

学校代码：10564

学 号：2014307328

分 类 号：S855.1

密 级：



華南農業大學

# 硕 士 学 位 论 文

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

任行星

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

领 域：

答辩委员会主席： 王贵平 教授

中国·广州

2016 年 6 月

# 华南农业大学

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提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

沙门菌是一种重要的人兽共患病原菌，目前，全球已鉴定出 2500 多种血清型，其中许多血清型对人、家畜和家禽等多种动物均有致病性，不仅给养殖业造成很大的危害，而且具有很重要的公共卫生意义。动物源沙门菌能够在不同动物和动物性食品中广泛存在，是人和动物感染的重要来源，所以开展动物源沙门菌流行病学研究具有重要意义。广东省是畜禽产品的生产和消费大省，畜禽产品的供应和安全性直接关系到社会稳定和人民群众健康。目前对广东地区动物源沙门菌流行情况和耐药数据了解不多。

为了掌握广东省动物源沙门菌流行特点和耐药情况，本研究在 2015 年从广东省不同地区采集动物和动物性食品样品 415 份（包括鸡肉 263 份、猪肉 128 份和沙门菌感染病例 24 份），共分离到沙门菌 273 株，其中鸡肉 153 株（分离率 58.2%）、猪肉 96 株（分离率 75.0%）和兽医临床分离 24 株；273 株沙门菌共鉴定出 28 个血清型，鸡肉中的沙门菌主要血清型为科瓦里斯、阿贡纳和肯塔基，猪肉中主要血清型为鼠伤寒、德比和罗森，兽医临床中主要血清型为鼠伤寒；药敏试验显示，16 种抗菌药物中耐药性最高的是四环素（76.2%），其次为磺胺异恶唑（48.0%）和氨苄西林（41.4%），且多重耐药菌株（耐三类或三类以上抗菌药物）占 51.6%；对产 ESBLs 主要基因型（*bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>CTX-M</sub>* 和 *bla<sub>OXA</sub>*）进行检测，29.3% 的菌株至少携带一个产 ESBLs 基因；采用 PCR 检测 I 型整合酶活性，33.7% 检测到整合酶活性，但只有 9.5% 扩增到整合子基因盒，基因盒总共检测到六类，其中 *aadA2-dfrA12* 检出率最高，说明广东省动物源沙门菌 I 型整合子在氨基糖苷药物和磺胺类药物的耐药基因传播中起着重要作用。

鉴于鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌是危害家禽最主要的沙门菌，目前的常规检测方法很难对其进行鉴别诊断。本研究通过测序比对结合文献报道，发现鸡白痢和鸡伤寒沙门菌 *rfbS* 基因在 237 位点和 598 位点有规律性的变化。在此基础上使用自行设计的引物对 SP-237F/237R 和 SG-598F/598R 成功建立了高分辨熔解曲线检测方法（PCR-HRM），该方法特异性为 100%，最低检测限分别为 34 copies/ $\mu$ L 和 42 copies/ $\mu$ L，灵敏度是普通 PCR 的 100 倍以上。该方法操作简便，检测时只需要在 PCR 反应中加入饱和荧光染料，简化了临床检验的流程并且大大缩短了检测时间，并且该方法具有高通量、高效率的特点，一次最多可以检验 384 个样本。与传统 PCR 后电泳开放操

作相比，本方法从 PCR 过程到 HRM 分析一步完成，实现了真正的闭管操作，解决了传统鸡白痢和鸡伤寒沙门菌检测方法特异性差、灵敏度低的问题。

综上所述，本研究对广东省动物源沙门菌流行状况进行分析，为沙门菌防控提供数据支撑；通过耐药性和耐药基因检测，探明了广东省动物源沙门菌耐药特点和耐药风险；进而建立鸡白痢和鸡伤寒沙门菌 PCR-HRM 快速检测方法，为在家禽中常见沙门菌中快速鉴别鸡白痢和鸡伤寒沙门菌提供了可靠的方法。

**关键词：**沙门菌；流行；耐药；高分辨率熔解曲线；鸡白痢；鸡伤寒

# Prevalence of *Salmonella* from animal origin in Guangdong and HRM analysis rapid identification of *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum*

Ren Xingxing

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

**Abstract:** *Salmonella* is one of the most important globally-distributed zoonotic pathogens. Until now, more than 2500 serovars of *Salmonella enterica* have been identified, among which a number of pathogenic serovars can be found in people, livestock and poultry that has caused serious damage to both human health and animal breeding industry. Animal origin *Salmonella* can widely exist in different animals and animal food, and can spread from animals and food chain to animal and human being. So it is important to study the epidemiology of *Salmonella* from animal origin. Furthermore, Guangdong is one of the largest poultry and animal products production and consumption province, the supply and safety of animal products directly related to the social stability and the health of the people, but the data of animal origin *Salmonella* prevalence in Guangdong area are lacking.

From May 2015 to December 2015, A total of 415 samples (chicken = 263, pork =128, veterinary hospital =24) were collected from Guangdong province. Two hundred and seventy-three *Salmonella* strains were isolated. The isolated strains of *Salmonella* belonged to 28 serotypes; most of them were *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Corvallis, advantages of serotypes of different sample types are distinguished; Isolates were frequently resistant to streptomycin (76.2%), sulfisoxazole (48.0%) and ampicillin (41.4%), 51.6% of the strains were resistant to three or more antimicrobial drugs. The isolates were screened for 3 ESBLs genes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>OXA</sub>), 29.3% of the 273 strains analyzed were carried at least one ESBLs gene; 33.7% of the strains were integrase positive via PCR detection, however, only 9.5% of the strains were detected out with gene cassettes. The *Salmonella* isolates bearing class 1 integron were amplified to six kinds of gene cassettes by DNA sequencing, the number aadA2-dfrA12 were the most frequent, which

indicates that class 1 integron plays an important role in the horizontal transfer of the aminoglycoside antibiotics and sulfonamides resistance genes.

In addition, *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum are the most common causative agents of chicken salmonellosis resulting in high mortality and morbidity in many parts of the world. It is difficult and laborious to discriminate these diseases via biochemical or phenotypic methods. In this article, we have developed a single nucleotide polymorphism (SNP) PCR-high resolution melt (PCR-HRM) assay for the detection and discrimination of *S. Pullorum* and *S. Gallinarum*. The *rfbS* gene has been identified as good genetic marker for identification of *S. Pullorum* and *S. Gallinarum* according to polymorphism at positions 237 and 598. Therefore, PCR-HRM analysis were applied to characterize this gene. The PCR-HRM assay was able to distinguish *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* and other strains using primer set SP-237F/237R and SG-598F/598R. The two assays showed high specificity (100%) for *S. Pullorum* and *S. Gallinarum*, and the sensitivity of the two assays was at least 100 times higher than that of the allele-specific PCR assay. The present study demonstrated that HRM analysis confirmed to be a potent, simple and economic tool for rapid, specific and sensitive detection of *S. Pullorum* and *S. Gallinarum*.

This study provides data supporting for prevention and controlling of *Salmonella*. This is the first report on successful application of the PCR-HRM technology to distinguish *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* and other strains, and this technique could be applicable in epidemiological research and diagnosis in veterinary clinical laboratory, which can contribute to more timely and efficient control measures on PD or FT.

**Key words:** *Salmonella*; Antimicrobial resistance; Prevalence; HRM; *Salmonella Pullorum*; *Salmonella Gallinarum*

## 缩写词 (Abbreviation)

缩写词	英文全称	中文全称
BPW	Buffered Peptone Water	缓冲蛋白胨水
$\mu$ mol/L	Micromole/liter	微摩尔/升
$\mu$ g	Microgram	微克
$\mu$ L	Microliter	微升
bp	Base pair	碱基对
bp	Base pair	碱基对
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	三磷酸脱氧核糖核苷
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FT	Fowl typhoid	禽伤寒病
g	Gram	克
GCP	Genotype confidence percent	基因分型置信值
h	Hour	小时
HRM	High resolution melting	高分辨率熔解曲线
L	Liter	升
m/L	mole/Liter	摩尔/升
mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
mol	Molecule	摩尔
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PD	Pullorum disease	鸡白痢病
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis	脉冲场凝胶电泳
pH	pondus hydrogenii	pH 值
r/min	Rotation per minute	每分钟转数
RV	Rappaport-Vassiliadis	RV 肉汤
s	Second	秒

缩写词	英文全称	中文全称
SNP	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
Taq 酶	Taq DNA Polymerase	Taq DNA 聚合酶
Tm	Melting temperature	熔解温度
TSA	TSA Agar	胰蛋白胨大豆琼脂
TSI	Triple Sugar Iron Agar	三塘铁琼脂
TTB	Tetrathionate Broth	四硫磺酸盐煌绿增菌液
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-硫酸四癸钠琼脂

# 目 录

第一章 前言 .....	1
1.1 病原学 .....	1
1.2 动物源沙门菌流行病学 .....	2
1.3 沙门菌耐药性现状 .....	3
1.4 沙门菌耐药机制 .....	4
1.4.1 沙门菌对 $\beta$ -内酰胺类抗生素的耐药机制 .....	6
1.4.2 沙门菌整合子系统研究进展 .....	6
1.5 鸡白痢和鸡伤寒沙门菌检测方法研究进展 .....	7
1.6 高分辨率熔解曲线在微生物检测中的应用 .....	8
1.6.1 HRM 分析方法原理 .....	8
1.6.2 HRM 分析在微生物检测中的应用 .....	10
1.7 研究目的及意义 .....	11
第二章 广东省动物源沙门菌流行特点 .....	12
2.1 引言 .....	12
2.2 材料与方法 .....	12
2.2.1 材料 .....	12
2.2.1.1 样品来源 .....	12
2.2.1.2 标准菌株 .....	13
2.2.1.3 引物 .....	13
2.2.1.4 主要试剂及其配制 .....	14
2.2.1.5 诊断血清 .....	15
2.2.1.6 药敏纸片 .....	15
2.2.1.7 主要仪器设备 .....	16
2.2.2 方法 .....	17

2.2.2.1 样品采集 .....	17
2.2.2.2 沙门菌的鉴定 .....	17
2.2.2.3 沙门菌的保存与复苏 .....	19
2.2.2.4 沙门菌的血清型鉴定 .....	19
2.2.2.5 药物敏感性试验 .....	20
2.2.2.6 耐药基因及整合子检测 .....	20
2.2.2.7 序列测定与分析 .....	21
2.3 结果及分析 .....	22
2.3.1 沙门菌分离鉴定 .....	22
2.3.2 沙门菌血清分型结果 .....	24
2.3.3 药敏试验结果 .....	25
2.3.4 $\beta$ -内酰胺类耐药基因型与表型相关性 .....	31
2.3.5 I 型整合子基因盒鉴定结果 .....	31
2.4 小结 .....	32
第三章 HRM 检测鸡白痢及鸡伤寒沙门菌方法的建立 .....	33
3.1 引言 .....	33
3.2 材料与方法 .....	34
3.2.1 样品来源 .....	34
3.2.2 主要试剂及其配制 .....	36
3.2.3 主要仪器设备 .....	36
3.2.4 引物的设计与合成 .....	36
3.2.5 核酸的提取 .....	37
3.2.6 标准曲线的建立 .....	38
3.2.7 PCR 扩增及 HRM 分析 .....	39
3.2.8 特异性性试验 .....	39
3.2.9 灵敏性试验 .....	39

3.2.10 序列测定与分析 .....	39
3.2.11 数据处理 .....	39
3.3 结果及分析 .....	40
3.3.1 引物设计 .....	40
3.3.2 标准菌株 PCR-HRM 分析结果 .....	40
3.3.3 标准菌株 PCR-HRM 分析结果 .....	41
3.3.4 敏感性试验结果 .....	42
3.3.5 特异性试验结果 .....	43
3.4 小结 .....	44
第四章 全文讨论与总结 .....	45
4.1 讨论 .....	45
4.1.1 沙门菌流行情况讨论 .....	45
4.1.2 沙门菌耐药特点讨论 .....	47
4.1.3 PCR-HRM 检测方法讨论 .....	49
4.2 总结 .....	51
致 谢 .....	52
参 考 文 献 .....	52
附录：硕士期间科研成果及获奖情况 .....	62

# 第一章 前言

沙门菌病是由沙门菌引起的一种全球性人兽共患病，据美国 CDC 统计，在美国大约每年有 120 万人患沙门菌病，造成 450 人死亡（Scallan *et al.*, 2011）；中国数据显示，每年大概 820 万人感染沙门菌，引起 792 人死亡（Mao *et al.*, 2011）。沙门菌暴发和随机感染的病例中大部分是由于摄入受污染的食物造成的，这些食物主要包括肉食品、牛奶、鸡蛋、水果和蔬菜等，其中动物源食品被认为是沙门菌的重要载体，是人类感染沙门菌的一个重源头（Jackson *et al.*, 2013）。目前，我国动物源沙门菌监测系统还处于起步阶段，完善动物和动物源食品中沙门菌的监测工作是预防和控制沙门菌病暴发和流行的基础。

## 1.1 病原学

沙门菌 (*Salmonella*) 是肠杆菌科一种革兰氏阴性杆菌，Salmon 和 Smith 在 1885 年首先从患有猪霍乱的猪体内分离到猪霍乱沙门菌，为了纪念该菌的共同发现者美国兽医师 D.E. Salmon，定该菌属为沙门菌属 (*Salmonella* genus)。沙门菌不产气，亦无荚膜，大小为  $0.7-1.5\mu\text{m}\times 2.0-5.0\mu\text{m}$ 。该属中除了鸡白痢沙门菌 (*Salmonella Pullorum*) 和鸡伤寒沙门菌 (*Salmonella Gallinarum*) 无鞭毛不运动之外，其余均具有周鞭毛，能运动。沙门菌为需氧及兼性厌氧菌，其最佳生长温度为  $37^{\circ}\text{C}$ ，在普通营养培养基上就能够良好生长。发酵 D-葡萄糖及其他糖类能产酸，产气，氧化酶阴性，触酶阳性，靛基质和 V-P 试验阴性（辛朝安等, 2003）。

本属沙门菌包括两个种，即肠道沙门菌 (*Salmonella enterica*) 和邦戈尔沙门菌 (*Salmonella bongori*)。肠道沙门菌有可以分为六个亚种，包括肠道沙门菌肠道亚种 (*Salmonella enterica subsp. enterica*)，肠道沙门菌萨拉姆亚种 (*Salmonella enterica subsp. salamae*)，肠道沙门菌亚利桑那亚种 (*Salmonella enterica subsp. arizonae*)，肠道沙门菌双向亚利桑那亚种 (*Salmonella enterica subsp. diarizonae*)，肠道沙门菌浩敦亚种 (*Salmonella enterica subsp. houtenae*) 和肠道沙门菌迪卡亚种 (*Salmonella enterica subsp. indica*)（朱超等, 2009）。

沙门菌具有 O（菌体）、H（鞭毛）、K（荚膜抗原，又称 Vi）和菌毛 4 类不同性质的抗原。O 抗原的主要组成成分是多糖和磷脂的复合物，H 抗原是由鞭毛素蛋白组成。根据这些抗原的不同，到目前为止已经鉴定了 2500 多种血清型。依据沙门菌对

宿主的感染情况可将其分为宿主适应性血清型和非宿主适应性血清型。如马流产沙门菌、鸡白痢沙门菌、猪霍乱沙门菌等只对其适应的宿主有致病性，而肠炎沙门菌、鼠伤寒沙门菌、山夫登堡沙门菌、阿贡纳沙门菌等对多种宿主均有致病性（Chiu *et al.*, 2004）。

## 1.2 动物源沙门菌流行病学

沙门菌广泛存活于人类、温血动物和冷血动物体内，另外，沙门菌对外界环境抵抗力强，也广泛存在于环境和食品中。被污染的食品，尤其是动物性食品是沙门菌感染人类的一个重要源头。常被污染的动物性食品有鸡肉、猪肉、牛奶、鸡蛋、海鲜、火腿等。Yan 等对中国北方地区零售动物食品中沙门菌流行情况进行调查，结果显示沙门菌在鸡肉、猪肉、牛肉、羊肉和海鲜中的污染率分别为 15.8%、26.7%、33.3%、33.3%和 20.8%（Yan *et al.*, 2010）；Yang 等对中国陕西零售市场和超市中鸡肉、猪肉、牛肉和羊肉中沙门菌污染情况分析发现，鸡肉中沙门菌污染最为严重，达到 54%，其次为猪肉（31%）、羊肉（20%）和牛肉（17%）（Yang *et al.*, 2010）；Cai 对中国扬州地区零售市场和屠宰场的猪肉采样发现，沙门菌污染率分别达到了 70.9%和 71.8%，而且通过 PFGE 证实对不同来源的样品间存在交叉污染的现象（Cai *et al.*, 2016）。以上数据可看出，各地区肉食品中沙门菌污染程度不同，但是沙门菌在肉食品中的污染是常态，并且，不同食物之间或者不同生产环节之间存在着交叉污染的现象。

