

- strain of salmonella enterica typhimurium, United States, 1997 - 1998 [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(5):795-801.
- [2] ANGULO F J, BAKER N L, OLSEN S J, et al. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans [J]. Semin Pediatr Infect Dis, 2004, 15 (2):78-85.
- [3] BRIGGS C E, FRATAMICO P M. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* typhimurium DT104 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43:846-849.
- [4] KARIUKI S, REVAYHI, KARIUKI N, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant non-typhoidal salmonella, Kenya, 1994-2003 [J]. J Antimicrob Agen, 2005, 25:38-43.
- [5] WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Antigenic formulas of the Salmonella serovars [M]. 8th ed. Paris Institute Pasteur, 2001.
- [6] FRED F A. Enteric pathogens Bacteria China WHO GSS. Level 3 Course Agenda[R]. Nanjing, 2004-05-10—15.
- [7] 郭云昌, 刘秀梅. 市售鸡肉中沙门菌分离株多重耐药谱测定 [J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2):100-103.
- [8] 陈建辉, 欧剑鸣, 谢一俊, 等. 2006 - 2008 年福建省沙门菌监测菌株血清型及药敏分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(10):2376-2379.
- [9] 王晓泉, 焦新安, 刘晓文, 等. 江苏部分地区食源性和人源沙门菌的多重耐药性研究 [J]. 微生物学报, 2007, 47:221-227.
- [10] 关文英, 申志新, 张淑红, 等. 河北省食品中沙门菌的耐药性研究 [J]. 现代预防医学, 2006, 33 (10):1761-1763.
- [11] 刘渠, 刘衡川, 李灶平, 等. 食品中沙门菌的耐药性研究 [J]. 现代预防医学, 2004, 31:330-332.

论著

沙拉沙星体外诱导鼠伤寒沙门菌耐药实验

任美玲, 焦红, 刘静宇, 易敏英, 许龙岩, 程树军
(广东出入境检验检疫局, 广东 广州 510623)

摘要:目的 为获得体外鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) 对盐酸沙拉沙星 (sarafloxacin hydrochloride) 的活性耐药菌株, 研究诱导其产生耐药的盐酸沙拉沙星最低浓度, 为评价食品中沙拉沙星残留导致的微生物耐药提供依据。方法 设置盐酸沙拉沙星 0.001、0.002 5、0.005、0.025、0.05、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 实验组和空白对照组、NaOH 溶剂对照组, 采用 NCCLS 法测试最小抑菌浓度, 对鼠伤寒沙门菌进行耐药诱导, 耐药判断为 $\geq 8 \times \text{MIC}$ (0.25 $\mu\text{g/ml}$)。对产生耐药的鼠伤寒沙门菌的 *gyrA* 基因片段进行 PCR 扩增, 焦磷酸凝胶测序法鉴定 *gyrA* 基因常见 5 个位点观察突变。结果 盐酸沙拉沙星在 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 水平传到第 10 代时, MIC 增大 32 倍, 抑菌浓度增加到 1 $\mu\text{g/ml}$, 耐药菌增殖停止; 传到第 25 代时, 鼠伤寒沙门菌 *gyrA* 基因 Ser83 位点发生突变, 获得多株稳定、有生物活性的耐药菌株。沙拉沙星浓度 $\geq 0.025 \mu\text{g/ml}$ 时, 细菌不生长; 沙拉沙星浓度 $\leq 0.002 5 \mu\text{g/ml}$ 时细菌生长, 不产生耐药。结论 沙拉沙星浓度为 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 时可体外诱导鼠伤寒沙门菌产生耐药, 经传代后获得具生物活性的耐药菌株。

