

论著

鼠伤寒沙门菌对抗生素和消毒剂耐药性研究

何雪萍¹, 许学斌², 刘爱平¹, 何利¹, 杨勇¹, 敖晓琳¹, 周康¹, 陈姝娟¹, 邹立扣³

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336;
3. 四川农业大学资源学院, 四川 成都 611130)

摘要:目的 检测 302 株食品源、动物源和人源鼠伤寒沙门菌(*Salmonella enterica* Typhimurium)对抗生素和消毒剂的耐药表型,测定消毒剂耐药基因型,并分析鼠伤寒沙门菌对抗生素和消毒剂耐药的相关性。方法 纸片扩散法测定鼠伤寒沙门菌对 16 种抗生素的耐药性,微量肉汤稀释法测定 4 种消毒剂的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MICs),聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测消毒剂的耐药基因。结果 鼠伤寒沙门菌分离株中 96.03%(290/302)至少对一种抗生素有耐药性,79.80%(241/302)是多重耐药(multidrug resistant, MDR)菌株。分离株对链霉素的耐药率最高(78.81%, 238/302),其次是磺胺复合物(78.15%, 236/302)、四环素(75.50%, 228/302)、氯霉素(71.85%, 217/302),所有分离株均对头孢吡肟和亚胺培南敏感。食品源鼠伤寒沙门菌对磺胺复合物、四环素、氯霉素、茶啉酸和庆大霉素的耐药率均高于动物源和人源鼠伤寒沙门菌,差异有统计学意义($P<0.05$);动物源鼠伤寒沙门菌对环丙沙星和氧氟沙星的耐药率高于食品源和人源鼠伤寒沙门菌,差异有统计学意义($P<0.05$);人源鼠伤寒沙门菌对头孢噻肟和头孢他啶的耐药率高于食品源和动物源分离株。消毒剂苯扎氯铵、三氯生、三氯异氰尿酸和聚维酮碘对鼠伤寒沙门菌分离株的 MICs 范围分别为 2~64、0.031 25~1、32~1 024 和 256~>1 024 mg/L。食品源与动物源鼠伤寒沙门菌对苯扎氯铵、三氯生和聚维酮碘的耐药率高于人源鼠伤寒沙门菌,差异有统计学意义($P<0.05$)。分离株中消毒剂耐药基因 *qacEΔ1*、*sugE*(*p*)和 *qacE* 检出率分别为 56.95%(172/302)、20.53%(62/302)和 2.65%(8/302),*qacEΔ1* 基因与鼠伤寒沙门菌对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、氯霉素类和喹诺酮类的耐药性显著相关($P<0.01$)。结论 鼠伤寒沙门菌对抗生素耐药普遍,多重耐药率较高,并表现对消毒剂的耐药,鼠伤寒沙门菌对抗生素和消毒剂耐药存在相关性。

关键词:鼠伤寒沙门菌;抗生素;消毒剂;耐药性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)04-0356-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.04.002

Antibiotic and disinfectant resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium

HE Xueping¹, XU Xuebin², LIU Aiping¹, HE Li¹, YANG Yong¹, AO Xiaolin¹,
ZHOU Kang¹, CHEN Shujuan¹, ZOU Likou³

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Sichuan Ya'an 625014, China; 2. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China;
3. College of Resources, Sichuan Agricultural University, Sichuan Chengdu 611130, China)

Abstract: Objective The aims of this study were to investigate the antibiotic resistance, disinfectant resistance and their associations in 302 *Salmonella enterica* Typhimurium (*S. Typhimurium*) isolates from retail meats, food animals and humans. **Methods** Antibiotic susceptibility testing was performed according to the Kirby-Bauer disk diffusion method. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of disinfectants were determined by broth microdilution method, and disinfectant resistance genes were detected by polymerase chain reaction (PCR) amplification. **Results** Antibiotic susceptibility testing demonstrated that 96.03% (290/302) of *S. Typhimurium* isolates were resistant to at least one antibiotic and 79.80% (241/302) were multidrug resistant (MDR). Tested isolates showed the highest resistance to streptomycin (78.81%, 238/302), followed by compound sulphonamides (78.15%, 236/302), tetracycline (75.50%,

收稿日期:2020-04-22

基金项目:国家自然科学基金(31671954,31701518);四川省科技厅应用基础项目(2017JY0118);成都市科技局技术创新重点研发计划(2019-YF05-00823-SN);成都市科技局重大科技应用示范项目(2019-YF09-0050-SN)