很多研究表明，动物是造成人感染沙门菌的一个重要源头（Barua *et al.*, 2014）。由于动物养殖过程中抗生素的长期添加，在动物养殖环节沙门菌检出率低，但是动物到了屠宰加工处理过程中，沙门菌检出率呈现一个放大的状态（Mohamed *et al.*, 2014）。所以加强监控动物源性食品从屠宰到加工过程的污染也非常重要。

沙门菌对畜禽健康也造成很大威胁，临床症状多表现为败血症和肠炎，也可使怀孕母畜发生流产，对畜禽繁育和幼畜的健康都有很大影响。大动物如牛、马和羊一般呈散发状态，而对于雏鸡常呈地方性流行和爆发状态，家禽中的沙门菌容易在养殖环境中形成复杂的传播循环，即沙门菌如鸡白痢沙门菌、禽伤寒沙门菌在健康动物的肠道、患病动物、鸡蛋、养殖环境、饲料饮水及粪便中循环交替，所以净化家禽，特别是种禽养殖中鸡白痢等，防止种鸡和种蛋中沙门菌的传播蔓延能极大的提高养殖效益（Parvej *et al.*, 2016）。

### 1.3 沙门菌耐药性现状

上世纪初，全球约三分之一以上的人死于肺炎、结核、肠炎和腹泻，而到了今天癌症和心脏病成为人类的主要杀手，肺炎和流感引起的死亡的人数则不到 4.5%。这主要得益于抗生素在各类感染性疾病的治疗中发挥了无可比拟的作用 (CDC, 1999)。自从十九世纪四十年代青霉素开始临床使用以来，抗生素广泛应用于预防和治疗人类和动物感染性的疾病。抗生素在动物养殖过程中的使用极大的促进了养殖业的发展，因为它能促进动物生长和减少疾病的发生概率，有研究表明，抗生素能够降低肠道微生物产生的胆碱水解酶的活性，从而使机体脂质代谢增加，因此达到促生长的目的 (Lin, 2014)。在世界范围内抗生素在人类和动物疾病临床治疗中超剂量使用，以及动物养殖过程中长期的低剂量添加都直接促进了微生物耐药性的增加。在美国每年至少有 200 万人感染至少耐一种抗菌药物的细菌，直接造成将近 23000 个死亡病例 (CDC, 2013)。随着产新德里金属- $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌、质粒介导抗多粘菌素肠杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和抗万古霉素肠球菌等超级细菌的出现 (Kumarasamy *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016)，科学家预测人类将很快进入一个新的抗生素时代。

与大肠杆菌、空肠弯曲杆菌等肠杆菌科细菌相比，沙门菌通常对多种抗生素比较敏感，但是随着抗生素的长期滥用，沙门菌耐药现象已经非常普遍，这对临床中沙门菌病的治疗带来了严峻的挑战。美国国家抗菌素耐药性监测系统 (NARMS, National Antimicrobial Resistance Monitoring System Animal Isolates) 监测报告显示，鼠伤寒沙门菌的耐药在 1979-1980 年为 0.6%，到了 1994-1995 年增长到了 19%，耐药性增加了 30 倍。然而近年，沙门菌的耐药性还在持续增加。对美国 2005-2011 年人源分离到的沙门菌耐药测试表明，21% 的菌株对至少一种抗生素耐药，13% 的菌株对五种或五种以上抗生素耐药。中国的情况更为严重，上海地区 2006 到 2010 年医院病人分离到的沙门菌 77.6% 至少耐一种抗菌药物，40.3% 耐三种或三种以上抗菌药物，其中耐药最为严重的药物依次是萘啶酸 (50.9%)、磺胺异恶唑 (47.9%)、链霉素 (37.6%)、氨苄西林 (31.3%) 和四环素 (30.5%) (Zhang *et al.*, 2014)。沙门菌主要耐受的抗菌药物在不同国家和地区类似，Cai 等对 2013-2014 年中国扬州地区猪肉屠宰场和零售市场中沙门菌耐药情况进行了检测发现，沙门菌耐药最高的为四环素 (45.5%) 和链霉素 (30.5) (Cai *et al.*, 2016)。意大利地区食物和人中分离的沙门菌耐药性检测结果显示，最耐受的抗菌药物分别为氨苄西林 (45.6%)、四环素 (48.3%)、链霉素 (52.6)

和磺胺类药物（53.5%）（Capuano *et al.*, 2013）。Deng 对中国广东省 2009-2012 年从医院病人分离到的沙门菌进行药敏实验，沙门菌的耐药性在逐年增加，氨苄西林、萘啶酸和磺胺类药物的耐药率在 40%到 58%之间，临床一线用头孢类药物头孢吡肟、头孢噻肟和头孢他啶的耐药率也分别达到了在 10%、11%和 7.4%。在英国抗三代头孢菌素沙门菌分离率在 0.55%（Burke *et al.*, 2014）。

以上数据表明，由于抗生素长期使用，沙门菌的耐药性呈现逐年增加的趋势，对于一些临床应用较早的抗生素如萘啶酸、四环素、链霉素、氨苄西林、磺胺类药物已经显示出了严重的耐药。此外，对三代、四代头孢类药物和二代、三代喹诺酮类药物的耐药也已经出现并呈现出增加的趋势，给临床治疗沙门菌感染带来极大的挑战。

## 1.4 沙门菌耐药机制

从抗生素使用以来，对细菌耐药机制的研究就在不断深入。沙门菌对抗生素的耐药机制大致可以分为以下四点：第一，基因突变改变药物靶点。沙门菌通过基因位点突变使抗生素作用靶点蛋白结构发生改变，如 *gyrA* 和 *gyrB* 是编码 DNA 旋转酶 A 亚单位和 B 亚单位编码基因，*gyrA* 编码蛋白的 67 位到 106 位氨基酸为喹诺酮耐药决定区（QRDR, Quinolone resistance determining region），QRDR 区域内氨基酸通常发生如下变化：Ser-83→Phe/Tyr/Ala、Asp-87→Gly/Asn/Tyr，这些变化都会引起氟喹诺酮类药物的抗性（Chen *et al.*, 2007）。*gyrB* 基因编码的第 420、437 和 464 位氨基酸的改变也可以导致喹诺酮类药物耐药性的出现。类似的情况还有编码沙门菌拓扑异构酶 IV 的 *parC* 基因和 *parE* 基因，当 *parC* 的 Thr-57→Ser、Ser-80→Arg/Ile，*parE* 的 Glu-453→Gly、His-461→Tyr；也可导致喹诺酮类药物抗药性的产生（Eaves *et al.*, 2004）。类似的突变还有很多，深入研究有助于耐药机制的研究和新抗菌药物的开发。第二，通过外排泵和改变外膜的通透性减少抗菌药物在细胞内的累计。革兰氏阴性菌细胞膜上存在一种转运蛋白，它能将细胞内抗生素及其他有毒物质排到细胞外。*AcrAB* 是最主要的外排泵，据报道，沙门菌对四环素、氨苄青霉素、头孢类药物、氯霉素、红霉素、三甲氧苄氨嘧啶等的多重耐药性与主动外排系统 *AcrAB* 有关（Boyd *et al.*, 2002）。沙门菌中还存在的外输泵蛋白 *NorA*、*MexAB*、*PmrA* 和 *Bmr* 具有对喹诺酮的外输作用（Giraud *et al.*, 2000）。细菌长期接触抗菌药物，可以引起细胞膜孔蛋白丢失，从而导致细胞膜通透性下降，引起低度耐药。目前，沙门菌的外膜蛋白改变引起耐药的研究还较少，据报道沙门菌的耐药性与外膜蛋白质（Outer membrane proteins, Omp），即

孔膜蛋白(Porin) 密切相关 (Hu *et al.*, 2009)。第三, 产生抵抗抗菌药物的钝化酶和灭活酶。钝化酶是细菌产生能够与抗菌药物上的某些位点结合, 具有破坏或灭活抗菌药物活性的某种酶,它通过水解或修饰作用破坏抗生素的结构使其失去活性。主要分为三类, 乙酰转移酶 (AAC)、腺苷酸转移酶 (AAD) 和磷酸转移酶 (APH)。沙门菌通过这些酶的作用改变了氨基糖苷类药物的结构, 从而影响药物作用的发挥。此外, 沙门菌还可以产生水解酶,  $\beta$ -内酰胺酶 (BLA) 是沙门菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的主要机制, 该酶能水解  $\beta$ -内酰胺类抗生素的酰胺键使该类药物失活。临床上重要的 BLA 有 AmpC 头孢菌素酶和超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (ESBLs)。AmpC 头孢菌素酶可由沙门菌的染色体和质粒介导。根据基因进化关系, 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (ESBLs) 主要包括 TEM 型、SHV 型、OXA 型和 CTX 型等, 其由质粒介导, 可以在同种属或不同种属革兰氏阴性菌间频繁转移, 从而导致  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药性广泛传播 (Arlet *et al.*, 2006)。

第四, 携带耐药基因的可移动元件在不同菌株间传递。沙门菌耐药相关的移动基因元件主要有质粒、整合子、转座子、噬菌体和 I 型基因岛 (*Salmonella* gene island, SGI I) 等 (Alcaine *et al.*, 2007)。这些元件能够携带耐药基因在细菌间水平传播。此外, 还有一些其他影响沙门菌耐药的因素, 如生物被膜的形成及状态、新代谢途径的建立等。沙门菌产生耐药性常常不是一种耐药机制起作用, 而是两个或多个不同的生化反应机制共同作用。综上所述, 沙门菌极易获得耐药性, 要制定一系列措施, 防止由于滥用抗生素导致耐药沙门菌的快速和广泛出现。

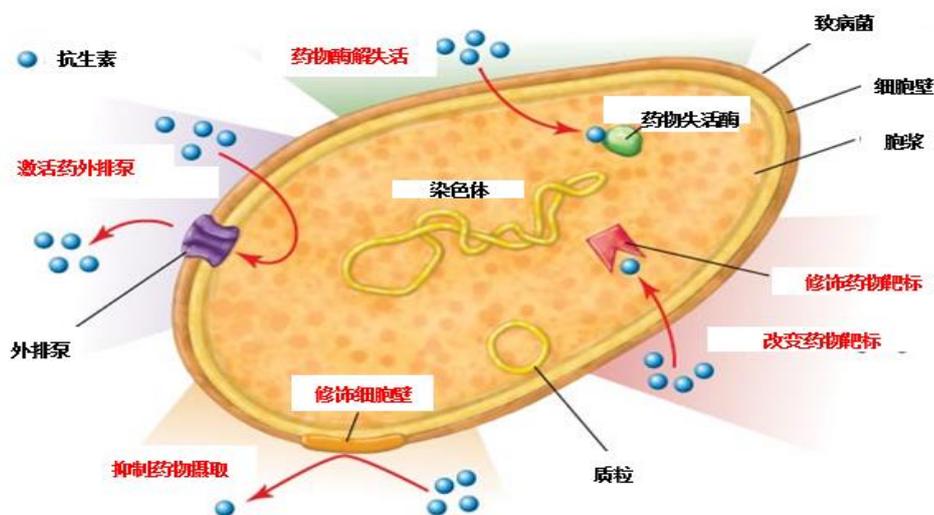


图 1.1 细菌耐药模式图

### 1.4.1 沙门菌对 $\beta$ -内酰胺类抗生素的耐药机制

$\beta$ -内酰胺类药物是发现最早和临床抗感染应用最普遍的抗生素，所以病原菌对这类药物的耐药性也非常高。细菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制主要有四种，第一是细菌产生  $\beta$ -内酰胺酶水解  $\beta$ -内酰胺类抗生素；第二是青霉素结合蛋白(Penicillin binding proteins, PBPs) 发生变异导致其与  $\beta$ -内酰胺类抗生素亲和力下降，进而导致细菌耐药性的产生；第三是外膜孔蛋白的缺失使外膜通透性改变，进入胞内药物含量减少；第四是外排泵主动将胞内高浓度的药物排出。然而产生  $\beta$ -内酰胺酶是革兰氏阴性菌最主要的耐药原因 (Pfeifer *et al.*, 2010)。

根据  $\beta$ -内酰胺酶分子结构中氨基酸的序列不同，可将  $\beta$ -内酰胺酶分成四种类型，即 A、B、C 和 D 类，A、C 和 D 类属于活性位点丝氨酸酶，B 类属于锌依赖酶 (Ambler, 1980)。A 类酶多为质粒介导，大多数青霉素类抗生素都是其良好底物；B 类酶基因通常在染色体上，依赖于 2 价过渡态金属离子，其中最为关注的就是金属  $\beta$ -内酰胺酶 (MBL) (又称碳青霉烯酶)；C 类酶多在染色体上，通常被称为头孢菌素酶，C 类中最重要的是 AmpC 酶；D 类酶是由质粒介导偏好苯唑西林和氯唑西林的酶，又被称为“苯唑西林酶”。

超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)是一种由质粒介导的能水解多种新型抗菌药，特别是三代头孢菌素 (如头孢噻肟、头孢曲松钠和头孢他啶等) 以及单环  $\beta$ -内酰胺类 (例：氨曲南)，并可被  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂(如克拉维酸等)所抑制的一类  $\beta$ -内酰胺酶。检验方法有表型验证法、E-test 法和双纸片法等。ESBLs 属于 Ambler 分类的 A 类和 D 类酶，按照 Bush 分类属于 2be 类。根据质粒上携带编码基因的同源性进行分型，ESBLs 主要有 TEM、SHV、CTX-M、OXA 型，还有一些少见的 ESBLs 型，如 PER、CMZ、VEB、SFO、GES 等，自 1983 年发现 ESBLs 以来，目前发现 TEM 型 80 种、SHV 型 48 种、CTX-M 型 43 种、OXA 型 18 种，其他基因型近 20 种。因其理化性质和耐药性的差异，不同地区流行的基因型不尽相同。SHV、CTX-M、TEM 是最常见的 ESBLs 型别 (Boontham *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015)。

### 1.4.2 沙门菌整合子系统研究进展

耐药基因水平传播的问题一直是人们比较关注的问题，整合子作为天然的克隆和表达载体，它所介导的耐药基因传播近年越来越受到重视。1989 年，Stokes 和 Hall 首次提出了一个与耐药基因水平传播有关的新的可移动基因元件，并命名为整合子

(integron, In) (Stokes *et al.*, 1989)。整合子是细菌基因组和质粒或者转座子中的可移动的能够捕获外源基因的特异重组系统,其通过捕获外源性基因(多为耐药基因)来增强细菌对外界环境的适应性,是革兰阴性菌多重耐药迅速发展的主要原因之一。其基本结构是由两端的保守的片段(5'端和 3'端)和中间的可变区(由一个或多个外来插入的基因盒组成)3个部分组成,5'端包含三种基因,1个编码整合酶的 *int* 基因、1个重组位点 *attI* 基因和一个启动子(P1 或 P2) (Lopes *et al.*, 2014)。

依据整合酶编码基因 *int* 序列的不同,整合子被分成不同种基因型,目前发现的整合酶已有 10 种类型,其中以 I 型整合子在临床中(特别是革兰氏阴性耐药菌株)最常见(Hsu *et al.*, 2013),它的整合酶是含有 337 个氨基酸的蛋白质。一个整合子可以插入多个基因盒,从而表达出不同的药物抗性基因。迄今已经发现了 70 多种基因盒,大多数为编码氨基糖苷类(*aad*, *aac*)、甲氧苄啶(*dfr*)、 $\beta$ -内酰胺类(*bla*)、苯唑西林类(*oxa*)及氯霉素类(*cat*)抗生素(Brown *et al.*, 2007),也有一些编码毒力基因和其他生物功能的基因盒(Vaisvila *et al.*, 2001)。

## 1.5 鸡白痢和鸡伤寒沙门菌检测方法研究进展

在家禽中,危害最严重的沙门菌是鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌,这两种血清型沙门菌在世界范围内广泛分布,对家禽养殖业造成了严重的经济损失,在很多发达国家如西欧、美国、加拿大、澳大利亚和日本已经实施和完成了该沙门菌的净化工作,但是在发展中国家,这两种血清型沙门菌仍然在流行和蔓延(Arora *et al.*, 2015)。

传统检测方法主要有两种,首先是针对病原,对感染家禽的肝脏及泄殖腔采样,采集的样品直接涂布于选择性琼脂平板如XLD、MC、BGA等,或者将样品放入增菌液如SC、RVS中,增菌后再涂上述的选择平板,最后挑选出典型的菌落(在XLD上呈黑色或者无色透明针尖状)进行生化鉴定和血清学鉴定。其次是针对患病动物血清进行检验,目前常用的血清学检疫方法有三种:全血玻片凝集反应、试管凝集反应、琼脂扩散反应(AGP)。由于全血玻片凝集反应方法简便、反应较快,又可在现场进行,因此,此法在生产实践中应用最广。但是该方法假阳性率高,适用于感染程度较高的成年家禽,对于幼禽和轻微带菌者鉴定不准确。以上方法都是利用血清反应进行,但鸡白痢和鸡伤寒沙门菌都属于肠道杆菌科沙门菌属D血清群的一员, O抗原非常相似(鸡白痢: O1、O9、O12<sub>1</sub>、O12<sub>2</sub>、O12<sub>3</sub>; 鸡伤寒: O1、O9、O12),所以血清学鉴定很容易出现交叉凝集反应,可使用一种抗原检出另一种病的带菌者(Berchieri *et al.*,

