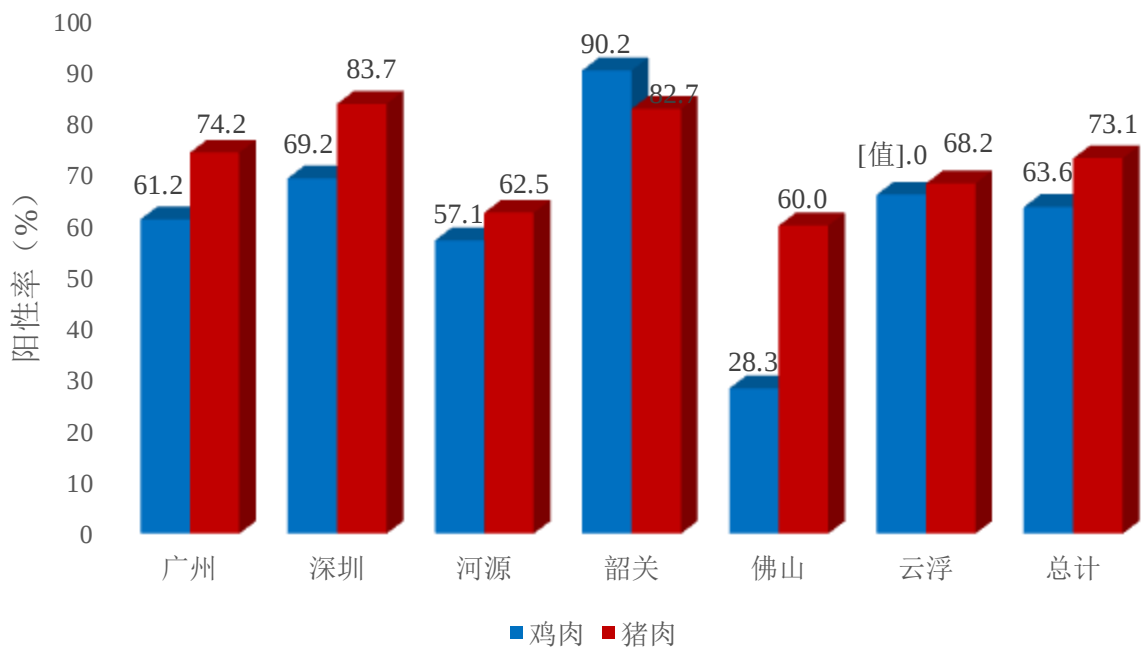


图 2-5 不同地区鸡肉和猪肉中沙门菌阳性率

从图 2-5 可以看出，不同采样地区以及不同样品类型的阳性率也不同。猪肉阳性率（73.1%）高于鸡肉（63.6%）。猪肉中沙门菌阳性率最高的地区是深圳市（83.7%），其次为韶关市（82.7%），其他依次为广州市、云浮市、河源市和佛山市，沙门菌阳性率分别为 74.2%、68.2%、62.5%和 60.0%；而鸡肉中阳性率最高的地区为韶关市，达到了 90.2%，其次为深圳市，阳性率为 69.2%，其他依次为云浮市、广州市、河源

市和佛山市，沙门菌阳性率分别为 66.0%、61.2%、57.1%和 28.3%。综上所述，深圳市和韶关市农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌污染情况严重，佛山市鸡肉和猪肉被沙门菌污染轻。总的来说，广东省农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌污染情况普遍高。

2.3.3 沙门菌血清型鉴定

2.3.3.1 鸡肉和猪肉中沙门菌的血清型分布

表 2-9 鸡肉和猪肉中沙门菌血清型分布

血清型	样品类型		总数目 (n=615)
	鸡肉 (n=302)	猪肉 (n=313)	
鼠伤寒	6	78	84
罗森	14	67	81
德比	9	66	75
伦敦	9	48	57
阿贡纳	55	1	56
科瓦利斯	45	1	46
肯塔基	38	-	38
姆班达卡	32	2	34
布伦登卢普	21	-	21
肠炎	21	-	21
火鸡	7	13	20
斯坦利	5	9	14
印第安纳	12	-	12
山夫登堡	3	2	5
塞罗	5	-	5

续表 2-9

血清型	样品类型		总数目 (n=615)
	鸡肉 (n=302)	猪肉 (n=313)	
韦太夫雷登	1	3	4
吉韦	-	4	4
阿尔巴尼	4	-	4
哈达尔	4	-	4
鸭	1	2	3
克雷菲尔德	-	3	3
纽波特	-	3	3
利奇菲尔德	3	-	3
明斯特	1	1	2
婴儿	1	1	2
黄金海岸	-	2	2
阿拉丘	-	1	1
病牛	-	1	1
勃兰登堡	-	1	1
查理	-	1	1
凯杜古	-	1	1
科特布斯	-	1	1
里定	-	1	1
海法	1	-	1
拉姆福德	1	-	1
圣保罗	1	-	1
汤卜逊	1	-	1
胥戈成格隆	1	-	1

注：表中 n 代表菌株数；表中-代表未检出此血清型

由表 2-9 可知，615 株沙门菌共鉴定出 38 种血清型，其中总体阳性率最为常见

的血清型为鼠伤寒（84 株，占总数的 13.7%）、罗森（81 株，占总数的 13.2%）和德比（75 株，占总数的 12.2%），其次为伦敦（57 株，占总数的 9.3%）、阿贡纳（56 株，占总数的 9.1%）、科瓦利斯（46 株，占总数的 7.5%）和肯塔基（38 株，占总数的 6.2%）等。不常见的沙门菌血清型或者检出率低的沙门菌血清型有阿拉丘、病牛、勃兰登堡、查理、凯杜古、科特布斯、里定、海法、拉姆福德、圣保罗、汤卜逊和胥戈成格隆，均占总数的 0.2%。

鸡肉中鉴定出 27 种血清型，最常见的沙门菌血清型为阿贡纳（55 株，18.2%）、科瓦利斯（45 株，14.9%）、肯塔基（38 株，12.6%）和姆班达卡（32 株，10.6%），其次分别为布伦登卢普（21 株，7.0%）、肠炎（21 株，7.0%）、罗森（14 株，4.6%）和印第安纳（12 株，4.0%）。不常见血清型为韦太夫雷登、鸭、明斯特、婴儿、海法、拉姆福德、圣保罗、汤卜逊和胥戈成格隆，其检出率均为超过 0.3%（1 株）。

猪肉中鉴定出 25 种血清型，最为常见的血清型为鼠伤寒（78 株，24.9%），罗森（67 株，21.4%）、德比（66 株，21.1%）和伦敦（48 株，15.3%）。不常见的血清型为阿贡纳、科瓦利斯、明斯特、婴儿、阿拉丘、病牛、勃兰登堡、查理、凯杜古、科特布斯和里定，其检出率均为 0.3%（1 株）。

在检出的 38 种沙门菌血清型中，仅在鸡肉中检出的血清型有 13 种，分别是肯塔基、布伦登卢普、肠炎、印第安纳、塞罗、阿尔巴尼、哈达尔、利奇菲尔德、海法、拉姆福德、圣保罗、汤卜逊和胥戈成格隆；而仅在猪肉中检出的血清型有 11 种，分别是吉韦、克雷菲尔德、纽波特、黄金海岸、阿拉丘、病牛、勃兰登堡、查理、凯杜古、科特布斯和里定。重要的是，还首次在国内动物源性产品中检出拉姆福德血清型沙门菌。

2.3.3.2 各采样地区鸡肉和猪肉中沙门菌的血清型分布

表 2-10 各采样地区沙门菌的血清型分布

血清型	地区					
	广州 (n=248)	深圳 (n=113)	河源 (n=53)	韶关 (n=98)	佛山 (n=40)	云浮 (n=63)
鼠伤寒	33	17	-	9	15	7
罗森	30	11	-	14	0	20
德比	21	12	9	6	6	3
伦敦	23	14	-	10	-	9
阿贡纳	18	14	8	4	2	-
科瓦利斯	12	17	-	7	-	2
肯塔基	16	-	4	8	-	6
姆班达卡	9	3	-	4	5	-
布伦登卢普	11	2	-	5	-	3
肠炎	7	5	8	-	-	-
火鸡	4	6	-	3	-	1
斯坦利	5	-	2	5	-	-
印第安纳	1	-	-	4	-	-
山夫登堡	3	-	-	2	-	-
塞罗	1	-	-	-	3	-
韦太夫雷登	2	-	-	2	-	-
吉韦	2	-	-	-	2	-
阿尔巴尼	2	-	2	-	-	-
哈达尔	2	-	-	1	-	-
鸭	2	-	-	1	-	-
克雷菲尔德	2	-	-	1	-	-
纽波特	-	2	-	1	-	-
利奇菲尔德	1	-	1	-	-	-

续表 2-10

血清型	地区					
	广州 (n=248)	深圳 (n=113)	河源 (n=53)	韶关 (n=98)	佛山 (n=40)	云浮 (n=63)
明斯特	-	-	-	2	-	-
婴儿	2	-	-	-	-	-
黄金海岸	-	-	-	1	-	-
阿拉丘	-	1	-	-	-	-
病牛	1	-	-	-	-	-
勃兰登堡	1	-	-	-	-	-
查理	1	-	-	-	-	-
凯杜古	1	-	-	-	-	-
科特布斯	1	-	-	-	-	-
里定	-	-	-	1	-	-
海法	1	-	-	-	-	-
拉姆福德	-	-	-	1	-	-
圣保罗	1	-	-	-	-	-
汤卜逊	1	-	-	-	-	-
胥戈成格隆	33	17	-	9	15	7

注：表中 n 代表菌株数；-代表未检出此血清型

由表 2-10 可以看出，从广州市采集的鸡肉和猪肉中共分离出沙门菌 248 株，涵盖了 38 种血清型中的 32 种，未分离到利奇菲尔德、婴儿、阿拉丘、病牛、海法和圣保罗这 6 种血清型的沙门菌。检出的最常见血清型为罗森（33 株，13.3%）、鼠伤寒（31 株，12.5%）和德比（30 株，12.1%），其次是阿贡纳（23 株，9.3%）、伦敦（21 株，8.5%）；其余沙门菌检出率在 0.4%~7.3%之间。从深圳市采集的鸡肉和猪肉中共分离到沙门菌 113 株，涵盖了 38 种血清型中的 13 种，未分离到姆班达卡、印第安娜、山夫登堡、塞罗、韦太夫雷登、吉韦、阿尔巴尼、哈达尔、鸭、克雷菲尔德、纽波特等 25 种血清型沙门菌。其中最常见的血清型为罗森（17 株，15.0%）、肯塔基（17 株，15.0%）、阿贡纳（14 株，12.4%）和科瓦利斯（14 株，12.4%），其他沙门菌检

出率在 0.9%~10.6%之间。从河源市采集的样品中共分离到沙门菌 53 株,只检出 38 种血清型中的 8 种,分别为鼠伤寒(19 株, 35.8%)、伦敦(9 株, 17.0%)、科瓦利斯(8 株, 15.1%)、火鸡(8 株, 15.1%)以及姆班达卡、印第安纳、哈达尔和明斯特等血清型沙门菌。从韶关市采集的样品中共分离到沙门菌 98 株,检出 23 种血清型。其中常见血清型为德比(14 株, 14.3%)和阿贡纳(10 株, 10.2%), 其次是罗森、姆班达卡和肯塔基等, 检出率不超过 9.2%。从佛山市采集的样品中共分离到沙门菌 40 株, 检出 7 种血清型。最普遍的血清型为罗森(15 株, 37.5%), 其次是鼠伤寒、伦敦、布伦登卢普、韦太夫雷登、科瓦利斯和阿尔巴尼这 6 种血清型, 检出率不超过 17.5%。从云浮市采集的样品中共分离到沙门菌 63 株, 检出 9 种血清型。最常见的血清型为德比(20 株, 31.7%)和鼠伤寒(12 株, 19.0%), 阿贡纳、罗森、姆班达卡、伦敦、肠炎、肯塔基、斯坦利等沙门菌血清型阳性率不超过 14.3%。

表 2-11 各采样地区鸡肉和猪肉中沙门菌的血清型分布

血清型	广州 (n=248)		深圳 (n=113)		河源 (n=53)		韶关 (n=98)		佛山 (n=40)		云浮 (n=63)	
	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉
鼠伤寒	3	28	-	9	2	17	-	6	-	7	1	11
罗森	5	28	3	14	-	-	2	7	3	12	1	6
德比	4	26	1	10	-	-	1	13	-	-	3	17
伦敦	4	17	3	9	1	8	-	6	1	5	-	3
阿贡纳	23	-	13	1	-	-	10	-	-	-	9	-
科瓦利斯	18	-	14	-	7	1	4	-	2	-	-	-
肯塔基	12	-	17	-	-	-	7	-	-	-	2	-
姆班达卡	14	2	-	-	4	-	8	-	-	-	6	-
布伦登卢普	9	-	3	-	-	-	4	-	5	-	-	-
肠炎	11	-	2	-	-	-	5	-	-	-	3	-
火鸡	2	5	-	5	5	3	-	-	-	-	-	-
斯坦利	1	3	3	3	-	-	1	2	-	-	-	1
印第安纳	5	-	-	-	2	-	5	-	-	-	-	-
山夫登堡	1	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-

续表 2-11

血清型	广州 (n=248)		深圳 (n=113)		河源 (n=53)		韶关 (n=98)		佛山 (n=40)		云浮 (n=63)	
	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉
塞罗	3	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
韦太夫雷登	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-
吉韦	-	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
阿尔巴尼	2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
哈达尔	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
鸭	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
克雷菲尔德	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
纽波特	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
利奇菲尔德	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-
明斯特	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
婴儿	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
黄金海岸	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿拉丘	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
病牛	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

续表 2-11

血清型	广州 (n=248)		深圳 (n=113)		河源 (n=53)		韶关 (n=98)		佛山 (n=40)		云浮 (n=63)	
	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉	鸡肉	猪肉
勃兰登堡	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
查理	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
凯杜古	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
科特布斯	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
里定	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
海法	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
拉姆福德	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
圣保罗	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
汤卜逊	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
胥戈成格隆	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
总计	124	124	61	52	23	30	56	42	13	27	25	38

注：表中 n 代表菌株数；表中-代表未检出此血清型

从表 2-11 可以看出,广州市从鸡肉中分离到 124 株沙门菌,涵盖了 22 种血清型,最常见的血清型为阿贡纳(23 株)、科瓦利斯(18 株)、姆班达卡(14 株)和肯塔基(12 株);从猪肉中共分离到 124 株沙门菌,涵盖 17 种血清型的沙门菌,常见血清型分别为鼠伤寒(28 株)、罗森(28 株)、德比(26 株)和伦敦(17 株)。深圳市从鸡肉中分离到 61 株沙门菌,涵盖了 10 种血清型,最常见的沙门菌血清型为肯塔基(17 株)、科瓦利斯(14 株)和阿贡纳(13 株);从猪肉中共分离到 52 株沙门菌,涵盖 8 种血清型的沙门菌,常见血清型为罗森(14 株)和德比(10 株)。河源市从鸡肉中分离到 23 株沙门菌,涵盖了 7 种血清型,最常见的沙门菌血清型为科瓦利斯(7 株);从猪肉中共分离到 30 株沙门菌,涵盖 5 种血清型的沙门菌,常见血清型为鼠伤寒(17 株)。韶关市从鸡肉中分离到 56 株沙门菌,涵盖了 17 种血清型,最常见的血清型为阿贡纳(10 株);从猪肉中共分离到 42 株,涵盖 11 种血清型的沙门菌,常见血清型为德比(13 株)。佛山市从鸡肉中分离到 13 株沙门菌,涵盖了 5 种血清型,最常见的血清型为布伦登卢普(5 株);从猪肉中共分离到 27 株沙门菌,涵盖 4 种血清型的沙门菌,常见血清型为德比(13 株)。云浮市从鸡肉中分离到 25 株沙门菌,涵盖了 7 种血清型,最常见的血清型为阿贡纳(9 株);从猪肉中共分离到 38 株沙门菌,涵盖 5 种血清型的沙门菌,常见血清型为德比(17 株)。

综上所述,不同地区以及不同样品中沙门菌血清型分布不同。广州市检出的沙门菌血清型种类最多(32 种),其次是韶关市(23 种)、深圳市(13 种)、云浮市(9 种)、河源市(8 种)和佛山市(7 种)。鸡肉中阿贡纳、科瓦利斯、肯塔基等沙门菌检出率最高,而猪肉样品中鼠伤寒、罗森和德比沙门菌占多数。六个地区沙门菌的常见血清型也各不相同,广州市、深圳市和佛山市罗森沙门菌检出率高,河源以鼠伤寒沙门菌居多,而德比沙门菌则为韶关市和云浮市的主要血清型,但在河源和佛山却未检出;阿贡纳沙门菌也未在河源市和佛山市检出,却未在上海市和福建省检出。说明广东省沙门菌血清型复杂多样且分布广泛。

