

市售鸡肉中沙门菌分离株多重耐药谱测定

郭云昌 刘秀梅

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:为了解我国市售鸡肉中沙门菌多重耐药状况及耐药程度,对国家食源性疾病监测网从市售鸡肉中分离到的 51 株沙门菌进行耐药检测,并对多重耐药谱进行分析。利用 NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standard) 推荐的纸片法进行耐药检测,51 株分离菌株全部对至少 3 种以上的抗生素耐药,属多重耐药株,耐 5 种抗生素的 9 株 (17.6%),耐 6~9 种抗生素的 12 株 (23.5%),耐 10 种以上抗生素的 9 株 (17.6%)。51 株沙门菌对万古霉素、红霉素、苯唑西林都具有耐药性 (100%),对其它抗生素的耐药情况是:萘啶酮酸 (52.9%)、磺胺 (35.3%)、链霉素 (33.3%)、四环素 (29.4%)、氨苄青霉素 (23.5%)、羧苄西林 (21.6%)、阿莫西林 (19.6%)、吡拉西林 (19.6%)、美唑西林 (17.6%)、强力霉素 (17.6%)、氯霉素 (13.7%) 和头孢噻吩 (9.8%)。有 3 株菌对庆大霉素耐药,有 2 株菌对丁胺卡那霉素和甲氧苄胺嘧啶耐药,有 1 株菌对复方新诺明耐药。分离出 1 株耐 15 种抗生素的鼠伤寒沙门菌,其耐药谱与超级耐药鼠伤寒沙门菌 DT104 的耐药谱类似。从 8 省市市售鸡肉中分离的 51 株沙门菌均为多重耐药株,提示我国畜牧养殖业在使用抗生素方面存在严重问题,应加强对饲料添加剂使用的安全性管理,合理使用抗生素。

关键词:沙门氏菌属;鸡;抗生素类;抗药性;微生物

Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from retail chicken in China

GUO Yun-chang, LIU Xiur-mei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: To determine the antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolates from retail chicken and evaluate the spectrum of their multiple-antimicrobial-resistance, fifty-one strains of identified *Salmonella* isolates were analyzed for minimal inhibitory concentrations (MICs) with 30 kinds of antibiotics using the disk diffusion method. All of the strains were resistant to at least three antibiotics. Eight strains (15.7%) were resistant to three kinds, thirteen strains (25.5%) to four, nine strains (17.6%) to five, twelve strains (23.5%) to six to nine and nine strains (17.6%) to ten antimicrobial agents. All of the 51 strains were resistant to vancomycin, erythromycin and mezlocillin. Resistance to the following antibiotics was common among isolates: nalidixic acid (52.9%), sulfonamides (35.9%), streptomycin (33.3%), tetracycline (29.4%), ampicillin (23.5%), carbenicillin (21.6%), amoxicillin (19.6%), piperacillin (19.6%), mezlocillin (17.6%), doxycycline (17.6%) and chloramphenicol (13.7%). It is important that one isolate of *Salmonella typhimurium* isolated from the retail chicken in Fujian province was resistant to fifteen antimicrobial agents, which exhibiting the antimicrobial resistance profile similar to that of *Salmonella typhimurium* DT104. These data indicate that the fifty-one *Salmonella* isolates recovered from retail raw chicken are commonly resistant to multiple antibiotics.

Key Words: *Salmonella*; Chickens; Antibiotics; Drug Resistance, Microbial

抗生素用于治疗动物疾病始于 20 世纪 40 年代

中期。50 年代早期,国外开始将抗生素用于牛、猪和鸡的商品饲料中。我国自 70 年代中期逐渐开始

基金项目:国家科技部社会公益项目(2002DIA30016)

作者简介:郭云昌 男 博士

通讯作者:刘秀梅 女 首席科学家

This work was supported by the Special Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2002DIA30016)