1995)。

虽然根据传统方法及家禽感染的临床症状及流行病学可以初步判断,但是确诊及深入研究,仍然需要对鸡白痢和鸡伤寒沙门菌进行鉴别。随着分子生物学的发展,利用分子上的差别辨别鸡白痢和鸡伤寒是一种趋势。对鸡白痢和鸡伤寒沙门菌序列比较发现,在*filC*基因的316位点和339位点存在单核苷酸的多态性,针对这两个位点的变化可以进行PCR扩增然后使用HinP1酶切鉴定(PCR-RFPL)(Kwon *et al.*, 2000);同时*rfbS*基因在598位点和237位点也存在规律性变化,可以利用PCR-RFLP方法进行区分(Park *et al.*, 2001),另外,shah等根据*rfbS*基因多态性建立了非等位基因特异性PCR方法对鸡白痢和鸡伤寒进行区分(Shah *et al.*, 2005);也有研究发现根据*speC*基因(与鸟氨酸代谢相关的基因)为靶标,使用EcoR I进行酶切建立的PCR-RFLP方法也可区分鸡白痢与鸡伤寒沙门菌(Ribeiro *et al.*, 2009);最近有研究针对沙门菌*glgC*和*speC*基因多态区使用双重PCR技术区分鸡白痢与鸡伤寒沙门菌(Kang *et al.*, 2011);也有在使用PFGE技术对爆发的病例进行调查区分鸡白痢和鸡伤寒沙门菌(Parvej *et al.*, 2016);但是这些方法大多数操作复杂,需要后期的电泳及酶切等处理,也正是由于这些缺陷,这些方法很难应用于临床诊断。

## 1.6 高分辨率熔解曲线在微生物检测中的应用

高分辨率熔解曲线(High Resolution Melting, HRM)分析技术是2003年美国犹他大学保健科中心病理部 Carl Wittwer 实验室与美国 Idaho Technology 公司共同合作开发出来的建立在实时荧光基础上的基因分析新技术(Wittwer *et al.*, 2003),并于2006年生产出世界上第一台 HRM 仪器 HR-1。它能够实时监测温度上升过程中双链 DNA 的解链过程从而鉴别 PCR 产物中核苷酸的差异。目前广泛应用于突变扫描、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)、甲基化研究、基因分型、序列匹配等方面。

### 1.6.1 HRM 分析方法原理

HRM 技术是基于核酸物理性质,在 PCR 体系中加入饱和染料,PCR 反应后饱和的荧光染料与双链 DNA 结合,然后对 PCR 扩增产物进行加热,初期荧光信号很强,温度从 50℃ 逐渐上升到 95℃ 过程中, DNA 双链逐渐解离的过程伴随着饱和荧光染料从局部解链的 DNA 分子中释放,释放后的荧光分子失去荧光信号。这个过程通过及

检测器以每秒多于 25 次频率记录荧光变化的过程。对数据作图，以温度变化为横坐标，荧光信号的变化为纵坐标就生成了溶解曲线。当 DNA 双链（dsDNA）有一半被分解或者形成了单链（ssDNA）时的温度称为溶解温度（melting temperature,  $T_m$ ），可以根据  $T_m$  的不同来分辨两个差异很小甚至只有单个核苷酸不同的 DNA 片段。

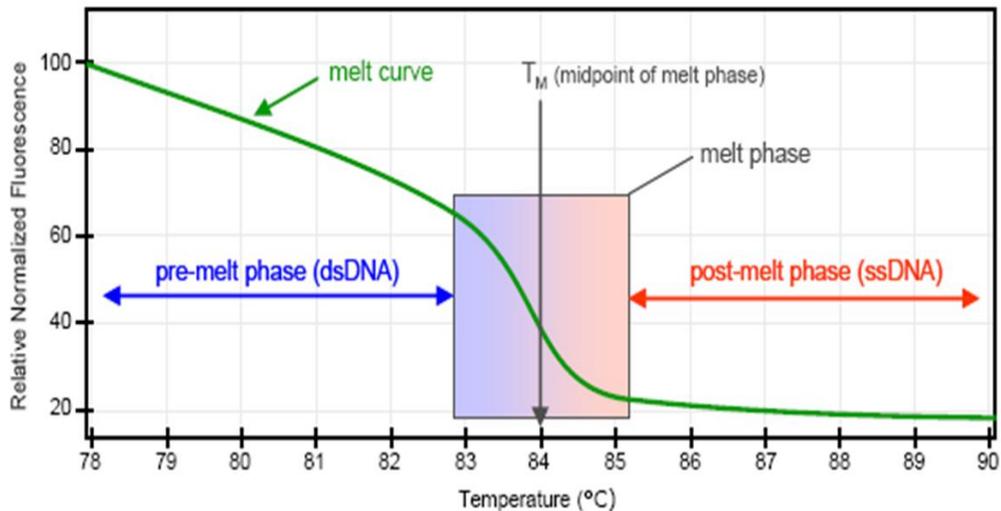


图 1.2 高分辨率溶解曲线示意图

HRM 分析技术主要是基于两种技术的进步。第一，双链 DNA 嵌入型饱和染料如 LC Green、Eva Green、Syto9 和 ResoLight 等的出现。1997 年 real time PCR 出现，人们利用 SYBR Green 荧光染料来检测 DNA 扩增和熔解的过程，然而，该染料进行溶解曲线时只适合区分片段差异较大的 DNA 序列，所以实时荧光定量 PCR 后熔解曲线基本是用来判断是否有引物二聚体及其他非特异扩增。这是因为 SYBR Green 为不饱和染料，对 PCR 反应有一定的抑制作用，必须低浓度使用，所以不能饱和的插入 DNA 双螺旋结构的小沟中（即使高浓度也不能完全均匀插入）。由于染料本身的性质，SYBR Green 在溶解脱落后还会发生重排，又与尚未解链的 DNA 双链结合，所以无法精确的反映 DNA 的溶解情况。饱和染料对 PCR 反应无抑制作用，可以在饱和浓度下对 DNA 双链完全标记，因此升温过程中的 DNA 双链细微变化都能通过荧光信号反映出来。第二，具有精确控温装置和高密度数据采集的仪器。常规仪器熔解曲线检测一般温度每升高 1°C 采集 2-5 次荧光，而高分辨熔解曲线温度每升高 1°C 至少采集 10 次以上，上限可达到 200 次以上。所以 0.1°C 的变化就能明显的检测出来。为了保证不同样品间实验温度一致，HRM 分析对仪器孔间温度差异要求极高。孔间温度均一性要

达到 0.2℃ 以下才能保证结果的准确性。大多数常规 real time PCR 仪器的孔间温度差在 0.3-0.5℃，所以无法胜任 HRM 分析。

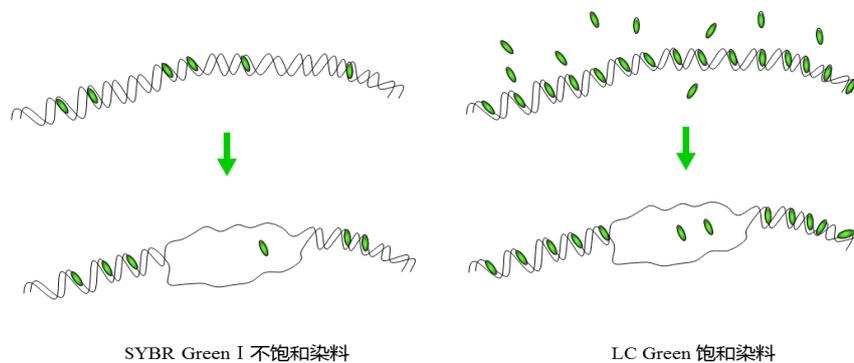


图 1.3 不同染料溶解示意图

### 1.6.2 HRM 分析在微生物检测中的应用

根据 HRM 分析简便、快速、灵敏度高和高通量的特点，其主要应用于 SNP 检测、多态片段扩增、DNA 甲基化分析和 RNA 编辑等方面，其逐渐成为了热门的核酸分析技术，这也是目前实时荧光定量 PCR 的发展方向。目前，HRM 技术在人医领域运用较广泛，如应用 HRM 技术检测正常个体和患有慢性肉芽肿病患者的相关基因进行检测，发现 CYBB 外显子上的 19 个突变位点可能是引起 X 连锁慢性肉芽肿的关键因素（Hill *et al.*, 2010）；HRM 分型方法在溃疡性结肠炎研究中发现基因位点与性别有关（Tedde *et al.*, 2008）。

微生物包括细菌、真菌及病毒等一大类生物群体，广泛涉及到食品、医药、农业、环保等诸多领域，其种类繁多，基因变异较快，种属间差异往往又很难通过血清型鉴定区分开。HRM 技术能检测基因片段中的微小差异，目前开始应用于微生物的分型和鉴定。如根据细菌 16S rRNA 对临床 58 种细菌进行分型（Yang *et al.*, 2009）和对 25 种细菌进行鉴定（Cheng *et al.*, 2006）；Jin 等根据 *ssA* 基因在李斯特菌不同种间的差异利用 HRM 技术进行鉴定（Jin *et al.*, 2012）；Bingga 等利用 HRM 技术对犬细小病毒的 CPV-2、CPV-2A、CPV-2b、CPV-2c、CPV-疫苗株进行了很好的区分（Bingga *et al.*, 2014）；Li 等成功的运用 HRM 技术建立了常见的血吸虫不同种类的检测方法（Li *et al.*, 2015）。

利用 HRM 技术对微生物分型也是一个重要的应用方向。Bratchikov 等根据沙门

菌 CRISPR 序列及一些其他可变序列扩增不同的片段，根据不同片段熔解时呈现的不同形态对沙门菌进行分型 (Bratchikov *et al.*, 2011)；Price 等利用 HRM 技术对不同空肠弯曲杆菌的 CRISPR 序列进行分析 (Price *et al.*, 2007)；Stephens 等利用金黄色葡萄球菌 *spa* 基因上存在的多个位点突变对其进行 HRM 技术分型 (Stephens *et al.*, 2008)。

另外，HRM 技术还常用于耐药基因的检测，Lee 等利用 PCR-HRM 直接对结核分枝杆菌喹诺酮和链霉素类的基因 *gyrA*、*rpsL*、*rrs* 进行检测，解决了传统依靠测序比较氨基酸位点变化费时费力的问题 (Lee *et al.*, 2012)；HRM 技术在肺炎克雷伯菌 (Andersson *et al.*, 2009)、肠炎沙门菌 (Slinger *et al.*, 2007) 及肺炎支原体 (Wolff *et al.*, 2008) 等耐药检测方面的应用都有报道。相信 HRM 技术在未来耐药基因的筛选和耐药基因的检测方面会发挥更重要的作用。

## 1.7 研究目的及意义

沙门菌是一种危害全球的人兽共患病原菌，其可以在人、动物、食品及环境中循环传播，给人类健康和畜禽养殖都带来了严重的危害。本研究首先对广东省鸡肉、猪肉及兽医临床中沙门菌流行情况进行调查，目的是掌握广东省动物源沙门菌流行特点及规律，为预防和控制该病原菌提供了理论依据；其次，准备对分离到的沙门菌进行了耐药性、产 ESBLs 基因流行情况和 I 型整合子携带情况进行了全面检测，为临床合理用药提供参考，也为监测耐药基因流行情况提供最新数据，对深入耐药机制研究打下基础；最后，建立两种危害家禽最主要的沙门菌-鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的 PCR-HRM 快速检测方法，为养殖场诊断和净化该疾病提供方法学支撑。

## 第二章 广东省动物源沙门菌流行特点

### 2.1 引言

沙门菌是重要的人兽共患病原菌，其血清型繁多，目前全球已鉴定出 2500 多种血清型，许多沙门菌对动物有致病性，也能通过食物感染人，是引起人类食物中毒的主要病原菌，另外，随着抗菌药物在养殖中的长期添加，其日趋严重的耐药性也可传递给人类，因此，动物源沙门菌的流行情况和耐药性已成为全球关注的公共卫生问题。中国是肉食品消费大国，饮食结构中主要的肉食品为鸡肉和猪肉。然而中国目前肉食品加工体系还不完善，很多肉食品检疫不严格，而且销售环境卫生管理和消毒不完善，从而造成很多食源性疾病的爆发和流行（Zhang *et al.*, 2016）。

广东省 2009 年建立了沙门菌监控实验室，主要是针对各医院沙门菌流行和爆发情况进行监测（Deng *et al.*, 2012），而动物源食品被认为是沙门菌的重要载体，在兽医及食品上缺乏沙门菌流行病学数据。广东地区是动物源食品生产和消费大省，该地区气候湿热，适宜很多食源性病原菌的增殖和扩散，加强该地区流行病学调查工作、制定合理的防控措施是减少食源性病原菌感染的关键。

本研究旨在调查广东地区鸡肉、猪肉和临床中沙门菌污染情况，明确动物源沙门菌的主要流行血清型和耐药状况，为临床合理使用抗菌药物和耐药机制研究提供基础工作，为预防和控制该病对人和动物的危害提供参考数据。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 材料

##### 2.2.1.1 样品来源

2015 年 5 月到 12 月，从广东省 5 个市（广州市，深圳市，韶关市，云浮市，河源市）采集零售肉食品样品 391 份，其中鸡肉样品 263 份，猪肉样品 128 份。如图 2.1 所示，每个城市的地理位置，其中广州市采样选择天河区、海珠区、越秀区及白云区，每个区选择 3 个农贸市场和一个大型超市。采样方式如下：广州市每月不同区定期采样一次；广东省其它市区每月定期采样一次，采样类型为每个城市挑选 3 个农贸市场和一个大型超市采样。另外，在此期间实验室对临床送检疑似沙门菌感染的鸡（17 份）、鸭（5 份）、鹅（1 份）、猪（2 份）病料 24 份进行沙门菌分离鉴定。



图 2.1 广东省采样地点

#### 2.2.1.2 标准菌株

PCR 鉴定所用标准菌株鼠伤寒沙门菌标准株 LT2 和大肠杆菌 ATCC 25922 均购于中国兽医药品监察所。

#### 2.2.1.3 引物

参考国标 GB/T 28642-2012 《饲料中沙门菌的快速检测方法-聚合酶链式反应 (PCR) 法》中以沙门菌 *invA* 基因为扩增对象的特异性引物, 由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成, 如图 2.1。耐药基因根据参考文献选取, 如图 2.2。

表 2.1 沙门菌鉴定引物序列

目的基因	引物	引物序列 (5'-3')	产物
<i>invA</i>	Jsalm-UP	TCGCACCGTCAAAGGAACCGTAAAGC	331bp
	Jsalm-LOW	GCATTATCGATCAGTACCAGCCGTCT	

表 2.2 耐药基因 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<sub>CTX-M</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M</sub>-F</i>	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	543bp	(Usha <i>et al.</i> , 2008)
	<i>bla<sub>CTX-M</sub>-R</i>	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub>-F</i>	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1083bp	(Brinas <i>et al.</i> , 2005)
	<i>bla<sub>TEM</sub>-R</i>	GACAGTTACCAATGCTTAATC		
<i>bla<sub>OXA</sub></i>	<i>bla<sub>OXA</sub>-F</i>	ACACAATACATATCAACTTCGC	813bp	(Weill <i>et al.</i> , 2004)
	<i>bla<sub>OXA</sub>-R</i>	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC		
整合酶	<i>int I-F</i>	CCTCCCGCACGATGATC	280bp	(Bass <i>et al.</i> , 1999)
	<i>int I-F</i>	TCCACGCATCGTCAGGC		
I 型整合子	<i>int I-F</i>	GGCATCCAAGCAGCAAG	不定	(Levesque <i>et al.</i> , 1995)
	<i>int I-R</i>	AAGCAGACTTGACCTGA		

#### 2.2.1.4 主要试剂及其配制

缓冲蛋白胨水 (BPW)、木糖赖氨酸脱氧胆盐 (XLD) 琼脂、XLT4 琼脂、RV 肉汤、四硫磺酸钠煌绿增菌液 (TTB)、LB 营养琼脂、LB 培养基、胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)、MH 培养基、三糖铁琼脂 (TSI)、尿素琼脂 (Urea)、半固体营养琼脂、无菌采样袋均为青岛海博生物技术有限责任公司产品。MH 琼脂为广州环凯微生物有限公司产品；细菌微量生化反应管葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、尿素、枸橼酸盐、吲哚、V-P 试验、甲基红、赖氨酸脱羧酶、L-阿拉伯糖、水杨苷、D-山梨醇、L-鼠李糖和棉子糖等微量发酵管均购自杭州天和微生物试剂有限公司；氧化酶购自法国生物梅里埃公司；十二烷基硫酸钠 (SDS)、三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris HCl)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、硼酸、氯化钠和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 购自 Sigma 公司；Tryptone 和 Yeast extract 购自英国 Oxoid 公司；DNA Marker DL2000、rTaq DNA 聚合酶 (Premix Taq)、蛋白酶 K 购自 TaKaRa 公司；Goldview 核酸染料、脱脂奶粉购自天根生化科技有限公司；1 mol/L Tris-HCl (pH8.0)、0.5mol/L EDTA (pH8.0)、5×TBE 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 (SDS)、氯化钠、NaOH 购自 Sigma 公司。

