

## 论著

## 整合子介导的沙门菌耐药性水平播散机制的初步研究

练维<sup>1</sup>, 石翠, 冒群<sup>2</sup>, 孙晓雷<sup>3</sup>, 汪晓莺<sup>3</sup>

(1. 江苏省南通市疾病预防控制中心, 江苏 南通 226001; 2. 江苏省如皋市人民医院, 江苏 如皋 226003; 3. 南通大学医学院, 江苏 南通 226019)

**摘要:**目的 分析南通地区沙门菌的耐药性,初步阐明定位于质粒上的整合子介导的耐药性传播的分子机制。方法 收集2008—2011年南通地区食品中分离的沙门菌67株,采用K-B纸片扩散法进行药敏试验,确定其耐药谱;筛选出多重耐药性菌株,并以大肠杆菌为受体菌进行接合试验。PCR分析受体菌整合子特异序列,并进行分型检测。结果 南通地区检测出的沙门菌中有74.6%的沙门菌株(50/67)对抗生素产生耐药性,其中31.3%(21/67)对超过1种抗生素有耐药性,发展成为多重耐药性沙门菌;沙门菌I类整合子检出率为20.9%(14/67)。结合实验还发现沙门菌I类整合子可以介导耐药性向大肠杆菌的传播。结论 南通地区食品分离的沙门菌I类整合子检出率较高。沙门菌携带的I类整合子是引起耐药性在种间和种内传播的重要因素。

**关键词:**沙门菌; 耐药性; 质粒; 整合子; 传播机制**中图分类号:**R378.2+1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2013)01-0016-04**The study of integron mediated antibiotic resistance transmit of *Salmonella*.**

Lian Wei, Shi Cui, Mao Qun, Sun Xiaolei, Wang Xiaoying

(NanTong Centers for Diseases and Prevention, Jiangsu Nantong 226001, China)

**Abstract: Objective** To investigate antibiotic resistance of *Salmonella* in Nantong and characterization of related molecule mechanism of integron mediated resistance transmit. **Methods** 67 *Salmonella* strains were isolated in Nantong area during 2008 to 2011. The susceptibility to antibiotics was tested by the disk diffusion assay. Conjugational transfer test was carried out using donor (*Salmonella*) and receiver (*Escherichia coli*). The different integron genes carried by donor and receiver were detected by PCR. **Results** 74.6% (50/67) strains was antibiotic resistant, 31.3% (21/67) were multidrug resistant. Class I integrons were identified in 20.9% (14/67) strains of *Salmonella*. The antibiotic resistant genes can transmit from *Salmonella* to *Escherichia coli* mediated by class I. **Conclusion** Multidrug resistance was frequently identified in *Salmonella* in Nantong area. Class I integron was an important factor of antibiotic resistance transmit in *Salmonella* and other bacillus.

**Key words:** *Salmonella*; drug resistance; plasmid; integron; dissemination mechanisms

沙门菌是引起腹泻的重要病原微生物之一,其引起的感染已成为严重的公共卫生问题,而沙门菌耐药性的出现也逐渐引起学者的关注。细菌耐药性来源于自身基因突变和耐药基因的获得,由基因突变引起的细菌耐药性是不可传播的,所以大多数细菌的耐药性都是因为获得外源性耐药基因所引起的。细菌包含了编码抗生素耐药的基因在不同菌种或菌属间水平转移的基因元件,从而导致细菌耐药性的传播<sup>[1]</sup>。

细菌不仅能将自身携带的耐药基因传递给子代细菌,也能将其传递给其他细菌。病原菌抗性的产生主要是通过自身基因的突变积累,或者在水平方向上获取耐药性基因。整合子是水平传播的重要因子,多位于转座子和质粒等可移动基因元件上<sup>[2]</sup>。整合子的传播借助于转化、转导及接合作用来完成,其中接合是最为常见的水平传播方式。

以南通地区食品中分离的沙门菌为材料,分析沙门菌耐药性,并确定沙门菌所携带的质粒,按照质粒上含有的整合子、耐药基因类型对质粒进行分类,确定各类质粒对细菌耐药及其传播的影响大小,了解其传播途径和机制。