关键词: 体外诱导; 耐药性; 鼠伤寒沙门菌; 沙拉沙星; 食源性致病菌

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)01-0013-05

The resistance of *Salmonella typhimurium* induced by sarafloxacin *in vitro*

Ren Meiling, Jiao Hong, Liu Jingyu, Yi Mingying, Xu Longyan, Cheng Shujun
(Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective To obtain active *Salmonella typhimurium* strains with resistance to sarafloxacin hydrochloride *in vitro* and investigate the lowest concentration of sarafloxacin that can cause the resistance of *Salmonella typhimurium*, which could provide the basis for the evaluation of microbial resistance caused by sarafloxacin residues in food. **Methods** In inducing the drug resistance of *Salmonella typhimurium*, the concentration of standard hydrochloric acid sarafloxacin in culture media was 0 $\mu\text{g/ml}$ in blank control group and 0.001, 0.002 5, 0.005, 0.025, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ in 6 experimental groups respectively, and also a solvent control group (NaOH) was set. The MIC of induced strains was tested

收稿日期: 2011-08-30

基金项目: 广东省自然科学基金 (10151062301000002)

作者简介: 任美玲 硕士生 研究方向为卫生检验与检疫 现工作单位为中山大学公共卫生学院

通信作者: 焦红 研究员 硕士生导师 研究方向为食品化妆品检验与安全评估 E-mail: jhcq1228@163.com

by NCCLS methods and the bacterial resistance was determined according to $\geq 8 \times \text{MIC}$ ($0.25 \mu\text{g/ml}$). PCR amplification of the quinolone resistance-determining region of *gyrA* in resistant *Salmonella typhimurium* was performed and the amplicons subjected to a pyrosequencing protocol was identified for 5 common mutation sites, Ala67, Gly81, Asp82, Ser83 and Asp 87. **Results** The MIC of the 10th generation of *Salmonella typhimurium* induced by $0.005 \mu\text{g/ml}$ of sarafloxacin hydrochloride was increased 32 times, and the bacteria stopped proliferation while the inhibitory concentration increased to $1 \mu\text{g/ml}$. Several stable, bioactive resistant strains with a mutation in *gyrA* at Ser83 were obtained at the 25 passage. The bacteria could not grow when the concentration of sarafloxacin was $\geq 0.025 \mu\text{g/ml}$; while the bacteria had no resistance but could grow when the concentration was $\leq 0.0025 \mu\text{g/ml}$. **Conclusion** The resistance of *Salmonella typhimurium* could be induced by sarafloxacin at a concentration of $0.005 \mu\text{g/ml}$, and drug-resistant strains with biological activity could be obtained after several passages.

Key words: *in vitro* induction; resistance; *Salmonella typhimurium*; sarafloxacin; foodborne pathogens

动物源性食物中抗生素残留量同微生物耐药之间的剂量效应研究少见报道,耐药菌对人体肠道微生态的直接作用也少见报道。为定量评价食物中沙拉沙星残留导致微生物耐药以及耐药菌对人正常肠道菌群的作用,本研究用体外实验筛选鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)对沙拉沙星产生耐药的最低浓度,为下一步研究耐药菌对体外肠上皮模型的影响,最终为提出沙拉沙星在动物源性食物中残留限量提供科学数据。

1 材料及设备

1.1 菌株

诱导母株鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028),血清型为 O4:Hi。质控株:大肠杆菌(ATCC 25922),试验前菌株复苏后 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3 代。

1.2 培养基及试剂

各类培养基,购自北京陆桥公司;沙门菌属 A-F 多价诊断血清,购自泰国 S&A 公司;AST-GN04 2200 药敏卡和 VITEK 2 GN Test Kit, 购自法国 Biomerieux;DNA 提取试剂、PCR 反应试剂和测序试剂盒,购自瑞典 Qiagen 公司;所有 PCR 引物购自上海生工。

盐酸沙拉沙星标准品,批号 71130,纯度为 95.0%,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH。用 0.1 mol/L NaOH 1 ml 助溶后,再用去离子水配制浓度为 1 mg/ml 的母液, $0.22 \mu\text{m}$ 过滤除菌,低温冰箱避光保存备用。