2.3.4 耐药性试验

2.3.4.1 鸡肉和猪肉中沙门菌对抗生素的耐药性

耐药性检测结果如表 2-12 显示。

表 2-12 鸡肉和猪肉中沙门菌对 18 种抗生素的耐药性

抗生素类别	抗生素名称	耐抗生素菌株的比例 (%)		
		鸡肉 (n=302)	猪肉 (n=313)	合计 (n=615)
β-内酰胺类	氨苄西林	96 (31.8)	199 (63.6)	295 (48.0)
	阿莫西林/克拉维酸	4 (1.3)	3 (1.0)	7 (1.1)
	头孢噻肟	30 (9.9)	10 (3.2)	40 (6.5)
	头孢他啶	10 (3.3)	4 (1.3)	14 (2.3)
	头孢吡肟	8 (2.6)	9 (2.9)	17 (2.8)
氨基糖苷类	庆大霉素	34 (11.3)	66 (21.1)	100 (16.3)
	链霉素	84 (27.8)	127 (40.6)	211 (34.3)
	阿米卡星	6 (2.0)	2 (0.6)	8 (1.3)
磺胺类	复方新诺明	10 (34.1)	145 (46.3)	248 (40.3)
	磺胺复合物	212 (70.2)	256 (81.8)	468 (76.1)
喹诺酮类	萘啶酸	112 (37.1)	65 (20.8)	177 (28.8)
	氧氟沙星	192 (63.6)	83 (26.5)	275 (44.7)
	环丙沙星	37 (12.3)	37 (11.8)	74 (12.0)
氯霉素类	氟苯尼考	142 (47.0)	96 (30.7)	238 (38.7)
	氯霉素	146 (48.3)	99 (31.6)	245 (39.8)
碳青霉烯类	亚胺培南	0	3 (1.0)	3 (0.5)
粘菌素类	多粘菌素 B	7 (2.3)	5 (1.6)	12 (2.0)
四环素类	四环素	216 (71.5)	247 (78.9)	463 (75.3)

注：表中 n 代表菌株数

由表 2-12 可知，所有沙门菌分离株对磺胺复合物（76.1%）的耐药率最高，其次为四环素（75.3%）、氨苄西林（48.0%）、氧氟沙星（44.7%）、复方新诺明（40.3%）、氯霉素（39.8%）、氟苯尼考（38.7%）、链霉素（34.3%）等；对头孢类抗生素、阿米卡星和阿莫西林/克拉维酸敏感。值得关注的是，检测到临床上治疗细菌感染性疾病的“最后一线”药物多粘菌素 B（2.0%）和亚胺培南（0.5%）耐药。

302 株鸡肉沙门菌分离株中，71.5%的沙门菌菌株都对四环素产生抗性，此外依次为磺胺复合物（70.2%）、氧氟沙星（63.6%）、氯霉素（48.3%）、氟苯尼考（47.0%）、萘啶酸（37.1%）、复方新诺明（34.1%）、阿莫西林（31.8%），其余几种抗生素的耐药率均未超过 27.8%。313 株猪肉沙门菌中，对磺胺复合物耐药率最高，为 81.8%，其次依次为四环素（78.9%）、氨苄西林（63.6%）、复方新诺明（46.3%）、链霉素（40.6%），其余几种抗生素的耐药率均在 31.7%以下。

2.3.4.2 鸡肉和猪肉中沙门菌的多重耐药率

表 2-13 和表 2-14 分别显示了鸡肉和猪肉中沙门菌的多重耐药率以及耐药谱。

表 2-13 鸡肉和猪肉中沙门菌的多重耐药率

抗生素种类	菌株数/抗生素耐药率 (%)		
	鸡肉 (n=302)	猪肉 (n=313)	合计 (n=615)
0	7 (2.3)	20 (6.4)	27 (4.4)
1-3	102 (33.8)	98 (31.3)	200 (32.5)
4-6	130 (43.0)	113 (36.1)	243 (39.5)
7-9	38 (12.6)	50 (16.0)	88 (14.3)
≥10	25 (8.3)	32 (10.2)	57 (9.3)
Resistance ≥ 1	295 (97.7)	293 (93.6)	588 (95.6)
MDR ≥ 3	245 (81.1)	229 (73.2)	474 (77.1)

注：表中 n 代表菌株数

由表 2-13 多重耐药结果显示，在 615 株沙门菌分离株中，除 27 株（4.4%）沙门菌对所有抗生素表现敏感外，588 株（95.6%）沙门菌至少可抗 1 种抗生素；200 株（32.5%）可抗 1-3 种抗生素；243 株（39.5%）可抗 4-6 种抗生素；88 株（14.3%）可抗 7-9 种抗生素；57 株（9.3%）可抗 10 种或 10 种以上的抗生素。其中来源于鸡肉沙门菌中有 97.7%的菌株和来源于猪肉沙门菌中 93.6%的菌株至少可抗 1 种抗生素，耐药菌株比例差异不大。源于鸡肉的 130 株（43.0%）沙门菌和源于猪肉的 113 株（36.1%）沙门菌至少可抗 4-6 种抗生素；抗 7-9 种抗生素的菌株数（比例）分别为 38 株（12.6%）

和 50 株 (16.0%)；抗 10 种及其以上抗生素分别为 25 株 (8.3%) 和 32 株 (10.2%)。沙门菌总体多重耐药率达 77.1%，鸡肉中沙门菌分离株 (81.1%) 多重耐药率高于猪肉 (73.2%) ($P<0.05$)。

由表 2-14 可知，基于 615 株沙门菌的药敏结果，本研究共得到 61 种不同的耐药谱。在每一种数量的抗生素耐药谱中，沙门菌对 4 种抗生素的耐药谱种类最多(8 类)，常见耐药谱为 SXT+S3+OFX+TET (29 株)；其次是对 5 种抗生素组成的耐药谱 (7 类)；其余依次是 6 种抗生素 (6 类)、2 种抗生素 (6 类)、3 种抗生素 (6 类)、7 种抗生素 (4 类)、8 种抗生素 (4 类)、12 种抗生素 (4 类)、14 种抗生素 (4 类)、1 种抗生素 (4 类)、9 种抗生素 (3 类)、10 种抗生素 (2 类)、11 种抗生素 (2 类)、13 种抗生素 (1 类)。具体耐药谱见表 2-14。

表 2-14 鸡肉和猪肉中沙门菌的耐药谱和相应菌株数

耐药谱	耐抗生素 种类	菌株数	
		耐药谱不同	耐相同抗生素种类 总数 (%)
S3	1	37	64 (10.4)
TET		16	
NAL		7	
OFX		4	
NAL+ TET	2	17	50 (8.1)
S3+ TET		11	
SXT+ TET		7	
AMP+TET		7	
STR+S3		4	
NAL+OFX		4	
STR+S3+TET	3	23	86 (14.0)
OFX+FFC+CHL		18	
AMP+S3+TET		15	

续表 2-14

耐药谱	耐抗生素 种类	菌株数	
		耐药谱不同	耐相同抗生素种 类总数 (%)
NAL+OFX+TET		14	
S3+OFX+TET	3	8	86 (14.0)
S3+NAL+OFX		8	
SXT+S3+OFX+TET		29	
AMP+SXT+S3+TET		19	
AMP+STR+S3+TET		22	
OFX+FFC+CHL+TET	4	11	118 (19.2)
STR+S3+OFX+TET		10	
AMP+S3+NAL+TET		10	
AMP+GEN+NAL+OFX		10	
S3+NAL+OFX+TET		7	
S3+OFX+FFC+CHL+TET	5	20	62 (10.1)
SXT+S3+FFC+CHL+TET		11	

续表 2-14

耐药谱	耐抗生素 种类	菌株数	
		耐药谱不同	耐相同抗生素种类 总数 (%)
AMP+S3+SXT+STR+TET	5	9	62 (10.1)
AMP+STR+S3+NAL+TET		6	
STR+SXT+S3+OFX+TET		6	
AMP+STR+NAL+OFX+TET		5	
AMP+S3+FFC+CHL+TET		5	
AMP+GEN+STR+SXT+S3+TET	6	21	63 (10.2)
SXT+S3+OFX+FFC+CHL+TET		16	
AMP+STR+SXT+S3+OFX+TET		9	
AMP+SXT+S3+FFC+CHL+TET		7	
STR+S3+OFX+FFC+CHL+TET		5	
AMP+STR+S3+NAL+OFX+TET		5	
AMP+SXT+S3+OFX+FFC+CHL+TET	7	13	33 (5.4)
SXT+S3+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		7	

表 2-14

耐药谱	耐抗生素 种类	菌株数	
		耐药谱不同	耐相同抗生素种类 总数 (%)
AMP+STR+SXT+S3+FFC+CHL+TET	7	7	33 (5.4)
STR+SXT+S3+OFX+FFC+CHL+TET		6	
AMP+GEN+STR+SXT+S3+FFC+CHL+TET	8	13	29 (4.7)
AMP+STR+SXT+S3+OFX+FFC+CHL+TET		9	
AMP+SXT+S3+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		5	
AMP+SXT+S3+NAL+OFX+FFC+CHL+TET		2	
AMP+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	9	14	26 (4.2)
AMP+GEN+STR+SXT+S3+OFX+FFC+CHL+TET		7	
AMP+STR+SXT+S3+NAL+OFX+FFC+CHL+TET		5	
AMP+GEN+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	10	19	31 (5.0)
AMP+GEN+STR+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		12	
AMP+GEN+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	11	10	17 (2.8)
AMP+CTX+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		7	

表 2-14

耐药谱	耐抗生素 种类	菌株数	
		耐药谱不同	耐相同抗生素种 类总数 (%)
AMP+CTX+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+PB+TET	12	1	4 (0.7)
AMP+GEN+STR+AMK+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		1	
CTX+CAZ+FEP+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		1	
AMP+CTX+GEN+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		1	
AMP+CTX+CAZ+FEP+GEN+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	13	1	1 (0.2)
AMP+CTX+CAZ+FEP+GEN+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	14	1	4 (0.7)
AMP+CTX+FEP+GEN+STR+AMK+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		1	
AMP+CTX+CAZ+FEP+GEN+AMK+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		1	
AMP+CTX+FEP+GEN+STR+AMK+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET		1	

注：表中抗生素的对应名称为：AMP（氨苄西林）、AMC（阿莫西林/克拉维酸）、CTX（头孢噻肟）、CAZ（头孢他啶）、FEP（头孢吡肟）、GEN（庆大霉素）、STR（链霉素）、AMK（阿米卡星）、SXT（复方新诺明）、S3（磺胺复合物）、NAL（萘啶酸）、OFX（氧氟沙星）、CIP（环丙沙星）、FFC（氟苯尼考）、CHL（氯霉素）、IPM（亚胺培南）、PB（多粘菌素 B）、TET（四环素）

2.3.4.3 鸡肉和猪肉中不同血清型沙门菌的耐药性

本研究对鸡肉和猪肉中常见血清型沙门菌耐药性观察，结果显示见表 2-15。由表 2-15 可知，在分离的常见血清型沙门菌中，总体可观察到对四环素，磺胺复合物，链霉素，氯霉素，氟苯尼考，氧氟沙星和氨苄西林的抗性。

其中鼠伤寒沙门菌对磺胺复合物、氨苄西林和四环素的耐药率最高，分别达到为 89.3%、83.3%和 82.1%；对头孢噻肟和头孢吡肟的耐药率分别为 9.5%和 6.0%；喹诺酮类抗生素的耐药率在 13.1%~29.8%；对氯霉素类抗生素耐药率在 35.7%~40.5%；还有少数对亚胺培南（1.2%）和多粘菌素 B（2.4%）耐药。罗森沙门菌对四环素的耐药率达 95.1%，对磺胺复合物、复方新诺明和氨苄西林的耐药率均为 77.8%；对头孢类、喹诺酮类和氯霉素类抗生素耐药率都在 10%以下。德比沙门菌对磺胺复合物抗性最强，可达 92.0%，其次是四环素（81.3%）和氨苄西林（56.0%）；对喹诺酮类和氯霉素类抗生素耐药率在 40.0%左右。伦敦沙门菌仅发现对常用抗生素如四环素，氨苄西林，磺胺类耐药，未发现对头孢类抗生素耐药，对喹诺酮类抗生素耐药率低。

《动物性食品中兽药最高残留限量》（农业部 235 公告）中将氯霉素列入禁止使用且不得在动物性食品中检出的药物。重要的是，本研究中检测出阿贡纳和肯塔基沙门菌对氯霉素类耐药率达 80%以上，科瓦利斯沙门菌达 50%以上；且这三种血清型沙门菌对氧氟沙星耐药率都很高，在 69.4%~91.1%之间。与鼠伤寒、德比、罗森和伦敦等沙门菌相比，肯塔基和姆班达卡对磺胺复合物的耐药率更高（ $P<0.05$ ）。姆班达卡、肯塔基和罗森比科瓦利斯、德比和阿贡纳等沙门菌对四环素类药物的耐药率更高（ $P<0.05$ ）。阿贡纳、科瓦利斯、肯塔基对头孢类抗生素的耐药率高于罗森、德比和伦敦等血清型沙门菌（ $P<0.05$ ）。总的来说，鼠伤寒、德比、阿贡纳、科瓦利斯和肯塔基等血清型沙门菌的抗生素耐药率最高。由于其余沙门菌的数量少，因此未对其血清型进行抗生素耐药性比较。

表 2-15 鸡肉和猪肉中不同血清型沙门菌的耐药性

抗生素	抗生素耐药率 (%)								
	鼠伤寒 (n=84)	罗森 (n=81)	德比 (n=75)	伦敦 (n=57)	阿贡纳 (n=56)	科瓦利斯 (n=46)	肯塔基 (n=38)	姆班达卡 (n=34)	其余 (n=144)
AMP	83.3	77.8	56.0	61.4	16.1	17.4	22.2	0	41.7
AMC	2.4	0	2.7	0	0	0	0	0	2.1
CTX	9.5	1.2	5.3	0	5.4	8.7	11.1	2.9	10.4
CAZ	2.4	1.2	0	0	1.8	4.3	0	2.9	4.9
FEP	6.0	0	4.0	0	0	2.2	0	0	5.6
GEN	15.5	2.5	36.0	57.9	0	0	8.3	2.9	14.6
STR	59.5	19.8	36.0	68.4	16.1	17.4	13.9	73.5	22.2
AMK	1.2	0	1.3	0	1.8	0	2.8	2.9	2.1
SXT	27.4	77.8	42.7	70.2	17.9	17.4	72.2	5.9	30.6
S3	89.3	77.8	92.0	77.2	41.1	73.9	97.2	100.0	63.2
NAL	29.8	7.4	40.0	1.8	19.6	43.5	30.6	2.9	50.0

续表 2-15

抗生素	抗生素耐药率 (%)								
	鼠伤寒 (n=84)	罗森 (n=81)	德比 (n=75)	伦敦 (n=57)	阿贡纳 (n=56)	科瓦利斯 (n=46)	肯塔基 (n=38)	姆班达卡 (n=34)	其余 (n=144)
OFX	29.8	8.6	42.7	15.8	91.1	87.0	69.4	61.8	45.1
CIP	13.1	1.2	33.3	0	1.8	17.4	30.6	2.9	11.1
FFC	35.7	6.2	45.3	40.4	87.5	54.3	83.3	0	29.2
CHL	40.5	8.6	44.0	42.1	89.3	52.2	83.3	0	29.9
IPM	1.2	0	0	3.5	0	0	0	0	0
PB	2.4	1.2	0	1.8	1.8	2.2	2.8	2.9	2.8
TET	82.1	95.1	81.3	86.0	48.2	80.4	91.7	97.1	53.5

注：表中 n 代表菌株数；表中抗生素的对应名称为：AMP（氨苄西林）、AMC（阿莫西林/克拉维酸）、CTX（头孢噻肟）、CAZ（头孢他啶）、FEP（头孢吡肟）、GEN（庆大霉素）、STR（链霉素）、AMK（阿米卡星）、SXT（复方新诺明）、S3（磺胺复合物）、NAL（萘啶酸）、OFX（氧氟沙星）、CIP（环丙沙星）、FFC（氟苯尼考）、CHL（氯霉素）、IPM（亚胺培南）、PB（多粘菌素 B）、TET（四环素）

2.3.4.4 不同血清型沙门菌的多重耐药率

本研究对鸡肉和猪肉中常见血清型沙门菌多重耐药率见表 2-16。

表 2-16 不同血清型沙门菌的多重耐药率

血清型（菌株数）	耐抗生素菌株的比例 %				
	1-3	4-6	7-9	≥10	合计 (≥ 1)
鼠伤寒（n=84）	23.8	38.1	19.0	14.3	95.2
罗森（n=81）	32.1	63.0	3.7	1.2	100
德比（n=75）	41.3	16.0	14.7	26.7	98.7
伦敦（n=57）	19.3	38.6	33.3	1.8	93.0
阿贡纳（n=56）	34.0	55.4	9.0	1.8	100
科瓦利斯（n=46）	34.8	39.1	19.6	4.3	97.8
肯塔基（n=38）	13.2	57.9	21.1	7.9	100
姆班达卡（n=34）	50.0	50.0	0	0	100
布伦登卢普（n=21）	81.0	4.8	4.8	9.5	100
肠炎（n=21）	33.3	61.9	4.8	0	100
火鸡（n=20）	30.0	30.0	15.0	0	75.0
斯坦利（n=14）	42.9	0	0	0	42.9
印第安纳（n=12）	0	0	0	100	100