磷酸盐缓冲液(PBS): 取 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液 40.5 mL 与 0.2 mol/L 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液 9.5 mL 混合, 加入 8.2 g NaCl, 用去离子水定容至 1000 mL, 即为 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS。

20% SDS: 称取 20 g 分析纯 SDS, 使用超纯水充分溶解并定容至 100 mL, 121°C 灭菌 30 min。

TE 缓冲液 (pH 8.0): 1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 2 mL 0.5mol/L 的 EDTA, pH 8.0; 用无菌超纯水稀释至 1000mL。

0.5×TBE Buffer: 200 mL 5×TBE 用纯水稀释到 2000 mL。

凝胶块琼脂糖(1% SeaKem Gold:1% SDS): 称 0.5 g(或 0.25 g)SeaKem Gold(SKG) 琼脂糖凝胶到 250 mL 螺帽瓶中; 加入 47.0 mL (或 23.5 mL) TE 缓冲液, 轻旋转瓶以分散 SKG 胶; 取下瓶盖, 用干净膜盖住瓶口, 微波加热, 直到胶完全熔化; 把瓶放到 55~60°C 水浴保温 5 min; 加入 2.5 mL (或 1.25 mL) 预热至 55°C 的 20% SDS, 混匀。盖好瓶口, 保温于 55~60°C 水浴备用。

Gelred 染液: 用无细胞毒性的核酸染料 Gelred 替代 EB, 配制 500 mL 的方法是在 450 mL 纯水中加入 50 mL 的 1M NaCl 和 150  $\mu\text{l}$  的 Gelred 染料。

10%的脱脂牛奶: 称取 10 g 脱脂奶粉用纯水定容至 100 mL, 用玻璃棒搅匀, 115°C 高压灭菌 20 min。

#### 2.2.1.5 诊断血清

诊断血清为泰国 S&A 公司产品, 包括 Vi 因子血清、O 多价 A-F 群血清; O 复合因子血清 3 种: O4,12、O9,12、O3,19; O 单因子血清 15 种: O2、O4、O5、O7、O8、O9、O10、O11、O14、O15、O19、O20、O27、O34、O46; H 多价血清 4 种: H 多价血清 1 (a, b, c, d, I)、H 多价血清 2 (e,h; e,n,x; f,g; g,m,s; g,p; m,t)、H 多价血清 3 (k; l,v; r; y; z; z10)、H 多价血清 4 (1,2; 1,5; 1,6; 1,7; z6); H 复合因子血清 5 种: He,h、He,n,x、Hl,v、Hg,p、H1,2,3,5; H 因子血清 31 种 Ha、Hb、Hc、Hd、Hf、Hg、Hh、Hi、Hk、Hm、Hn、Hp、Hr、Hs、Ht、Hu、Hv、Hw、Hx、Hy、Hz、Hz6、Hz10、Hz13、Hz15、Hz28、Hz29、H2、H5、H6、H7。

#### 2.2.1.6 药敏纸片

药敏纸片 (OXOID, 英国) 种类及药敏实验判定标准见表 2.3。

表 2.3 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	AMX	≤13	14-17	≥18
头孢类	头孢西丁	CFX	≤14	15-17	≥18
	头孢曲松	CRO	≤13	14-20	≥21
氨基糖甙类	链霉素	STR	≤11	12-14	≥15
	庆大霉素	GEN	≤12	13-14	≥15
	卡那霉素	KAN	≤13	14-17	≥18
	阿米卡星	AMK	≤14	15-19	≥17
喹诺酮类	萘啶酸	NA	≤13	14-18	≥19
	环丙沙星	CIP	≤15	16-20	≥21
	左氟沙星	LEV	≤13	14-16	≥17
	加替沙星	GAT	≤14	15-17	≥18
四环素类	四环素	TET	≤11	12-14	≥15
氯霉素类	氯霉素	CHL	≤12	13-17	≥18
磺胺类	磺胺异恶唑	SIZ	≤12	13-16	≥17
	复方新诺明	SXT	≤10	11-15	≥16

### 2.2.1.7 主要仪器设备

SHP-250 生化培养箱（上海精宏实验设备有限公司）

YJ-1450 超净工作台（苏州净化设备厂）

5424R 高速冷冻离心机（Eppendorf 公司）

JY2001 电子天平（上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂）

MLS-3780 高温蒸汽灭菌锅（日本 Sanyo 公司）

DK-500 恒温水浴锅（上海精宏实验设备有限公司）

PTC-200 PCR 仪（美国 MJ ReSearch 公司）

Gel Doc XR 凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）

Elix100 纯净水装置（美国 Millipore 公司）

DESICHECK 比浊仪（法国 BioMerieux 公司）

FreeZone 6L 冷冻干燥机（美国 Labconco 公司）

## 2.2.2 方法

### 2.2.2.1 样品采集

样品采集和分离方法主要根据国家标准（GB 4789.4-2010）结合参考文献进行（Yang *et al.*, 2010）。零售市场随机抽取整只肉鸡或者 250g 左右猪肉装入无菌采样袋内，所有样品采集后均置于低温保存箱中（泡沫箱内加冰块），从样品采集到送至实验室时间不超过 8 h。

脱毛屠宰整鸡和猪肉样品用 400 ml 无菌 BPW 充分振荡、洗涤后将含菌 BPW 转移至无菌三角瓶，充分振荡。含菌 BPW 置 37 °C、100 r/min 条件下增菌 6 h 后，轻轻摇动培养过的样品混合物，移取 1 mL，转种于 10 mL TTB 内，于 42 °C±1 °C 培养 18 h~24h。同时，另取 1 mL，转种于 10 mL SC 内，于 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

分别用接种环取选择性增菌液 1 环，TTB 划线接种于 XLT4 琼脂平板，SC 划线接种于 XLD 琼脂平板。于 36 °C±1 °C 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。挑取典型的沙门菌菌落，进行下一步生化鉴定和 PCR 鉴定。

### 2.2.2.2 沙门菌的鉴定

生化鉴定选择沙门菌生化鉴定试剂盒鉴定。从营养琼脂平板上挑取可疑菌落，用生理盐水制备成浊度适当的菌悬液，按照生化鉴定试剂盒说明书进行鉴定。鉴定流程及结果如图 2.2 所示。

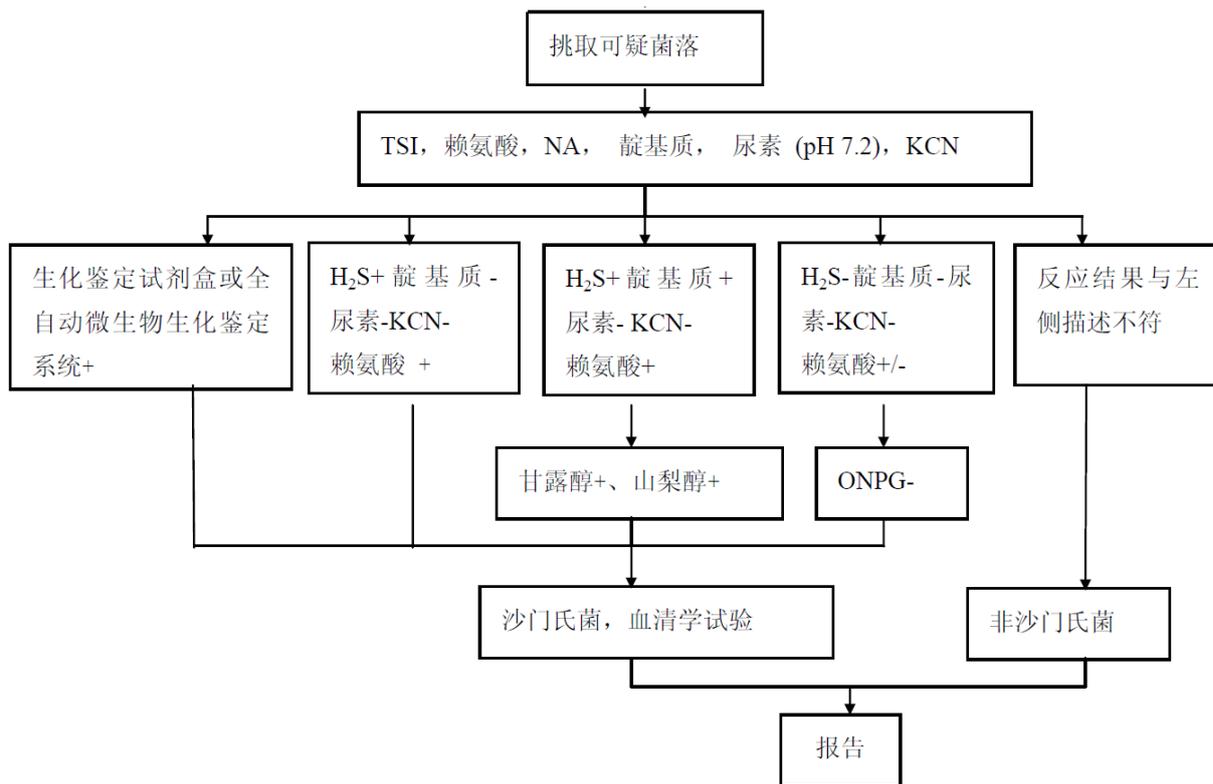


图 2.2 沙门菌生化鉴定方法

沙门菌分离株的 PCR 鉴定：用煮沸法提取疑似沙门菌的 DNA，将疑似菌落培养 12-18 h，取 1 mL 菌液加入 1.5 mL 离心管中，10000 r/min 离心 5 min，弃上清液，加入 200  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 混匀，置沸水中煮沸 10min，立刻冰浴 10 min，再以 12000 r/min 离心 3 min，取上清液即为模板，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。按照表 2.4 的反应体系进行 PCR 鉴定，鉴定时同时设置阴阳性对照。

表 2.4 PCR 扩增体系

试剂	用量 ( $\mu$ L)
Premix Ex Taq	12.5
模板 DNA	2
引物 Jsalm-UP (10 $\mu$ mol)	1
引物 Jsalm-LOW (10 $\mu$ mol)	1
无菌水	8.5
总体积	25

反应条件：95℃变性 5 min；95℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 1min，72℃ 10 min，PCR 产物 4℃保存。

PCR 产物分析：用 0.5×TBE 电泳缓冲液配制 1.0%琼脂糖凝胶，微波炉熔胶至澄清透明，冷却至不烫手时向每 100 mL 琼脂糖凝胶中加入 0.5 μL GoldView，轻轻摇匀，倒入插有梳子的模具中，待琼脂糖凝胶完全凝固后拔出梳子，将胶块放入加有足够电泳缓冲液的电泳槽中。以 DNA Marker DL2000 作为分子质量标准，取 5 μL 电泳产物，以 100V 电压电泳 30 min 后，进行凝胶紫外成像系统观察并拍照和结果分析。

### 2.2.2.3 沙门菌的保存与复苏

保存：将纯化并确定为沙门菌的细菌在 LB 营养琼脂平板上密集划线，培养 16~18 h 后，向每个长有沙门菌的培养皿中加入 5 mL 10%的灭菌脱脂牛奶，用灭菌三角玻璃棒将细菌菌落从琼脂平板上刮下来，并在脱脂牛奶中混匀，用移液器吸取 2.5 mL 混有沙门菌的脱脂牛奶加入西林瓶中，冰冻成块后，用冻干机抽干水份，保存于-80℃冰箱。

复苏：将冻存的沙门菌接种于 LB 肉汤中，复苏 8 h，然后接种于 XLD 平板培养 24 h，挑取典型的沙门菌单菌落，接种于 LB 琼脂上。37℃培养 14~18 h。

### 2.2.2.4 沙门菌的血清型鉴定

血清型测定方法主要按照泰国 S&A 公司提供的沙门菌诊断血清操作步骤和说明进行，具体如下：

将待测沙门菌纯种培养物划线接种在半固体营养琼脂斜面，37℃培养过夜，备用；用胶头滴管吸取适量沙门菌 A-I 群多价抗 O 血清滴加于干净的载玻片表面，同时用生理盐水做阴性对照；用接种环从斜面顶部取适量菌体（抗原），将其充分分散于抗血清中，在 1 min 之内观察抗血清中是否有凝集现象发生；选择能被 A-I 多价 O 抗血清凝集的沙门菌，再依次用 O21、O28、O30、O35、O39、O40、O41、O48、O61 等沙门菌 O 群抗血清因子进行凝集试验，判定 O 群；再用 O1、O2、O4、O5、O61、O62、O7、O8、O9、O10、O12、O14、O15、O19、O20、O22、O23、O25、O27、O34 和 O46 等 O 单因子血清进行定型；对于不被 A-I 多价血清凝集者，先用沙门菌因子血清中的 9 种多价 O 血清检查，如果一种血清凝集，则用包含的 O 群血清逐一检查，以确定 O 抗原；使用同 O 血清型鉴定相同的方法确定沙门菌的 H 抗原。

使用的 H 相抗血清共 12 种，包括：Ha、Hb、Hc、Hd、Hi、Hk、Hr、Hy、Hz、Hz6、Hz10 和 Hz29 等；沙门菌 H 单因子抗血清共 19 种，包括：Hf、Hg、Hh、Hm、Hnx、Hp、Hs、Ht、Hu、Hv、Hw、Hx、H2、H5、H6、H7、Hz13、Hz15 和 Hz28 等；如 H 项抗原无凝集反应者，取少量该菌接种于含有 H 抗原诱导相抗血清（诱导抗血清的类型由该菌 O 抗原的抗原型确定）的半固体营养琼脂培养基中，37℃培养过夜后就得到只暴露有另一相鞭毛的菌株，再进行 H 项的单因子凝集试验以确定 H 相抗原型；查阅 S&A 公司沙门菌抗血清诊断结果表格或沙门菌检验国家标准，根据测定得到的抗原式确定沙门菌的血清型。

#### 2.2.2.5 药物敏感性试验

根据世界卫生组织推荐的 K-B 纸片扩散法和美国临床实验室标准化委员会（Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI）推荐的操作规程，以大肠杆菌 ATCC 25922 为药敏实验质控菌株，测定沙门菌阳性菌株药物敏感性。

选琼脂平板上形态相同的菌落至少 4-5 个，用接种环挑其顶部，移至 4-5ml LB 培养液中；置 37℃培养至菌液浓度达到或超过比浊管浓度（一般需 2-6 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，调节细菌悬液使浊度至 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，贴在已接种细菌的平板表面，每个平板贴 5 张纸片，每张纸片间距不少于 24 mm，纸片中心距皿边缘不少于 15 mm。纸片一旦与平板接触，不应再移动。贴好纸片的培养基于 37℃培养 16~18 h；先读取质控菌株的抑菌环直径，如果在 CLSI 规定的药敏范围内，再用刻度尺测量各纸片抑菌环直径，并根据抑菌圈直径判定敏感、中敏或耐药。

#### 2.2.2.6 耐药基因及整合子检测

根据表 2.2 的序列合成引物，以沙门菌的总 DNA 为模板，参考 TaKaRa Premix Ex Taq 酶的使用说明书进行 PCR 扩增，同时设置阴阳性对照，扩增后的产物使用琼脂糖凝胶电泳检测。扩增体系见表 2.5，PCR 反应条件见表 2.6。

表 2.5 耐药基因及整合子检测 PCR 反应体系

试剂	用量 ( $\mu\text{L}$ )
Premix Ex Taq	12.5
模板 DNA	1
上游引物 (20 $\mu\text{mol}$ )	1
下游引物 (20 $\mu\text{mol}$ )	1
无菌水	9.5
总体积	25

表 2.6 耐药基因及整合子检测 PCR 扩增条件

目的基因	PCR 反应条件		
	预变性	扩增 (35 个循环)	终延伸
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	94°C, 5min	(94°C, 45s) (56°C, 30s) (72°C, 30s)	72°C, 10min
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	94°C, 5min	(94°C, 45s) (55°C, 30s) (72°C, 30s)	72°C, 10min
<i>bla<sub>OXA</sub></i>	94°C, 5min	(94°C, 45s) (57°C, 30s) (72°C, 30s)	72°C, 10min
整合酶	94°C, 5min	(94°C, 45s) (58°C, 30s) (72°C, 30s)	72°C, 10min
基因盒	94°C, 5min	(94°C, 45s) (55°C, 30s) (72°C, 30s)	72°C, 10min

### 2.2.2.7 序列测定与分析

选取基因盒扩增结果为阳性的扩增产物进行产物回收，产物回收和纯化操作按照说明书进行(Omega)。回收的片段在核酸蛋白分析仪上测定核酸浓度后连接 pMD19-T 载体 (TaKaRa)，连接后的产物转化到感受态细胞 (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英潍捷基 (上海) 贸易有限公司测序。测序结果通过软件 DNASTar 进行拼接，拼接后序列在 NCBI BLAST 比对。