**1 材料和方法****1.1 试验菌株**

收稿日期:2012-06-20

基金项目:南通市科技课题多重耐药性沙门菌质粒介导的整合子传播机制初步研究(K2010044)

作者简介:练维 男 硕士 研究方向为微生物免疫

E-mail:romly80@sina.com

通信作者:汪晓莺 女 教授 研究方向为微生物

E-mail:romly80@sina.com

沙门菌株为2008年7月—2011年7月,从6类1302份食品样品中分离的67株。阴性质控菌株大肠埃希菌(ATCC25922)购自北京中国药品生物制品检定所。

## 1.2 仪器与试剂

### 1.2.1 仪器

全自动细菌鉴定药敏分析系统、Biofuge 22R型高速低温离心机(德国HERAEUS公司)、DNA Thermal cycler480型PCR仪(美国Perkin Elmer公司)、DNA测序仪(美国BERKMAN公司)。

### 1.2.2 试剂

①抗生素纸片:头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、泰能、阿米卡星、头孢曲松、头孢噻肟、头孢吡新、头孢西丁、庆大霉素、环苯沙星、左氧氟沙星、氨苄西林和哌拉西林等13种含药纸片由杭州微生物试剂厂生产。②培养基:SS培养基、WS培养基、32E生化反应板、SS培养基中加入200mg/L氨苄青霉素即是SSA培养基、克氏双糖铁培养基、LB培养液(均由江苏博达生物公司提供)。③PCR试剂:所有引物均为上海生物公司合成,PCR试剂盒由宝生物公司提供(TaKaRa公司)。

## 1.3 检测方法

### 1.3.1 分离鉴定

参照《食品卫生微生物学检验》、《临床检验病原生物学》进行沙门菌分离鉴定。标本经增菌培养后,接种WS琼脂平板置37℃培养24h,挑取可疑菌落接种克氏双糖铁培养基置37℃培养24h,挑选符合沙门菌属反应特征的菌落接种32E生化反应板置37℃培养24h,在全自动细菌鉴定药敏分析系统上读取结果。对鉴定为沙门菌的菌株用沙门菌属诊断血清进行确认、分型,按药敏卡使用说明书在上述系统上进行药敏实验。

### 1.3.2 细菌接合实验

以含有耐药质粒的大肠埃希菌为供体菌,以不耐药的病原菌为受体菌。分别将供体菌和受体菌接种在LB培养液中,适温过夜培养,然后各取1ml接种于LB培养液,30℃恒温培养,每隔一段时间取出少量培养液进行10倍系列稀释,取适当稀释度菌液0.1ml分别涂布于含200mg/L氨苄青霉素和不含氨苄青霉素的SS培养基(标本中肠道杆菌的分离培养)平板,37℃恒温培养24h,计算菌落数。能在含200mg/L氨苄青霉素SS平板上生长的即为转入耐药质粒的病原菌。而在不含氨苄青霉素SS平板上生长的是总病原菌。按下列公式计算转化率:转化率=已转入耐药质粒的菌数/总菌数。在含氨苄青霉素SS平板上生长的有两种菌:已转入耐药基

因大肠埃希菌和的沙门菌数。按下列公式计算转化率:转化率=已转入耐药基因的大肠埃希菌数/总大肠埃希菌数。

### 1.3.3 Integron分型检测

所得序列与GenBank中Blast进行同源分析。PCR反应体系为50μl,各组分的浓度分别为:1U Taq DNA聚合酶1μl,2μl模板DNA,500μmol/L dNTP,25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,25μmol/L的引物(表1)4μL。

表1 Integron基因引物信息

引物序列	扩增基因	片段长度	扩增温度
5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3'	Integron 1	1 900 bp	49 °C
5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'			
5'-GACGGCATGCACGATTGTA-3'	Integron 2	1 900 bp	52 °C
5'-GATGCCATCGCAAGTACGAG-3'			
5'-CTTGCTTCTCGGTGGCGAGAG-3'	Integron 3	1 900 bp	52 °C
5'-GCAAACCACAAAAGCGCAACTGG-3'			