使用饲用抗生素。近 10 年来随着广谱高效抗菌药物,尤其是第三代头孢菌素的广泛使用或滥用,引起感染的菌群变迁,出现大量的新型耐药菌株,同时也导致细菌耐药性变异而形成多重耐药。近几年,随着鼠伤寒沙门菌超级耐药株 DT104 的出现,细菌的耐药性已越来越受到各国政府和科学家的关注,沙门菌的多重耐药给临床治疗带来了很大困难,使治疗成本大大增加,也为新抗生素的研制带来巨大压力。

本研究用 NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standard) 推荐的纸片扩散法对国家食源性疾病监测网分离的 51 株沙门菌进行药敏检测,并对多重耐药谱进行分析。

1 材料与方

1.1 材料

温箱(36 ±1)℃、天平、高压灭菌器。HE 琼脂购自北京陆桥技术有限责任公司。营养琼脂 购自北京陆桥技术有限责任公司。耐药纸片(OXOID) 购自广州白云同和海特科技经营服务部。

质控菌株 大肠埃希菌(ATCC 25922);实验菌株 国家食源性疾病监测网分离的 51 株沙门菌,分离于来自江苏、北京、内蒙、河南、浙江、福建、山东和广西的市售鸡肉。

1.2 方法

按照耐药纸片操作说明进行药敏检测。共使用 30 种抗生素,中英文名称及浓度见表 1。

表 1 纸片扩散法所用抗生素中英文名称及浓度

中文名称	英文名称	浓度 (µg/ml)
1 丁胺卡那霉素	Amikacin (AMI)	15
2 氨苄西林	Ampicillin (AMP)	30
3 阿莫西林	Amoxicillin (AMX)	10
4 阿莫西林 + 棒酸	Amoxicillin/clavulanic acid (AMC)	10
5 羧苄西林	Carbenicillin (CAR)	30
6 头孢唑肟	Ceftizoxime (ZOX)	100
7 头孢曲松	Ceftriaxone (CRO)	30
8 头孢噻吩	Cephalothin (CEP)	30
9 氯霉素	Chloramphenicol (CHL)	30
10 头孢氨噻肟	Cefotaxime (CTX)	30
11 头孢西丁	Cefoxitin (FOX)	30
12 头孢噻甲羧肟	Ceftazidime (CAZ)	30
13 强力霉素	Doxycycline (DOX)	30
14 红霉素	Erythromycin (ERY)	15
15 四环素	Tetracycline (TCY)	30
16 庆大霉素	Gentamicin (GEN)	10
17 卡那霉素	Kanamycin (KAN)	30
18 亚胺培南	Imipenem (IPM)	10
19 氧氟沙星	Ofloxacin (OFX)	5
20 链霉素	Streptomycin (STR)	100
21 奈替米星	Netilmicin (NET)	30
22 诺氟沙星	Norfloxacin (NOR)	10
23 吡拉西林	Piperacillin (PIP)	100
24 茶唑西林	Oxacillin (OXA)	1
25 萘啶酮酸	Nalidixic acid (NAL)	30
26 复方新诺明	Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)	25
27 磺胺	Sulfonamides (SUL)	300
28 甲氧苄氨嘧啶	Trimethoprim (TMP)	5
29 美唑西林	Mezlocillin (Mez)	75
30 万古霉素	Vancomycin (VAN)	30

1.3 结果判定

参照 NCCLS 药敏标准进行结果判定,分为敏感(susceptible)、中介度(Intermediate susceptible)和耐药(resistant)3种。

2 结果

药敏检测结果显示,51 株沙门菌对至少 3 种以上的抗生素耐药,其中耐 3 种抗生素的 8 株(15.7%),耐 4 种抗生素的 13 株(25.5%),耐 5 种抗生素的 9 株(17.6%),耐 6~9 种抗生素的 12 株(23.5%),耐 10 种以上抗生素的 9 株(17.6%)。耐药谱分布见表 2。