## 2.3 结果及分析

### 2.3.1 沙门菌分离鉴定

本研究共分离到沙门菌 273 株，其中包括鸡肉 153 株（分离率 58.2%），猪肉 96 株（分离率 75.0%），在此期间，从临床疑似沙门是感染的鸡、鸭、鹅和猪病料中分离到沙门菌 24 株。273 株沙门菌在 XLD 和 XLT4 选择性琼脂平板上呈现光滑、圆形、中心为黑色、边缘透明的菌落；在沙门菌显色培养基上为紫色、圆润半透明菌落；在 LB 培养基上为白色、光滑半透明菌落。如图 2.3。对分离到的 273 株沙门菌进行 PCR 和生化鉴定，结果均符合沙门菌生化特征，具体生化结果见表 2.7。

不同采样地点鸡肉和猪肉中沙门菌分离情况如表 2.8 和图 2.4 所示。

表 2.7 沙门菌生化试验结果

试剂	生化反应	试剂	生化反应
葡萄糖(Glucose)	+	ONPG 赖氨酸脱羧酶 (Lysine—decarboxylase)	-/+
乳糖(Lactose)	-	氧化酶(Oxidase)	+
麦芽糖(Mannose)	+	L-阿拉伯糖( Arabinose)	-
D-甘露醇( D-Mannitol)	+	水杨苷(Salicin)	+
蔗糖(Sucrose)	-	D-山梨醇(D-Sorbitol)	-/+
尿素(Urea)	-	H <sub>2</sub> S(在三糖铁上)	+
枸橼酸盐(Citrate)	+	L-鼠李糖( L-rhamnose)	+
吲哚(Benzo pyrrole)	-	棉子糖(Raffinose)	-
V-P 试验(V-P test)	-	运动性(Sport)	+
甲基红( Methyl red)	+		

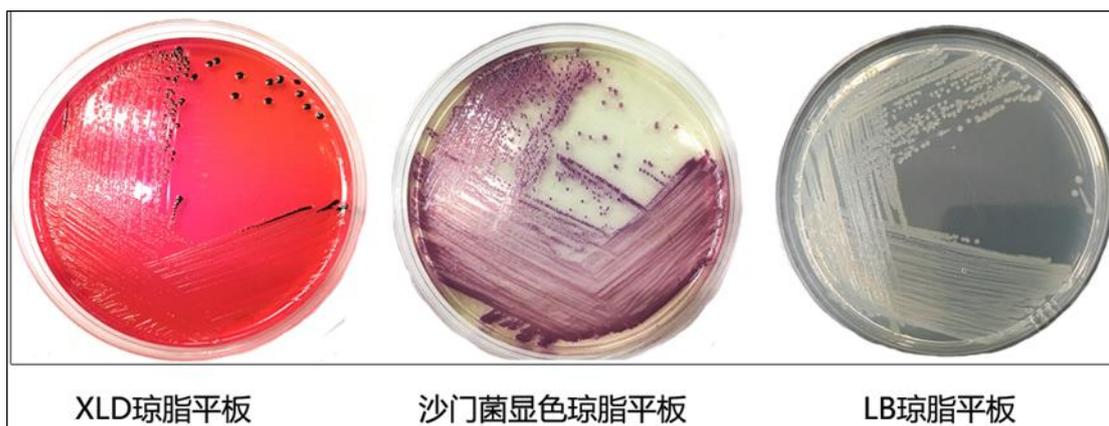


图 2.3 不同琼脂平板上沙门菌形态

表 2.8 不同采样地点鸡肉和猪肉源沙门菌阳性率

地区	鸡肉			猪肉		
	样品数	阳性数	分离率(%)	样品数	阳性数	分离率(%)
广州	143	88	61.5	64	52	81.3
深圳	30	16	53.3	16	14	87.5
韶关	30	26	86.7	16	9	56.3
云浮	30	13	43.3	16	12	75.0
河源	30	10	33.3	16	9	47.4
合计	263	153	58.2	128	96	75.0

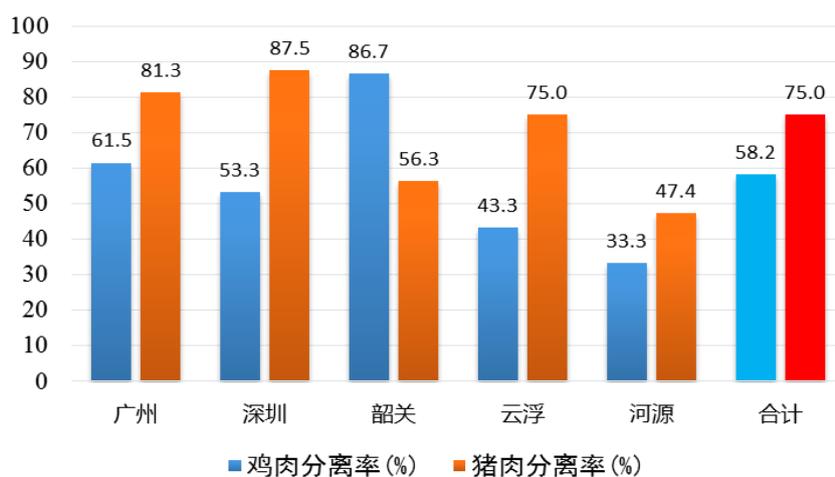


图 2.4 广东省部分地区鸡肉和猪肉中沙门菌阳性样品比例

从各个地区采样结果可以看出，猪肉的分离率（75.0%）高于鸡肉（58.2%），鸡肉分离率最高的地区为韶关市，达到了 86.7%，其次为广州市，阳性率为 61.5%。猪肉中沙门菌分离率最高的地区是深圳市（87.5%），其次为广州市（81.3%）。综上，广东省沙门菌分离率较高，说明动物源沙门菌污染严重。另外，临床样品都为感染沙门菌的病料，所以计算分离率无意义，以上数据没有对临床中分离情况进行比较。

### 2.3.2 沙门菌血清分型结果

对所有分离菌株进行血清型鉴定，共鉴定出 28 个血清型，其中鸡肉中鉴定出 24 个血清型，猪肉中鉴定出 10 个血清型，临床样品鉴定出 4 个血清型。仅存在于鸡肉中的血清型有哈达尔沙门菌、肠炎沙门菌、布伦登卢普沙门菌、塞罗沙门菌、海德堡沙门菌等，仅存在于猪肉中的沙门菌有斯坦利沙门菌、山夫登堡沙门菌、吉韦沙门菌和黄金海岸沙门菌。临床分离到的四个血清型沙门菌在鸡肉或猪肉中都存在。

总体分离率最高的血清型为鼠伤寒沙门菌（53 株，19.4%）、科瓦利斯沙门菌（34 株，12.5%）和德比沙门菌（26 株，9.5%）；检出率较低或者不常见的沙门菌血清型有旺兹沃思沙门菌、明尼苏达沙门菌、胥戈成格隆沙门菌、黄金海岸沙门菌。鸡肉中分离率最高的血清型为科瓦里斯沙门菌（31 株，20.3%）、阿贡纳沙门菌（23，15.0%）和哈达尔沙门菌（14，9.2%）；猪肉菌株中主要为鼠伤寒沙门菌（31 株，32.3%）、德比沙门菌（17 株，17.7%）和罗森沙门菌（17 株，17.7%）；兽医临床菌株共鉴定出血清型 4 个，主要为鼠伤寒（14 株，58.3%）。如表 2.9。

综上，不同样品类型动物源沙门菌优势血清型不同，鸡肉中科瓦利斯沙门菌检出率最高，而猪肉和临床样品鼠伤寒沙门菌居多，特别是兽医临床病料中，鼠伤寒沙门菌占据了很高的比例（58.3%），由此可见，血清型分布的种类和不同样品类型有很大关系。

表 2.9 广东省动物源沙门菌血清型分布

血清型	总数	样品类型		
		鸡肉	猪肉	临床
鼠伤寒	53	8	31	14
科瓦利斯	34	31	2	1
德比	26	9	17	0
阿贡纳	24	23	1	0
罗森	21	4	17	0
肯塔基	18	17	1	0
印第安纳	18	10	0	8
哈达尔	14	14	0	0
韦太夫雷登	9	3	6	0
伦敦	9	2	7	0
阿尔巴尼	8	7	0	1
火鸡	6	2	4	0
肠炎	3	3	0	0
布伦登卢普	3	3	0	0
塞罗	3	3	0	0
斯坦利	3	0	3	0
山夫登堡	3	0	3	0
海德堡	2	2	0	0
利奇菲尔德	2	2	0	0
姆班达卡	2	2	0	0
婴儿	2	2	0	0
海法	2	2	0	0
非丁伏斯	2	1	1	0
吉韦	2	0	2	0
旺兹沃思	1	1	0	0
明尼苏达	1	1	0	0
胥戈成格隆	1	1	0	0
黄金海岸	1	0	1	0

### 2.3.3 药敏试验结果

对分离到的 273 株沙门菌进行 16 种抗菌药物药敏试验, 结果显示, 耐药率最高的为四环素 (76.2%), 其次为磺胺异恶唑 (48.0%)、复方新诺明 (41.0%) 和氨苄西

林（41.4%）等；较为敏感的药物有头孢西丁（1.1%）、加替沙星（2.9%）和左氟沙星（4.4%）（见图 2.5）。对广东省不同来源沙门菌整体耐药水平分析，整体耐药率鸡肉和猪肉相似，然而临床分离菌株耐药水平显著高于肉食品（ $P<0.05$ ），临床菌株对氨苄西林、四环素和萘啶酸的耐药率达到了 70%以上，对青霉素类、氨基糖苷类及磺胺类药物也都达到了很高的耐药水平，具体见图 2.6。

头孢西丁、头孢曲松、左氟沙星和加替沙星耐药率分别在 1.1%、7.0%、4.4%和 2.9%。这些药物是治疗感染性疾病的高级药物，在本次调查中都出现了耐药的情况（具体见表 2.10）。

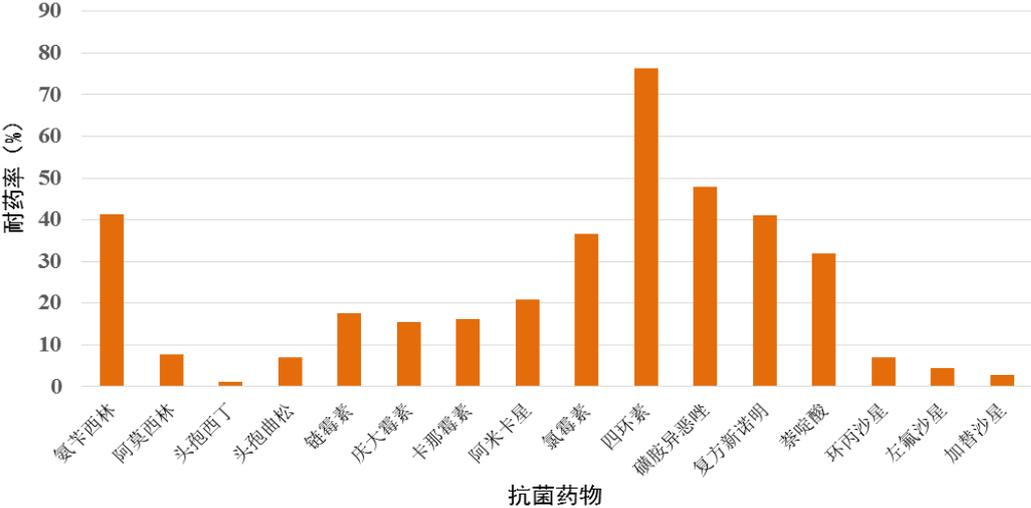


图 2.5 沙门菌总体耐药比率

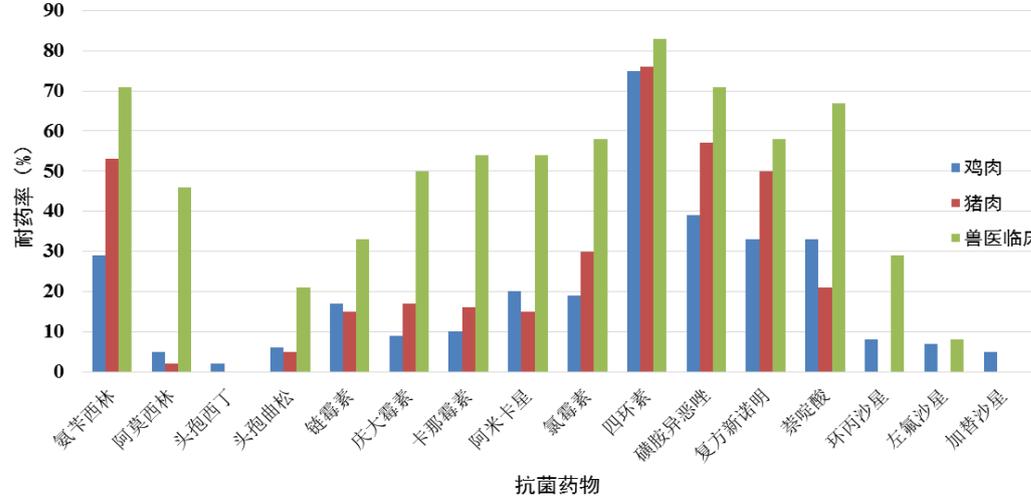


图 2.6 不同来源沙门菌耐药比率

表 2.10 不同样品类型沙门菌的药物敏感性结果

		AMP	AMX	CFX	CRO	STR	GEN	KAN	AMK	CHL	TET	SIZ	SXT	NA	CIP	LEV	GAT
鸡	R	<b>29.4%</b>	<b>5.2%</b>	<b>2.0%</b>	<b>5.9%</b>	<b>17.0%</b>	<b>9.2%</b>	<b>10.5%</b>	<b>19.6%</b>	<b>37.3%</b>	<b>75.2%</b>	<b>38.6%</b>	<b>32.7%</b>	<b>33.3%</b>	<b>7.8%</b>	<b>6.5%</b>	<b>5.2%</b>
肉		45/153	8/153	3/153	9/153	26/153	14/153	16/153	30/153	57/153	115/153	59/153	50/153	51/153	12/153	10/153	8/153
	I	1.3%	12.4%	0.0%	1.3%	11.1%	0.7%	11.1%	15.0%	0.7%	0.7%	11.1%	0.0%	3.3%	3.3%	1.3%	0.0%
		2/153	19/153	0/153	2/153	17/153	1/153	17/153	23/153	1/153	1/153	17/153	0/153	5/153	5/153	2/153	0/153
	S	69.3%	82.4%	98.0%	92.8%	71.9%	90.2%	78.4%	65.4%	62.1%	24.2%	50.3%	67.3%	63.4%	88.9%	92.2%	94.8%
		106/153	126/153	150/153	142/153	110/153	138/153	120/153	100/153	95/153	37/153	77/153	103/153	97/153	136/153	141/153	145/153
猪	R	<b>53.1%</b>	<b>2.1%</b>	<b>0.0%</b>	<b>5.2%</b>	<b>14.6%</b>	<b>16.7%</b>	<b>15.6%</b>	<b>14.6%</b>	<b>30.2%</b>	<b>76.0%</b>	<b>57.3%</b>	<b>50.0%</b>	<b>20.8%</b>	<b>0.0%</b>	<b>0.0%</b>	<b>0.0%</b>
肉		51/96	2/96	0/96	5/96	14/96	16/96	15/96	14/96	29/96	73/96	55/96	48/96	20/96	0/96	0/96	0/96
	I	0.0%	7.3%	0.0%	0.0%	4.2%	0.0%	5.2%	12.5%	3.1%	2.1%	6.3%	2.1%	6.3%	15.6%	0.0%	0.0%
		0/96	7/96	0/96	0/96	4/96	0/96	5/96	12/96	3/96	2/96	6/96	2/96	6/96	15/96	0/96	0/96
	S	46.9%	80.2%	100.0%	94.8%	81.3%	83.3%	79.2%	72.9%	66.7%	21.9%	36.5%	47.9%	72.9%	84.4%	100.0%	100.0%
		45/96	77/96	96/96	91/96	78/96	80/96	76/96	70/96	64/96	21/96	35/96	46/96	70/96	81/96	96/96	96/96
临	R	<b>70.8%</b>	<b>45.8%</b>	<b>0.0%</b>	<b>20.8%</b>	<b>33.3%</b>	<b>50.0%</b>	<b>54.2%</b>	<b>54.2%</b>	<b>58.3%</b>	<b>83.3%</b>	<b>70.8%</b>	<b>58.3%</b>	<b>66.7%</b>	<b>29.2%</b>	<b>8.3%</b>	<b>0.0%</b>
床		17/24	11/24	0/24	5/24	8/24	12/24	13/24	13/24	14/24	20/24	17/24	14/24	16/24	7/24	2/24	0/24
	I	0.0%	12.5%	0.0%	0.0%	12.5%	0.0%	0.0%	0.0%	4.2%	0.0%	4.2%	0.0%	0.0%	0.0%	12.5%	12.5%
		0/24	3/24	0/24	0/24	3/24	0/24	0/24	0/24	1/24	0/24	1/24	0/24	0/24	0/24	3/24	3/24