作者简介:何雪萍 女 硕士生 研究方向为食品微生物 E-mail: 704438756@qq.com

通信作者:陈姝娟 女 副教授 研究方向为食品安全检测 E-mail: chenshujuan1@163.com

邹立扣 男 教授 研究方向为微生物与食品安全 E-mail: zoulikou@sicau.edu.cn

228/302) and ampicillin (71.85%, 217/302). All isolates were sensitive to cefepime and imipenem. The resistance of *S. Typhimurium* from food to compound sulphonamides, tetracycline, ampicillin, nalidixic acid, and gentamicin were significantly higher than those from human and animal origin ($P<0.05$). The resistance of animal isolates to ciprofloxacin and ofloxacin was significantly higher than that of food and human isolates ($P<0.05$). The resistance of human isolates to cefotaxime and ceftazidime were higher than those of food and animal isolates. The MICs of benzalkonium chloride (BC), triclosan (TCS), trichloroisocyanuric acid (TCCA) and povidone iodine (PVP-I) for *S. Typhimurium* isolates were 2-64, 0.031 25-1, 32-1 024 and 256->1 024 mg/L, respectively. In addition, the frequency of resistance to PVP-I, BC and TCS was observed significantly higher in food and animal isolates than human isolates ($P<0.05$). The *qacEΔ1*, *sugE* (*p*) and *qacE* disinfectant resistance genes were detected in 56.95% (172/302), 20.53% (62/302) and 2.65% (8/302) of all the isolates, respectively. Notably, *qacEΔ1* gene was significantly associated with β -lactam, aminoglycoside, tetracycline, sulfonamide, quinolone and chloramphenicol resistance ($P<0.01$). **Conclusion** It was indicated that antibiotic and disinfectant resistance were common among *S. Typhimurium* isolates and the use of disinfectants or antibiotics may contribute to co-selecting isolates with acquired resistance to other antimicrobials, which could pose significant threats to food safety and public health.

Key words: *Salmonella enterica* Typhimurium; antibiotic; disinfectant; resistance

沙门菌是全球范围内最常见的可引发食源性疾病的病原菌之一,动物源食品中猪肉、鸡肉和鸡蛋等是沙门菌感染人类的主要传播媒介,在已确定的2 700多种血清型中鼠伤寒沙门菌是引起沙门菌病的主要血清型之一^[1]。在中国,零售肉类和动物源分离的沙门菌中,鼠伤寒沙门菌位居血清型分型结果前列,对抗生素的耐药性高于其他血清型,沙门菌的耐药性可通过食物链传播给人类,增加人类健康和食品安全风险^[2-4]。

抗生素在沙门菌病的预防和控制中有着不可替代的作用,由于对抗生素使用的管控不严,无论是发达国家还是发展中国家,沙门菌对抗生素产生耐药性的现象都十分普遍^[5-6]。在美国和新加坡零售肉类中分离的沙门菌,对氨苄西林(ampicillin, AMP)、四环素(tetracycline, TET)和磺胺类抗生素具有较高的耐药性^[7-8]。在我国,已有研究报道^[9-10]食品源和动物源沙门菌对磺胺类、四环素类、喹诺酮类和 β -内酰胺类抗生素普遍存在较高的耐药性。

消毒剂在临床、农业和食品工业中被广泛用于预防和控制微生物污染,日益频繁的使用促使细菌出现对消毒剂的耐药性^[11-12]。前期研究发现^[13-14],鸡蛋生产链中沙门菌对苯扎氯铵、苯扎溴铵和氯化十六烷基吡啶有较高水平的耐药性,并且鼠伤寒沙门菌对季铵盐类消毒剂的抗性较其他血清型而言更强。细菌通过质粒、转座子和整合子等可移动遗传元件以基因水平转移的方式获得外源性耐药基因,从而获得对抗菌药物的耐药性,其中质粒型消毒剂抗性基因家族*qac*最为常见,其编码的外排泵蛋白可排出双胍类消毒剂和季铵盐类消毒剂^[15]。*qacE*基因位于1类整合子3'保守区段,*qacEΔ1*基因是*qacE*的功能缺失形成的衍生物^[16],而*sugE*(*p*)经常存在于多重耐药质粒中,在大肠埃希菌和沙门

菌中已有报道^[17-18]。

沙门菌对消毒剂的耐药性已经引起了人们的广泛关注,尤其是对抗生素和消毒剂的交叉/共同耐药性^[19-21]。目前关于鼠伤寒沙门菌对消毒剂和抗生素耐药性的研究较少,本研究调查了食品源、动物源和人源鼠伤寒沙门菌对16种抗生素和4种消毒剂的耐药性,以及3种消毒剂耐药基因的流行率,分析鼠伤寒沙门菌对抗生素与消毒剂耐药性、以及消毒剂耐药基因之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品和菌株来源

2017年8月—2018年9月在四川地区各大超市和农贸市场随机采集零售肉类共388份,包括零售猪肉193份,零售鸡肉195份,每份大于150 g。采集的样品装入无菌采样袋后放入冰盒,低温运回实验室,48 h内对样品进行处理。

零售肉类中分离的174株食品源鼠伤寒沙门菌、家禽粪便中分离的48株动物源鼠伤寒沙门菌、腹泻患者粪便中分离的40株人源鼠伤寒沙门菌(上海市疾病预防控制中心惠赠,2017—2018年分离于四川)及本实验室同一时期分离出的40株食品源鼠伤寒沙门菌。大肠埃希菌(ATCC 25922)、大肠埃希菌(ATCC 35218)作为药敏试验质控菌株,消毒剂最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MICs)测定使用大肠埃希菌(ATCC 10536)作为质控菌株(本实验室保存)。

1.1.2 主要仪器与试剂

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、凝胶成像分析仪均购自美国Bio-Rad,单通道可调微量移液器、高速离心机、超净工作台、恒温