注：表中 n 代表菌株数

由表 2-16 可知，对常见血清型沙门菌的耐药性进行比较分析可以发现，抗 1-3 种抗生素的沙门菌血清型最常见的是布伦登卢普（81.0%），其次为姆班达卡（50.0%）、斯坦利（42.9%）、德比（41.3%）。对 4-6 种抗生素产生耐药的最常见沙门菌血清型是罗森（63.0%）和肠炎（61.9%），其次分别是肯塔基（57.9%）、阿贡纳（55.4%）和姆班达卡（50.0%）。对 7-9 种抗生素产生耐药的沙门菌血清型以伦敦（33.3%）最为多见，其次分别为肯塔基（21.1%）、科瓦利斯（19.6%）和鼠伤寒（19.0%）。对 10 种及 10 种以上抗生素出现耐药的沙门菌血清型主要为印第安纳（100%）、德比

(26.7%) 和鼠伤寒 (14.3%)。

13 种主要沙门菌血清型中, 100%的罗森、阿贡纳、肯塔基、姆班达卡、布伦登卢普、肠炎和印第安纳等血清型沙门菌以及 98.7%的德比、97.8%的科瓦利斯、95.2%的鼠伤寒、93.0%的伦敦、75.0%的火鸡和 42.9%的斯坦利均可抗至少 1 种抗生素。总体来说, 印第安纳和肯塔基这两个血清型的沙门菌耐药程度高, 其它耐药程度高的血清型依次为伦敦、鼠伤寒、罗森、阿贡纳和科瓦利斯。除斯坦利沙门菌和火鸡沙门菌外, 大多数沙门菌都对所测试的抗生素出现普遍的耐药情况。

2.3.5 产 ESBLs 沙门菌的筛选及相关基因的检测

2.3.5.1 产 ESBLs 沙门菌的筛选

从 615 株沙门菌药敏实验结果中选取对头孢他啶抑菌环 $\leq 22\text{mm}$ 或头孢噻肟抑菌环 $\leq 27\text{mm}$ 的疑似产 ESBLs 的沙门菌 136 株 (鸡肉 68 株, 猪肉 68 株), 通过双纸片协同试验检测到 21 株沙门菌 (3.4%) 产 ESBLs, 其中鸡肉 14 株, 猪肉 7 株。

2.3.5.2 ESBLs 相关基因的检测及亚型分布

对确认产 ESBLs 的沙门菌进行六种常见基因的 PCR 扩增, 结果得到与阳性对照一致大小的 DNA 片段, 经 PCR 产物测序可知, 有 10 株 (47.6%) 含有 *bla*_{CTX-M} 基因, 9 株 (42.9%) 含有 *bla*_{OXA} 和 *bla*_{TEM} 基因。

21 株产 ESBLs 的沙门菌分离株中共检测到 8 种 ESBLs 编码基因亚型, 包括 *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-206}, *bla*_{TEM-214}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-64}, *bla*_{CTX-123} 和 *bla*_{OXA-1}, 未检测到 *bla*_{SHV}, *bla*_{PSE} 和 *bla*_{CMY} 基因, 见表 2-17。

100%产 ESBLs 的沙门菌分离株携带至少一种 ESBLs 编码基因, 其中 *bla*_{OXA-1} 检出率最高, 为 42.9% (9/21), 其次是 *bla*_{CTX-M-55} 检出率为 23.8% (5/21), *bla*_{TEM-206} 和 *bla*_{TEM-214} 的检出率均为 19.0% (4/21), *bla*_{CTX-M-123} 的检出率为 14.3% (3/21), *bla*_{TEM-1}、*bla*_{CTX-M-15} 和 *bla*_{CTX-M-64} 的检出率均为 4.8% (1/21)。33.3% (n=7) 的菌株共同携带两种 ESBLs 编码基因, 同时携带 *bla*_{TEM} 和 *bla*_{CTX-M} 基因的菌株数量最多 (3 株), *bla*_{OXA} 和 *bla*_{CTX-M} (2 株), *bla*_{TEM} 和 *bla*_{OXA} 基因 (2 株), 见表 2-18。其中 *bla*_{OXA} 基因家族中 *bla*_{OXA-1} (n=9) 基因型是主要的流行型, *bla*_{CTX-M} 基因家族中 *bla*_{CTX-M-55} (n=5) 基因型是主要的流行型, *bla*_{TEM} 基因家族中 *bla*_{TEM-206} 和 *bla*_{TEM-214} (n=5) 基因型是主要的流行型。

在产 ESBLs 沙门菌分离株中包括 6 种血清型，见表 2-18。最普遍的血清型是印第安纳 7 株（33.3%），其次是鼠伤寒 5 株（23.8%），肯塔基 3 株（14.3%），利奇菲尔德 3 株（14.3%），德比 2 株（9.5%），胥戈成格隆 1 株（4.8%），这些血清型沙门菌均表现耐 5 种及 5 种以上抗生素。

表 2-17 携带 β -内酰胺酶和编码基因的 ESBLs 的沙门菌的流行率（n = 21）

ESBLs 基因		菌株数	百分比 (%)
<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{TEM-1}</i>	1	4.8
	<i>bla_{TEM-206}</i>	4	19.0
	<i>bla_{TEM-214}</i>	4	19.0
<i>bla_{CTX}</i>	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	1	4.8
	<i>bla_{CTX-M-55}</i>	5	23.8
	<i>bla_{CTX-M-64}</i>	1	4.8
	<i>bla_{CTX-M-123}</i>	3	14.3
<i>bla_{OXA}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	9	42.9

表 2-18 携带 ESBLs 编码基因的沙门菌和相应的抗生素耐药谱

菌株	样品来源	血清型	耐药谱	ESBLs 基因
1	猪肉	德比	AMP+CTX+FEP+NAL+TET	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
3	猪肉	德比	AMP+CTX+FEP+NAL+TET	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
36	鸡肉	印第安纳	AMP+CTX+GEN+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL	<i>bla</i> _{TEM-214} , <i>bla</i> _{OXA-1}
55	鸡肉	印第安纳	AMP+CTX+FEP+GEN+STR+AMK+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	<i>bla</i> _{CTX-M-123}
270	猪肉	鼠伤寒	AMP+CTX+CAZ+FEP+STR+S3+OFX+TET	<i>bla</i> _{TEM-206}
348	鸡肉	印第安纳	AMP+CTX+CAZ+FEP+GEN+AMK+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	<i>bla</i> _{OXA-1}
449	猪肉	鼠伤寒	AMP+CTX+GEN+STR+SXT+S3+FFC+CHL+TET	<i>bla</i> _{TEM-214}
467	猪肉	鼠伤寒	AMP+CTX+FEP+STR+SXT+S3+OFX+FFC+CHL+TET	<i>bla</i> _{TEM-206} , <i>bla</i> _{CTX-M-55}
473	鸡肉	印第安纳	AMP+CTX+FEP+GEN+STR+AMK+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}
485	鸡肉	肯塔基	AMP+CTX+GEN+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	<i>bla</i> _{TEM-214}
564	猪肉	鼠伤寒	AMP+CTX+STR+S3+TET	<i>bla</i> _{TEM-214} , <i>bla</i> _{CTX-M-55}
566	猪肉	鼠伤寒	AMP+CTX+FEP+STR+S3+NAL+OFX+CHL+TET	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
586	鸡肉	印第安纳	AMP+CTX+GEN+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	<i>bla</i> _{OXA-1}
590	鸡肉	利奇菲尔德	AMP+CTX+CAZ+FEP+GEN+STR+SXT+S3	<i>bla</i> _{CTX-M-123}

续表 2-18

菌株	样品来源	血清型	耐药谱	ESBLs 基因
595	鸡肉	胥戈成格隆	AMP+CTX+GEN+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	<i>bla_{OXA-1}</i>
610	鸡肉	印第安纳	AMP+CTX+CAZ+FEP+GEN+STR+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	<i>bla_{CTX-M-64}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i>
629	鸡肉	印第安纳	AMP+CTX+CAZ+FEP+GEN+SXT+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL+TET	<i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i>
668	鸡肉	利奇菲尔德	AMP+CTX+CAZ+FEP+GEN+STR+SXT+OFX+FFC+CHL+TET	<i>bla_{CTX-M-123}</i> , <i>bla_{TEM-206}</i>
669	鸡肉	利奇菲尔德	AMP+CTX+GEN+STR+SXT+S3+OFX+FFC+CHL+TET	<i>bla_{TEM-206}</i>
671	鸡肉	肯塔基	AMP+CTX+S3+OFX+FFC+CHL	<i>bla_{OXA-1}</i>
672	鸡肉	肯塔基	AMP+CTX+GEN+S3+NAL+OFX+CIP+FFC+CHL	<i>bla_{OXA-1}</i>

注：表中抗生素的对应名称为：AMP（氨苄西林）、AMC（阿莫西林/克拉维酸）、CTX（头孢噻肟）、CAZ（头孢他啶）、FEP（头孢吡肟）、GEN（庆大霉素）、STR（链霉素）、AMK（阿米卡星）、SXT（复方新诺明）、S3（磺胺复合物）、NAL（萘啶酸）、OFX（氧氟沙星）、CIP（环丙沙星）、FFC（氟苯尼考）、CHL（氯霉素）、IPM（亚胺培南）、PB（多粘菌素 B）、TET（四环素）

2.4 结论与讨论

2.4.1 沙门菌在鸡肉和猪肉产品中流行现状

本研究结果表明广东省鸡肉和猪肉中沙门菌污染率很高，其中鸡肉样品中沙门菌污染率高达 63.6% ($n = 302$)，猪肉污染率高达 73.1% ($n = 313$)。这些污染率高于中国部分地区的先前研究报告，例如河南省的鸡肉和猪肉污染率分别为 45.2% 和 29.2% (Bai *et al.*, 2015)；2010 年至 2012 年江苏省鸡肉污染率占 14.1% (Li *et al.*, 2014)；北京市鸡肉污染率为 49.9% (Wang *et al.*, 2014)；山东鸡肉污染率为 26.3% (Cui *et al.*, 2016)；河北省猪肉污染率为 26.7% (Yan *et al.*, 2010)；四川省猪肉污染率为 10.7% (Li *et al.*, 2013)。同时，沙门菌污染率也高于其他发展中国家，例如 2013 年韩国鸡肉污染率为 42% (Choi *et al.*, 2015)；1992 年至 2012 年间东京鸡肉沙门菌污染率为 29.8% (Katoh *et al.*, 2015)；2007 年至 2009 年越南北部猪肉和鸡肉污染率为 39.6% 和 42.9% (Truong *et al.*, 2012)；埃及鸡肉污染率占 10% (Gharieb *et al.*, 2015)。

由于采样地区的不同，沙门菌的污染率也各不相同。研究发现韶关市和深圳市鸡肉和猪肉沙门菌的污染率要高于其他几个市区，显示出了地域间的差异性。这种地域差异性与多种因素有关，如当地的卫生管理程度、居民的消费习惯和人口的流动程度等。调查中发现韶关市农贸市场卫生环境欠佳，不同动物源性产品摊位穿插一起售卖；深圳市由于流动人口大。

研究结果还发现，猪肉 (73.1%) 的污染率高于鸡肉 (63.6%) ($P < 0.05$)。调查中发现，农贸市场销售的鸡肉均为现宰，期间有清洗过程；而猪肉大多数是从屠宰厂批发到市场，再根据不同消费者需求进行二次分割售卖，所以易造成交叉污染。

综上所述，广东省鸡肉和猪肉中沙门菌污染严重，这大大增加了人感染沙门菌的风险。建议鸡肉和猪肉产品应作为广东省监测的重点对象。另外，由于地区，采样季节，样本类型，分离方法，培养方法，培养基和环境条件等之类的差异，导致不同研究中沙门菌流行率有所差异。但广东省属于热带和亚热带气候类型，全年高温高湿，适合沙门菌的生长繁殖。值得提醒的是，热带地区的动物源性食品值得关注。同时沙门菌污染率高也反映了市场在供应动物源性食品期间需要加强对沙门菌的监测；加强食品加工环境卫生以及提高售卖人员个人卫生健康意识，并制定了相关的预防和控制措施，以确保广东省的食品安全。

2.4.2 沙门菌在鸡肉和猪肉产品中血清型分布

本研究在鸡肉和猪肉样品中共鉴定出 38 种沙门菌血清型。在鸡肉样品中检出了 27 种不同类型的沙门菌血清型，在猪肉样品中也检出了 25 种血清型。不同样品来源中的沙门菌血清型差异很大。鸡肉中常见血清型沙门菌为阿贡纳，科瓦利斯和肯塔基，而猪肉中沙门菌最常见的血清型为鼠伤寒，罗森和德比。猪肉样品中的血清型与国内外报道相同(Arnedo-Pena *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Truong *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2010)。

特别值得一提的是，鸡肉样品中的血清型分布与其他地区差异很大。据报道，肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌是来自其他地区鸡肉产品中的两种主要血清型 (Li *et al.*, 2017)。有趣的是，在之前的研究中，阿贡纳，科瓦利斯和肯塔基等沙门菌的报道少 (Choi *et al.*, 2015; Gharieb *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014)，而在目前的调查中它成为常见血清型。此外，有报道过在中国医院里阿贡纳沙门菌是人感染沙门菌病的常见血清型之一 (Zhang *et al.*, 2014)；科瓦利斯沙门菌曾在巴西，德国和土耳其报道过，尚不清楚此血清型是否由其他国家或地区传播的 (Fischer *et al.*, 2013; Kocabiyik *et al.*, 2006; Yamatogi *et al.*, 2015)；肯塔基沙门菌是美国最常见的血清型 (Galanis *et al.*, 2006; van Duijkeren *et al.*, 2002)。这提醒我们广东省流行的阿贡纳、科瓦利斯和肯塔基沙门菌可能会引起公共卫生问题。

值得注意的是，鼠伤寒沙门菌是广东婴儿中常见的主要血清型 (Deng *et al.*, 2012)。因此，需要进一步研究以确定该菌株的来源 (Liang *et al.*, 2015; O'Leary *et al.*, 2015)。此外，本研究中发现了一些罕见的沙门菌血清型，如海法，黄金海岸和姆班达卡。关于这些血清型的研究很少，应该集中在监测和深入研究上。重要的是，首次在动物性食品中检测到拉姆福德沙门菌。该菌株的检测不仅填补了我国细菌种群库的空白，而且为该菌株的检测诊断和流行病学调查提供了新的依据。

本研究表明，广东省农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌血清型复杂多样，且受沙门菌污染的食品和样品来源之间可能存在关联。由于广东省主要以黄羽肉鸡生产为主，其饲养模式和生产方式与其他地区不同，可能导致不同的血清型分布。因此，应加强对黄鸡的监测并注意不同地区血清型的变化。同时也提醒我们，监测不同沙门菌血清型的出现和频率以更好地控制沙门菌病是至关重要的。

2.4.3 沙门菌在动物源性产品中耐药特点

沙门菌血清型中的抗生素耐药性已成为全球性问题。监测数据显示,在 20 世纪 90 年代初期,沙门菌分离株的总体抗生素耐药性增加,从 20%上升到 30%,而在本世纪初,一些国家的耐药率高达 70% (Lee *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2004)。同中国其他地区研究相比 (Chen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2010),本研究耐药性结果显示超过 75%的沙门菌分离株对四环素和磺胺异恶唑都有耐药性。与其他报道一致,原因可能由于在食品动物生产和临床环境中使用不同种类和剂量的抗菌剂 (Bai *et al.*, 2015; Perugini *et al.*, 2010)。此外,鸡肉样品对氟苯尼考和氯霉素的耐药率分别为 47.0%和 48.3%,猪肉为 30.7%和 31.6%很值得我们关注,因为对这种抗生素的耐药性可能会对人体产生抗药性。在这项研究中,所有沙门菌分离株对阿莫西林/克拉维酸和丁胺卡那霉素敏感,这可能是这种抗生素不用于临床兽医药物的治疗目的,其结果与其他报道一致 (Sinwat *et al.*, 2015)。95.6%的菌株都至少对一种抗生素产生耐药性,77.1%的沙门菌对三种或更多种抗生素耐药性,分别有 14.3%和 9.3%的菌株分别对 7 种和 10 种抗生素有耐药性,分别略高于其他研究报道的耐药率 (Abdellah *et al.*, 2009; Dogru *et al.*, 2010)。本研究中发现的高流行的抗生素耐药性可能归因于在中国滥用抗生素作为预防和生长促进剂。

本研究中,沙门菌分离株的多重耐药性严重,不同血清型沙门菌耐药率也不同,多重耐药沙门菌分离株在鸡和猪肉中普遍存在。阿贡纳,科瓦利斯和肯塔基等血清型沙门菌分离株对第三代头孢菌素 (CTX, CAZ) 和氟喹诺酮类的耐药率高于罗森和德比。同时这三种血清型沙门菌对氧氟沙星也表现出高的耐药率。这为进一步研究头孢菌素或氟喹诺酮类耐药沙门菌提供了更多信息。多重耐药沙门菌可引起沙门菌对各种抗生素产生耐药性并向超级细菌发展 (Campioni *et al.*, 2014)。由于抗生素耐药性与特定血清型之间存在关联,数据提供的证据表明肯塔基,鼠伤寒,科瓦利斯和阿贡纳等血清型沙门菌与多重耐药表型密切相关。另外,发现了对人医临床一线药物耐药的菌株,如对碳青霉烯类和多粘菌素耐药,这表明沙门菌具有耐药性倾向。因此,有必要加强对沙门菌感染的流行病学调查并进一步研究以了解其耐药性传播特点。