1.3 仪器

DNA 提取仪,紫外凝胶成像系统,电泳槽,PCR 仪;VITEK-2-COMPACT 30 微生物鉴定系统,PYROMARK ID 定量遗传分析系统,DNP-9272 型电热恒温培养箱,比浊计等。

2 方法

2.1 菌种复苏

将冻存的鼠伤寒沙门菌适量接种于 2 ml MH 肉

汤培养液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 16 ~ 18 h,将菌液接种于血平板, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 16 ~ 18 h。次日挑选单个菌落 1 ~ 2 个接种于 2 ml MH 培养液中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 16 ~ 18 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 药物浓度与分组

2001 年 1 月美国 FDA 撤销新兽药申请公告(21CFR 520.813)规定,在家禽中禁用兽药氟喹诺酮,检测低限为 $0.005 \mu\text{g/ml}$ 。本研究以 $0.005 \mu\text{g/ml}$ 为参考,将盐酸沙拉沙星配制成 0.001 、 0.0025 、 0.005 、 0.025 、 0.05 和 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 6 个浓度组;设空白对照组和 NaOH 溶剂对照组。

2.3 最小抑菌浓度测定

用 WHO 推荐的美国临床实验室标准委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards,NCCLS)的肉汤微量稀释法^[1],大肠杆菌作为质控菌株。按照细菌耐药标准 $\geq 8 \times$ 最小抑菌浓度(MIC)($0.25 \mu\text{g/ml}$)判定为耐药^[2]。

2.3.1 MIC 板制备

在无菌操作下,将沙拉沙星各浓度组采用倍比稀释法使其呈梯度,分别加到无菌的 96 孔聚苯乙烯板中,每孔 $10 \mu\text{l}$,设空白对照, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存备用。

2.3.2 标准菌悬液制备

用直接菌悬液法制备相当于 0.5 麦氏比浊度的标准菌悬液,用 MH 肉汤 1:1 000 稀释为浓度约 $5 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$ 的细菌悬液。向上述 MIC 每孔加 $100 \mu\text{l}$ 细菌悬液,密封后置 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 普通空气孵箱中,孵育 16 ~ 20 h。

2.3.3 结果判定和质量控制

当微量肉汤稀释出现单一跳孔时,记录抑菌的最高浓度。如出现多处跳孔,则需重复试验。MIC 为完全抑菌的药物浓度。空白对照孔细菌应明显生长。每次测定在大肠杆菌质控范围内读数。每个浓度设 1 个平行,实验重复 3 次,以 MIC 频率最高的为终结果。

2.4 体外耐药诱导

2.4.1 实验分组及平板制备

实验组: MH 琼脂培养基加热溶解,冷却到 40 °C 以下凝固前,将沙拉沙星按 $1/2 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 加入,沙拉沙星:MH 琼脂 = 1:9,制成沙拉沙星 MH 琼脂培养基,加入直径 10 mm 一次性无菌培养皿中,待其凝固后倒置备用,现配现用。

空白对照:MH 琼脂培养基加热溶解,冷却到 40 °C 左右注入直径 10 mm 的一次性无菌培养皿中,待其凝固后倒置备用,现配现用。

溶剂对照:用无菌去离子水配制 0.1 mol/L NaOH 溶液,以 NaOH:MH 琼脂 = 1:9 加入直径 10 mm 的一次性无菌培养皿中,待其凝固后倒置备用,现配现用。

2.4.2 第一次诱导

将空白对照组连续培养 3 代(37 °C、24 h),取 5 个直径大于 1 mm 的已复苏鼠伤寒沙门菌菌落于无菌生理盐水中,制成菌悬液,用比浊仪测定浓度为 0.5 麦氏比浊度。