培养箱、MaxQ6000 气浴摇振培养箱、DKT200-4 恒温金属浴。

琼脂糖、10×*Taq* DNA Reaction Buffer、*ExTaq* DNA 聚合酶、dNTPmix、10TPmixNAA Re 均购自大连宝生物工程有限公司。胰蛋白胨大豆琼脂培养基(tryptic soy agar,TSA)、水解酪蛋白肉汤培养基、水解酪蛋白固体培养基、孔雀绿氯化镁肉汤培养基、三糖铁培养基、赖氨酸铁琼脂培养基、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂培养基均购自广东环凯微生物科技有限公司,丹麦 SSI 肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌快速鉴定试剂盒(*Salmonella* Sero-quick ID Kit,丹麦国家血清研究院)。 β -内酰胺类:头孢吡肟(cefepime, FEP, 30 μ g/片)、头孢噻肟(cefotaxime, CTX, 30 μ g/片)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ, 30 μ g/片)、AMP(10 μ g/片)、阿莫西林/克拉维酸(amoxicillin/clavulanic acid, AMC, 20/10 μ g/片);碳青霉烯类:亚胺培南(imipenem, IPM, 10 μ g/片);氨基糖苷类:庆大霉素(gentamicin, CN, 10 μ g/片)、链霉素(streptomycin, S, 10 μ g/片);四环素类:TET(30 μ g/片);喹诺酮类:萘啶酸(nalidixic acid, NA, 30 μ g/片)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP, 5 μ g/片)、氧氟沙星(ofloxacin, OFX, 5 μ g/片);磺胺类:磺胺复合物(compound sulphonamides, S3, 10 μ g/片)、复方新诺明(paediatric compound sulfamethoxazole tablets, SXT, 1.25/23.75 μ g/片)、甲氧苄啶(trimethoprim, TMP, 5 μ g/片);氯霉素类:氯霉素(chloramphenicol, C, 30 μ g/片)。以上 16 种药敏纸片均购自杭州微生物有限公司。消毒剂包括苯扎氯铵(benzalkonium chloride, BC)、聚维酮碘(povidone iodine, PVP-I)、三氯异氰尿酸(trichloroisocyanuric acid, TCCA)和三氯生(triclosan, TCS)均购自成都贝斯特试剂有限公司。引物由上海生工生物工程股份有限公司进行合成,见表 1。

表 1 消毒剂耐药基因引物^[22]

Table 1 Primer sequences for detection of disinfectant-resistant genes			
引物	基因序列(5'-3')	扩增长度/bp	退火温度/℃
<i>qacEΔI</i>	F:AATCCATCCCTGTCGGTGTT	175	56
	R:CGCAGCGACTTCCACGATGGGGAT		
<i>qacE</i>	F:AAGTAATCGCAACATCCG	258	50
	R:CTACTACACCACTAACTATGAG		
<i>sugE(p)</i>	F:GTCTTACGCCAAGCATTATCACTA	190	57
	R:CAAGGCTCAGCAAACGTGC		

1.2 方法

1.2.1 沙门菌分离及血清型鉴定

参照 DENG 等^[9]的方法进行零售猪肉和鸡肉

中沙门菌的分离与鉴定。采用 PCR 法用 *invA* 基因对疑似菌落进行鉴定^[23],用无菌棉签蘸取 TSA 平板上 3~4 个单菌落放入装有 1 mL 无菌超纯水的离心管中涡旋混匀,100 ℃ 金属浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min(离心半径为 13 cm),上清液作为 PCR 模板备用。PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶进行检测,采用凝胶成像系统拍照,PCR 阳性产物送至上海生工生物工程有限公司进行测序,使用 BLAST 对测序结果进行比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

参照丹麦 SSI 肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌快速鉴定试剂盒说明书,采用玻片凝集确定沙门菌的 O 抗原和 H 抗原类型,得到抗原式后查阅 White-Kauffmann 抗原表,确定沙门菌的血清型。

1.2.2 抗生素药敏试验

采用临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)^[24]推荐的纸片扩散法测定鼠伤寒沙门菌对抗生素的耐药表型,按照 CLSI 标准判读药敏纸片结果并确定耐药表型。

1.2.3 消毒剂 MICs 测定

使用微量肉汤稀释法测定消毒剂对鼠伤寒沙门菌 MICs^[25],以 96 孔板中未观察到细菌可见生长的最低消毒剂浓度作为 MICs。

1.2.4 消毒剂耐药基因检测

利用煮沸法制备细菌 DNA 模板,25 μ L PCR 扩增体系为:10×*Taq* DNA Reaction Buffer 2.5 μ L, 20 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L, dNTPmix (10 mmol/L) 0.5 μ L, *ExTaq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA 模板 2.5 μ L, 无菌超纯水补足至 25 μ L。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 1 min,50~57 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶进行检测,采用凝胶成像系统拍照,观察结果。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 进行卡方检验分析数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 动物源食品中鼠伤寒沙门菌分离率

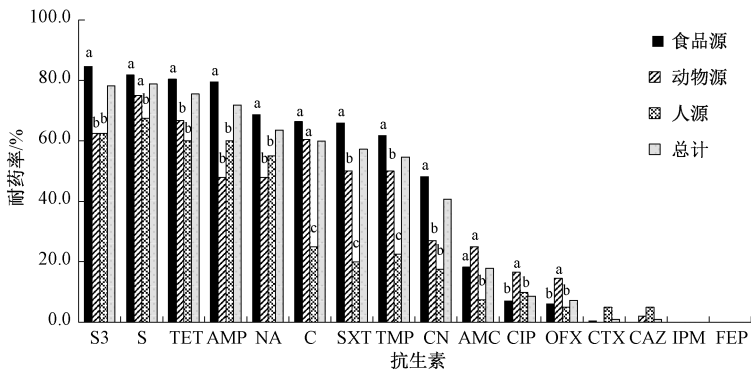
从 388 份零售肉类(猪肉 193 份、鸡肉 195 份)共分离到 157 株沙门菌,其中从猪肉中分离沙门菌 93 株(59.24%, 93/157),鸡肉中分离沙门菌 64 株(40.76%, 64/157)。血清学分型结果显示,在所分离的 157 株沙门菌中,鼠伤寒沙门菌为 40 株,分离