2.4.4 ESBLs 流行情况

在世界范围内产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 的沙门菌引起了临床和食品安全的关注 (Hirakata *et al.*, 2005)。含有 ESBLs 编码基因的沙门菌分离株能够水解青霉素以及大部分第一代, 第二代和第三代头孢菌素, 甚至是碳青霉烯类 (Seiffert *et al.*, 2013)。

本研究发现鸡肉和猪肉中产 ESBLs 沙门菌的阳性率为 3.4%, 其他研究报道在中国零售市场鸡肉中有 10.8% 的沙门菌检出产 ESBLs; 尼日利亚的鸡肉生产链中有 1% 的大肠杆菌分离株检出产 ESBLs; 德国鸡肉中有 60% 的肠杆菌检出产 ESBLs (Belmar *et al.*, 2014; Ojo *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2017)。本研究中最常见的 ESBLs 编码基因是 OXAs (42.9%), 其次是 CTX-Ms (23.8%)。这与以前研究中描述的类似 (Nguyen *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2017)。以前的研究表明如下: TEM-1 型 β -内酰胺酶可使青霉素和早期头孢菌素失活; CTX-M 被归类为主要危害广谱头孢菌素和氨曲南的 ESBLs; OXA-1 属于能够水解碳青霉烯类抗生素的碳青霉烯酶, 并且 OXA 相关的编码基因可以在多重耐药质粒中携带 (Bush, 2008)。此外, 有报道指出 CTX-Ms 近年来在临床环境中的革兰氏阴性菌群体中迅速传播 (Shahid *et al.*, 2009)。在该研究中检测到 100% 沙门菌分离株携带 1 种 ESBLs 编码基因, 33.3% 携带 2 种 β -内酰胺酶和/或 ESBLs 编码基因。这意味着在食物链中传播超广谱 β -内酰胺酶和碳青霉烯酶耐药性将是一个严重的问题, 尽管大多数关于 β -内酰胺酶集中于临床和动物来源的细菌中 (Archambault *et al.*, 2006; Karim *et al.*, 2001)。

因此, 本研究在鸡肉和猪肉中检测到携带 ESBLs 的沙门菌, 表明产 ESBLs 沙门菌可能存在通过接触或食用动物源性肉类从而传播给人类, 提示食品加工和供应链的管理以及在畜禽饲养中谨慎使用抗生素, 对于减少携带 ESBLs 的分离株至关重要。

第三章 鸡肉中常见血清型沙门菌喹诺酮类耐药基因检测和 PFGE 分子分型

3.1 引言

沙门菌是重要的食源性致病菌，许多研究都表明鸡肉产品中沙门菌可通过食物摄入导致人类感染，所以鸡肉中沙门菌污染对公共卫生有重要意义(Scallan *et al.*, 2011)。近年来动物性产品抗生素耐药性逐渐增加，已显示喹诺酮耐药菌可通过摄入受污染的食物而传播给人类(Fabrega *et al.*, 2008)。因此，细菌中喹诺酮类耐药基因的检测和分子流行病学调查是非常重要的(Ranjbar *et al.*, 2016; Ranjbar *et al.*, 2014)。此外，沙门菌对人类的感染主要取决于沙门菌的血清型，对于同一血清型内不同菌株之间可通过 PFGE 分子分型的方法揭示这些菌株之间的同源性关系。

在前期调查研究的基础上发现，广东省鸡肉样品中沙门菌血清型特点与其他地区差异大(Li *et al.*, 2017)。在此之前的动物源产品研究中，阿贡纳、科瓦利斯和肯塔基沙门菌的报道少(Wang *et al.*, 2014)，而在广东省目前的调查中为常见血清型。

因此，根据广东省畜牧业生产和对鸡肉消费情况，本研究的目的是调查鸡肉中常见血清型沙门菌(氟)喹诺酮类抗生素相关耐药基因的携带情况及其血清型的遗传相似性特征，这些数据可为预警和控制食源性疾病爆发提供依据，可以为合理使用喹诺酮类药物提供参考依据，从而有助于从食物链的源头和动物性食品生产中采取合理的干预措施。

3.2 材料与方法

3.2.1 试验材料

3.2.1.1 样品来源

本研究共使用 138 株沙门菌，均来源于第一章鸡肉中分离到的常见血清型样品。包括 55 株阿贡纳沙门菌，45 株科瓦利斯沙门菌，38 株肯塔基沙门菌。

鼠伤寒标准菌株 LT2 购自中国兽医药品监察所；PFGE 分型所用标准菌株 H9812 由本实验室保存。

3.2.1.2 培养基

LB 营养琼脂、LB 肉汤均购自广东环凯微生物科技有限公司。

3.2.1.3 抗生素

3 种（氟）喹诺酮类抗生素萘啶酸（NAL, 30 μg ）、氧氟沙星（OFX, 5 μg ）、环丙沙星（CIP, 5 μg ）均购自杭州滨和微生物试剂有限公司

3.2.1.4 主要试剂

蛋白酶 K、限制性内切酶 *Xba* I、DNA Marker DL1000 均购自大连 TaKaRa 公司；PFGE 电泳级琼脂糖（SeaKem Gold Agarose）购自 Bio-Rad 公司；1 mol/L Tris-HCl（pH8.0）、0.5 mol/L EDTA（pH8.0）、5×TBE、50×TAE 购自上海索莱宝生物科技有限公司；Gelred 核酸染料购自美国 Biotium 公司；十二烷基硫酸钠（10% SDS）、氯化钠、NaOH 购自广州鼎国生物公司。

3.2.1.5 主要仪器设备

见第一章 2.2.1.6

3.2.2 试验方法

3.2.2.1 沙门菌的复苏

详细见第一章 2.2.2.5

3.2.2.2 药物敏感性试验

详细见第一章 2.2.2.7

3.2.2.3 喹诺酮类耐药基因的检测

DNA 模板的提取：详细见第一章 2.2.2.3。

引物设计及合成：参考文献报道的相应的引物序列，由广州艾基生物技术有限公司合成。12 对特异性引物序列见表 3-1。

表 3-1 耐药基因引物序列

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	大小 (bp)	参考文献
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516	(Robicsek <i>et al.</i> , 2006)
	<i>qnrA</i> -R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> -F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469	(Guerra <i>et al.</i> , 2010)
	<i>qnrB</i> -R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
<i>qnrC</i>	<i>qnrC</i> -F	GGGTTGTACATTTATTGAATC	447	(Bin Kim <i>et al.</i> , 2009)
	<i>qnrC</i> -R	TCCACTTTACGAGGTTCT		
<i>qnrD</i>	<i>qnrD</i> -F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	644	(Bin Kim <i>et al.</i> , 2009)
	<i>qnrD</i> -R	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417	(Robicsek <i>et al.</i> , 2006)
	<i>qnrS</i> -R	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
<i>oqxAB</i>	<i>oqxAB</i> -F	AGTCCATACCAACCTCGTCTCC	529	(Bin Kim <i>et al.</i> , 2009)
	<i>oqxAB</i> -R	GCGTGGCTTTGAACTCTGC		
<i>aac</i> (6')-Ib-cr <i>r</i>	<i>aac</i> (6')-Ib-cr -F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	(Park <i>et al.</i> , 2006)
	<i>aac</i> (6')-Ib-cr -R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>qepA</i>	<i>qepA</i> -F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199	(Bin Kim <i>et al.</i> , 2009)
	<i>qepA</i> -R	CTTCCTGCC CGAGTATCGTG		
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -F	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC	470	This study
	<i>gyrA</i> -R	CGTTAATCACTTCCGTCAG		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F	GAAATGACCCGTCGTAAAGG	710	This study
	<i>gyrB</i> -R	TACAGTCTGCTCATCAGAAAG		

续表 3-1

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	大小 (bp)	参考文献
<i>parC</i>	<i>parC</i> -F	ATGAGCGATATGGCAGAGCG	413	This study
	<i>parC</i> -R	TGACCGAGTTCGCTTAACAG		
<i>parE</i>	<i>parE</i> -F	GACCGAGCTGTTCTTGTGG	493	This study
	<i>parE</i> -R	GCGTAACTGCATCGGGTTCA		

注：表中 F 代表上游引物；R 代表下游引物

PCR 反应体系：根据文献报道的 PCR 反应程序进行，并设立阴阳性对照，25 μ L 的反应体系见表 3-2。PCR 反应运行程序如下：见表 3-3。

表 3-2 PCR 反应体系

试剂	用量 (μ L)
Premix Taq	13
DNA 模板	2
上游引物 (25 μ mol)	0.5
下游引物 (25 μ mol)	0.5
无菌去离子水	9
总体积	25

表 3-3 PCR 反应运行参数

目的基因	运行参数
<i>qnrA</i>	(94 $^{\circ}$ C,5min) +{ (94 $^{\circ}$ C,45s) + (52 $^{\circ}$ C,45s) + (72 $^{\circ}$ C,45s) } $\times$ 30+ (72 $^{\circ}$ C,5min)
<i>qnrB</i>	(94 $^{\circ}$ C,5min) +{ (94 $^{\circ}$ C,30s) + (53 $^{\circ}$ C,45s) + (72 $^{\circ}$ C,1min) } $\times$ 30+ (72 $^{\circ}$ C,5min)
<i>qnrC</i>	(94 $^{\circ}$ C,5min) +{ (94 $^{\circ}$ C,30s) + (53 $^{\circ}$ C,30s) + (72 $^{\circ}$ C,1min) } $\times$ 30+ (72 $^{\circ}$ C,5min)
<i>qnrD</i>	(94 $^{\circ}$ C,5min) +{ (94 $^{\circ}$ C,45s) + (50 $^{\circ}$ C,45s) + (72 $^{\circ}$ C,1min) } $\times$ 30+ (72 $^{\circ}$ C,5min)
<i>qnrS</i>	(94 $^{\circ}$ C,5min) +{ (94 $^{\circ}$ C,45s) + (53 $^{\circ}$ C,45s) + (72 $^{\circ}$ C,1min) } $\times$ 30+ (72 $^{\circ}$ C,5min)

续表 3-3

目的基因	运行参数
<i>oqxAB</i>	(94°C,5min) + { (94°C,30s) + (55°C,45s) + (72°C,45s) } ×30+ (72°C,5min)
<i>aac (6')-Ib</i>	(94°C,5min) + { (94°C,45s) + (55°C,45s) + (72°C,45s) } ×30+ (72°C,5min)
<i>qepA</i>	(94°C,5min) + { (94°C,30s) + (61°C,30s) + (72°C,45s) } ×30+ (72°C,5min)
<i>gyrA</i>	(94°C,5min) + { (94°C,1min) + (55°C,30s) + (72°C,1min) } ×30+ (72°C,5min)
<i>gyrB</i>	(94°C,5min) + { (94°C,1min) + (55°C,30s) + (72°C,1min) } ×30+ (72°C,5min)
<i>parC</i>	(94°C,5min) + { (94°C,1min) + (55°C,30s) + (72°C,1min) } ×30+ (72°C,5min)
<i>parE</i>	(94°C,5min) + { (94°C,1min) + (55°C,30s) + (72°C,1min) } ×30+ (72°C,5min)

产物的电泳分析：反应结束后，取 5 μL 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶（含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Goldview）中进行电泳，用 DNA Marker DL1000 作为标准分子量，按照 10V/cm 电压电泳 20 min，结束后用凝胶成像系统观察拍照分析电泳结果。

序列测定：PCR 结果直接送广州艾基生物技术有限公司进行序列测定。测序结果提交 NCBI BLAST 进行比对来确定突变点和突变种类。

3.2.2.4 PFGE（脉冲场凝胶电泳）分型

胶块的制备：将待检沙门菌和标准株 H9812 接种于 LB 琼脂平板培养 14 h~18 h。从平板上刮取适量细菌，置于细胞悬浮液中悬浮菌体，并矫正其 OD 值达到 4.0~4.5 范围。取 400 μL 细菌悬液转移到 1.5 mL 离心管中。将蛋白酶 K（20 mg/mL 贮存浓度）加入上述细菌悬液中，使其终浓度为 1 mg/mL。将上述菌液混合物于 37°C 孵育 10 min。同时用 TE 溶液制备 1.2% 浓度的低熔点琼脂糖凝胶，并于 58°C 保温。再将上述菌液混合物与 2.5 mL 20% 十二烷基硫酸钠（SDS）和 1% 的琼脂糖迅速充分混合，然后用移液器灌注入模具中。4°C 放置 10 min 使模块凝固。

细菌裂解：小心取出模具中的胶块，转入含有 5 mL 细胞裂解液（CLB）和 25 μL 蛋白酶 K（20 mg/mL）的 50 mL 离心管中，并于 55°C 水浴轻微振荡 1.5 h~2 h。

胶块洗涤：小心取出上述裂解完毕的胶块，加入 15 mL 预热至 50°C 的灭菌纯水，置于 50°C 水浴轻微振荡 10 min。然后再用 15 mL 预热至 50°C 的 TE 缓冲液于 50°C 缓慢振荡洗涤 15 min，重复此步骤 3 次。洗涤完毕后，将胶块放于 TE 缓冲液中待用。

限制性内切酶消化：按照表 3-4 的酶切体系于 37℃作用 2 h 以上。剩下的胶块置于 TE 溶液中 4℃保存。

表 3-4 限制性内切酶消化反应体系

试剂	预酶切体系(μL)	酶切体系(μL)
纯水	180	175
10×M buffer	10	10
0.1 % BSA	10	10
<i>Xba</i> I	0	5
总体积	200	200

制备 PFGE 琼脂糖凝胶：按照 1%的比例，用 0.5×TBE 电泳缓冲液制备 PFGE 凝胶。用刀片小心切取 1/3 体积的胶块，贴于相应的梳齿位置上。然后缓慢将备好的 1% SKG 电泳胶倒入模具中，待胶块凝固后于室温放置 30 min。

脉冲场电泳：加 2.2 L 0.5×TBE 电泳缓冲液于 CHEF-DR®III System (Bio-Rad Laboratories, USA)电泳槽中，依次打开电源开关-循环泵开关-冷凝机开关。

脉冲场凝胶电泳参数设置：预冷电泳缓冲液降至 14℃时，开始电泳。

表 3-5 脉冲电泳各个参数设置

电泳参数	设置
起始缓冲时间	2.16s
结束缓冲时间	63.8s
电泳时间	19h
电压	6V/cm
温度	14℃
角度	120°
斜率	线性

图像获取及分析：电泳结束后，将电泳胶块放入浓度为 1 μg/mL 的 Gelred 溶液中，染色 20~30 min，然后用水洗凝胶块 2~3 次后，放入 Gel Doc XR 凝胶成像系统拍摄并保存图像。以 UPGMA 方法（Unweighted pair-group mean arithmetic, UPGMA）进行聚类分析，用 DICE 相似性系数来确定菌株之间的差异程度。根据 BioNumerics 5.1 分析软件绘制的菌株间关系图以判定菌株间的同源关系。

3.3 试验结果及分析

3.3.1 常见血清型沙门菌喹诺酮类抗生素耐药性

由表 3-6 可知，138 株沙门菌中对氧氟沙星的耐药性达 83.3%，萘啶酸 30.4%，环丙沙星 14.5%。就萘啶酸而言，科瓦利斯沙门菌对其耐药性最强，耐药率为 44.4%，肯塔基和阿贡纳沙门菌耐药率分别为 28.9%和 20.0%，其中科瓦利斯沙门菌对萘啶酸的耐药率高于平均水平。3 种血清型沙门菌分离株对氧氟沙星的耐药状况依次为阿贡纳（90.9%）、科瓦利斯（88.9%）和肯塔基（65.8%）；对环丙沙星的耐药状况分别为肯塔基（28.9%）、科瓦利斯（17.8%）和阿贡纳（1.8%）。就 3 种抗生素而言，科瓦利斯沙门菌总体上对（氟）喹诺酮类抗生素的抗性最强，达 50.4%；其次是肯塔基沙门菌 41.2%和阿贡纳沙门菌 37.6%。

表 3-6 常见血清型沙门菌对（氟）喹诺酮类抗生素的耐药率（%）

抗生素名称	抗特定数量抗生素菌株的比例（%）			平均（n=138）
	阿贡纳（n=55）	科瓦利斯（n=45）	肯塔基（n=38）	
萘啶酸	20.0（11）	44.4（20）	28.9（11）	30.4（42）
氧氟沙星	90.9（50）	88.9（40）	65.8（25）	83.3（115）
环丙沙星	1.8（1）	17.8（8）	28.9（11）	14.5（20）
平均	37.6	50.4	41.2	42.7

注：“（）”指比例（菌株数）

3.3.2 沙门菌（氟）喹诺酮类抗生素耐药基因检测

3.3.2.1 沙门菌 PMQR（质粒介导的喹诺酮耐药）基因检测

由表 3-7 可以看出，138 株沙门菌中共有 115 株携带至少一种 PMQR 基因，检

出率为 83.3%，其中阿贡纳沙门菌检出率最高为 100%（55/55），其他依次是科瓦利斯沙门菌 93.3%（42/45）、和肯塔基沙门菌 47.4%（18/38）；但肯塔基沙门菌 34.2%（13/38）是携带两种或两种以上 PMQR 基因最多的，阿贡纳沙门菌为 23.6%（13/55），科瓦利斯沙门菌 20.0%（9/45）。阿贡纳沙门菌（100%）和科瓦利斯沙门菌（93.3%）同时携带 1 个 PMQR 基因所占比例高于其肯塔基沙门菌（47.4%）（ $p<0.01$ ）。