取上述菌悬液 0.1 ml 加入到沙拉沙星 $1/2 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 的 MH 平板中,37 °C 培养 24 h。将有细菌生长的最大浓度沙拉沙星 MH 平板上的细菌按同样方法制成菌悬液,接种到 2 倍该浓度沙拉沙星培养基中培养 24 h。依此类推,逐渐提高 MH 平板中的药物浓度,直至细菌停止生长。

2.4.3 第二次诱导

将一次诱导停止生长的细菌在肉汤培养基中复苏,待肉汤培养基中细菌浓度达到 0.5 麦氏比浊度时,分别取 0.1 ml 移入 $1/2 \times \text{MIC}$ 、 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 沙拉沙星 MH 琼脂平板中,37 °C 培养 72 h,观察生长情况,同时做空白对照和溶剂对照。每个浓度诱导 3 代,经无药空白培养基传代 10 次后测试 MIC。重复上述筛选步骤,直至鼠伤寒沙门菌 MIC 达到 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.5 体外沙拉沙星最低耐药浓度实验

2.5.1 抗菌药物平板的配制

分别配制盐酸沙拉沙星 0.001、0.002 5、0.025、0.005、0.05、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,按 2.4.1 制作抗生素 MH 琼脂平板。每个浓度平板配制 5 份,配好后 4 °C 冰箱保存,1 周内有效。

2.5.2 体外诱导最低耐药浓度试验

取 5 个直径大于 1 mm 已复苏标准鼠伤寒沙门菌制成菌悬液,用比浊仪测定并调整其浊度为 0.5 麦氏单位。

取上述菌悬液 0.1 ml 分别注入含盐酸沙拉沙星 0.001、0.002 5、0.025、0.005、0.05、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的

MH 琼脂平板上,涂布,37 °C 培养 72 h。观察细菌生长,取培养基上生长的细菌用相同浓度沙拉沙星的培养基连续传代 25 代,每代培养 24 h。每传代 5 次用空白 MH 对照平板再连续传代 10 次,以判定细菌是否为非适应性生长。按 2.3 测试 MIC,产生细菌耐药的最低浓度即为体外沙拉沙星最低耐药浓度。

2.6 敏感菌株血清学验证

用 VITEK 2 GN Test Kit 鉴定卡对耐药菌进行生化鉴定;用玻片凝集法进行沙门菌属血清学鉴定,同时设立生理盐水阴性对照。

2.7 耐药基因突变鉴定

选择 *gyrA* 基因作为耐药突变基因的分子标志,用焦磷酸凝胶快速测序法检测 *gyrA* 基因 A67、G81、D82、S83、D87^[3-5] 位点的突变。

2.7.1 *gyrA* 基因片段 PCR 扩增

取 MIC < $8 \times \text{MIC}$ 的未耐药株(编号 1 ~ 11)、MIC $\geq 8 \times \text{MIC}$ 的耐药株(编号 12 ~ 15),同空白对照(编号 16)、敏感株(编号 17),同时按 PSS MagaZorb DNA Common Kit 试剂盒要求提取总 DNA。按鼠伤寒沙门菌 NCTC 74(编号 X78977) *gyrA* 基因序列设计引物。

gyrA (291bp) 扩增引物: *gyrA*pyro-F (5' - TGGGCAATGACTGGAACAAAG-3') 和 P2 (5' - TACCGTCATAGTTAT CCACG-3' (5' 生物素标记)。

PCR 反应体系(50 μl):模板 1 μl ,上下游引物各 1 μl (10 pmol/ μl), 10 \times Ex Taq 缓冲液 5 μl , dNTP 混合液 (2.5 mmol/L) 4 μl , TaKaRa Ex Taq (83.35 nmol/s) 0.25 μl , 灭菌超纯水 37.75 μl 。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,50 个循环;72 °C 延伸 10 min。

2.7.2 焦磷酸凝胶测序与同源性比较

参照文献 [6] 和 [7],选择引物 *gyrA*pyro-F (A67)、*pyroGDS-3* (5' - CGGTAAATACCATCCCCA-3', G81, D82, S83 和 D87),用焦磷酸凝胶测序比较实验生成耐药株及敏感株 *gyrA* 基因常见突变位点的变化。