## 1.4 数据分析

数据分析采用WHONET 5.3软件,组间比较采用SPSS 13.0软件中的 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 正常人群沙门菌携带情况与食品污染状况

2008—2011年自6类1302份食品中共检出沙门菌67株,检出率为5.15%,生禽畜肉检出率最高,为13.63%,淡水水产品、豆制品未检出(表2)。

表2 南通地区各类食品沙门菌检出结果

样品名称	样品数量(份)	检出数(株)	检出率(%)
生禽畜肉	411	56	13.63
熟肉制品	294	4	1.36
蔬菜	305	6	1.97
海水产品	146	1	0.68
淡水产品	75	0	0.00
豆制品	71	0	0.00
合计	1 302	67	5.15

### 2.2 沙门菌耐药性

67株沙门菌,经纸片扩散增强法检测,74.6%(50/67)的沙门菌株对抗生素产生耐药性,其中31.3%(21/67)对超过1种抗生素有耐药性,为多重耐药性沙门菌。

### 2.3 接合菌株的耐药谱

接合实验中以10株携带质粒的沙门菌作为供体菌,与质控菌株(大肠埃希菌)按一定菌体量(10:1)混合培养24h以完成接合。24h后,经SS培养基鉴别培养后,黑色的菌落为供体菌,红色的菌落即

为受体菌。实验表明,大肠埃希菌转化率为  $4.6 \times 10^{-6} \sim 1.18 \times 10^{-5}$ ;受体菌株除有 SSA 培养基中预加的氨苄青霉素抗性外,还获得了其他的耐药性。经过比较,发现受体菌和对应的供体菌的耐药谱具

有一定的相似性(表 3),表现为受体菌含有部分供体菌的耐药性,但是缺少供体菌的某些耐药性,而且受体菌不具有供体菌没有的抗性。因此可知受体菌获得了沙门菌的部分或全部耐药基因。

表 3 接合实验中受体株与供体菌株的耐药性比较(株)

Table 3 Comparability of antibiotic resistance between donor (*salmonella*) and receiver (*Escherichia coli.*)

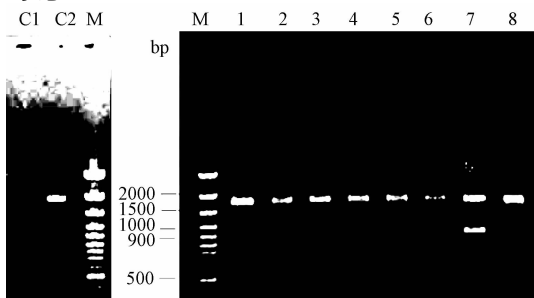
抗生素	比例(相同数/总数)			抗生素	比例(相同数/总数)		
	1	2	3		1	2	3
头孢呋新	8/10	7/10	9/10	氨苄西林	8/10	8/10	7/10
头孢西丁	6/10	5/10	7/10	哌拉西林	7/10	7/10	6/10
庆大霉素	7/10	7/10	6/10	阿米卡星	6/10	6/10	9/10
环苯沙星	8/10	5/10	7/10	头孢曲松	5/10	6/10	5/10
左氧氟沙星	8/10	7/10	7/10	头孢噻肟	6/10	7/10	8/10

注:1、2、3 分别对应 3 次重复实验。

### 2.4 菌株的整合子检测

整合子是耐药基因传播的主要运载工具。根据整合酶的不同,细菌携带的整合子分为 3 类,其中最主要的是 I 型整合子。分别对供体菌和受体菌所携带的整合子进行检测。PCR 扩增结果显示,南通地区的 67 株沙门菌 I 类整合子阳性检出率为 20.9% (14/67),未发现 II、III 型整合子。为进一步探讨细菌耐药性传播的机制,利用菌体 PCR 研究 I 型整合子在接合细菌(7 株)染色体上分布情况。图 1 显示接合细菌的染色体上定位了 I 型整合子的特征片段。设计整合子引物是以 5' 与 3' 端保守区域 (conserved segments, CS) 为匹配位点,然而其扩增产物分布的情况与供体菌中有所不同,除含有与供体菌扩增片段共有一个最大的片段(1.9kb),部分接合菌株染色体上整合子,受体菌染色体上整合子有一些更小的片段(图 1)。推测这些小的片段是供体菌在整合子插入染色体过程中部分耐药基因盒发生了丢失或突变。结果也带来一个问题,较大质粒是否有贡献于耐药性,目前尚不清楚。