S	29.2%	41.7%	100.0%	79.2%	54.2%	50.0%	45.8%	45.8%	37.5%	16.7%	25.0%	41.7%	33.3%	70.8%	79.2%	87.5%
	7/24	10/24	24/24	19/24	13/24	12/24	11/24	11/24	9/24	4/24	6/24	10/24	8/24	17/24	19/24	21/24
总 R	<b>41.4%</b>	<b>7.7%</b>	<b>1.1%</b>	<b>7.0%</b>	<b>17.6%</b>	<b>15.4%</b>	<b>16.1%</b>	<b>20.9%</b>	<b>36.6%</b>	<b>76.2%</b>	<b>48.0%</b>	<b>41.0%</b>	<b>31.9%</b>	<b>7.0%</b>	<b>4.4%</b>	<b>2.9%</b>
	113/253	21/253	3/253	19/253	48/253	42/253	44/253	57/253	100/253	208/253	131/253	112/253	87/253	19/253	12/253	8/253
I	0.7%	10.6%	0.0%	0.7%	8.8%	0.4%	8.1%	12.8%	1.8%	1.1%	8.8%	0.7%	4.0%	7.3%	1.8%	1.1%
	2/253	29/253	0/253	2/253	24/253	1/253	22/253	35/253	5/253	3/253	24/253	2/253	11/253	20/253	5/253	3/253
S	57.9%	78.0%	98.9%	92.3%	73.6%	84.2%	75.8%	66.3%	61.5%	22.7%	43.2%	58.2%	64.1%	85.7%	93.8%	96.0%
	158/253	213/253	270/253	252/253	201/253	230/253	207/253	181/253	168/253	62/253	118/253	159/253	175/253	234/253	256/253	262/253

注：表中 R 表示耐药，I 表示中敏，S 表示敏感；表中耐药谱中抗菌药物的对应名称为：AMP（氨苄西林）、AMX（阿莫西林）、CFX（头孢西丁）、CRO（头孢曲松）、STR（链霉素）、GEN（庆大霉素）、KAN（卡那霉素）、AMK（阿米卡星）、CHL（氯霉素）、TET（四环素）、SIZ（磺胺异恶唑）、SXT（复方新诺明） NA（萘啶酸）、CIP（环丙沙星）、LEV（左氟沙星）、GAT（加替沙星）

多重耐药结果显示，至少耐一种抗生素的菌株为 89.0%，耐三类或三类以上抗生素的沙门菌比例在 51.6%。具体的耐药分布见图 2.7；另外不同来源的菌株耐药也有差异，其中耐药最广的在鸡肉中，耐药谱为 AMP-CRO-GEN-KAN-AMK-CHL-TET-SUL-SXT-NAL-CHL-LVX-GAT，耐药模式最多的依次为 TET（25）、TET-NAL（18）及 AMP-TET-SUL-SXT（10），图 2.11 有具体耐药谱数据。

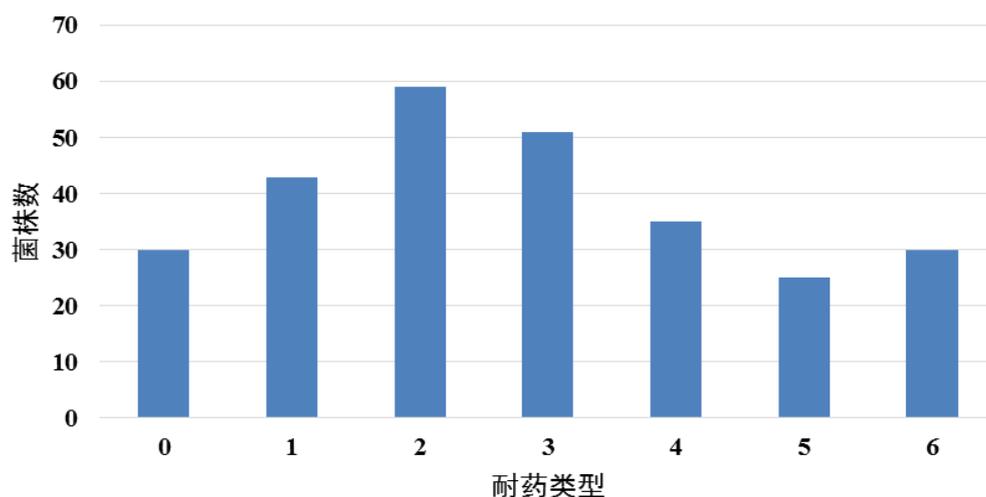


图 2.7 多重耐药分布

表 2.11 沙门菌耐药谱分布

数目	耐药模式	来源
3	AMP-CRO-GEN-KAN-AMK-CHL-TET-SUL-SXT-NAL-CHL-LVX-GAT	鸡肉
2	AMP-AMC-CHL-TET-SUL-SXT-NAL	鸡肉
3	AMP-AMK-CHL-TET-SUL-SXT-NAL	鸡肉
3	AMP-AMK-CHL-TET-SUL-SXT	鸡肉
2	AMP-CHL-TET-SUL-SXT-NAL	鸡肉
3	AMP-CHL-TET-SUL-SXT	鸡肉
3	AMK-CHL-TET-SUL-SXT	鸡肉
2	AMK-TET-SUL-SXT	鸡肉
5	CHL-TET-SUL-SXT	鸡肉
2	STR-TET-SUL	鸡肉

---

2	AMK-CHL-TET	鸡肉
2	CHL-TET-SXT	鸡肉
6	STR-TET	鸡肉
10	CHL-TET	鸡肉
2	TET-SUL	鸡肉
3	TET-SXT	鸡肉
13	TET-NAL	鸡肉
3	CHL	鸡肉
20	TET	鸡肉
5	NAL	鸡肉
5	AMP-GEN-KAN-AMK-CHL-TET-SUL-SXT-NAL	猪肉
2	AMP-GEN-KAN-AMK-CHL-TET-SUL-SXT	猪肉
2	AMP-GEN-KAN-CHL-TET-SUL-SXT-NAL	猪肉
2	AMP-GEN-KAN-CHL-TET-SUL-SXT	猪肉
4	AMP-CHL-TET-SUL-SXT	猪肉
2	AMP-CHL-TET-SUL	猪肉
10	AMP-TET-SUL-SXT	猪肉
2	AMP-TET-SUL	猪肉
4	STR-TET-SUL	猪肉
6	TET-SUL-SXT	猪肉
5	TET-NAL	猪肉
5	TET	猪肉
3	SUL	猪肉
2	SXT	猪肉
3	NAL	猪肉
2	AMP-AMC-GEN-KAN-AMK-CHL-TET-SUL-SXT-NAL-CHL	临床
2	AMP-STR-GEN-KAN-AMK-CHL-TET-SUL-SXT-NAL	临床
3	AMP-GEN-KAN-AMK-CHL-TET-SUL-SXT-NAL	临床
2	STR-TET-SUL	临床

---

### 2.3.4 $\beta$ -内酰胺类耐药基因型与表型相关性

对沙门菌中携带最常见产 ESBLs 三种类型基因检测发现，TEM 检出率为 17.2% (47/273)，CTX-M 检出率为 8.1% (22/273)，OXA 检出率为 9.2% (25/273)，总共有 80 (29.3%) 株菌至少携带一个产 ESBLs 基因。另外，比较携带产 ESBLs 基因和无携带产 ESBLs 基因的菌株发现，二者对氨苄西林、阿莫西林及头孢曲松有显著差异，携带该类基因的菌株表现出明显的对  $\beta$ -内酰胺类药物的耐药，由于对头孢西丁耐药的菌株只有 3 株，无统计意义，具体见图 2.8。

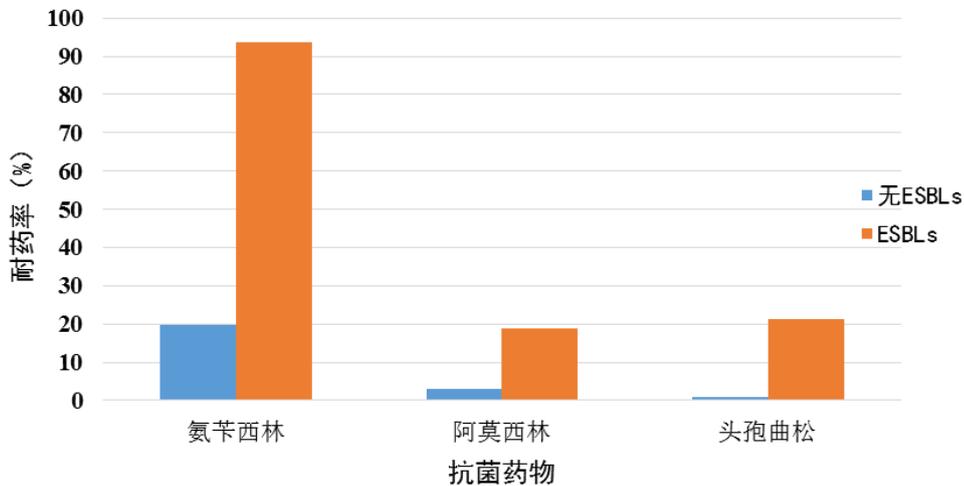


图 2.8 ESBLs 基因携带情况对  $\beta$ -内酰胺类敏感性对比

### 2.3.5 I 型整合子基因盒鉴定结果

采用 PCR 检测 I 型整合酶活性，33.7%检测到整合酶活性，但只有 9.5% 扩增到整合子基因盒。基因盒总共有六类 (A、B、C、D、E 和 F)，其中 *aadA2-dfrA12* 检出率最高。说明 I 型整合子在氨基糖苷类药物和磺胺类药物的耐药基因传播中起着重要作用。沙门菌整合子主要整合了抗氨基糖苷类药物和磺胺类药物的耐药基因，据相关报道，革兰氏阴性菌 I 型整合子主要插入的基因盒以编码氨基糖苷酸转移酶的 *aadA* 基因和编码二氢叶酸还原酶 *dfrA* 基因为主。另外统计发现，整合酶阳性的多重耐药平均值为 3.98，整合酶阴性的多重耐药平均值为 2.18，说明整合子对沙门菌耐药有明显影响。

表 2.12 整合子插入基因盒类型

整合子类型	数目	插入基因类型	编码产物	耐药类型
A	1	<i>aadA1 dfrA1</i>	氨基糖苷酸转移酶 二氢叶酸还原酶	氨基糖苷类 磺胺类、甲氧苄啶类
B	1	<i>aadA7</i>	氨基糖苷酸转移酶	氨基糖苷类
C	1	<i>LinF aadA2</i>	结合林可胺类药物 氨基糖苷酸转移酶	林可胺类 氨基糖苷类
D	3	<i>aadA2</i>	氨基糖苷酸转移酶	氨基糖苷类
E	8	<i>dfrA1</i>	二氢叶酸还原酶	磺胺类、甲氧苄啶
F	12	<i>aadA2 dfrA12</i>	氨基糖苷酸转移酶 二氢叶酸还原酶	氨基糖苷类 磺胺类、甲氧苄啶

## 2.4 小结

本研究从广东省不同地区动物源食品和兽医临床采集的 415 份样品中分离到沙门菌 273 株，经分离、生化鉴定和 PCR 鉴定确定为沙门菌，其中鸡肉和猪肉的分离率分别为 58.2% 和 75.0%。然后对分离株进行血清分型，结果表明，广东省动物源食品中沙门菌污染率高（63.7%），存在很大的食品安全风险。血清型复杂（24 种），有些血清型（如科瓦利斯、韦太夫雷登）危害性强，值得关注。对分离株进行 16 种抗菌药物敏感性实验、产 ESBLs 基因和 I 整合子检测。发现广东省动物源沙门菌对四环素耐药性最高，达到了 76.2%，且耐三类或三类以上抗生素菌株比例在 51.6%，29.3% 的菌株至少携带一个产 ESBLs 基因，33.7% 检测到整合酶活性，9.5% 扩增能到整合子基因盒，其中 *aadA2-dfrA12* 检出率最高。表明广东地区动物源沙门菌耐药性严重，且存在着水平转移的风险。

## 第三章 HRM 检测鸡白痢及鸡伤寒沙门菌方法的建立

### 3.1 引言

鸡白痢病（Pullorum disease）和禽伤寒病（Fowl typhoid）是两个引起家禽高发病率和死亡率的败血性疾病，鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌分别是这两种家禽疾病的病原。鸡白痢病是一种严重的系统性疾病，其主要感染小鸡，并造成小鸡很高的死亡率。禽伤寒病是一种急性或者慢性败血性疾病，各种年龄的家禽均易感（Barrow *et al.*, 2011）。目前，受沙门菌污染的家禽及相关产品已经成为人类沙门菌感染和食物中毒的主要来源之一。另外，随着养禽业的迅猛发展，鸡白痢沙门菌病已成为家禽最重要的细菌病之一，并列如国家中长期动物疫病防治规划（2012-2020），每年造成的经济损失非常可观。

传统的鉴定方法周期长、灵敏度低、特异性差。鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌都属于 D 血清群的成员，利用血清型鉴定他们 O 抗原都是 1、9、12，所以利用血清学检测很难将彼此区分，另外肠炎沙门菌（9,12:g,m:-）的无动力变种（9,12:-:-），因失去 H 相（g,m）抗原表达能力而无法用诊断血清确认（g 和 m 因子），而纯粹依据抗原式（9,12:-:-）则会误判为鸡白痢沙门菌。随着核酸测序技术的发展，很多分子诊断方法的靶点被发现，但是大部分都是根据单个核酸的差异区分这两种菌，如根据 *rfbS*、*fljC* 等基因上规律性单个碱基的变化，利用非等位基因 PCR、或者普通 PCR 后酶切技术（PCR-RFPL）检测单个基因的变化，这些技术流程长、灵敏度低，而且需要后期的核酸电泳判断。所以在国家提倡净化养殖场沙门菌的背景下，寻找一种高效、特异、快速的鸡白痢沙门菌检测方法具有重要的公共卫生意义和经济效益（Shah *et al.*, 2005）。

高分辨率熔解曲线（high-resolution melting, HRM）是一种基于单核苷酸熔解温度不同而形成不同形态熔解曲线的基因分析新技术，在病原菌检测方面成本低、通量高、速度快、结果准确、不受检测位点的局限，实现了真正的闭管操作。在病原菌检测方面有着巨大的应用前景。本研究拟利用 PCR-HRM 技术建立一种快速鉴定鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的分子诊断方法。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 样品来源

本研究总共使用 46 株沙门菌，其中 13 株是标准参考菌株，购于中国兽医微生物菌种保藏中心（CVCC）、中国工业微生物菌种保藏中心（CICC）及美国模式培养物集存库（ATCC）。参考菌株包括鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌各 1 株，其他常见血清型沙门菌 9 株，肠杆菌科其他革兰氏阴性菌 2 株。33 株沙门菌临床分离菌株是在 2009 到 2014 年从全国不同地区患病家禽的肝脏或肛拭子中分离到的。所有菌株前期都经过血清学鉴定确定血清型。具体样品来源如下表 3.1。

表 3.1 菌株信息

菌株	编号	来源	应用
<i>Salmonella Pullorum</i>	CVCC535	CVCC	参考菌株
<i>Salmonella Gallinarum</i>	CICC21510	CICC	参考菌株
<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC13076	ATCC	参考菌株
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC14028	ATCC	参考菌株
<i>Salmonella Agona</i>	ATCC51957	ATCC	参考菌株
<i>Salmonella Weltevreden</i>	ATCC BAA-2568	ATCC	参考菌株
<i>Salmonella Meleagridis</i>	CICC21511	CICC	参考菌株
<i>Salmonella Thompson</i>	ATCC8391	ATCC	参考菌株
<i>Salmonella Senftenberg</i>	ATCC43845	ATCC	参考菌株
<i>Salmonella Stanle</i>	ATCC7308	ATCC	参考菌株
<i>Salmonella Infantis</i>	ATCC BAA-1675	ATCC	参考菌株
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	ATCC	参考菌株
<i>Pasteurella multocida</i>	ATCC12948	ATCC	参考菌株
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd01	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd02	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd03	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd04	Field sample	临床检验

---

<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd05	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd06	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd07	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd08	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd09	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd10	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd11	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd12	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd13	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd14	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd15	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd16	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd17	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd18	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd19	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd20	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd21	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Pullorum</i>	SP-gd22	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Gallinarum</i>	SG-gd01	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Gallinarum</i>	SG-gd02	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Gallinarum</i>	SG-gd03	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Gallinarum</i>	SG-gd04	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Gallinarum</i>	SG-gd05	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Gallinarum</i>	SG-gd06	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Gallinarum</i>	SG-gd07	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Enteritidis</i>	SE-gd01	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Enteritidis</i>	SE-gd02	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Enteritidis</i>	SE-gd03	Field sample	临床检验
<i>Salmonella Enteritidis</i>	SE-gd04	Field sample	临床检验

---

### 3.2.2 主要试剂及其配制

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker DL1000 购自大连 TakaRa 公司。Eva Green 染料由美国 Biotium 公司生产。木糖赖氨酸脱氧胆盐 (XLD) 琼脂、LB 营养琼脂、LB 培养基购自青岛海博生物技术有限责任公司

磷酸盐缓冲液 (PBS): 称 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 溶于 800ml 蒸馏水中, 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 最后加蒸馏水定容至 1L 即可。在 15lb/in<sup>2</sup>(1034×105Pa) 高压下蒸气灭菌 (至少 20 分钟), 保存于室温或 4℃ 冰箱中。