将标准株 ATCC 14028 *gyrA* 基因片段核苷酸序列与 GenBank NCTC 74(编号 X78977)鼠伤寒沙门菌相应核苷酸 *gyrA* 基因序列进行同源性比较。

3 结果

3.1 体外诱导盐酸沙拉沙星鼠伤寒沙门菌耐药株

大肠杆菌作为质控菌株对照,在最小抑菌浓度为 0.031 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,得到 16 株鼠伤寒沙门菌耐药株,耐药水平分别在 $8 \times \text{MIC}$ (1 株)、 $16 \times \text{MIC}$

(2 株)、32 × MIC(1 株)、64 × MIC(1 株)、128 × MIC(1 株)、256 × MIC(1 株)、2048 × MIC(7 株)、4096 × MIC(2 株)。

3.2 盐酸沙拉沙星体外诱导鼠伤寒沙门菌耐药最低浓度

当沙拉沙星浓度在 0.001 ~ 0.002 5 μg/ml 时,诱导耐药传代 25 代, MIC < 8 × MIC, 细菌未产生耐药。

沙拉沙星浓度在 0.005 μg/ml 传代第 10 代时,耐药产生, MIC 增大 32 倍, 抑菌浓度增殖到 1 μg/ml, 得到 4 株耐药株, MIC 增大至 1 μg/ml 后耐药水平不再提高。当沙拉沙星浓度在 0.025、0.05 和 0.1 μg/ml 时, 细菌不生长。0.005 μg/ml 是盐酸沙拉沙星体外诱导鼠伤寒沙门菌耐药的最低浓度。结果见表 1。

表 1 盐酸沙拉沙星体外诱导鼠伤寒沙门菌耐药的最低浓度实验

Table 1 Testing the lowest concentration of sarafloxacin that could induce the resistance of *Salmonella typhimurium*

诱导代数	盐酸沙拉沙星 (μg/ml)						空白对照	溶剂对照
	0.001	0.002	0.005	0.025	0.05	0.1		
诱导母株	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
5 代	0.03	0.03	0.03	-	-	-	0.03	0.03
10 代	0.03	0.03	1	-	-	-	0.03	0.03
15 代	0.03	0.06	1	-	-	-	0.03	0.03
20 代	0.06	0.06	1	-	-	-	0.06	0.03
25 代	0.06	0.06	1	-	-	-	0.06	0.06

注:-细菌不生长。

3.3 耐药株血清型鉴定

所有实验产生的耐药株血清学鉴定为鼠伤寒沙门菌,与标准株 ATCC 14028 一致,血清分型同为 O4: Hi。

3.4 gyrA 基因突变位点的鉴定

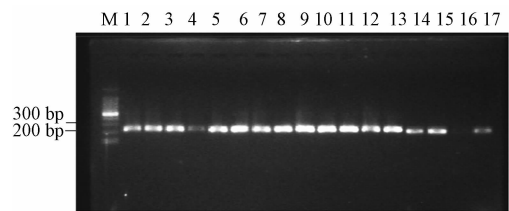
3.4.1 gyrA 基因 PCR 扩增结果

DNA 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳 200 ~ 300 bp 之间出现特异性 gyrA 基因片段,见图 1。

3.4.2 耐药株的焦磷酸凝胶测序及同源性比较结果

标准试验菌株 ATCC 14028 gyrA 基因片段核苷酸序列与 GenBank NCTC 74 (编号 X78977) 鼠伤寒沙门菌核苷酸 gyrA 基因序列的同源性达到 100%。