率为 25.48% (40/157), 其中从猪肉中分离到 23 株, 占有鼠伤寒沙门菌菌株的 57.50% (23/40), 从鸡肉中分离到 17 株, 占 42.50% (17/40)。猪肉和鸡肉中沙门菌以及鼠伤寒沙门菌分离率差异无统计学意义($\chi^2=2.62, P>0.05$)。

2.2 鼠伤寒沙门菌对抗生素耐药性

302 株鼠伤寒沙门菌中共有 290 株 (96.03%) 对抗生素有不同程度的耐药性, 其中 241 株 (79.80%) 为多重耐药菌株。鼠伤寒沙门菌对 S、S3、TET、AMP 耐药率较高, 分别为 78.81% (238/302)、78.15% (236/302)、75.50% (228/302)、71.85% (217/302), 所有菌株对 FEP、IPM 敏感 (图 1)。鼠伤寒沙门菌共产生 74 种不同的耐药谱, 位居前三的优势耐药谱分别为: AMP-C-CN-NA-S-

S3-SXT-TET-TMP ($n=35$)、AMP-C-S-S3-SXT-TET-TMP ($n=29$)、AMC-AMP-C-CN-NA-S-S3-SXT-TET-TMP ($n=23$)。不同来源的鼠伤寒沙门菌对抗生素耐药性有所不同, 食品源鼠伤寒沙门菌对 S3 (84.58%, 181/214)、TET (80.37%, 172/214)、AMP (79.44%, 170/214)、NA (68.69%, 147/214) 和 CN (27.10%, 58/214) 的耐药率高于动物源和人源鼠伤寒沙门菌, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 动物源鼠伤寒沙门菌对 CIP (16.67%, 8/48)、OFX (14.58%, 7/48) 的耐药率高于食品源和人源分离株, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 食品源和动物源分离株对 C、SXT、TMP 和 AMC 的耐药率均高于人源鼠伤寒沙门菌 ($P<0.05$)。总体看, 食品源鼠伤寒沙门菌对抗生素耐药性高于动物源和人源分离株。



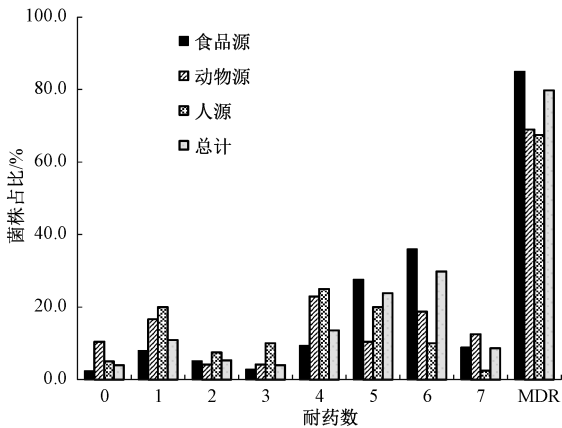
注: 不同字母表示差异有统计学意义, $P<0.05$

图 1 不同来源鼠伤寒沙门菌对抗生素耐药率

Figure 1 Frequency of antibiotic resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium from different sources

由图 2 可知, 不同来源的鼠伤寒沙门菌多重耐药情况各异, 耐药种类最多为七重。食品源鼠伤寒沙门菌多重耐药率达 84.58% (181/214), 主要耐药类型为六重耐药 (35.98%, 77/214) 与五重耐药 (27.57%, 59/214)。动物源鼠伤寒沙门菌多重耐药率为 68.75% (33/48), 主要耐药类型为四重耐药 (22.92%, 11/48) 和六重耐药 (18.75%, 9/48)。人源鼠伤寒沙门菌多重耐药率为 67.50% (27/40), 主要耐药类型为四重耐药 (25.00%, 10/40) 和五重耐药 (20.00%, 8/40)。可见, 食品源鼠伤寒沙门菌的多重耐药率远远高于动物源和人源分离株。不同来源鼠伤寒沙门菌所产生的耐药谱也有所不同, 食品源分离株共产生 60 种耐药谱, 优势耐药谱为: AMP-C-CN-NA-S-S3-SXT-TET-TMP ($n=31$)、AMC-AMP-C-CN-NA-S-S3-SXT-TET-TMP ($n=23$)、AMP-C-S-S3-SXT-TET-TMP ($n=18$)。动物源分离株共产生 20 种耐药谱, 耐药谱以 S ($n=5$)、C-S-S3-SXT-TET ($n=5$)、AMC-AMP-C-CIP-CN-NA-OFX-S-S3-SXT-TET-TMP ($n=5$) 为主。人源分离株共产生 19 种耐药谱, 优势耐药谱为 NA ($n=7$)、AMP-S-S3-