DEPC 水: 按照 1: 1000 的比例将 DEPC 加入到三蒸水中, 室温放置 12h 以上, 高温灭菌。保存存于室温或 4℃ 冰箱中。

含氨苄青霉素 (100μg/ml) 的 LB 液体培养基: 在已经灭菌的 LB 液体培养基中加入氨苄青霉素至浓度为 100μg/ml, 4℃ 保存。

含氨苄青霉素 (100μg/ml) 的 LB 固体培养基: 当灭菌好的 LB 培养基的温度降至 50℃ 左右时, 向培养基中加入氨苄青霉素至终浓度为 100μg/ml, 充分摇匀后倒板, 完全凝固后的培养基 4℃ 保存。

### 3.2.3 主要仪器设备

Rotor-Gene Q (德国 Qiagen 公司)

Nanodrop 2000 (美国 Thermo Scientific 公司)

SHP-250 生化培养箱 (上海精宏实验设备有限公司)

YJ-1450 超净工作台 (苏州净化设备厂)

5424R 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司)

MLS-3780 高温蒸汽灭菌锅 (日本 Sanyo 公司)

DK-500 恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司)

PTC-200 PCR 仪 (美国 MJ ReSearch 公司)

Gel Doc XR 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)

Elix100 纯净水装置 (美国 Millipore 公司)

FreeZone 6L 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司)

### 3.2.4 引物的设计与合成

根据 NCBI 已公布的沙门菌全基因序列以及查阅相关资料发现鸡白痢沙门菌

(*Salmonella Pullorum*) 在 *rfbS* 基因上 237 位有规律性的变化, 所有鸡白痢都为 G, 而鸡伤寒、肠炎等血清型为 A, 别的一些血清型和别的种类的菌株不含有该基因或者变化较大; 鸡伤寒沙门菌在 *rfbS* 基因 598 位有规律性的变化, 所有鸡伤寒都为 A, 而鸡白痢、肠炎等血清型为 G, 别的一些血清型和别的种类的菌株不含有该基因或者变化较大, 固可根据此位点设计特异扩增引物, 由于碱基 A 和 T 之间为两个氢键连接, 碱基 C 和 G 之间为三个氢键连接, 所以碱基 A/T 到 C/G 的变化伴随着氢键数目的变化, 以上的变化使得碱基序列熔解温度不同, 可以进行 HRM 区分。

采用 Oligo7 引物设计软件, 根据 GenBank 发布的沙门菌 *rfbS* 序列 (鸡白痢沙门菌的 *rfbS* 序列的 GenBank 登录号: LK931482; 鸡伤寒沙门菌的 *rfbS* 序列的 GenBank 登录号: AF442573; 肠炎沙门菌 *rfbS* 序列的 GenBank 登录号: CP007267) 分别在 *rfbS* 基因 237 位点和 598 位点两侧设计两对引物。另外, 设计一对长引物用于测序比对及后期敏感性检测, 该引物扩增片段至少能包含以上两对引物扩增的片段, 引物见表 3.2。

表 3.2 引物序列

Primer	Sequence(5'-3')	扩增长度	Interpretation
SP-237F	AAAGCAATATTCTTATGCCTA	72bp	HRM primer differentiate of <i>S. Pullorum</i>
SP-237R	CACAATTTATGAATACTGCATC		
SG-598F	TGTTAATAATTTCCCCAA	79bp	HRM primer differentiate of <i>S. Gallinarum</i>
SG-598R	AGTCTCTACATATTCACG		
<i>rfbS</i> -F	ACATACTGTGATTGGCTTAG	661bp	Pre-amplification and sequencing primer
<i>rfbS</i> -R	CATTGGCTCTTTCTTTGA		

### 3.2.5 核酸的提取

实验中所用到的所有细菌核酸均使用 Omega 公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取。提取方法参考说明书进行。具体提取步骤如下:

取细菌培养液 1mL, 12000rpm 离心 1min, 尽量吸尽上清; 向细菌沉淀中加入 200 $\mu$ L 溶液 A, 振荡至菌体充分悬浮, 然后加入 200  $\mu$ L 10 mg/mL 的 RNase A, 37 $^{\circ}$ C 放置 15-30 min; 向管中加入 20  $\mu$ L 10 mg/mL 的蛋白酶 K, 充分混合均匀, 55 $^{\circ}$ C 消化 30-60 min, 期间颠倒离心管混匀数次, 直到样品消化完全为止。消化完全的标志是液体清亮及粘

稠；向管中加入 200  $\mu\text{L}$  溶液 B，充分混匀。如果出现白色沉淀。可放在 75 $^{\circ}\text{C}$  15-30 min，沉淀即会消失，不影响后续实验；向管中加入 200  $\mu\text{L}$  的无水乙醇，充分混合均匀。将溶液加入到吸附柱中，静置 2min；12000 rpm 离心 1min，弃收集管中液体，将吸附柱重新放入收集管中；向吸附柱中加入 700  $\mu\text{L}$  漂洗液，12000 rpm 离心 1 min，弃废液，将吸附柱放入收集管中；向吸附柱中加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液，12000 rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中；12000 rpm 空离 2 min，静置吸附柱使其充分干燥，然后将其放入一个新的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 50-200  $\mu\text{L}$  经 75 $^{\circ}\text{C}$  水浴预热的脱洗液，室温放置 5 min，1200 rpm 离心 1 min，离心所得洗脱液在再次加入吸附柱中，放置 2 min，12000 rpm 离心 2 min，即可得细菌基因组 DNA。

### 3.2.6 标准曲线的建立

选取 13 株参考菌株用于标准曲线的建立。菌株信息见表 3.1。分别采用两对引物对参考菌株进行扩增，每个扩增做两个重复，加上阴性对照，引物对 SP-237F/237R 和引物对 SG-598F/598R 扩增的管数为各 28 管，总计 56 个反应。加完样品后统一进行 PCR 扩增。参考 Takara Premix Taq<sup>TM</sup> Kit 产品说明书，按照以下组成配制 PCR 反应体系（表 3.3）。

表 3.3 PCR-HRM 反应体系

试剂	用量
PremixEx-Taq	5.0 $\mu\text{L}$
rfbS-F	0.5 $\mu\text{L}$
rfbS-R	0.5 $\mu\text{L}$
DNA 模板	1.0 $\mu\text{L}$
Eva green 染料	1.0 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	2.0 $\mu\text{L}$
Total	10 $\mu\text{L}$

PCR-HRM 的反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3min；95 $^{\circ}\text{C}$  变性 20s，54 $^{\circ}\text{C}$  退火 20s，72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 20s，循环数 40 次；60 $^{\circ}\text{C}$  到 80 $^{\circ}\text{C}$  以 0.3 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  的熔解速率进行熔解曲线分析。HRM 实验结果利用软件 Rotor-Gene Q<sup>TM</sup> 2.0.2.软件进行分析。

### 3.2.7 PCR 扩增及 HRM 分析

上述反应建立成功后，确定  $T_m$  温差能够用于区分不同菌株，然后对临床菌株进行扩增验证。选取 33 株临床分离到的菌株，提取基因组 DNA 后按照上述程序进行扩增和分析。首先使用引物对 SP-237F/237R 对 33 株临床菌株进行验证，鉴定出鸡白痢沙门菌，然后使用引物对 SG-598F/598R 对其他样品进行再次扩增，鉴定出鸡伤寒沙门菌。反应体系与上述相同。PCR-HRM 的反应程序为：95℃ 预变性 3 分钟；95℃ 变性 20s，54℃ 退火 20s，72℃ 延伸 20s，循环数 40 次；60℃ 到 80℃ 以 0.3℃/s 的溶解速率进行溶解曲线分析。HRM 实验结果利用软件 Rotor-Gene Q™ 2.0.2. 软件进行分析。

### 3.2.8 特异性性试验

选取鸡体内常见的细菌以及沙门菌常见的血清型菌株作为对照菌株，根据建立的 PCR-HRM 法进行检测。证明设计的引物和方法的特异性。

### 3.2.9 灵敏性试验

使用引物 *rfbS*-F/*rfbS*-R 根据普通 PCR 方法扩增出标准菌株鸡白痢沙门菌 *rfbS* 基因和鸡伤寒沙门菌 *rfbS* 基因。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析，采用商业化 PCR 产物胶回收试剂盒（Omega）按照说明书指导对 PCR 产物进行回收，将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD19T 载体上，将连接产物转化至感受态细胞，将转化后的感受态细胞涂布到氨苄抗性 LB 营养琼脂板上，培养后挑取单菌落到含有氨苄抗性的 LB 培养液中培养，16~18 小时后提取质粒并测序，确认连接成功。测定连接成功的阳性质粒的浓度，并且按照 10 倍倍比稀释法进行稀释，得到不同浓度的标准样品（鸡白痢沙门菌 *rfbS* 基因载体 pMD19T-SP 和鸡伤寒沙门菌 *rfbS* 基因载体 pMD19T-SG）。

### 3.2.10 序列测定与分析

为了验证 PCR-HRM 基因分型结果，利用引物 *rfbS*-F/*rfbS*-R 对所有菌株进行扩增和测序验证。测序结果利用 GenStar 进行比对分析，判断 PCR-HRM 检测结果是否和测序结果一致。

### 3.2.11 数据处理

对原始熔解曲线数据进行归一化处理，即确定溶解温度。分别以 69.0-70.0℃ 和 70.0-71.0℃ 温度区间作为引物 SP-237SP/237R 扩增产物溶解曲线归一化温度范围；以

72.0-73.0 和 72.5-73.5℃ 温度区间作为引物 SG-598F/598R 扩增产物溶解曲线归一化温度范围。另外，本实验采用 90% 的基因分型置信值（Genotype confidence percentage, GCP）对样品进行分析。即以标准样品为对照，GCP 值大于或等于 90% 时判定为同一基因型。以上数据分析过程利用 Rotor-Gene Q™ 2.0.2. 软件进行分析。

### 3.3 结果及分析

#### 3.3.1 引物设计

本试验根据沙门菌 *rfbS* 基因上 237 位点和 598 位点的变化来区分二者及其他细菌。*rfbS* 基因第一个 SNP 位点为 237 位，用于区分鸡白痢，第二个位点为 598 位，用于区分鸡伤寒。引物设计如下图，引物 SP-237SP/237R 扩增的片段是从 *rfbS* 基因的 203 位到 274 位（扩增片段长度为 72bp）；SG-598F/598 扩增的片段是从 *rfbS* 基因的 549 位到 627 位（扩增片段长度为 79bp）。

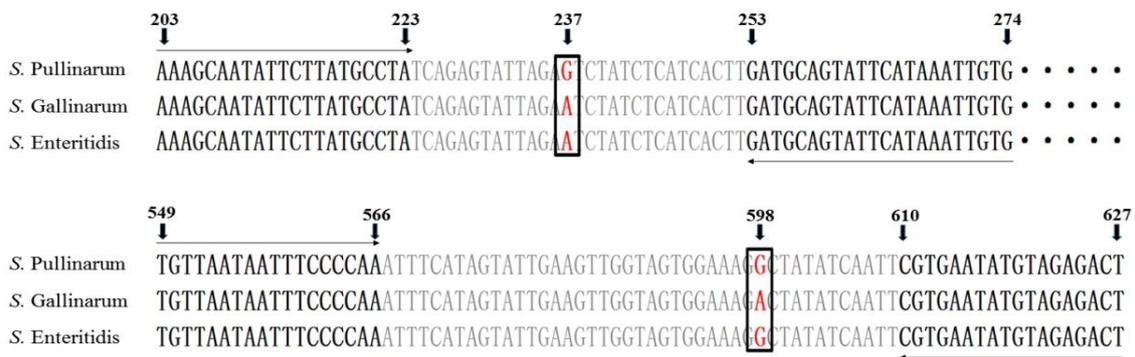


图 3.1 引物 SP-237SP/237R 和 SG-598F/598 设计示意图

注:方框中为 SNP 位点

#### 3.3.2 标准菌株 PCR-HRM 分析结果

为了验证鉴别鸡白痢和鸡伤寒沙门菌方法的可行性，本研究首先使用 13 株标准菌株进行 PCR-HRM 分析，结果如图 3.2，左图为 PCR-HRM 归一化溶解曲线图，右图为峰形化曲线图。上图为使用鸡白痢鉴别引物 SP-237SP/237R 的溶解曲线，下图为使用鸡伤寒鉴别引物 SG-598F/598R 的溶解曲线。使用鸡白痢沙门菌鉴别引物 SP-237SP/237R 时（图 AB），只有鸡白痢沙门菌、鸡伤寒沙门菌和肠炎沙门菌有扩增

和溶解曲线，鸡白痢沙门菌的溶解温度为  $70.32\pm 0.04^{\circ}\text{C}$ ，而鸡伤寒和肠炎沙门菌的溶解温度为  $69.71\pm 0.04^{\circ}\text{C}$ ，二者有近  $0.6^{\circ}\text{C}$  的差别，所有很明显能够区分出来；使用鸡伤寒鉴别引物 SG-598F/598R 时（图 CD）也只有鸡白痢沙门菌、鸡伤寒沙门菌和肠炎沙门菌有扩增和溶解曲线，鸡伤寒沙门菌的溶解温度为  $72.41\pm 0.02^{\circ}\text{C}$ ，而肠炎沙门菌和鸡白痢沙门菌的溶解温度在  $72.91^{\circ}\text{C}\pm 0.02^{\circ}\text{C}$ ，二者有  $0.5^{\circ}\text{C}$  的温差，能够使用 HRM 分辨出来。

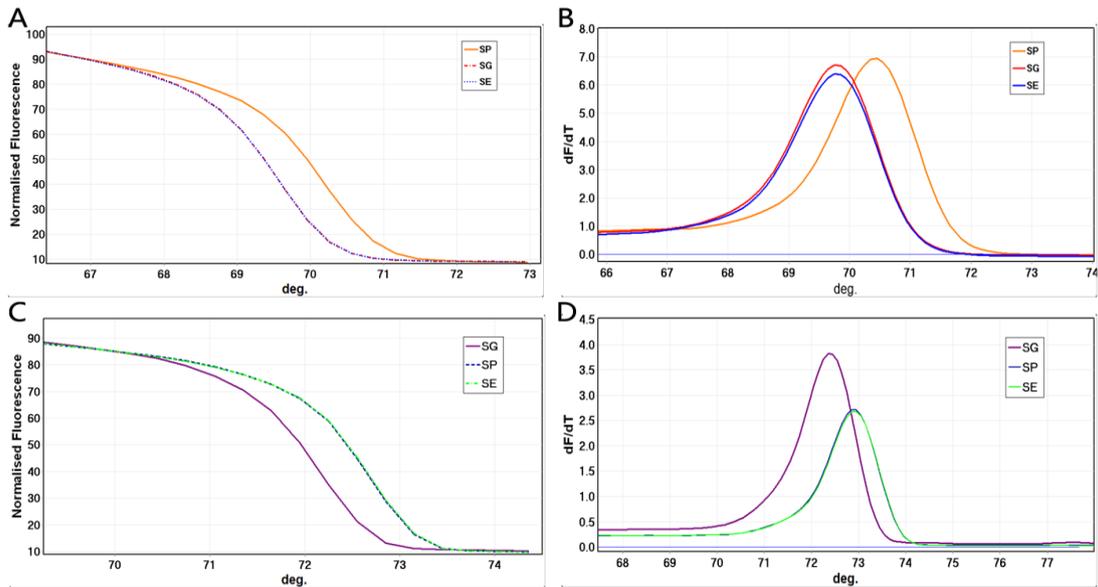


图 3.2 HRM 标准曲线图

注：引物 SP-237SP/237R 和 SG-598F/598 标准品归一化 (A)、(C) 和峰型化 (B)、(D) 溶解曲线图。

### 3.3.3 标准菌株 PCR-HRM 分析结果

对 33 株已知血清型沙门菌进行 PCR-HRM 检测，结果如图 3.3，左图为 PCR-HRM 归一化溶解曲线图，右图为峰形化曲线图。上图为使用鸡白痢鉴别引物 SP-237SP/237R 的溶解曲线，下图为使用鸡伤寒鉴别引物 SG-598F/598R 的溶解曲线。首先使用鸡白痢鉴别引物 SP-237SP/237R 对 33 株菌进行 PCR-HRM 扩增（图 AB），有 22 个样品的温度符合上述标准曲线的溶解温度  $70.32\pm 0.04^{\circ}\text{C}$ ，因此可以判断此温度范围内的样品为鸡白痢沙门菌；对剩余的 11 株样品使用鸡伤寒沙门菌鉴别引物 SG-598F/598R 进行 PCR-HRM 扩增（图 CD），结果显示有 7 个样品的溶解温度符合上述鸡伤寒沙门菌判