如表 3-7 所示，138 株沙门菌 PMQR 基因检测中检出 *qnrS* 检出最多（98 株，71.0%），其次是 *aac(6')-Ib-cr*（30 株，21.7%），*qnrB*（25 株，18.1%），*qnrA*（4 株，2.9%），*oqxAB*（2 株，1.4%）和 *qnrD*（1 株，0.7%）。本研究并未检出 *qnrC* 和 *qepA*。55 株阿贡纳沙门菌中 *qnrS* 检出率最高，达 100%；*qnrB*、*qnrA* 和 *aac (6')-Ib-cr* 检出率分别为 17%、5.7%、1.9%；*qnrC*、*qnrD*、*oqxAB* 和 *qepA* 均为检出。45 株科瓦利斯沙门菌检测出的 PMQR 因子中以 *qnrS*（91.1%，41/45）基因为主；其次依次为 *aac (6')-Ib-cr*（26.7%，12/45）、*qnrB*（11.1%，5/45），*qnrA* 和 *qnrD* 均为 2.2%，1/45），未检出 *qnrC*、*oqxAB* 和 *qepA*。38 株肯塔基沙门菌中检出 *aac (6')-Ib-cr*（17 株，44.7%）、*qnrB*（11 株，29.0%）、*qnrS*（2 株，5.3%）和 *oqxAB*（2 株，5.3%）。

表 3-7 不同血清型沙门菌 PMQR 的检出率

PMQR 基因	携带 PMQR 菌株数 (%)			合计(n=138)
	阿贡纳 (n=55)	科瓦利斯 (n=45)	肯塔基 (n=38)	
<i>qnrA</i>	5.7 (n=3)	2.2 (n=1)	NM	2.9 (n=4)
<i>qnrB</i>	17 (n=9)	11.1 (n=5)	29.0 (n=11)	18.1 (n=25)
<i>qnrC</i>	NM	NM	NM	0

续表 3-7

PMQR 基因	携带 PMQR 菌株数 (%)			合计(n=138)
	阿贡纳 (n=55)	科瓦利斯 (n=45)	肯塔基 (n=38)	
<i>qnrD</i>	NM	2.2 (n=1)	NM	0.7 (n=1)
<i>qnrS</i>	100 (n=55)	91.1 (n=41)	5.3 (n=2)	71.0 (n=98)
<i>oqxAB</i>	NM	NM	5.3 (n=2)	1.4 (n=2)
<i>aac (6')-Ib-cr</i>	1.9 (n=1)	26.7 (n=12)	44.7 (n=17)	21.7 (n=30)
<i>qepA</i>	NM	NM	NM	0
≥1	100 (n=55)	93.3 (n=42)	47.4 (n=18)	83.3 (n=115)
≥2	23.6 (n=13)	20.0 (n=9)	34.2 (n=13)	25.4 (n=35)

注：NM，表示未发现；≥1，表示携带任何一种 PMQR 基因；≥2，表示携带任何两种或两种以上 PMQR 基因

3.3.2.2 沙门菌 QRDR（喹诺酮耐药性决定区）突变情况

由表 3-8 可以看出，138 株沙门菌的 QRDR 基因中共检出 40 个点突变，没有在 *gyr B* 和 *parE* 基因中检出突变。16 株沙门菌基因突变株中 6.5%（9 株）*gyr A* 基因中 Ser83→Phe 发生变异为最为常见突变，在此位点，由于基因突变使丝氨酸突变成苯丙氨酸。其中除了 9 株沙门菌在 83 位氨基酸处发生突变外，其他基因的第 87 位氨基酸上也同时发生了突变，87 位点上最常见的突变为 Asp87→Asn（6 株）或 Asp87→Tyr（1 株），即 87 位的天冬氨酸替代成天冬酰胺或酪氨酸。24 株沙门菌基因突变株中 13.0%（18 株）*parC* 基因中苏氨酸变异为丝氨酸（Thr57→Ser），其余 4.3%（6 株）在 80 位氨基酸处发生丝氨酸突变成异亮氨酸（Ser80→Ile）。

结合沙门菌对（氟）喹诺酮类抗生素的耐药性可知，耐药表型与突变点检出率之间存在着一定关系。研究中沙门菌以同时耐萘啶酸、氧氟沙星和环丙沙星（耐药谱为 NAL+OFX+CIP）的现象最为常见。

表 3-8 不同血清型沙门菌 QRDR 突变情况

QRDR 基因	突变类型	携带 QRDR 菌株数 (%)			合计 (n=138)
		阿贡纳 (n=55)	科瓦利斯 (n=45)	肯塔基 (n=38)	
<i>gyrA</i>	Asp87Tyr	-	2.2 (n=1)	-	0.7 (n=1)
	Ser83Phe	-	-	23.7 (n=9)	6.5 (n=9)
	Asp87Asn	-	-	15.8 (n=6)	4.3 (n=6)
<i>gyrB</i>	-	-	-	-	-
<i>parC</i>	Thr57Ser	20.8 (n=11)	15.6 (n=7)	-	13.0 (n=18)
	Ser80Ile	-	-	15.8 (n=6)	4.3 (n=6)
<i>parE</i>	-	-	-	-	-

注：表中 NM 表示“无突变”，氨基酸符号表示的意义为：Thr（苏氨酸-Threonine）、Ser（丝氨酸-Serine）、Asp（天冬氨酸-Aspartic）、Tyr（酪氨酸-Tyrosine）、Phe（苯丙氨酸-Phenylalanine）、Asn（天冬酰胺-Asparagine）、Ile（异亮氨酸-Isoleucine）。

在 55 株阿贡纳沙门菌仅发现 *parC* 基因中 57 位突变，在 57 位突变中 20.8% 的苏氨酸突变为丝氨酸（Thr57→Ser），未发现 *gyrA*、*gyrB* 和 *parE* 基因突变；常见耐药表型为 NAL+OFX（10 株）。45 株科瓦利斯沙门菌基因突变株中，有 2.2%（1 株）沙门菌在其 *gyrA* 基因的第 87 位氨基酸发生突变，突变类型为天冬氨酸被酪氨酸所替代（Asp87→Tyr）。与此同时 15.6%（7 株）编码其拓扑异构酶 *parC* 亚基的基因也发生了突变，导致其第 57 位氨基酸发生了苏氨酸突变为丝氨酸（Thr57→Ser），未发现 *gyrB* 和 *parE* 基因突变；常见耐药表型为 NAL+OFX+CIP（5 株）。38 株肯塔基沙门菌中也未发现 *gyrB* 和 *parE* 基因突变，但是在其 *gyrA* 基因上检出了双突变，即发现在 83 位点和 87 位点都有突变；其中有 23.7%（9 株）第 83 位的氨基酸丝氨酸被苯丙氨酸替代（Ser83→Phe），15.8%（6 株）第 87 位的氨基酸天冬氨酸被天冬酰胺所替代（Ser83→Asn）。在其 *parC* 基因中也检出了突变，突变类型为 Ser80→Ile，即该亚基第 80 位的丝氨酸突变为异亮氨酸；常见耐药表型为 NAL+OFX+CIP（5 株）。

3.3.3 常见血清型沙门菌 PFGE 分型

3.3.3.1 阿贡纳沙门菌 PFGE 分型

由图 3-1 可知, 55 株阿贡纳沙门菌(广州 23 株, 深圳 13 株, 韶关 10 株, 云浮 9 株)使用 Xba I 酶切分型后共呈现出 44 种不同的 PFGE 基因型。按照同源性 $\geq 85\%$ 视为同一谱型菌株来判断, 可分成 6 个基因簇和 15 个单一的基因型。6 个基因簇分别是 A 簇、C 簇、E 簇、F 簇、K 簇和 P 簇, 分别包含菌株数为 4 株、12 株、5 株、12 株、3 株和 4 株。A 簇 4 株菌含有 4 个基因型, C 簇 12 株菌含有 7 个基因型, E 簇 5 株菌含有 5 个基因型, F 簇 12 株菌含有 6 个基因型, K 簇 3 株菌含有 3 个基因型, P 簇 4 株菌含有 4 个基因型。15 个单一的基因型分别是 B 型, D 型, G 型, H 型, I 型, J 型, L 型, M 型, N 型, O 型, Q 型, R 型, S 型, T 型, U 型, 都包含了 1 株菌, 在基因簇中常见基因簇是 C 簇。表明广东省流行的阿贡纳沙门菌基因型种类复杂, 并且基因型差异性大。

来源于广州市的 23 株阿贡纳沙门菌有 22 种 PFGE 基因型, 主要分布于 A、C、E 和 F 簇, 其中仅有 2 株(编号 81 和 86)来源于海珠区的菌株同源性为 100%; 深圳市此血清型的沙门菌有 13 个基因型, 主要分布于 F 和 P 簇; 韶关市此血清型的菌株有 10 个基因型, 则全部集中于 F 簇; 而云浮市此血清型的菌株有 9 个基因型, 则分布于 C 簇。同一血清型的沙门菌来源不相同则基因型多样, 说明可能是不同起始菌株的克隆系。

大部分菌株都以单一基因型存在, 但有 7 组沙门菌菌株同源性为 100%, 其来源时间和地点均不同, 包括了广州、深圳、韶关和云浮。说明此血清型是存在相同克隆系水平传播的现象。

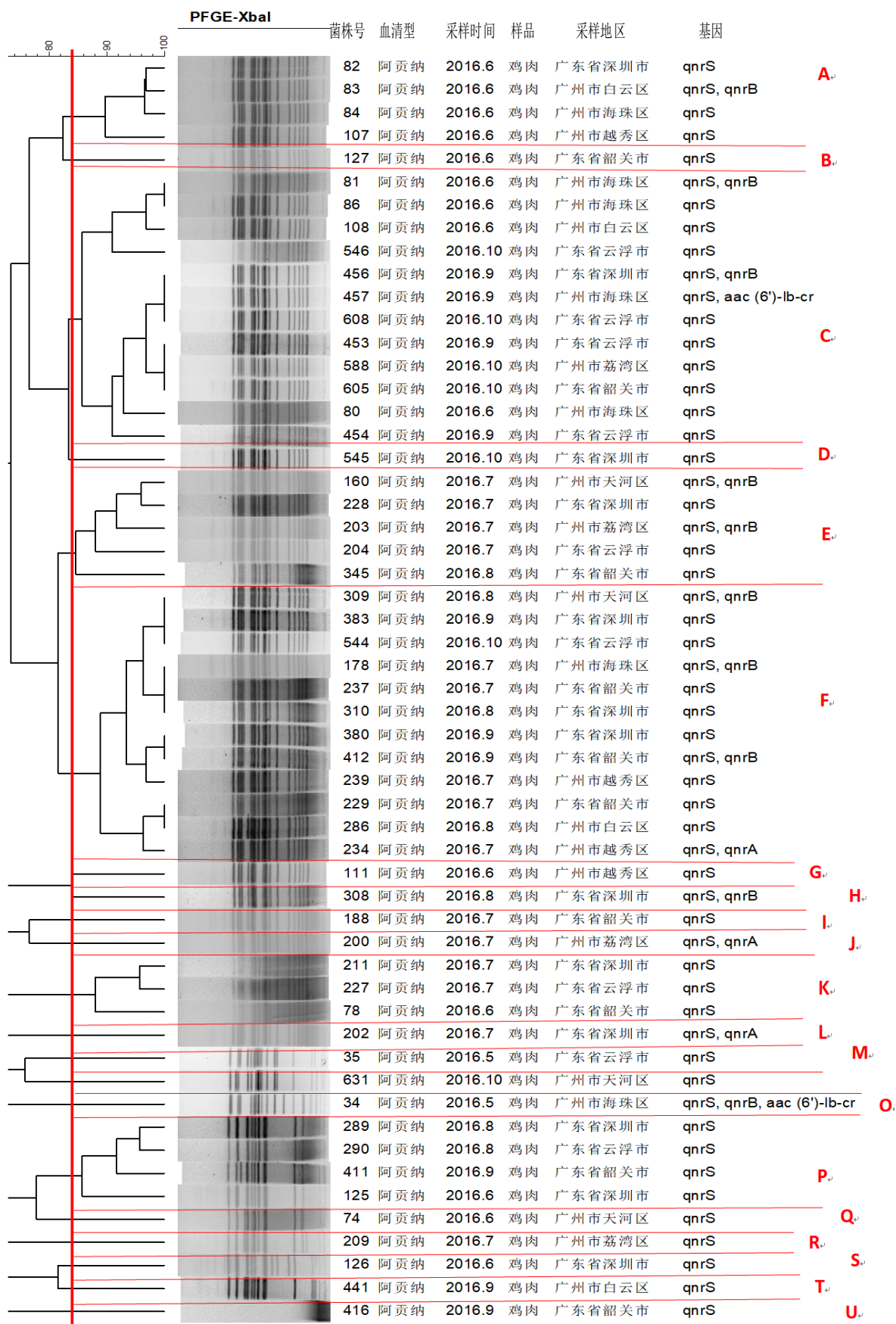


图 3-1 阿贡纳沙门菌 PFGE 图谱（附录 A 为此大图）

3.3.3.2 科瓦利斯沙门菌 PFGE 分型

由图 3-2 可知，45 株科瓦利斯沙门菌（广州 18 株，深圳 14 株，河源 7 株，韶关 4 株，佛山 2 株）经 PFGE 分型后共呈现出 34 种不同的 PFGE 基因型。

按照同源性 $\geq 85\%$ 视为同一谱型菌株来判断，可分成 11 个基因簇和 5 个单一的基因型。11 个基因簇分别是 A 簇、C 簇、D 簇、F 簇、G 簇、H 簇、I 簇、K 簇、L 簇、M 簇和 N 簇，分别包含菌株数为 2 株、3 株、3 株、9 株、6 株、2 株、3 株、2 株、2 株、5 株和 3 株。A 簇含有 2 个基因型，C 簇含有 3 个基因型，D 簇含有 3 个基因型，F 簇含有 4 个基因型，G 簇含有 3 个基因型，H 簇含有 2 个基因型，I 簇含有 3 个基因型，K 簇含有 2 个基因型，L 簇含有 2 个基因型，M 簇含有 4 个基因型，N 簇含有 1 个基因型。5 个单一的基因型分别是 B 型，E 型，J 型，O 型，P 型，仅包含了 1 株菌。在基因簇中常见基因簇是 F 簇和 M 簇。

来源于广州市的 18 株科瓦利斯沙门菌有 14 种 PFGE 基因型，主要分布于 G 簇；深圳市此血清型的沙门菌有 12 个基因型，主要分布于 F 簇；河源市此血清型的菌株有 6 个基因型，则全部集中于 F 簇；韶关市此血清型的菌株有 4 个基因型，均散在存在于各基因簇中；而佛山市此血清型的菌株仅有 2 个基因型，也分布分散于各基因簇。

说明此血清型沙门菌同源性高，多数都是两两为一个克隆系，提示科瓦利斯沙门菌可能存在跨时间和地域交叉传播能力。

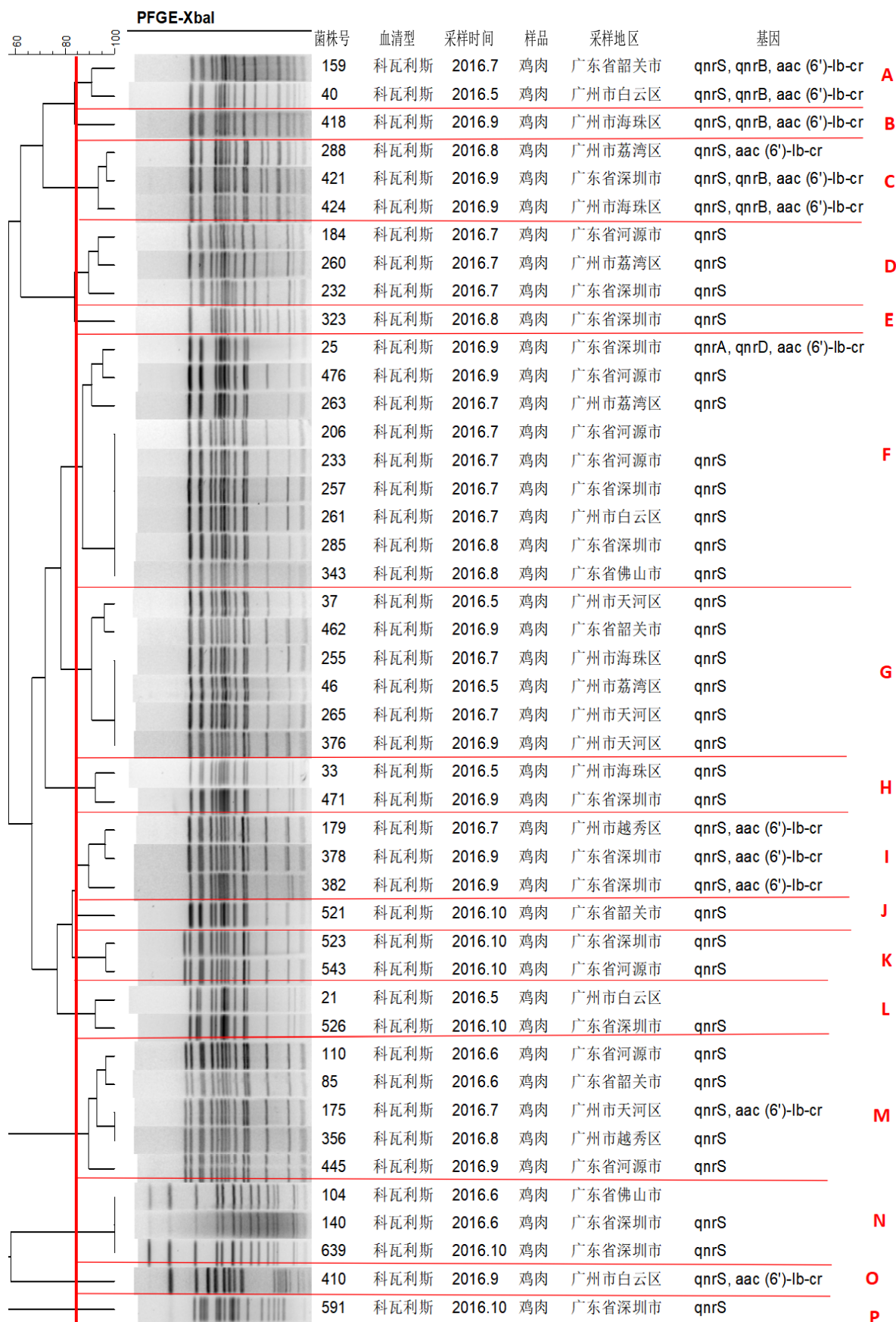


图 3-2 科瓦利斯沙门菌 PFGE 图谱（附录 B 为此大图）

3.3.3.3 肯塔基沙门菌 PFGE 分型

由图 3-3 可知, 38 株肯塔基沙门菌(广州 12 株, 深圳 17 株, 韶关 7 株, 云浮 2 株)经 PFGE 分型后共呈现出 29 种不同的 PFGE 基因型。