表 2 市售鸡肉中分离的 51 株沙门菌多重耐药测定结果

抗菌素	耐药菌株数
ERY-OXA-VAN	8
ERY-OXA-VAN-NAL	9
ERY-OXA-VAN-SUL	2
ERY-OXA-VAN-CAR	1
ERY-OXA-VAN-STR	1
ERY-OXA-VAN-CEP-SUL	1
ERY-OXA-VAN-DOX-TCY	2
ERY-OXA-VAN-NAL-TCY	2
ERY-OXA-VAN-NAL-AMI	2
ERY-OXA-VAN-NAL-STR	1
ERY-OXA-VAN-NAL-SUL	1
ERY-OXA-VAN-NAL-STR-TCY	2
ERY-OXA-VAN-DOX-SUL-SXT	1
ERY-OXA-VAN-STR-TCY-NAL-DOX	2
ERY-OXA-VAN-STR-TCY-NAL-SUL	1
ERY-OXA-VAN-STR-TCY-SUL-DOX	1
ERY-OXA-VAN-STR-TCY-SUL-DOX-GEN	1
ERY-OXA-VAN-STR-TCY-DOX-NAL-SUL	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-PIP-MEZ	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-CEP-PIP-MEZ	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-GEN-PIP-NAL	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CEP-CHL-PIP-SUL-MEZ	1
ERY-OXA-VAN-AMP-CAR-CHL-STR-PIP-NAL-SUL-MEZ	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-STR-PIP-NAL-SUL-MEZ	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-CHL-STR-NAL-SUL-MEZ-CEP	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-CHL-STR-NAL-SUL-MEZ-PIP	2
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-CEP-TCY-STR-PIP-NAL-SUL-MEZ	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-CHL-DOX-TCY-PIP-NAL-SUL-TMP-MEZ	1
ERY-OXA-VAN-AMP-AMX-CAR-CHL-TCY-STR-PIP-NAL-SUL-TMP-MEZ-GEN	1

对多重耐药鼠伤寒沙门菌分离株 MARS001 与超级耐药鼠伤寒沙门菌 DT104 的耐药谱进行比较,发现两者十分相似。鼠伤寒沙门菌 DT104 耐受的 6 种抗生素中,有 5 种同样为分离株 MARS001 所耐受。本研究未测定壮观霉素(spectinomycin),见表 3。

表3 多重耐药鼠伤寒沙门菌株 MARS001 与 DT104 耐药谱比较

菌株	耐药	中介度
DT104	氨苄青霉素、氯霉素、磺胺、链霉素、四环素、壮观霉素	头孢噻吩、环丙沙星
MARS001	氨苄青霉素、氯霉素、磺胺、链霉素、四环素、庆大霉素、萘啶酮酸、万古霉素、红霉素、甲氧苄氨嘧啶、阿莫西林、羧苄西林、吡拉西林、美洛西林、苯唑西林	头孢噻吩、阿莫西林 + 棒酸

本次药敏实验根据 NCCLS 药敏指南共选择了 10 余类 30 种抗生素,结果显示,51 株沙门菌对万古霉素、红霉素、苯唑西林都具有耐药性(100%),对其它抗生素的耐药情况:萘啶酮酸(52.9%)、磺胺(35.3%)、链霉素(33.3%)、四环素(29.4%)、氨苄青霉素(23.5%)、羧苄西林(21.6%)、阿莫西林(19.6%)、吡拉西林(19.6%)、美唑西林(17.6%)、强力霉素(17.6%)、氯霉素(13.7%)、头孢噻吩(9.8%),有 3 株菌对庆大霉素耐药,有 2 株菌分别对丁胺卡那霉素和甲氧苄氨嘧啶耐药,有 1 株菌对复方新诺明耐药。另外,处于中介度的抗生素主要有链霉素(54.9%)、庆大霉素(31.4%)、吡拉西林(25.5%)、美唑西林(21.6%)、头孢噻吩(21.6%)、卡那霉素(18.8%)、羧苄西林(17.6%)和强力霉素(13.7%),结果见表 4。