TET ($n=7$)、AMP-NA-S-TET ($n=3$) 和 AMP-NA-S-S3-TET ($n=3$)。



注: MDR: 多重耐药

图 2 鼠伤寒沙门菌耐药种类

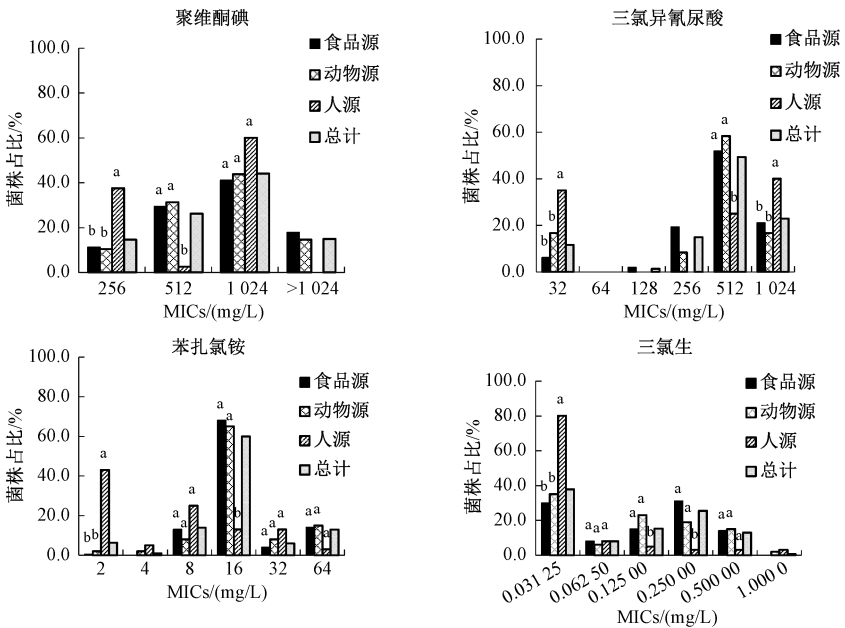
Figure 2 Multi-drug resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from different sources

2.3 鼠伤寒沙门菌对消毒剂耐药表型

聚维酮碘、三氯异氰尿酸、苯扎氯铵和三氯生对鼠伤寒沙门菌的 MICs 范围分别为: 256~>1 024、

32~1 024、2~64、0.031 25~1 mg/L,见图3。聚维酮碘对食品源、动物源和人源鼠伤寒沙门菌的 MICs 在 1 024 mg/L 分布最多(44.04%, 133/302),抑制 50%受试菌生长所需 MIC(MIC_{50})和抑制 90%受试菌生长所需 MIC(MIC_{90})分别为 1 024 和>1 024 mg/L。三氯异氰尿酸对食品源和动物源鼠伤寒沙门菌的 MICs 在 512 mg/L 分布最多(49.34%, 149/302), MIC_{50} 和 MIC_{90} 分别为 512 和 1 024 mg/L。苯扎氯铵对食品源和动物源鼠伤寒沙门菌的 MICs 大多分布在 16 mg/L,占 59.93% (181/302),人源鼠伤寒沙

门菌主要分布在 2 mg/L; MIC_{50} 和 MIC_{90} 分别为 16 和 64 mg/L。三氯生对鼠伤寒沙门菌的 MICs 在 0.031 25 mg/L 分布最多(37.75%, 114/302), MIC_{50} 和 MIC_{90} 分别为 0.125 00 和 0.500 00 mg/L,见表 2。消毒剂对不同来源的鼠伤寒沙门菌的 MIC_{50} 和 MIC_{90} 也有所不同。聚维酮碘、三氯异氰尿酸及苯扎氯铵对食品源与动物源鼠伤寒沙门菌的 MIC_{50} 和 MIC_{90} 相同,而苯扎氯铵和三氯生对人源鼠伤寒沙门菌的 MIC_{50} 和 MIC_{90} 则低于食品源和动物源分离株。



注:不同字母表示差异有统计学意义, $P<0.05$

图3 消毒剂对鼠伤寒沙门菌 MICs 分布情况

Figure 3 Distribution of disinfectant MICs among *Salmonella enterica* Typhimurium

表2 消毒剂对鼠伤寒沙门菌 MIC_{50} 与 MIC_{90} (mg/L)

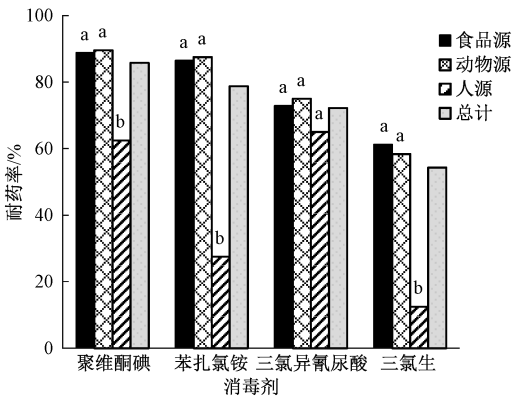
来源	苯扎氯铵		三氯生		三氯异氰尿酸		聚维酮碘	
	MIC_{50}	MIC_{90}	MIC_{50}	MIC_{90}	MIC_{50}	MIC_{90}	MIC_{50}	MIC_{90}
食品源	16	64	0.125 00	0.500 00	512	1 024	1 024	>1 024
动物源	16	64	0.062 50	0.500 00	512	1 024	1 024	>1 024
人源	8	32	0.031 25	0.125 00	512	1 024	1 024	1 024
所有菌株	16	64	0.125 00	0.500 00	512	1 024	1 024	>1 024

参考文献^[9,13,22],将聚维酮碘、三氯异氰尿酸、苯扎氯铵和三氯生对鼠伤寒沙门菌 MICs 大于 256、256、8、0.062 50 mg/L 的菌株定义为耐药菌株,则鼠伤寒沙门菌对其耐药率分别为 85.43% (258/302)、72.19% (218/302)、78.81% (238/302)、54.30% (164/302)。总体看,本研究中聚维酮碘对鼠伤寒沙门菌抑制效果最弱,三氯生抑菌效果最强。不同来源鼠伤寒沙门菌对不同种类的消毒剂表现出不同程度的抗性,食品源与动物源分离株对 4 种消毒剂的耐药率相近,均大于人源分离株对消毒剂的耐药率,尤其是对聚维酮碘、苯扎氯铵和三氯生的耐