按照同源性 $\geq 85\%$ 视为同一谱型菌株来判断, 可分成 6 个基因簇和 13 个单一的基因型。6 个基因簇分别是 A 簇、D 簇、E 簇、F 簇、M 簇和 O 簇, 分别包含菌株数为 4 株、12 株、2 株、2 株、3 株和 2 株。A 簇含有 2 个基因型, D 簇含有 6 个基因型, E 簇含有 2 个基因型, F 簇含有 2 个基因型, M 簇含有 2 个基因型, O 簇含有 2 个基因型。13 个单一的基因型分别是 B 型、C 型、G 型、H 型、I 型、J 型, K 型、L 型、N 型、P 型、Q 型、R 型、S 型, 仅包含了 1 株菌。在基因簇中常见基因簇是 D 簇。

来源于广州市的 12 株肯塔基沙门菌有 12 种 PFGE 基因型, 主要分布于 D 簇; 深圳市此血清型的沙门菌有 13 个基因型, 主要分布于 D 簇; 韶关市此血清型的菌株有 6 个基因型, 均散在存在于各基因簇中; 而云浮市此血清型的菌株仅有 2 个基因型, 也分散于各基因簇, 其采样地点与 DNA 带谱相关性分布并没有很明显的相关性。表明科瓦利斯沙门菌基因型种类单一, 在同一时期流行的此血清型菌株可能为同一种菌株而来。

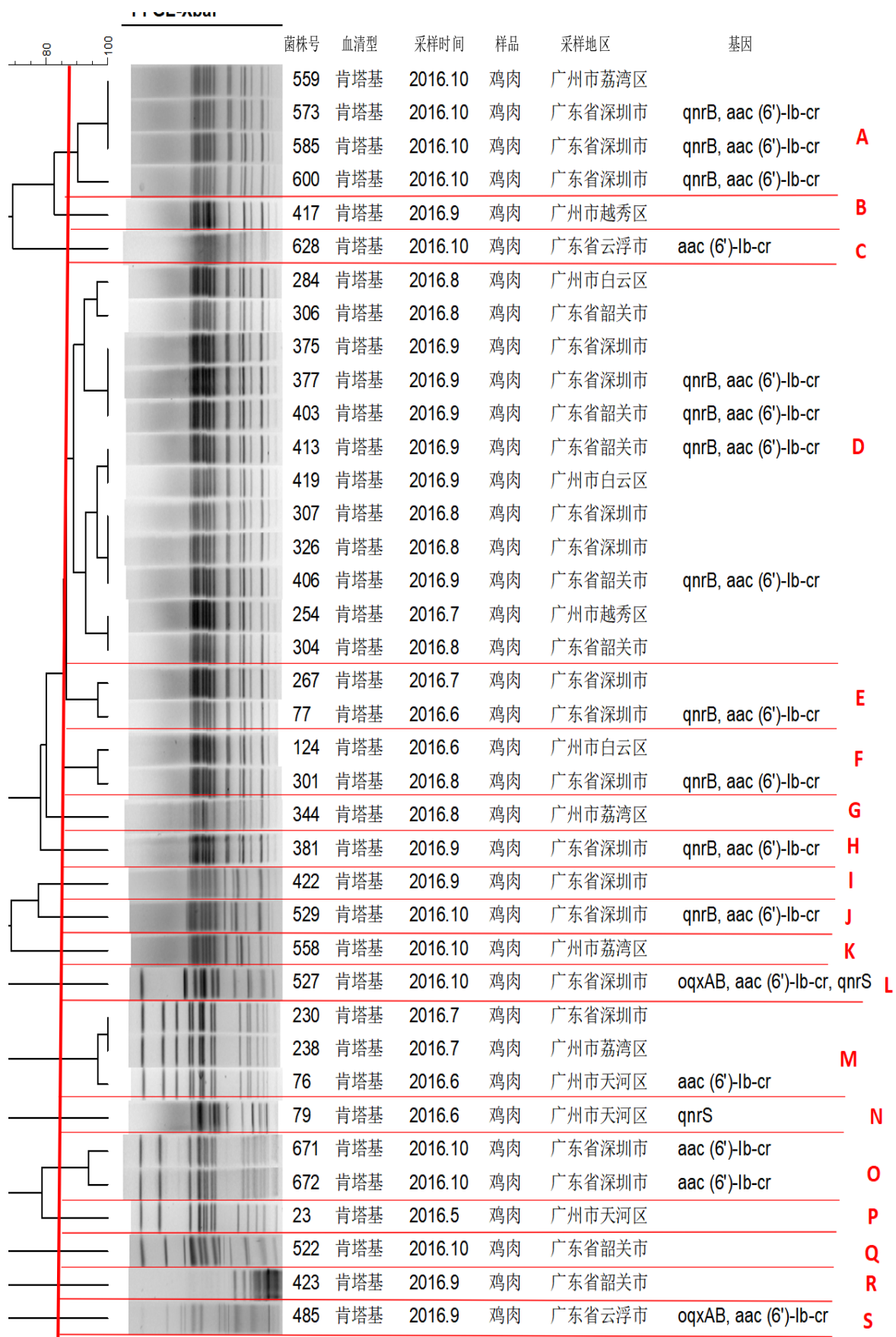


图 3-3 肯塔基沙门菌 PFGE 图谱（附录 C 为此大图）

3.4 结论与讨论

在过去的二十年中，全球出现多重耐药性沙门菌菌株已导致氯霉素停用并用氟喹诺酮类和第三代头孢菌素替代（Bhan *et al.*, 2005）。喹诺酮类和氟喹诺酮类已用于治疗人类和动物沙门菌病，并且自 20 世纪 80 年代以来一直在中国使用（Angulo *et al.*, 2000）。不幸的是，在 20 世纪 90 年代初在世界范围内的几个血清型中，观察到高度喹诺酮类和氟喹诺酮类耐药沙门菌分离株的出现和传播（Izumiya *et al.*, 2005）。

在 2004 至 2007 年间从哥伦比亚动物源性食品（鸡肉，香肠和绞肉）中分离出 13 株对萘啶酸耐药的沙门菌菌株中，发现 4 株（30.8%）*qnrB* 阳性，所有这些菌株都对环丙沙星敏感。在婴儿沙门菌、乌干达沙门菌和沙门菌 6,7:d:- 中检出 *qnrB* 基因，无其他喹诺酮类抗性基因（*qnrA*、*qnrS*、*aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA*）被检测到（Kakatkar *et al.*, 2011）。在一项对来自丹麦、泰国和美国的人、食物和动物性食品中分离出的胥戈成格隆沙门菌研究中，在 123 株萘啶酸耐药菌株中有 29 株（24%）检出环丙沙星耐药；在测试 10 个环丙沙星耐药分离株中发现在 83 位（Ser→Phe）和 87 位（Asp→Asn）处含有 *gyrA* 的双突变，导致高水平的环丙沙星耐药性（Aarestrup *et al.*, 2007）。在 13 个欧洲国家进行的一项国际合作研究表明，各种来源（环境，食物，人类，猪，家禽，爬行动物，绵羊，火鸡）肠炎沙门菌分离株中，59%（288/485）携带 PMQR 基因；在食物分离株中，检测到 *qnrS1* 基因最常见（与 *aac(6')-Ib-cr* 基因在一个分离株中被检测到），而两个分离株是 *qnrB19* 阳性，并且单一菌株携带 *qnrD* 基因（Veldman *et al.*, 2011）。在 2007 年和 2008 年期间从陕西省零售肉类样品（鸡肉、猪肉和羊肉）中发现了 30 株多重耐药沙门菌，其中共检测到在 *gyrA*，*parC* 和 *parE* 中 68 个突变，未检出 *gyrB* 突变（Yang *et al.*, 2012）。Wong 等人从香港零售肉中分离到的沙门菌中检测出 *oqxAB* 基因，这是第一次发现喹诺酮类抗生素分离株中含有 *oqxAB* 基因，其他分离株检测到携带 *qnrS* 和 *aac(6')-Ib-cr* 基因（Wong *et al.*, 2013）。

此外，在一些细菌物种，如大肠杆菌和肺炎克雷伯菌中，喹诺酮耐药性也与质粒介导的 *qnr* 基因的表达有关（Li, 2005; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003）。QNR 蛋白是五肽家族的成员，能够保护促旋酶和拓扑异构酶免受喹诺酮和氟喹诺酮类药物引起的损伤，从而降低对这些抗生素的易感性（Robicsek *et al.*, 2006）。对含有 *qnr* 的质粒进行的研究表明，该基因可以通过缀合从其他细菌物种转移到沙门菌。本研究

发现,不同 *qnr* 基因在不同血清型之间的流行情况存在差异,如阿贡纳沙门菌 *qnrS* 基因达 100%,而肯塔基沙门菌仅 5.3%,且肯塔基沙门菌中发现 2 株(5.3%)的 *oqxAB* 基因。*aac (6')-Ib-cr* 是由于其能够同时修饰氟喹诺酮类和氨基糖苷类这两类抗生素以及其广泛的分布性引起研究者很大的重视。*oqxAB* 基因赋予喹乙醇和氯霉素耐药性,并降低对其他抗生素的敏感性。在中国,沙门菌以及其他致病菌中已报道了 *qnr* 和 *aac (6')-Ib-cr* 基因的存在 (Luo *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010)。目前关于 PMQR 其他耐药基因的研究报道不是很多 (Bartoloni *et al.*, 2013)。

本研究中 115 种(83.3%)沙门菌分离株中发现了高流行的 PMQR 基因。沙门菌 PMQR 基因的流行正在迅速增加 (Zhang *et al.*, 2016)。本研究中, *qnrS* 和 *aac (6')-Ib-cr* 是 PMQR 基因中最常见的,其中阿贡纳、科瓦利斯和肯塔基这三种血清型沙门菌中的 *gyrA* 和 *parC* 的 QRDR 基因中检测到 40 个氨基酸突变。一些是单突变,只在 *gyrA* 中检测到,而一些突变在 *gyrA* 和 *parC* 中同时发现。此外,一些突变仅存在某种血清型上,如 *gyrA* 基因中 Asp87Tyr 突变仅发生于科瓦利斯沙门菌上; Ser83Phe 和 Asp87Asn 突变发生于肯塔基沙门菌上; *parC* 基因中 Ser80Ile 突变也仅发生于肯塔基沙门菌,说明沙门菌对喹诺酮的耐药性与血清型有关。*parC* 基因中 Thr57Ser 突变率最高达 13.0%,其次是 *gyrA* 基因中 6.5%的 Ser83Phe 突变。这些突变类型已被许多研究者证实,与 DNA 促旋酶和拓扑异构酶是喹诺酮类和氟喹诺酮类作用靶点的发现一致,并且 *gyrA* 和/或 *parC* 的 QRDR 中的点突变可以介导对非氟化喹诺酮(例如萘啶酮酸)的耐药性并减少对氟喹诺酮类(如环丙沙星)的易感性 (Eaves *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009)。

在许多细菌性病原体的流行病学调查中, PFGE 一直被证明是一种高度区别性的亚型分型方法 (Lee *et al.*, 2000)。本研究对从广东省鸡肉中检出的常见血清型沙门菌进行 PFGE 分型研究,结果显示各菌株沙门菌的基因型相似性在 50%~100%之间。每个血清型中的沙门菌分离株具有遗传多样性(数据未显示)。分离自广州市鸡肉的沙门菌谱型相对更为复杂,共有 44 个谱型,证明鸡肉中沙门菌感染源复杂。按同源性判断标准,大部分沙门菌在亲缘关系上有相关性。在不同血清型中,虽然沙门菌有不同的谱型,但多数菌株的基因型相似性高,而且有多组沙门菌共有一种谱型,表明广

东省鸡肉中沙门菌相关性明显。另外，从不同地区采集的科瓦利斯沙门菌分离株中发现了几种相同的 PFGE 模式，提示鸡肉中可能存在沙门菌沿生产链水平传播的情况。

综上所述，本研究结果表明需要加强控制广东省农贸市场鸡肉中沙门菌的流行和对喹诺酮类抗生素的使用。另外，耐药基因的检测有助于了解此三种血清型流行株的耐药机制，从而丰富和完善鸡肉源致病性沙门菌耐药性的分子流行病学资料，也为临床治疗沙门菌疾病的合理用药及沙门菌多重耐药机制的进一步研究提供实验依据。

第四章 全文总结

本研究调查 2016 年 5 月至 10 月采自广东省（广州市、深圳市、河源市、韶关市、佛山市、云浮市）农贸市场鸡肉和猪肉中的沙门菌流行特征，并研究流行菌株的血清型、耐药性、ESBLs 基因型。同时调查了鸡肉中常见血清型沙门菌对喹诺酮类抗生素耐药基因的携带情况和 PFGE 分型等。全文总结如下：

1. 广东省不同地区鸡肉和猪肉中沙门菌污染程度不同，污染严重的是韶关市和深圳市，污染轻的为佛山市。表明广东省农贸市场鸡肉和猪肉中存在严重的沙门菌污染现象，需加强市场监督监测和卫生管理。

2. 分离到的 615 株沙门菌共鉴定出 38 种血清型。其中鸡肉样品鉴定出 27 种血清型；猪肉样品鉴定出 25 种血清型。还首次在国内动物源性产品中检出拉姆福德血清型沙门菌。表明广东省农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌血清型复杂多样且分布广泛。

3. 耐药性检测发现，所有菌株对磺胺复合物的耐药率最高，其次是四环素；对头孢吡肟，头孢他啶，阿米卡星和阿莫西林/克拉维酸耐药率低。检测到临床上治疗细菌感染性疾病的“最后一线”药物多粘菌素 B 和亚胺培南耐药。多重耐药率达 77.1%，3.4%的沙门菌分离株产 ESBLs 且涵盖 6 种沙门菌血清型。*Bla_{OXA-1}* 是主要的 ESBLs 基因，其次是 *bla_{CTX-M-55}*。表明广东省农贸市场鸡肉和猪肉中沙门菌对抗生素的耐药性及多重耐药性已成普遍现象。

4. 鸡肉中常见血清型沙门菌的 PMQR 基因检出率为 83.3%。QRDR 基因 *gyrA* 和 *parC* 的中检测到 40 个氨基酸突变。一些突变仅存在某种血清型上，说明沙门菌对喹诺酮的耐药性与血清型有关。

5. PFGE 结果显示不同时间和地点分离到的相同血清型沙门菌呈现出相同或不同的基因型，表现出多样化特征又具有同源性，表明沙门菌可能存在跨时间和地域交叉传播能力。

致 谢

本研究及毕业论文是在我的导师廖明教授的亲切关怀和悉心指导下完成的，在本文完成之际，我谨向我敬爱的导师廖明教授致以最崇高的敬意和最诚挚的谢意！感谢廖老师在科研和生活上的指导和关怀。廖老师严谨求实的科学态度、一丝不苟的工作作风、认真负责的治学精神、思维敏锐的洞察力时刻激励着我，是我终身学习的榜样。

衷心感谢张建民副教授在论文的选题、试验方案的确定和实施、试验结果的分析、论文的撰写和修改等方面给予我的指导和帮助。张老师踏实严谨、严于律己、宽厚待人的处事态度以及高度的责任心使我受益匪浅，在此致以最诚挚的敬意！

感谢本实验室亓文宝教授、樊惠英教授、曹伟胜教授、焦培荣副研究员、贾伟新副教授、瞿孝云老师及预防兽医系的其他各位老师对实验开展提出的宝贵意见与热情帮助，在此向他们致以真诚的谢意！