11 株未耐药株焦磷酸凝胶测序耐药基因未突



M: 标记; 1 ~ 11: 未耐药菌株; 12 ~ 15: 耐药菌; 16: 空白对照; 17: 敏感菌

图 1 gyrA 基因 PCR 结果电泳图

Figure 1 PCR amplification of gyrA gene

变;最低耐药浓度 0.005 μg/ml 获得的 4 株耐药菌,碱基对发生 C248→T 突变,进而导致 gyrA 基因发生 Ser83→Phe (TCC→TTC) 突变。见图 2。

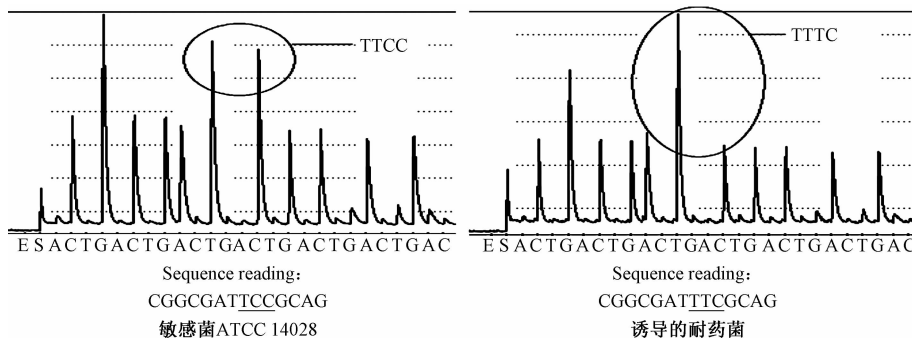


图 2 焦磷酸凝胶测序 gyrA 基因 TCC 突变为 TTC

Figure 2 Pyrosequencing results of gyrA gene: TCC→TTC

4 讨论

2007 年美国多次从中国输美水产品中检出禁用抗菌药氟喹诺酮类(检测限 5 μg/kg),从 2007 年

6 月对我国 4 种水产品实施自动扣留,直接导致我国水产品对美出口全面停止,至今仍未完全解除,严重阻碍我国水产养殖业和出口企业的健康发

展^[8]。沙拉沙星(sarafloxacin)是第一个被美国批准用于食用动物的专用型第三代喹诺酮类药物,因上市后耐药菌株逐渐增多,耐药率逐年上升^[9],已被美国停用。沙门菌是重要的人畜共患致病菌,鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)是其最常见的血清型^[10-11],也是极易在动物源食品中发生耐药的菌株之一。郭云昌和刘秀梅^[12]于2005年对市售鸡肉中分离的51株沙门菌进行耐药检测,其中1株鼠伤寒沙门菌耐15种抗菌药物。

国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)对食源性微生物耐药的风险评估定义为:动植物产品、饲料以及水产品使用抗菌药物,产生的耐药微生物和耐药因子通过食物暴露给人类健康带来危害^[8]。虽然国际国内对耐药微生物耐药机制有大量研究报道,但有关耐药微生物直接通过食物暴露给人体产生危害的安全评价方法,国际上至今尚缺乏成熟的方法和模型。FDA-CVM159和VICH36号指南^[13]推荐了用于研究耐药微生物致病机制和确定危害效应阈剂量的测试系统和方法,方法假设:如果检测到耐药微生物到达结肠时还具有微生物活性,那么可能会有两个有效的毒理学效应终点(no observed adverse effect level, NOAEL),即:菌群屏障紊乱和人体结肠中的耐药菌群数量增加。由于肠道菌群的复杂性,体内实验存在很多不确定因素,该方法在实践与技术上难度很大。McConbille等^[14]在模拟结肠环境离体模型中实验,沙拉沙星给药在0.24和3.7 μg/ml水平得到大肠杆菌依赖性抑制,拟杆菌和双歧杆菌不敏感;Carman^[15]和Woodburn在人体肠道菌群连续流动离体恒化器培养基中实验,环丙沙星给药在0.43 μg/ml水平耐药大肠杆菌依赖性增加,4.3 μg/ml水平使防御性沙门菌入侵能力下降;美国FDA资助AFSSA的项目(2001)使用HFA动物环丙沙星饮水给药在100 μg/ml水平使防御性沙门菌入侵能力下降;100 μg/ml水平使耐药肠球菌和梭菌百分数增加;10~100 μg/ml水平,使耐药脆弱拟杆菌增加^[16]。国内刘健华等^[17]利用离体肠道模型研究了低剂量恩诺沙星对人体肠道细菌数量、菌群结构、定植抗力和耐药性的影响,并采用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)法分析低剂量抗菌药物对肠道菌群多态性影响。