3 讨论

本研究对国家食源性疾病监测网市售鸡肉中分离的 51 株沙门菌进行了耐药检测 and 多重耐药谱的分析。所有受试菌株对万古霉素、红霉素和苯唑西林等 3 种抗生素均具有耐药性。同时,发现 1 株对 8 类 15 种抗生素耐药的三重耐药鼠伤寒沙门菌 MARS001,其耐药谱与国际暴发流行的超级耐药鼠伤寒沙门菌 DT104 非常相似(表 3)^[1]。国外文献报道 DT104 对头孢类和环丙沙星的耐药水平呈上升趋势,而我们发现 MARS001 已经对环丙沙星和萘啶酮酸耐药,对头孢噻吩和阿莫西林 + 棒酸也达到中介度水平,其耐药谱已超过 DT104,并有继续扩大的趋势。因此,对该菌株进行深入的实验研究,开展密切的主动和流行监测刻不容缓。

本次研究结果发现,沙门菌对同属 β-内酰胺类抗生素的青霉素类和头孢类药物的耐药性存在较大的差异,所有菌株都对至少一种青霉素类药物耐药。刘衡川等 1996 年对从食物中毒中分离的 50 株沙门菌的耐药谱的分析发现,所有菌株对青霉素 100% 耐药^[2]。青霉素类药物是最早用于牛、猪和鸡的商品饲料中的抗生素,具有良好的抑菌性,且价格

表4 51 株菌中耐药沙门菌株的耐药谱分布及耐药程度

抗生素	耐药		中介度	
	菌株数	%	菌株数	%
AMP	12	23.53	1	1.96
MEZ	9	17.65	11	21.57
OXA	51	100.00	0	0.00
AMX	10	19.61	1	1.96
CAR	11	21.57	9	17.65
PIP	10	19.61	13	25.49
AMC	0	0.00	0	0.00
AMI	2	3.92	4	7.84
GEN	3	5.88	16	31.37
KAN	0	0.00	9	18.75
STR	17	33.33	28	54.9
NET	0	0.00	1	1.96
DOX	9	17.65	7	13.72
TCY	15	29.41	1	1.96
CEP	5	9.80	11	21.57
CTX	0	0.00	1	1.96
CRO	0	0.00	1	1.96
CAZ	0	0.00	1	1.96
ZOX	0	0.00	0	0.00
FOX	0	0.00	1	1.96
SXT	1	1.96	0	0.00
SUL	18	35.29	6	11.76
TMP	2	3.92	0	0.00
NAL	27	52.94	5	9.80
NOR	0	0.00	0	0.00
OFX	0	0.00	0	0.00
IPM	0	0.00	0	0.00
ERY	51	100.00	0	0.00
VAN	51	100.00	0	0.00
CHL	7	13.72	2	3.92

便宜,是我国畜牧养殖业中应用最广泛的抗生素之一。抗菌药物的选择压力是细菌产生耐药性的主要原因,同时细菌在耐受一种药物的同时,往往交叉耐受同类抗菌药物。头孢类药物是目前治疗沙门菌等感染的主要药物,目前已有三代产品问世,由于价格因素,我国还没有广泛应用于养殖业,还没有高耐药株出现,这与本次药敏实验结果基本一致。但对第一代头孢类药物,头孢噻吩的耐药应引起关注,虽然只有 5 株耐药,但处于中介度的却有 11 株(21.6%),若对其使用不加控制,会导致类似青霉素一样的严重后果。

喹诺酮、氟喹诺酮类药物和头孢类药物是目前临床治疗沙门菌病的一线药物,在我国使用最广泛的是喹诺酮类药物萘啶酮酸。我国早在 20 世纪 80 年代就批准萘啶酮酸作为兽药,广泛应用于畜牧养殖业,而美国 1995 年才批准应用于畜牧业。本次药敏实验在 51 株耐药沙门菌中有 27 株(52.9%)对其耐药,1999 年~2000 年从我国禽畜肉中分离到的 44 株沙门菌对其耐药的菌株为 14 株(31.8%),而美国 1999 年~2000 年 89 株禽畜肉沙门菌分离株没有一株对其耐药^[3]。