感谢 119 细菌组这个温暖大家庭中的硕士研究生符颖、杨开杰、熊智颖、马叶本、韦懿桓、白洁、陈政权、詹泽强等每一位小伙伴，是你们让我度过愉快的研究生生活！感谢大家的相亲相爱和互帮互助。

此外，我还要特别感谢我的家人，感谢他们多年来对我的教育、鼓励和支持！你们是最坚强的精神后盾！

最后感谢参加论文答辩的各位专家教授，你们辛苦了！

本研究在华南农业大学人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室、农业部兽用疫苗创制重点实验室、广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室、广东普通高校人兽共患预防与控制重点实验室和家禽疫病防控与产品安全协同创新中心完成，并得到动物源性沙门菌病防控技术与示范，公益性行业（农业）科研专项（201403054）；国家肉鸡产业技术体系疾病控制研究室岗位科学家，国家肉鸡产业技术体系项目（CARS-41-G16）；国家自然科学基金项目(31402193)；广州市珠江新星科技人才项目（201806010183）；广东省科技攻关项目（2017A020208055）；沃尔玛国际合作项目（SA1703162）等项目资助，特此表示感谢。

参考文献

- 韩喜荣, 丁越江, 胡英, 等. 2005年~2006年细菌性食物中毒情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2007(10):1883-1884.
- 侯小刚, 刘书亮, 韩新锋, 等. 四川部分地区猪肉产业链中沙门氏菌的分离及其鉴定[J]. 食品科学, 2013(11):250-253.
- 黄瑞伦, 黄志广, 莫嘉延, 等. 佛山市高明区食源性沙门菌的分布特点及其流行情况[J]. 中国预防医学杂志, 2012(06):436-438.
- 李郁. 合肥市屠宰生猪卫生现状调查研究[D]. 扬州大学, 2006.
- 李昱辰. 猪肉生产链中沙门菌的分离鉴定、耐药性分析及分子分型[D]. 扬州大学, 2014.
- 刘萍. 细菌耐药性的产生及防控对策[J]. 现代医药卫生, 2014(17):2712-2714.
- 马国正. 喹诺酮药物与生物大分子相互作用的计算化学研究[D]. 浙江大学, 2006.
- 冉陆. 食源性致病菌及其耐药性[J]. 预防医学文献信息, 2001(05):480-612.
- 饶星, 李月婷, 柳增善. 沙门菌鞭毛抗原及其多样性研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2008(03):77-81.
- 任行星. 广东省动物源沙门菌流行特点及HRM检测鸡白痢和鸡伤寒沙门菌方法的建立[D]. 华南农业大学, 2016.
- 谭艳, 方治平, 宋晓红. 耐氟喹诺酮类铜绿假单胞菌gyrA及parC基因突变研究[J]. 中国药理学通报, 2004(08):932-935.
- 王路梅, 杨晋川, 郭慧, 等. 徐州市2007—2011年食品中食源性致病菌监测结果分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2012(06):561-563.
- 王晓泉. 不同来源多重耐药性沙门氏菌分离株的耐药机制和脉冲场凝胶电泳分析[D]. 扬州大学, 2007.
- 夏培元. 细菌体内药物蓄积浓度减少与氟喹诺酮耐药性的研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2001(01):24-27.
- 杨晓林. 四川部分地区鸡沙门氏菌的分离鉴定及其弱毒株的培育[D]. 四川农业大学, 2014.
- 印广浩. 扬州地区部分屠宰场、农贸市场和动物医院猪源沙门菌分离鉴定、耐药性分析及致病性研究[D]. 扬州大学, 2016.
- 张代涛, 阚颀. 沙门菌属分子分型技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2009(05):465-468.
- 张海旺, 邓旭明, 韩春田, 等. 大肠杆菌耐药株的体外诱导及其acrA和marA基因分析[J]. 中国预防

- 兽医学报, 2005(06):115-119.
- 赵飞. 鸡肉中沙门菌的定量检测及分离株CRISPRS分子亚分型分析[D]. 扬州大学, 2013.
- 钟运华, 何林, 周克元, 等. 超广谱 β -内酰胺酶研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008(03):252-254.
- Aarestrup F M, Hendriksen R S, Lockett J, *et al.*. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products[J]. Emerging Infectious Diseases, 2007,13(5):726-731.
- Abdellah C, Filali Fouzia R, Abdelkader C, *et al.*. Prevalence and anti-microbial susceptibility of *Salmonella* isolates from chicken carcasses and giblets in Meknes, Morocco[J]. AFRICAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY RESEARCH, 2009,3(5):215-219.
- Alvarez-Fernandez E, Alonso-Calleja C, Garcia-Fernandez C, *et al.*. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012,153(3):281-287.
- Angulo F J, Johnson K R, Tauxe R V, *et al.*. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: Implications for the use of fluoroquinolones in food animals[J]. Microbial Drug Resistance, 2000,6(1):77-83.
- Archambault M, Petrov P, Hendriksen R S, *et al.*. Molecular characterization and occurrence of extended-spectrum beta-lactamase resistance genes among *Salmonella* enterica serovar Corvallis from Thailand, Bulgaria, and Denmark[J]. Microbial Drug Resistance, 2006,12(3):192-198.
- Arnedo-Pena A, Sabater-Vidal S, Herrera-Leon S, *et al.*. An outbreak of monophasic and biphasic *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Derby associated with the consumption of dried pork sausage in Castellon (Spain)[J]. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, 2016,34(9):544-550.
- Aslam M, Checkley S, Avery B, *et al.*. Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada[J]. Food Microbiology, 2012,32(1):110-117.
- Bai L, Lan R, Zhang X, *et al.*. Prevalence of *Salmonella* Isolates from Chicken and Pig Slaughterhouses and Emergence of Ciprofloxacin and Cefotaxime Co-Resistant *S. enterica* Seroovar Indiana in Henan, China[J]. Plos One, 2015,10(e014453212).
- Bartoloni A, Pallecchi L, Riccobono E, *et al.*. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20years of surveillance in resource-limited settings from Latin America[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2013,19(4):356-361.

- Barza M. Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2002,343:S123-S125.
- Baucheron S, Tyler S, Boyd D, *et al.*. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004,48(10):3729-3735.
- Belmar C C, Fenner I, Wiese N, *et al.*. Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014,304(5-6):678-684.
- Ben Said L, Jouini A, Andrea Alonso C, *et al.*. Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia[J]. *Science of the Total Environment*, 2016,550:1103-1109.
- Bhan M K, Bahl R, Bhatnagar S. Typhoid and paratyphoid fever[J]. *Lancet*, 2005,366(9487):749-762.
- Bin Kim H, Park C H, Kim C J, *et al.*. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009,53(2):639-645.
- Bouchrif B, Paglietti B, Murgia M, *et al.*. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco[J]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2009,3(1):35-40.
- Bradford P A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001,14(4):933-951.
- Bush K. Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008,141:134-143.
- Campioni F, Zoldan M M, Falcao J P. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil[J]. *Epidemiology and Infection*, 2014,142(7):1403-1410.
- Cavaco L M, Hasman H, Xia S, *et al.*. qnrD, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009,53(2):603-608.
- Chen S, Zhao S H, White D G, *et al.*. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004,70(1):1-7.
- Choi D, Chon J, Kim H, *et al.*. Incidence, Antimicrobial Resistance, and Molecular Characteristics of

- Nontyphoidal *Salmonella* Including Extended-Spectrum beta-Lactamase Producers in Retail Chicken Meat[J]. *Journal of Food Protection*, 2015,78(11):1932-1937.
- Cui M, Xie M, Qu Z, *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from an integrated broiler chicken supply chain in Qingdao, China[J]. *Food Control*, 2016,62:270-276.
- Dahms C, Huebner N, Kossow A, *et al.* Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany[J]. *Plos One*, 2015,10(e014332611).
- Dalhoff A. Resistance surveillance studies: a multifaceted problem--the fluoroquinolone example[J]. *Infection*, 2012,40(3):239-262.
- Dallal M M S, Doyle M P, Rezadehbashi M, *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran[J]. *Food Control*, 2010,21(4):388-392.
- Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*[J]. *Nature*, 1965,208(5007):239-241.
- Deng X, Ran L, Wu S, *et al.* Laboratory-Based Surveillance of Non-typhoidal *Salmonella* Infections in Guangdong Province, China[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012,9(4):305-312.
- Dogru A K, Ayaz N D, Gencay Y E. Serotype identification and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* spp. isolated from chicken carcasses[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2010,42(5):893-897.
- Eaves D J, Randall L, Gray D T, *et al.* Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004,48(10):4012-4015.
- Fabrega A, Sanchez-Cespedes J, Soto S, *et al.* Quinolone resistance in the food chain[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008,31(4):307-315.
- Fang H, Xu J, Ding D, *et al.* An FDA bioinformatics tool for microbial genomics research on molecular characterization of bacterial foodborne pathogens using microarrays[J]. *Bmc Bioinformatics*, 2010,116(S4).
- Fischer J, Schmoger S, Jahn S, *et al.* NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany[J]. *Journal of Antimicrobial*

- Chemotherapy, 2013,68(12):2954-2956.
- Foley S L, White D G, Mcdermott P F, *et al.*. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006,44(10):3569-3577.
- Galanis E, Lo F W D, Patrick M E, *et al.*. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002[J]. Emerging Infectious Diseases, 2006,12(3):381-388.
- Gharieb R M, Tartor Y H, Khedr M H E. Non-Typhoidal *Salmonella* in poultry meat and diarrhoeic patients: prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains[J]. Gut Pathogens, 2015,7(34).
- Giraud E, Cloeckert A, Kerboeuf D, *et al.*. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella* enterica serovar typhimurium[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000,44(5):1223-1228.
- Guerra B, Helmuth R, Thomas K, *et al.*. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Salmonella* spp. isolates from reptiles in Germany[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010,65(9):2043-2045.
- Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, *et al.*. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme[J]. Research in Microbiology, 2010,161(1):26-29.
- Hansen L H, Johannesen E, Burmolle M, *et al.*. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004,48(9):3332-3337.
- Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, *et al.*. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002)[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2005,52(4):323-329.
- Hunter S B, Vauterin P, Lambert-Fair M A, *et al.*. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: Converting the national databases to the new size standard[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005,43(3):1045-1050.
- Ibrahim D R, Dodd C E R, Stekel D J, *et al.*. Multidrug resistant, extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm[J]. Fems Microbiology Ecology, 2016,92(fiw0134).

- Izumiya H, Mori K, Kurazono T, *et al.*. Characterization of isolates of *Salmonella* enterica serovar typhimurium displaying high-level fluoroquinolone resistance in Japan[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005,43(10):5074-5079.
- Jackson B R, Griffin P M, Cole D, *et al.*. Outbreak-associated *Salmonella* enterica serotypes and food Commodities, United States, 1998-2008[J]. Emerging Infectious Diseases, 2013,19(8):1239-1244.
- Jacoby G A. AmpC beta-lactamases[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2009,22(1):161-182.
- Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, *et al.*. qnr gene nomenclature[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008,52(7):2297-2299.
- Kakatkari A S, Pansare L S, Gautam R K, *et al.*. Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella* isolates from Indian foods[J]. Food Research International, 2011,44(10):3272-3275.
- Karim A, Poirel L, Nagarajan S, *et al.*. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1[J]. Fems Microbiology Letters, 2001,201(2):237-241.
- Katoh R, Matsushita S, Shimojima Y, *et al.*. [Serovars and Drug-Resistance of *Salmonella* Strains Isolated from Domestic Chicken Meat in Tokyo (1992-2012)].[J]. Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, 2015,89(1):46-52.
- Kocabiyik A L, Cetin C, Dedicova D. Detection of *Salmonella* spp. in stray dogs in Bursa province, Turkey: First isolation of *Salmonella* corvallis from dogs[J]. JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE SERIES B-INFECTIOUS DISEASES AND VETERINARY PUBLIC HEALTH, 2006,53(4):194-196.
- Lai J, Wu C, Wu C, *et al.*. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014,180:30-38.
- Lee H, Su L, Tsai M, *et al.*. High Rate of Reduced Susceptibility to Ciprofloxacin and Ceftriaxone among Nontyphoid *Salmonella* Clinical Isolates in Asia[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009,53(6):2696-2699.
- Lee T, Chang L, Chang C, *et al.*. Molecular analysis of *Shigella sonnei* isolated from three well-documented outbreaks in school children[J]. Journal of Medical Microbiology, 2000,49(4):355-360.
- Li R, Lai J, Wang Y, *et al.*. Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs,

- ducks and chickens in Sichuan Province, China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013,163(1):14-18.
- Li S, Zhou Y, Miao Z. Prevalence and Antibiotic Resistance of Non-typhoidal *Salmonella* Isolated from Raw Chicken Carcasses of Commercial Broilers and Spent Hens in Tai'an, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2017,8(2106).
- Li X Z. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005,25(6):453-463.
- Li X, Fang L, Song J, *et al.*. Clonal spread of mcr-1 in PMQRcarrying ST34 *Salmonella* isolates from animals in China[J]. Scientific Reports, 2016,6(38511).
- Li Y, Pan Z, Kang X, *et al.*. Prevalence, Characteristics, and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* in Retail Pork in Jiangsu Province, Eastern China[J]. Journal of Food Protection, 2014,77(2):236-245.
- Liang Z, Ke B, Deng X, *et al.*. Serotypes, seasonal trends, and antibiotic resistance of non-typhoidal *Salmonella* from human patients in Guangdong Province, China, 2009-2012[J]. BMC Infectious Diseases, 2015,15(53).
- Ling J M, Chan E W, Lam A W, *et al.*. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant salmonellae in Hong Kong[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003,47(11):3567-3573.
- Little C L, Richardson J F, Owen R J, *et al.*. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005[J]. Food Microbiology, 2008,25(3):538-543.
- Luo Y, Li J, Meng Y, *et al.*. Joint Effects of Topoisomerase Alterations and Plasmid-Mediated Quinolone-Resistant Determinants in *Salmonella enterica* Typhimurium[J]. Microbial Drug Resistance, 2011,17(1):1-5.
- Maka L, Mackiw E, Sciezynska H, *et al.*. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food other than meat in Poland[J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2015,22(3):403-408.
- Maka L, Mackiw E, Sciezynska H, *et al.*. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2012[J]. Food Control, 2014,36(1):199-204.
- Maka L, Sciezynska H, Grochowska A, *et al.*. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *SALMONELLA* STRAINS ISOLATED FROM FOOD IN POLAND[J]. Bromatologia i Chemia

- Toksykologiczna, 2010,43(3):260-265.
- Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby G A. Quinolone resistance from a transferable plasmid[J]. Lancet, 1998,351(9105):797-799.
- Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders F, *et al.*. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004,97(1):23-29.
- Nguyen D T A, Kanki M, Nguyen P D, *et al.*. Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC β -lactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016,236:115-122.
- Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005,56(3):463-469.
- Ojo O E, Schwarz S, Michael G B. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from chicken production chains in Nigeria[J]. Veterinary Microbiology, 2016,194:62-68.
- O'Leary D, McCabe E M, McCusker M P, *et al.*. Acid environments affect biofilm formation and gene expression in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015,206:7-16.
- Park C H, Robicsek A, Jacoby G A, *et al.*. 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.
- Perugini A G, Carullo M R, Esposito A, *et al.*. Characterization of antimicrobial resistant *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolates from animal and food in Southern Italy[J]. Veterinary Research Communications, 2010,34(4):387-392.
- Philippon A, Arlet G, Jacoby G A. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002,46(1):1-11.
- Piddock L J V, White D G, Gensberg K, *et al.*. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000,44(11):3118-3121.
- Qiao J, Zhang Q, Alali W Q, *et al.*. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)-producing *Salmonella* in retail raw chicken carcasses[J]. International Journal of Food