本实验直接采用MIC方法在体外诱导敏感沙门菌对抗菌药物盐酸沙拉沙星耐药,获得的耐药菌株将作为下一步实验中体外模拟肠道菌群的挑战微生物。本实验提示,食源性动物在感染沙门菌后多次低剂量使用抗菌药盐酸沙拉沙星抗感染,可使

食用动物产生稳定的耐药菌株。本实验结果可为动物体内试验验证提供必要的技术参考。

参考文献

- [1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Tentative Standard M100-S19. USA: NCCLS, 2009.
- [2] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 6-22.
- [3] 魏秀丽, 陈杖榴. 沙门氏菌耐药株 gyrA 基因和 parC 基因突变特征分析[J]. 中国兽医杂志, 2006, 9(42): 6-8.
- [4] HANSEN H, HEISIG P. Topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant Salmonellae selected in vitro[J]. Microb Drug Resist, 2003, 9(1): 25-32.
- [5] LING J M, CHAN E W, Lam A W. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant Salmonellae in Hong Kong [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(11): 3567-3573.
- [6] 刘华雷, 吕艳, 郑东霞. 焦磷酸测序技术在禽流感病毒金刚烷胺耐药性检测中的应用[J]. 病毒学报, 2010, 26(5): 392-395.
- [7] HOPKINS K L, ARNOLD C, THRELFALL E J. Rapid detection of gyrA and parC mutations in quinolone-resistant Salmonella enterica using Pyrosequencing technology [J]. Microbiol Methods, 2007, 68(1): 163-171.
- [8] 焦红, 李荀, 陈晓清, 等. 食源性抗菌药耐药微生物风险评估国际研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(24): 3770-3773.
- [9] 罗军, 王渝栋. 喹诺酮类药物的现状及应用[J]. 中华现代内科学杂志, 2005, 2(2): 159-160.
- [10] 中国卫生部编委会. 中国卫生年鉴 2008[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [11] 王云华, 龙丽坤, 蔡先全, 等. 水产品中沙门氏菌的分离与血清学鉴定[J]. 检验检疫科学, 2008, 18(2): 42-44.
- [12] 郭云昌, 刘秀梅. 市售鸡肉中沙门菌分离株多重耐药谱测定[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 100-103.
- [13] FDA/CVM GFI #159/VICH GL-36. Studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food - A general approach to establish a microbiological ADI [EB/OL]. (2005-05) [2011-04]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004537.pdf.
- [14] McCONBILLE M L, DIJKSTRA J W, STAMM J M, et al. Effects of sarafloxacin hydrochloride on human enteric bacteria under simulated human gut conditions [J]. Vet Quarterly, 1995, 17(1): 1-5.
- [15] CARMAN R J, WOODBURN M A. Effects of low levels of ciprofloxacin on a chemostat model of the human colonic microflora[J]. Regul Toxicol Pharm, 2001, 33(3): 276-284.
- [16] FDA. Assessment of the effects of antimicrobial drug residues from food of animal on the human flora [EB/OL]. (2001-12-27) [2011-04]. http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/93d-0398_nad0003_vol1.pdf.
- [17] 刘健华, 陈杖榴, 柳阳伟, 等. 低浓度恩诺沙星在离体肠道模拟系统中对人体肠道菌群的影响[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(7): 38-41.