药率与人源分离株比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。食品源与动物源鼠伤寒沙门菌对 4 种消毒剂耐药率从高到低为聚维酮碘>苯扎氯铵>三氯异氰尿酸>三氯生,人源鼠伤寒沙门菌对消毒剂耐药率从高到低为三氯异氰尿酸>聚维酮碘>苯扎氯铵>三氯生,见图 4。

2.4 鼠伤寒沙门菌消毒剂耐药基因型

消毒剂耐药基因在分离株中均有检出,其中 *qacEΔ1* 阳性菌株共 172 株,检出率最高(56.95%, 172/302),*sugE* (*p*) 检出率为 20.53% (62/302),而 *qacE* 检出率最低(2.65%, 8/302)。不同来源鼠伤

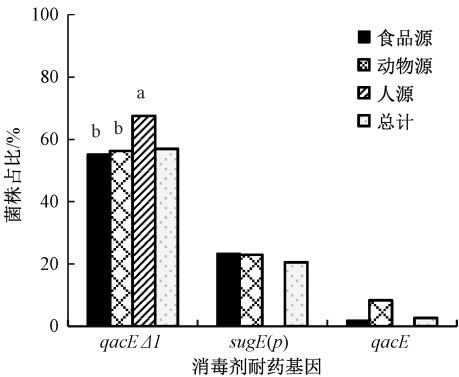


注:不同字母表示差异有统计学意义, $P < 0.05$

图4 鼠伤寒沙门菌对消毒剂耐药率

Figure 4 Frequency of disinfectant resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium

寒沙门菌中消毒剂耐药基因检出情况有所不同,食品源和动物源鼠伤寒沙门菌中 *qacEΔ1* 检出率最高,其次为 *sugE(p)*,检出率最低的耐药基因为 *qacE*。在人源鼠伤寒沙门菌中仅检出 *qacEΔ1*,其检出率高于食品源和动物源分离株,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),未检出 *sugE(p)* 和 *qacE*,见图5。



注:不同字母表示差异有统计学意义, $P < 0.05$

图5 鼠伤寒沙门菌中消毒剂耐药基因流行率

Figure 5 Prevalence of disinfectant-resistant genes of *Salmonella enterica* Typhimurium

2.5 鼠伤寒沙门菌对抗生素和消毒剂耐药相关性
相关性分析结果发现:在苯扎氯铵耐药的菌株中,氨基糖苷类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类和氯霉素类抗性菌株数量高于敏感菌株,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);在三氯异氰尿酸耐药菌株中, β -内酰胺类、喹诺酮类和氯霉素类抗性菌株多于敏感菌株,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

消毒剂耐药基因 *qacEΔ1* 检出率与 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、氯霉素类和喹诺酮类耐药性均显著相关 ($P < 0.01$);在172株 *qacEΔ1* 阳性菌株中有97.67% (168/172)的菌株至少对一种抗生素耐药,87.79% (151/172)为多重耐药菌株。*sugE(p)* 检出率与 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、氯霉素类和喹诺酮类耐药性无显著相关性 ($P > 0.05$),但在62株 *sugE(p)* 阳性菌株中,91.94% (57/62)的菌株至少对一种抗生素耐药,多重耐药率为72.58% (45/62)。因 *qacE* 检出率较低,故未作相关性分析,但发现 *qacE* 阳性菌株均对抗生素耐药,且耐药类型均为七重耐药。

3 讨论

沙门菌血清型众多,可引起人畜共患疾病,而鼠伤寒沙门菌是全球范围内引起人类小肠结肠炎的主要病原菌,其耐药性逐年增强,并可通过食物链传播至人类,对人类健康和食品安全造成威胁^[26]。中国是猪肉和鸡肉消费大国,了解鼠伤寒沙门菌在零售肉类中的污染情况具有重要意义。本研究中鼠伤寒沙门菌分离率与其他研究^[27-28]一致,鼠伤寒沙门菌在畜禽肉类中分离的沙门菌血清学分型结果中位居前列,应引起重视。

本研究中鼠伤寒沙门菌对抗生素耐药性普遍,多重耐药率较高,食品源鼠伤寒沙门菌对S3、TET和AMP显示出比动物源和人源分离株更高的耐药性。首先,食品工业各个环节常使用消毒剂控制微生物污染,而沙门菌长期反复暴露于亚抑制浓度的消毒剂可使外排泵基因(*acrB*)过量表达和细胞膜通透性降低从而增强对抗生素的耐药性^[29]。有研究表明沙门菌在亚抑制浓度的戊二醛和苯扎氯铵混合溶液中暴露12 d后,对TET、C、S3和CN的MICs明显增加 ($P < 0.01$),并产生了对AMP、TET和C的耐药性^[30]。其次,零售肉类中四环素类和磺胺类抗生素残留水平较高,抗生素在畜禽肉中残留可促进沙门菌对抗生素耐药性的传播^[31-32]。动物源鼠伤寒沙门菌分离株对喹诺酮类抗生素(CIP和OFX)的耐药率高于食品源和人源分离株,CIP和OFX常用于治疗动物中由沙门菌引起的疾病;并且动物养殖环境需使用消毒剂控制微生物污染,沙门菌长期暴露于消毒剂可增强对喹诺酮类药物的耐药性^[33]。人源鼠伤寒沙门菌对头孢类抗生素(CTX和CAZ)的耐药率高于食品源和动物源分离株,而第三代头孢菌素是治疗人类沙门菌病的一线抗生素^[34];因此,为应对细菌耐药性挑战,消毒剂和抗生素的规范使用以及新型抗菌药物的研发迫在眉睫。