BN 大鼠食物过敏动物模型的实验研究

吕相征 刘秀梅 杨晓光

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:为了解挪威棕色大鼠(BN)作为食物过敏动物模型的可行性。将24只BN大鼠随机分为灭菌水组(对照组)、卵清蛋白组(Ovalbumin, OVA)、马铃薯酸性磷酸酶组(Potato acid phosphatase, PAP)、鸡蛋清粗提蛋白质组(hen's egg-white protein, HEWP),每组6只。对各组大鼠灌胃,1ml/只, OVA、PAP组蛋白质浓度为1mg/ml, HEWP组蛋白质浓度为10.0mg/ml,每天1次,共6周。检测血清中特异IgE抗体滴度,同时进行皮肤过敏反应试验(PCA)。在第28、42天, OVA、HEWP组BN大鼠32倍稀释血清中特异IgE抗体均较对照组升高,并有统计学差异,第14、28、42天的PAP组及第14天的OVA、HEWP组BN大鼠32倍稀释血清中特异IgE抗体较对照组相比无统计学差异。BN大鼠对常见致敏食物蛋白质OVA和HEWP产生过敏反应,对无致敏史食物蛋白质PAP无过敏反应。BN大鼠模型可能是较为理想的食物过敏动物模型。

关键词:食物过敏;疾病模型;动物;大鼠;近交BN

暴露剂量和暴露时间是影响耐药产生的重要因素,我国虽然自70年代中期才逐渐开始在饲料中添加抗生素,晚于西方国家的50年代早期。但由于长期缺乏科学性指导和相应法律法规的约束,造成抗生素的滥用,它所带来的危害开始显现出来,不仅导致多重耐药株的出现,畜牧养殖业成本增加,而且高水平的抗生素残留,影响了我国动物性食品的出口,造成巨大的经济损失。

氟喹诺酮类药物是喹诺酮的换代产品,主要包括环丙沙星、诺氟沙星和氧氟沙星(氟哌酸)。本次药敏实验使用的是诺氟沙星和氧氟沙星,所有菌株均对它们敏感。但有研究表明沙门菌对环丙沙星的耐药性呈上升趋势^[2]。同时动物耐药菌株会通过交叉感染,影响到人类治疗用药物的耐药性。

本次研究中几乎发现了对我国畜牧养殖业常用抗生素产生耐药的所有菌株,如青霉素、萘啶酮酸、红霉素、四环素、链霉素、磺胺等。特别是耐10种以上抗生素的多重耐药株,每株耐5类以上的抗生素,都是最常用的抗生素。由此可见,我国畜牧养殖业抗生素的滥用,以及由此导致的多重耐药问题已经

到了非常严重的地步,应引起政府相关部门的重视,加强对饲料抗生素类添加剂使用的安全性管理,指导养殖户合理使用抗生素。幸运的是,本研究分析的51株沙门菌对一些抗生素的换代产品,如氟喹诺酮药物和头孢类的三代产品(头孢曲松、头孢他啶、头孢西丁等)均敏感。

参考文献

- [1] Cloeckaert A, Boumedine KS, Flaujac G, et al. Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT014-like antibiotic resistance gene cluster including the floR gene in *S. enterica* serovar agona [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44:1359-1361.
- [2] 刘衡川,叶梅君,余倩,等.沙门氏菌食物中毒菌株的质粒及耐药谱分析[J]. *现代预防医学*, 1996, 23(2):81-83.
- [3] Sheng Chen, Shaohua Zhao, David G White, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *salmonella* serovars isolates from retail meats [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1):1-7.

[收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;R378.22;TS251.55 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)02-0100-04

基金项目:国家高技术研究发展计划“863”(2001AA212291);国家重点基础研究发展规划“973”(2001CB109007)

作者简介:吕相征 男 博士生

通讯作者:刘秀梅 女 首席科学家

This work was supported by National High-Tech Research Program of China (2001AA212291) and National Basic Research Program of China. (2001CB109007)