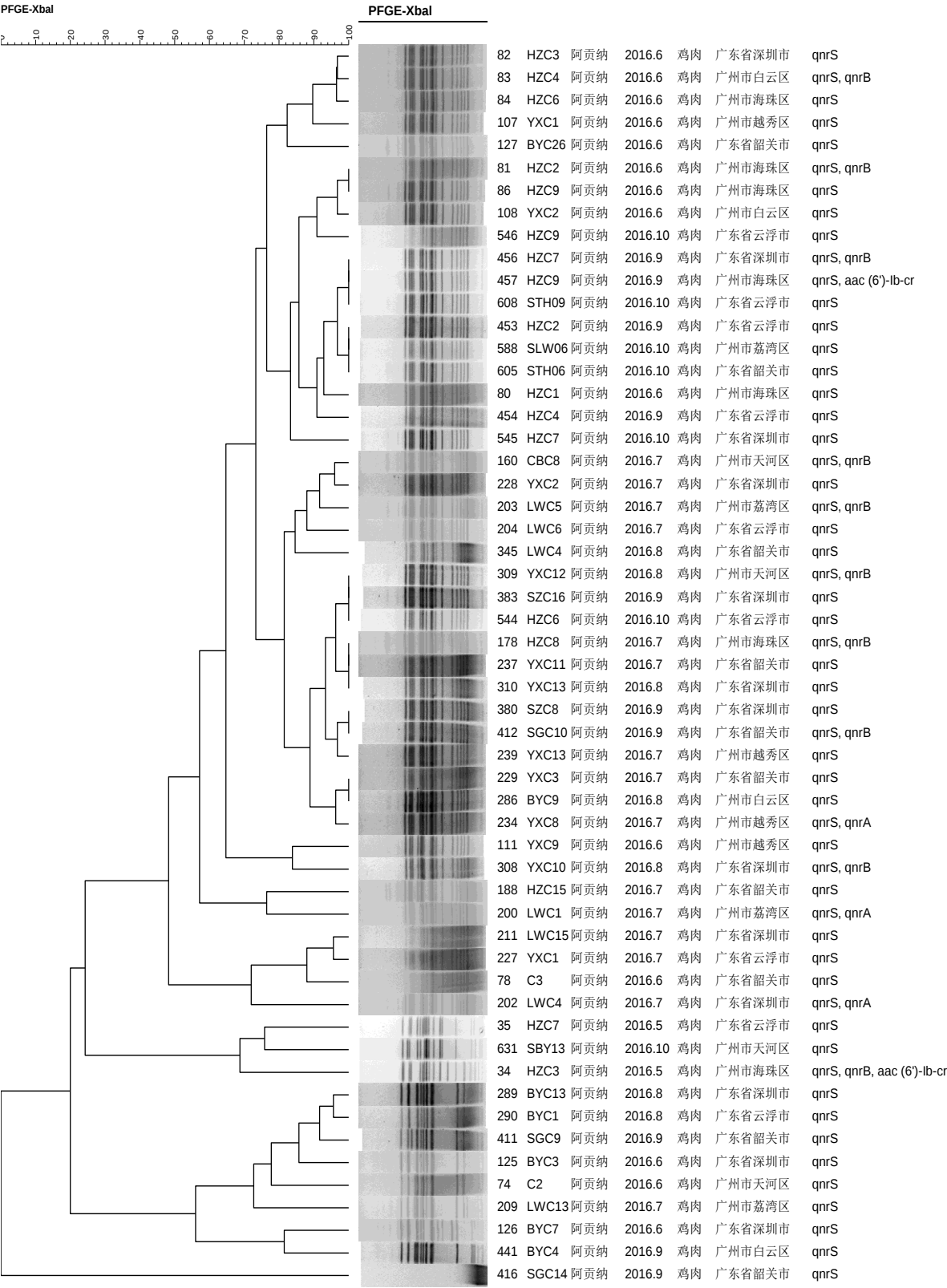
- Microbiology, 2017,248:72-81.
- Ranjbar R, Behnood V, Memariani H, *et al.*. Molecular characterisation of quinolone-resistant *Shigella* strains isolated in Tehran, Iran[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2016,5:26-30.
- Ranjbar R, Karami A, Farshad S, *et al.*. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide[J]. New Microbiologica, 2014,37(1):1-15.
- Ribot E M, Fair M A, Gautom R, *et al.*. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2006,3(1):59-67.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G A, *et al.*. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase[J]. Nature Medicine, 2006,12(1):83-88.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm D F, *et al.*. qnr Prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006,50(8):2872-2874.
- Russell D A, Bowman C A, Hatfull G F. Genome Sequence of *Salmonella* enterica subsp. enterica Strain Durban.[J]. Genome announcements, 2014,2(3).
- Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, *et al.*. Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens[J]. Emerging Infectious Diseases, 2011,17(1):7-15.
- Seiffert S N, Hilty M, Perreten V, *et al.*. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health?[J]. Drug Resist Updat, 2013,16(1-2):22-45.
- Shahid M, Sobia E, Singh A, *et al.*. Beta-lactams and Beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: A comprehensive update[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2009,35(2):81-108.
- Singh S, Yadav A S, Singh S M, *et al.*. Prevalence of *Salmonella* in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance[J]. Food Research International, 2010,43(8):2027-2030.
- Sinwat N, Angkittitrakul S, Chuanchuen R. Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella* enterica Isolated from Pork, Chicken Meat, and Humans in Northeastern Thailand[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015,12(9):759-765.
- Sorensen A H, Hansen L H, Johannesen E, *et al.*. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003,47(2):798-799.

- Su L H, Chiu C H, Chu C S, *et al.*. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: A global challenge[J]. Clinical Infectious Diseases, 2004,39(4):546-551.
- Swaminathan B, Barrett T J, Hunter S B, *et al.*. PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States[J]. Emerging Infectious Diseases, 2001,7(3):382-389.
- Thong K L, Modarressi S. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods[J]. Food Research International, 2011,44(9):2641-2646.
- Threlfall E J, Frost J A. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications.[J]. The Journal of applied bacteriology, 1990,68(1):5-16.
- Truong H T, Hirai T, Nguyen T L, *et al.*. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012,156(2):147-151.
- van Duijkeren E, Wannet W, Heck M, *et al.*. Sero types, phage types and antibiotic susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from horses in The Netherlands from 1993 to 2000[J]. Veterinary Microbiology, 2002,86(PII S0378-1135(02)00007-X3):203-212.
- Veldman K, Cavaco L M, Mevius D, *et al.*. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella* enterica and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011,66(6):1278-1286.
- Vo A, van Duijkeren E, Fluit A C, *et al.*. Distribution of *Salmonella* enterica Serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the Dominance of *Salmonella* Typhimurium Phage Type 90[J]. Veterinary Microbiology, 2006,113(1-2):153-158.
- Wang M G, Sahm D F, Jacoby G A, *et al.*. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004,48(4):1295-1299.
- Wang M G, Tran J H, Jacoby G A, *et al.*. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003,47(7):2242-2248.
- Wang S, Duan H, Zhang W, *et al.*. Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in China between 1994 and 2005[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007,51(1):8-13.

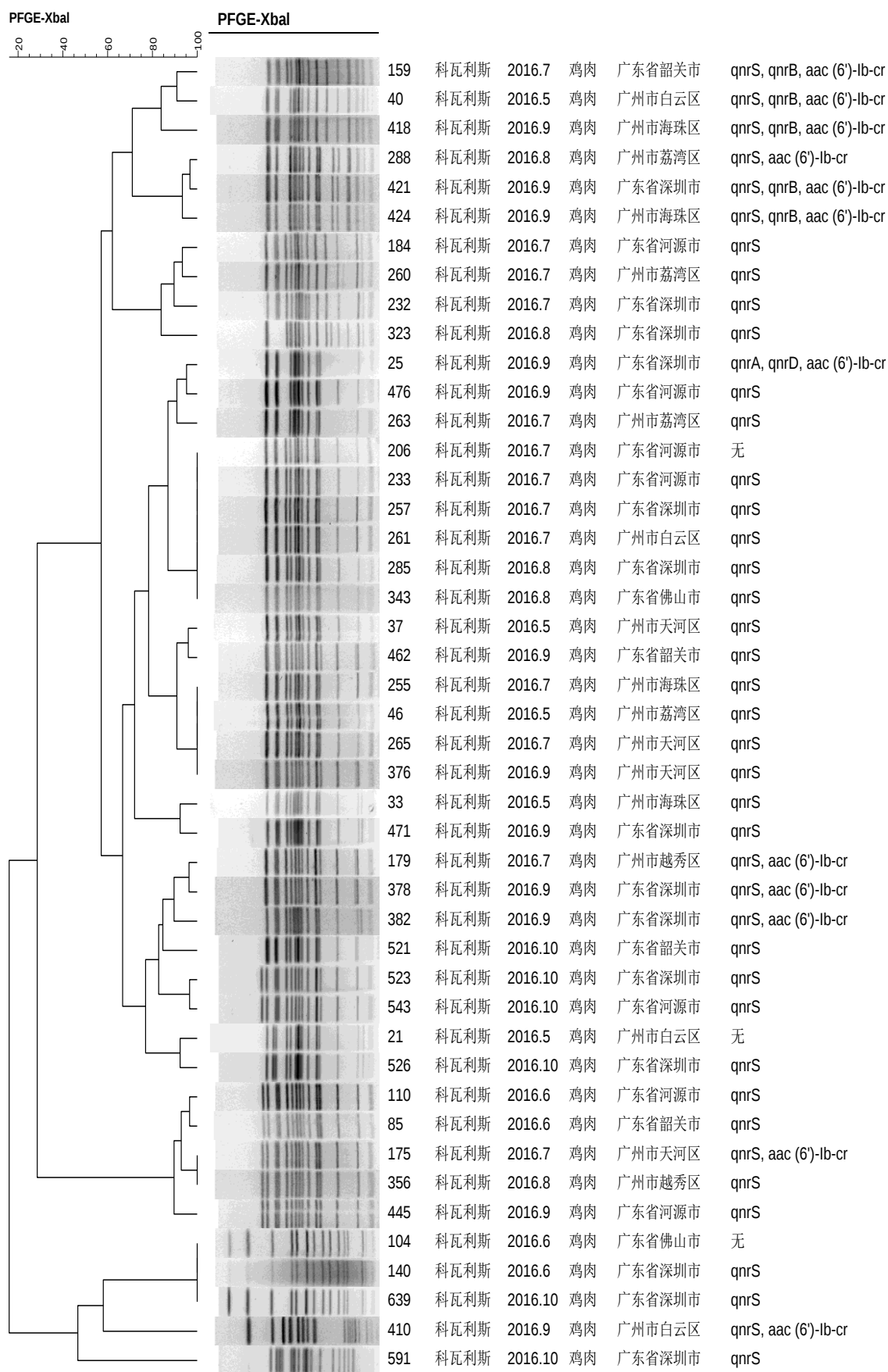
- Wang Y, Chen Q, Cui S, *et al.*. Enumeration and Characterization of *Salmonella* Isolates from Retail Chicken Carcasses in Beijing, China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014,11(2):126-132.
- Wasyl D, Hoszowski A. First isolation of ESBL-producing *Salmonella* and emergence of multiresistant *Salmonella* Kentucky in turkey in Poland[J]. Food Research International, 2012,45(2SI):958-961.
- Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella* enterica subsp enterica Subtyping: Gold Standards and Alternatives[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011,77(22):7877-7885.
- Winokur P L, Brueggemann A, Desalvo D L, *et al.*. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000,44(10):2777-2783.
- Wong M H Y, Chen S. First Detection of oqxAB in *Salmonella* spp. Isolated from Food[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013,57(1):658-660.
- Wu W, Wang H, Lu J, *et al.*. Genetic Diversity of *Salmonella* enteric serovar Typhi and Paratyphi in Shenzhen, China from 2002 through 2007[J]. BMC Microbiology, 2010,10(32).
- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, *et al.*. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(9):3354-3360.
- Yamatogi R S, Oliveira H C, Camargo C H, *et al.*. Clonal relatedness and resistance patterns of *Salmonella* Corvallis from poultry carcasses in a Brazilian slaughterhouse[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2015,9(10):1161-1165.
- Yan H, Li L, Alam M J, *et al.*. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010,143(3):230-234.
- Yang B, Qu D, Zhang X, *et al.*. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010,141(1-2):63-72.
- Yang B, Xi M, Cui S, *et al.*. Mutations in gyrase and topoisomerase genes associated with fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars from retail meats[J]. Food Research International, 2012,45(2SI):935-939.
- Yang B, Zheng J, Brown E W, *et al.*. Characterisation of antimicrobial resistance-associated integrons and mismatch repair gene mutations in *Salmonella* serotypes[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009,33(2):120-124.

- Yildirim Y, Gonulalan Z, Pamuk S, *et al.*. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses[J]. Food Research International, 2011,44(3):725-728.
- Zewdu E, Cornelius P. Antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* serotypes isolated from food items and personnel in Addis Ababa, Ethiopia[J]. Tropical Animal Health and Production, 2009,41(2):241-249.
- Zhang J, Jin H, Hu J, *et al.*. Serovars and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* from human patients in Shanghai, China, 2006-2010[J]. Epidemiology and Infection, 2014,142(4):826-832.
- Zhang W, Lin X, Xu L, *et al.*. 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).
- Zhao S, White D G, Friedman S L, *et al.*. Antimicrobial Resistance in *Salmonella* enterica Serovar Heidelberg Isolates from Retail Meats, Including Poultry, from 2002 to 2006[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008,74(21):6656-6662.
- Zou W, Tang H, Zhao W, *et al.*. Data mining tools for *Salmonella* characterization: application to gel-based fingerprinting analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2013,1414(S15).

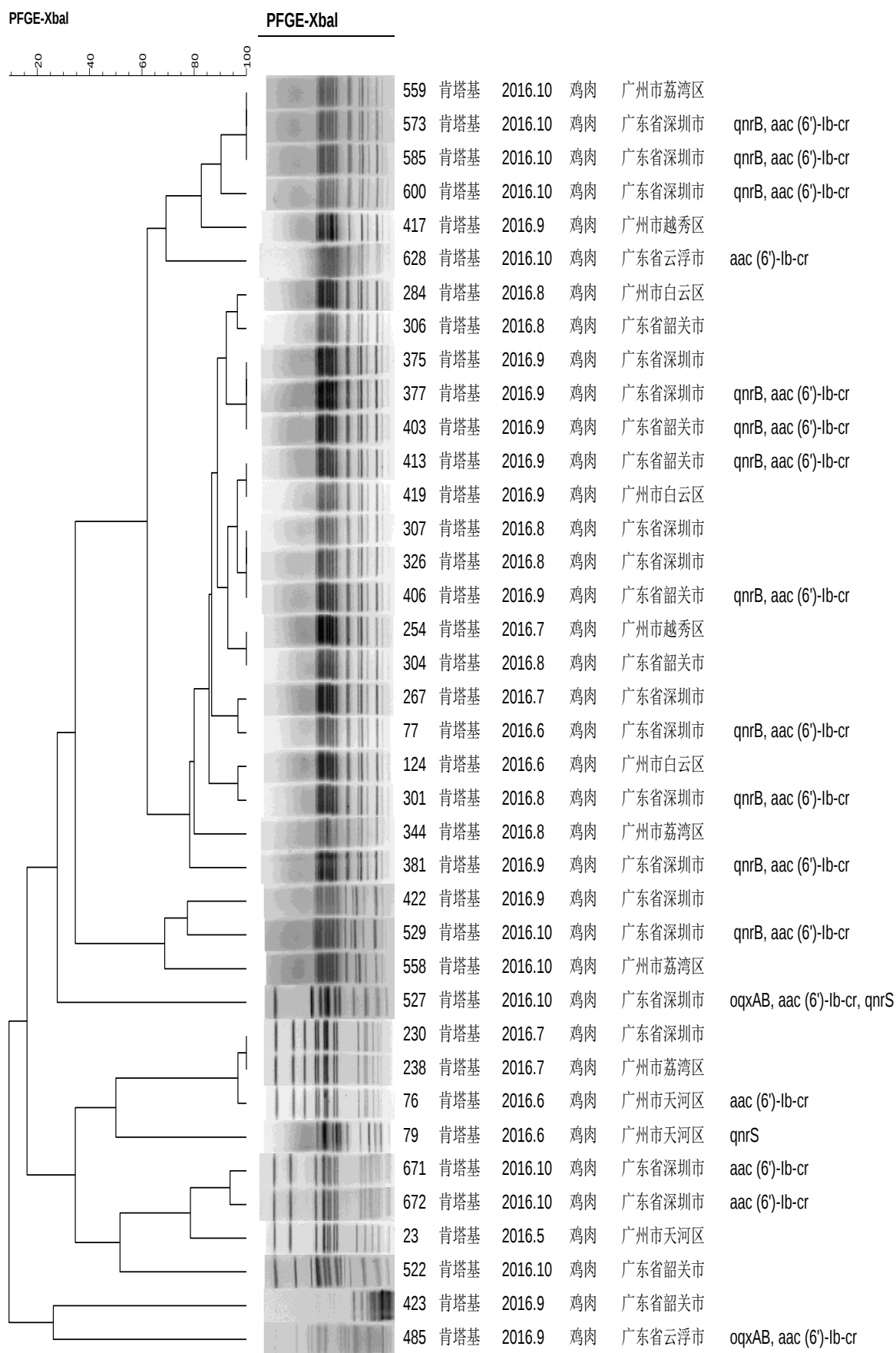
附录



附录A 阿贡纳沙门菌PFGE图谱



附录B 科瓦利斯沙门菌PFGE图谱



附录C 肯塔基沙门菌PFGE图谱

硕士研究生期间所获科研成果及获奖情况

科研成果：

1. **Lina Zhang**, Ying Fu, Zhiying Xiong, Yeben Ma, Yihuan Wei, Xiaoyun Qu, Hongxia Zhang, Jianmin Zhang and Ming Liao. High prevalence and multidrug resistance of *Salmonella* from chicken and pork meat at retail markets in Guangdong, China. *Frontiers in Microbiology*. (Minor Revision)
2. 瞿孝云, 许学斌, 邱荣超, **张丽娜**, 符颖, 张建民, 廖明. 上海市鸭源沙门菌的分离鉴定、血清分型及耐药性分析. *中国兽医杂志*. (已接收)
3. 孙朋浩, 邱荣超, 李书宁, 郑双双, 杨伟聪, **张丽娜**, 符颖, 詹泽强, 张建民, 廖明, 瞿孝云. 广州市生鲜鸡中肠炎沙门菌的监测及耐药基因的分子鉴定. *畜牧兽医学报*. 2018, 49 (2):388-395

获奖情况：

2015年华南农业大学研究生学业二等奖学金

2016年华南农业大学研究生学业二等奖学金

优质肉禽计划食品安全国际学术研讨会“最佳墙报奖”