食品源和动物源鼠伤寒沙门菌对聚维酮碘、苯扎氯铵和三氯生的耐药性高于人源分离株,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。消毒剂广泛应用于食品生产线和畜禽养殖环境消毒,CONDELL等^[35]将沙门菌暴露于亚抑制浓度消毒剂(三氯生、氯己定

和苯扎氯铵)后,发现菌株对 3 种消毒剂耐受性均有不同程度的增加。有研究^[36]报道,持续的消毒剂作用可增加细菌的基因突变率,调节外排泵表达水平,而鼠伤寒沙门菌对苯扎氯铵和三氯生具有相似的耐药机制,即 AcrAB-Tol 外排泵的外排作用,因此,消毒剂的广泛使用可导致食品源和动物源分离株表现出对苯扎氯铵和三氯生的高耐药性。

质粒介导的消毒剂耐药基因 *qacEΔ1* 与 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、氯霉素类和喹诺酮类耐药性显著相关($P<0.01$)。本研究中多重耐药菌株主要表现出对磺胺类、四环素类、 β -内酰胺类抗生素的抗性,*qacEΔ1* 基因可以和其他抗生素耐药基因(如 *sul1*、*sul2*、*dfrA1*、*tetA*、*tetX*、*bla*_{TEM} 等)一起由 I 型整合子进行水平传播,从而使细菌产生对抗生素的多重耐药性^[37-39]。本研究中苯扎氯铵耐药菌株显示出对抗生素更高的耐药性,这与其他研究结果^[40]一致,季铵盐类消毒剂的频繁使用会选择对消毒剂具有抗性的菌株,促进沙门菌抗生素耐药基因传播和进化,还可诱导沙门菌中 AcrAB-Tol 外排泵系统过量表达,增强沙门菌的侵袭力,同时增强细菌对消毒剂和抗生素的耐药性^[41]。

综上所述,鼠伤寒沙门菌对抗生素和消毒剂耐药性十分普遍,尤其是食品源鼠伤寒沙门菌对抗生素和消毒剂的耐药性较高,表明消毒剂或抗生素的使用可筛选耐药菌株,可能有助于细菌对不同抗菌药物的共同耐药,这将对食品安全和公共卫生构成重大威胁。

参考文献

[1] FERRARI R G, ROSARIO D K A, CUNHA-NETO A, et al. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85 (14): e00591-19. DOI: 10.1128/AEM.00591-19.

[2] LI Y, PEI X Y, ZHANG X L, et al. A surveillance of microbiological contamination on raw poultry meat at retail markets in China [J]. Food Control, 2019, 104 (4): 99-104. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.04.037.

[3] SHANG K, WEI B, JANG H K, et al. Phenotypic characteristics and genotypic correlation of antimicrobial resistant (AMR) *Salmonella* isolates from a poultry slaughterhouse and its downstream retail markets [J]. Food Control, 2019, 100 (12): 35-45. DOI:10.1016/j.foodcont.2018.12.046.

[4] ZHU Y T, LAI H M, ZOU L K, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 259 (7): 43-

51. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.023.

[5] WILSON A, FOX E M, FEGAN N, et al. Comparative genomics and phenotypic investigations into antibiotic, heavy metal, and disinfectant susceptibilities of *Salmonella enterica* strains isolated in Australia [J]. Frontier in Microbiology, 2019, 10: 1620. DOI:10.3389/fmicb.2019.01620.

[6] ZHANG B, KU X, YU X, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens in Chinese pig farms from 2013 to 2017 [J]. Scientific Reports, 2019, 9 (1): 9908. DOI:10.1038/s41598-019-45482-8.

[7] ZWE Y H, YEN TANG V C, AUNG K T, et al. Prevalence, sequence types, antibiotic resistance and, *gyrA* mutations of *Salmonella* isolated from retail fresh chicken meat in Singapore [J]. Food Control, 2018, 90 (3): 233-240. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.03.004.

[8] WANG X C, BISWAS S, PAUDYAL N, et al. Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016 [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10:985. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00985.

[9] DENG W W, QUAN Y, YANG S Z, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* from retail foods of animal origin and its association with disinfectant and heavy metal resistance [J]. Microbial Drug Resistance, 2017, 24 (6): 782-791. DOI: 10.1089/mdr.2017.0127.

[10] JIANG Z H, PAUDYAL N, XU Y H, et al. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* recovered from finishing pigs and slaughter facilities in Henan, China [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10:1513. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01513.

[11] CONDELL O, IVERSEN C, COONEY S, et al. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78 (9): 3087-3097. DOI: 10.1128/AEM.07534-11.

[12] MAERTENS H, DE REU K, MEYER E, et al. Exposure of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* broiler isolates to subinhibitory concentrations of a quaternary ammonium compound does not increase antibiotic resistance gene transfer [J]. Poultry Science, 2019, 98 (7): 2972-2976. DOI: 10.3382/ps/pez185.

[13] LONG M, LAI H, DENG W, et al. Disinfectant susceptibility of different *Salmonella* serotypes isolated from chicken and egg production chains [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121 (3): 672-681. DOI: 10.1111/jam.13184.