### 3 讨论



M: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder; C1: 质控大肠埃希菌 DNA; C2: I 型整合子阳性大肠埃希菌 DNA; 1~7: 受体菌(大肠埃希菌)染色体上整合子; 8: 供体菌(沙门菌)染色体上整合子。

Figure 1 The distribution of integron1 in the receiver strains (*Escherichia coli.*)

### 3.1 南通地区沙门菌耐药性特点

沙门菌是引起腹泻的重要病原体之一,严重危害人类的生存与健康。全球范围内已达成共识:通过在动物生产环节谨慎使用抗生素来抑制致病菌抗生素耐药性的发展<sup>[3]</sup>。大量报道表明<sup>[4]</sup>,各种病原菌都已经产生了不同程度的耐药性,而且它们的耐药谱呈现出多样化和复杂化的趋势。多重耐药菌株的不断出现已成为现代社会所面临的公共健康问题之一<sup>[5-7]</sup>。

White 等<sup>[8]</sup> 报告称 1998 年美国从地摊零售肉中分离到的 45 株沙门菌中,36 (80%)、33 (73%) 和 12 (27%) 株分别对四环素、链霉素和氨苄西林具有耐药性。Poppe 等<sup>[9]</sup> 在加拿大从动物、动物性食品和动物生产的环境中分离到的 1 336 株菌株中,341 (25.5%)、354 (26.5%) 和 212 (15.9%) 株分别对四环素、链霉素和氨比西林具有耐药性。这些抗生素的耐药性在东南亚的发展中国家也有过报道。Van 等<sup>[10]</sup> 报道在越南胡志明市零售生肉中分离到的 91 株沙门菌中,22%、22%、2.2%、2.2%、14.3%、16.5%、8.8%、2.2%、3.3% 分别对氨比西林、阿莫西林、卡那霉素、庆大霉素、链霉素、磺胺异恶唑、尼克酰胺、噻孢霉素、甲氧苄啶具有耐药性。在美国,儿童感染的沙门菌检测出对头孢噻肟耐药,WHO 1998 年从美国地摊零售肉中分离到 45 株沙门菌有 7 株(16%) 对其具有耐药性<sup>[11]</sup>。

本研究的药敏试验选用了 14 种临床上常用的抗生素,对所分离的 67 株沙门菌进行了药敏分析。耐药谱显示:67 株分离株的多重耐药分布于 2~8 耐不等,主要集中在 2、5 和 13 耐,占其中的 60% 左右。这些数据表明,沙门菌多重耐药的情况已经比较严重。沙门菌多重耐药增长的重要因素是耐药基因在细菌内的水平及垂直传播。因此,南通地区有必要加强对抗生素药物的销售管理。

### 3.2 整合子介导的耐药性传播机制

由于整合子本身无法进行转移,因此常常出现在转座子或者接合性质粒上,如 I 类整合子被携带在 Tn21 及 Tn21 类似转座子上,而这些转座子又常常位于质粒上,这种情况提高了耐药基因扩散的能力<sup>[12-13]</sup>。国外的研究资料显示,菌株的耐药性与携带大分子质粒有关<sup>[14-16]</sup>。质粒上的整合子能建立与耐药谱、耐药机理和播散方式三者对应的关系,按整合子的类型标准建立致病菌数据库系统,为解决耐药性传播问题提供了新的思路。本实验显示, I 类整合子阳性检出率为 20.9% (14/67),与国内申进玲等<sup>[17]</sup>报道(16%)比较接近。此外,实验还对结合实验中的沙门菌和受体菌进行了整合子基因的检测,结果发现,整合子可能存在于较大的质粒上,也可能存在受体菌的染色体上。原因可能是由于质粒携带整合子进入受体菌后全部或部分整合于染色体上。

### 3.3 整合子转移中的一些问题

病原菌抗生素抗性的产生主要是通过自身基因的突变积累,或者在水平方向上获取耐药性基因,整合子是水平传播的重要因子,多位于转座子和质粒等可移动基因元件上<sup>[18]</sup>。整合子的传播借助于转化、转导及接合作用来完成,其中接合是最为常见的水平传播方式。本研究显示,大肠埃希菌通过整合子将某些耐药基因水平传播至其他菌。在模拟人体体温(37℃)条件下效率较高,转化率达到  $4.62 \times 10^{-6} \sim 1.18 \times 10^{-5}$ 。受体菌的整合子除了含有与供体菌扩增片段共有一个最大片段(1.9 kb),还有一些较短的整合子片段(<1.9 kb)。这也说明整合的过程并不是简单的基因交流,也会发生整合子自身的变化。

### 参考文献

- [ 1 ] Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes [J]. *Science*, 1994, 264 (5157): 375-382.
- [ 2 ] Hall R M, Collis C M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria; the role of gene cassettes and integrons [J]. *Drug Resist*, 1998, 7(1): 109-115.
- [ 3 ] Chuc N, Tomson G. "Doi moi" and private pharmacies: a case study on dispensing and financial issues in Hanoi. Vietnam [J]. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, 1999, 55: 325-332.
- [ 4 ] Mead P, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States [J]. *Infectious Diseases*, 1999, 5: 607-625.
- [ 5 ] Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, et al. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica typhimurium* DT104 infection in the United States [J]. *The New England Journal of Medicine*, 1998, 338: 1333-1338.
- [ 6 ] Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B. Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales [J]. *Eurosurveillance*, 1997, 2: 81-84.
- [ 7 ] Wegener HC, Bager, F, Aarestrup, FM. Surveillance of antimicrobial resistance in humans, food stuffs and livestock in Denmark [J]. *Euro surveillance*, 1997, 2: 17-19.
- [ 8 ] White DG, Zhao S, Sulddler R, et al. The isolation of antibiotic resistant *Salmonella* from retail ground meats [J]. *New Engl J. Med*, 2001, 345: 1147-1154.
- [ 9 ] Poppe C, Ayroud M, Ollis G, et al. Trends in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animals, foods of animal origin, and the environment of animal production in Canada, 1994 - 1997 [J]. *Microbiology Drug Resist*, 2001, 7: 197-212.
- [ 10 ] Van TT, Moutafis G, Istivan T, et al. Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 6885-6890.
- [ 11 ] Use of quinolones in food animals and potential impact on human health [R]. Report of a WHO Meeting, World Health Organization: Geneva, Switzerland: 1998.
- [ 12 ] Rowe Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super integron gene cassettes [J]. *Mol Microbiology*, 2002, 43: 1657-1669.
- [ 13 ] Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flag ship of the floating genome [J]. *Microbiology Mol Rev*, 1999, 63: 507-522.
- [ 14 ] Tzouveleki L S, Tzelepi E, Tassios P T, et al. CTX-M type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2000, 14 (2): 137-141.
- [ 15 ] Wang H, Kelkar S, Wu W, et al. Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamases: prevalence of CTX-M -3 at a hospital in China [J]. *Antimicrob Agents Chem other*, 2003, 47 (2): 790-796.
- [ 16 ] Hasan Z, Rahman KM, Alam MN, et al. Role of a large plasmid in mediation of multiple drug resistance in *Salmonella typhi* and paratyphi A in Bangladesh [J]. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 1995, 21 (1): 50-55.
- [ 17 ] 申进玲, 杨保伟, 席美丽, 等. 陕西省部分地区零售肉中沙门氏菌和奇异变形杆菌 I 类整合子检测与耐药分析 [J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 130-134.
- [ 18 ] Hall R M, Collis C M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria; the role of gene cassettes and integrons [J]. *Drug Resist*, 1998, 7(1): 109-115.