[14] YANG S, WU G, MEI L, et al. Antibiotic and disinfectant resistance of *Salmonella* isolated from egg production chains [J]. Hereditas, 2016, 38 (10): 948-956. DOI: 10.16288/j.ycz.16-185.

[15] 吴舜,周燕. 细菌对消毒剂的检测方法 with 耐药机制研究进展 [J]. 海南医学, 2018, 29 (8): 1142-1145.

[16] CALL D R, SINGER R S, MENG D, et al. *bla*_{CMY-2}-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids [J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2010, 54 (2): 590-596. DOI: 10.1128/AAC.00055-09.

- [17] NORDMANN P, POIREL L, MAK J K, et al. Multidrug-resistant *Salmonella* strains expressing emerging antibiotic resistance determinants [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 46(20):324-325. DOI: 10.1086/524898.
- [18] ZHAO S, BLICKENSTAFF K, GLENN A, et al. β -lactam resistance in *Salmonella* strains isolated from retail meats in the United States by the national antimicrobial resistance monitoring system between 2002 and 2006 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (24): 7624-7630. DOI: 10.1128/AEM.01158-09.
- [19] KAMPF G. Antibiotic resistance can be enhanced in gram-positive species by some biocidal agents used for disinfection [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2019, 8(1):13. DOI:10.3390/antibiotics8010013.
- [20] HARDY K, SUNNUCKS K, GIL H, et al. Increased usage of antiseptics is associated with reduced susceptibility in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. *MBio*, 2018, 9(3): e00894-18. DOI: 10.1128/mBio.00894-18.
- [21] MURRAY A K, ZHANG L H, SNAPE J, et al. Comparing the selective and co-selective effects of different antimicrobials in bacterial communities [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2019, 53 (6): 767-773. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.03.001.
- [22] ZOU L K, MENG J H, MCDERMOTT P F, et al. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, 69(10): 2644-2649. DOI: 10.1093/jac/dku197.
- [23] CUI S Z, ZHANG J, MENG J H. An improved method for rapid isolation of *Salmonella* against proteus in chicken carcasses [J]. *Journal of Food Safety*, 2006, 26(1):49-61. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2005.00032.x.
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Wayne, PA. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- [25] WU G Y, YANG Q R, LONG M, et al. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility [J]. *Journal of Antibiotics*, 2015, 68(11): 661-665. DOI: 10.1038/ja.2015.51.
- [26] MELLOR K C, PETROVSKA L, THOMSON N R, et al. Antimicrobial resistance diversity suggestive of distinct *Salmonella* Typhimurium sources or selective pressures in food-production animals [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 708. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00708.
- [27] 曹晨阳, 张依, 张倩, 等. 浙江和上海地区生产及零售端鸡肉源沙门氏菌特性研究[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(7): 1161-1169.
- [28] 钟舒红, 冯世文, 李军, 等. 广西畜禽产品中沙门氏菌血清型、耐药性及耐药基因调查[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(3): 770-780.
- [29] MÁRQUEZ M L F, BURGOS M J G, PULIDO R P, et al. Biocide tolerance and antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from hen eggshells [J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2016, 14(2): 89-95. DOI: 10.1089/fpd.2016.2182.
- [30] TRUNG N T, THUY C T, TRUNG N V, et al. Induction of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and non-typhoidal *Salmonella* strains after adaptation to disinfectant commonly used on farms in vietnam [J]. *Antibiotics*, 2015, 4(4): 480-494. DOI: 10.3390/antibiotics4040480.
- [31] WANG H X, REN L S, YU X, et al. Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment [J]. *Food Control*, 2017, 80(4): 217-225. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.04.034.
- [32] REIS A C, KOLVENBACH B A, NUNES O C, et al. Biodegradation of antibiotics: the new resistance determinants-part II [J]. *New Biotechnol*, 2020, 54:13-27. DOI: 10.1016/j.nbt.2019.08.003.
- [33] RANDALL P, COOLES S W, COLDHAM N G, et al. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60(6): 1273-1280.
- [34] GUERRANT R L, VAN GILDER T, STEINER T S, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 32(3):331-351.
- [35] CONDELL O, IVERSEN C, COONEY S, et al. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3087-3097. DOI: 10.1128/AEM.07534-11.
- [36] ROEDEL A, DIECKMANN R, BRENEBACH H, et al. Biocide-tolerant *Listeria monocytogenes* isolates from German food production plants do not show cross-resistance to clinically relevant antibiotics [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85 (20): e01253-19. DOI: 10.1128/AEM.01253-19.
- [37] CHUANCHUEN R, PATHANASOPHON P, KHEMTONG S, et al. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2008, 70(6): 595-601. DOI: 10.1292/jvms.70.595.
- [38] CANAL N, MENEGHETTI K L, DE ALMEIDA C P, et al. Characterization of the variable region in the class I integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(2): 337-344. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.01.015.
- [39] HAN Y, ZHOU Z C, ZHU L, et al. The impact and mechanism of quaternary ammonium compounds on the transmission of antibiotic resistance genes [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, 26(27): 28352-28360. DOI: 10.1007/s11356-019-05673-2.
- [40] YU T, JIANG X B, ZHANG Y G, et al. Effect of benzalkonium chloride adaptation on sensitivity to antimicrobial agents and tolerance to environmental stresses in *Listeria monocytogenes* [J]. *Frontier in Microbiology*, 2018, 9:2906. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02906.
- [41] KAMPF G. Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in gram-negative species [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2018, 7(4):110. DOI: 10.3390/antibiot-ics7040110.