别温度  $72.41 \pm 0.02^\circ\text{C}$ ，因此可以判断这 7 个样品为鸡伤寒沙门菌。鉴别结果与传统血清型鉴定结果完全一致。

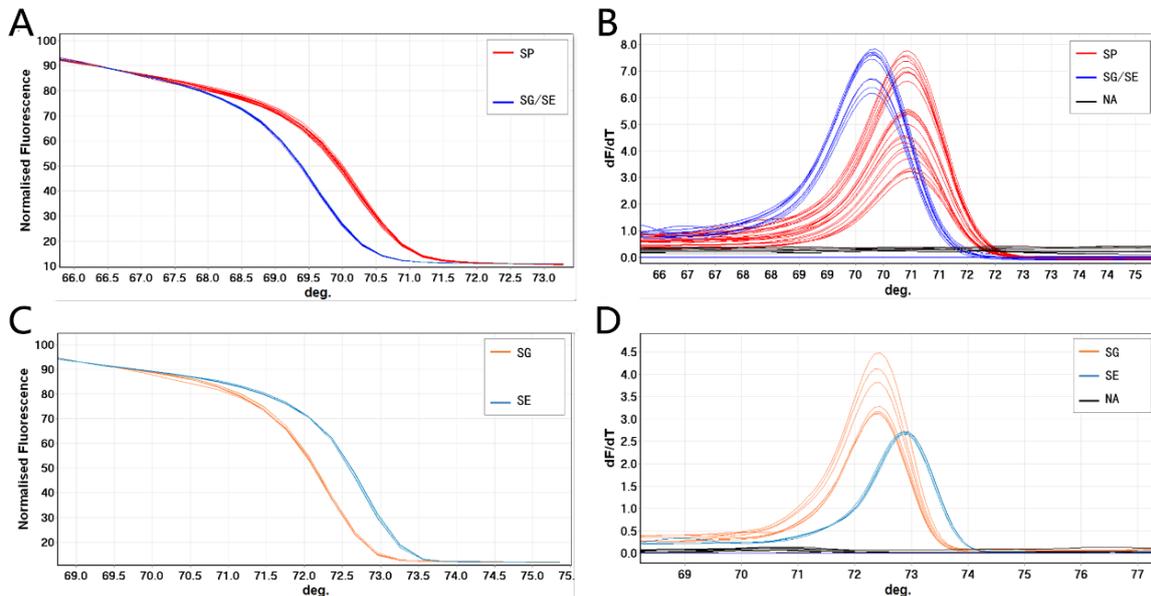


图 3.3 HRM 临床样品检测图

注：引物 SP-237SP/237R 和 SG-598F/598 标准品归一化 (A)、(C) 和峰型化 (B)、(D) 溶解曲线图。

### 3.3.4 敏感性试验结果

阳性质粒 pMD19T-SP 和 pMD19T-SG 的原液浓度分别为  $126.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$  和  $153.0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，结果显示，浓度梯度稀释后检测结果和 CT 值之间有很好的相关性，按照公式  $(6.02 \times 10^{23}) \times (\text{浓度}) / (\text{MW g/mol}) = \text{copies/mL}$  进行计算的最低检测限。最低检测限分别为  $34 \text{ copies}/\mu\text{L}$  (原液稀释  $10^8$  倍) 和  $42 \text{ copies}/\mu\text{L}$  (原液稀释  $10^8$  倍)。

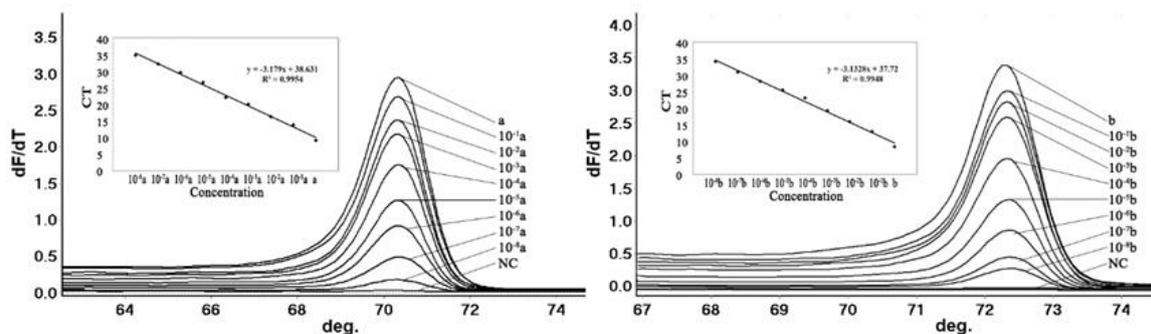


图 3.4 敏感性检测图

### 3.3.5 特异性试验结果

本研究对选取的 2 株目标菌株（鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌）和 11 株革兰氏阴性非目标菌株（常见血清型沙门菌、巴氏杆菌和大肠杆菌）进行特异性检测实验。结果显示，使用引物 SP-237SP/237R 进行检测时，只有鸡白痢沙门菌在相应位置出现了溶解曲线和  $T_m$  值，别的血清型沙门菌未收集到荧光信号或者溶解温度不对。使用引物 SG-598F/598 进行检测时，只用鸡伤寒沙门菌在相应位置出现了溶解曲线和  $T_m$  值。别的血清型沙门菌未收集到荧光信号或者溶解温度不对。

表 3.4 特异性试验结果

序号	参考菌株	编号	结果
1	<i>Salmonella Gallinarum</i> （鸡伤寒沙门菌）	CICC21510	+
2	<i>Salmonella Pullorum</i> （鸡白痢沙门菌）	CVCC535	+
3	<i>Salmonella Enteritidis</i> （肠炎沙门菌）	ATCC13076	-
4	<i>Salmonella Typhimurium</i> （鼠伤寒沙门菌）	ATCC14028	-
5	<i>Salmonella Agona</i> （阿贡纳沙门菌）	ATCC51957	-
6	<i>Salmonella Weltevreden</i> （韦太夫雷登沙门菌）	ATCC BAA-2568	-
7	<i>Salmonella Meleagridis</i> （火鸡沙门菌）	CICC21511	-
8	<i>Salmonella Thompson</i> （汤普逊沙门菌）	ATCC8391	-
9	<i>Salmonella Senftenberg</i> （山夫登堡沙门菌）	ATCC43845	-
10	<i>Salmonella Stanle</i> （斯坦利沙门菌）	ATCC7308	-
11	<i>Salmonella Infantis</i> （婴儿沙门菌）	ATCC BAA-1675	-
12	<i>Escherichia coli</i> （大肠杆菌）	ATCC25922	-
13	<i>Pasteurella multocida</i> （多杀性巴氏杆菌）	ATCC12948	-

### 3.4 小结

本研究成功建立了鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌 PCR-HRM 检测方法，该方法特异性为 100%，最低检测限分别为 34 copies/ $\mu\text{L}$  和 42 copies/ $\mu\text{L}$ ，灵敏度是普通 PCR 的 100 倍以上。该方法具有快速高效、低成本和高通量的特点，整个过程 PCR 产物无需再转入其他装置，实现了真正的闭管操作，避免了交叉污染。为家禽中鸡白痢和鸡伤寒沙门菌的快速诊断和净化提供了可靠的方法。

## 第四章 全文讨论与总结

### 4.1 讨论

#### 4.1.1 沙门菌流行情况讨论

当前，动物源沙门菌感染是全球关注的公共卫生问题，沙门菌是最常见引起食物中毒的病原菌之一（Galanis *et al.*, 2006）。据统计全球每年有 9300 万人感染沙门菌，造成 15.5 万死亡（Majowicz *et al.*, 2010）。大部分感染沙门菌病例是由于接触了被污染的饮水、肉类、鸡蛋、牛奶及蔬菜等造成的，动物源性食品，特别是猪肉和鸡肉被认为是沙门菌的重要载体（Linam *et al.*, 2007）。动物源沙门菌可以存在与动物体本身、动物养殖环境和动物性食品中，这些环节之间往往能相互传播、交叉污染，并且可以通过食物链向人类传递，无论对养殖业健康发展还是对人类健康都造成严重的威胁，所以，加强动物源沙门菌的监测是防治沙门菌感染的重要环节。

本研究从广东省不同区域鸡肉、猪肉及兽医临床分离到沙门菌 273 株，零售鸡肉、猪肉中沙门菌分离率分别高达 58% 和 75%，鸡肉中的优势血清型为科瓦里斯、阿贡纳及肯塔基沙门菌；猪肉中分离最多的血清型为鼠伤寒、阿贡纳和罗森沙门菌。在中国，Li 在 2010-2012 年对江苏省 20 个零售市场采集 1096 份猪肉样品，阳性样品仅 154 份（14.1%），主要流行的血清型为德比、鼠伤寒和火鸡沙门菌等（Li *et al.*, 2014）；Bai 对河南地区屠宰后的鸡肉和猪肉进行采样，其中鸡肉的分离率为 45.2%，猪肉的分离率为 29.2%，鸡肉中最流行的血清型为肠炎、哈达尔和印第安纳沙门菌，猪肉中最流行的血清型为鼠伤寒、德比和肠炎沙门菌（Bai *et al.*, 2015）。Wang 在北京地区 395 份鸡肉样品中分离到 197 株沙门菌（49.9%），其中肠炎沙门菌、印第安纳沙门菌和婴儿沙门菌是主要的血清型（Wang *et al.*, 2014）。在其他国家，Choi 对 2013 韩国鸡肉中沙门菌流行情况进行调查发现，零售鸡肉中沙门菌污染率为 42%（Choi *et al.*, 2015），主要血清型为斐尔科、巴雷利和婴儿沙门菌；Katoh 在 1992-2012 年间从东京 1576 份鸡肉样品中分离到沙门菌 469 株（29.8%），最流行的血清型为婴儿沙门菌，其他依次为索菲亚、哈达尔、鼠伤寒和曼哈顿沙门菌等（Katoh *et al.*, 2015）；Thai 在 2007-2009 年从越南北部 318 份猪肉样品和 268 份鸡肉样品中分离到 126（39.6%）株和 115（42.9%）株沙门菌，血清型排名依次为鸭沙门菌（15.8%）、婴儿沙门菌（13.3%）、埃梅克沙门菌（10.4%）、德比沙门菌（9.5%）和罗森沙门菌（9.1%）（Thai *et al.*, 2012）；

Donado 对哥伦比亚零售常温鸡肉中鸡肉和冷冻鸡肉中沙门菌进行分离计数发现，常温鸡肉和冷冻鸡肉沙门污染率分别为 37%和 2.1% (Donado-Godoy *et al.*, 2014)；Gharieb 调查发现，埃及鸡肉中沙门菌分离率为 10%，其中德比和鼠伤寒沙门菌最多 (Gharieb *et al.*, 2015)。

从以上国内外数据可以看出，鸡肉和猪肉是沙门菌的重要传播者，本研究的猪肉和鸡肉中沙门菌的分离率明显高于国内其他省份及国外地区，这说明了广东省动物性食品沙门菌污染情况严重，食品安全风险比较大。也反映广东省动物性食品供给过程中卫生防控措施和别的地区相比还有很大进步空间，要加强动物和动物性食品沙门菌监测工作，对各个可能污染的环节都要深入研究，并根据污染来源制定相关防控措施。保障动物性食品的安全。另外，高分离率可能与以下因素有关，首先，本研究分离时间为5月份到12月份，主要为夏季和秋季，南方地区在该季节气候适合沙门菌生长和繁殖；其次，不同地区鸡肉加工及销售方式不同。另外，本研究中猪肉中的分离率会略高于鸡肉，可能原因是猪的体积较大，加工过程中整体消毒不完善，特别是去内脏的环节污染较大 (Cai *et al.*, 2016)。总体来讲，广东省动物源食品中沙门菌污染情况较为严重，这极大的增加了人类感染沙门菌的风险。高污染率与产业链的完善程度、食品安全的管理水平以及各地的饮食习惯都有很大关系，要制定科学合理的卫生管理体系，推动产业链发展，逐步降低肉食品中沙门菌污染。

本研究发现，广东省动物源沙门菌中主要的血清型为鼠伤寒沙门菌、科瓦利斯沙门菌、德比沙门菌和阿贡纳沙门菌，除科瓦利斯外，其他血清型也是国内外比较常见的血清型。鼠伤寒沙门菌被认为是全球危害最严重的沙门菌之一，这种血清型沙门菌宿主范围广、毒力强、耐药性高，并且在恶劣环境中生物被膜形成能力强，从而增强对不同环境的适应性 (O'Leary *et al.*, 2015)；德比沙门菌被认为是猪肉中最常见沙门菌之一，也是医院腹泻病人中常见沙门菌血清型 (Arnedo-Pena *et al.*, 2016)；阿贡纳沙门菌是中国医院感染病例中排名前十的血清型之一，Kuang 等对上海地区环境、食品医院腹泻病人分离的阿贡纳沙门菌对比发现，该血清型沙门菌存在着爆发的情况 (Kuang *et al.*, 2014)。另外，本研究中发现了一些不常见血清型沙门菌，如海法、黄金海岸、非丁伏斯及姆班达卡等，这些血清型沙门菌研究还比较少，很多特性未知，要注重监测和深入研究。

从不同地区血清型分布状况可以看出，沙门菌优势血清型地域性差异很大，这可能和不同地区的环境、养殖水平和肉食品加工模式及抗生素的使用状况等都有很大关

系。但是各地区也交叉出现一些共同的优势血清型，如鼠伤寒沙门菌、婴儿沙门菌、德比沙门菌、印第安纳沙门菌及阿贡纳沙门菌等在很多国家和地区都是排在前列的血清型。在广东省2009-2012年医院沙门菌病患者研究报告中，发现广东人感染沙门菌主要血清型和本研究动物源沙门菌主要血清型吻合度非常高，人感染沙门菌病例中排名前10的血清型中除了汤普逊沙门菌其他9种都在本次研究中出现，分别是鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、斯坦利沙门菌、德比沙门菌、罗森沙门菌、韦太夫雷登沙门菌、婴儿沙门菌、阿尔巴尼沙门菌和阿贡纳沙门菌（Liang *et al.*, 2015）。这也反应了动物源食品沙门菌的污染和人感染沙门菌之间有着密切关系。

不同来源的样品中沙门血清型差异也很大，本研究中鸡肉中沙门菌最多的血清型为科瓦利斯，而猪肉和临床分离到的沙门菌最多的血清型为鼠伤寒。科瓦利斯在国内报道数据很少，特别是本次调查中鸡肉中占如此高的比例值得密切关注。科瓦利斯沙门菌（*Salmonella corvallis*）最早报道是在1949年Dickinson从雏鸡肠道中分离到的（Edwards *et al.*, 1949），2001年日本兵库县一个医院爆发科瓦利斯引起的食物中毒案例（Hamada *et al.*, 2001），Archambault 从泰国、丹麦和保加利亚病人和食品中收集到59株科瓦利斯沙门菌，耐药性及PFGE分子分型结果显示，该血清型耐药性在不同国家有很大差异，但是该血清型沙门菌在这三个国家存在相互传播现象（Archambault *et al.*, 2006）。该血清型沙门菌在巴西的肉鸡屠宰场、德国的野鸟中及土耳其的犬中都有相关报道（Fischer *et al.*, 2013; Kocabiyik *et al.*, 2006; Yamatogi *et al.*, 2015）。所以不排除该血清型沙门菌是由别的国家地区传播过来的可能。

#### 4.1.2 沙门菌耐药特点讨论

本研究使用16种常用抗生素对分离到的273株沙门菌进行药敏试验，结果显示，分离的沙门菌对氨基青霉素类、四环素类及磺胺类耐药率都在40%以上，最高的为四环素，达到了76.2%。为了促进动物生长和预防疾病，四环素类及磺胺类药物长期作为饲料添加剂应用于动物养殖，所以动物源沙门菌对此类药物高耐药性跟畜禽养殖过程中大量使用有直接关系。据统计，全球90%以上的抗菌药物是动物养殖中使用的，2013年美国出售的抗生素药物中73%是用于兽医的（NRDC, 2013）。由于养殖中大量抗菌药物的添加，美国农场中养殖的牛对四环素和红霉素的耐药率分别为42.9%和12.7%，远远高于美国野牛中的8%和4%（Anderson *et al.*, 2008）。沙门菌耐药性问题是—个全球性的问题，泰国从鸡肉、猪肉和病人中分离到221株沙门菌，95.9%为多重

耐药，对复方新诺明（96.4%）和链霉素（93.2%）几乎全部耐受，对大观霉素、四环素、氨苄西林和甲氧苄啶也达到了一个很高水平（Sinwat *et al.*, 2015）。Lai对中国山东地区2009年和2012年养殖场中沙门菌耐药情况分析比较发现，三年间，四环素、氨苄西林、萘啶酸及磺胺异恶唑的耐药率增长分别从17%到59.2%、11.9%到71.4%、81.4%到95.9%及29.6到78.2%（Lai *et al.*, 2014）。另外，本研究中人医临床一线用药如头孢西丁、头孢曲松、左氟沙星及加替沙星等都出现了耐药菌株，这说明沙门菌对高级 $\beta$ -内酰胺类药物和喹诺酮已经出现耐药的趋势，这两类药物为治疗肠道微生物感染的主要药物，要加强监测。

比较广东省不同来源沙门菌发现，整体耐药率和耐药水平鸡肉和猪肉相似，然而临床分离菌株耐药水平明显高于肉食品，临床菌株对氨苄西林、四环素和萘啶酸的耐药率达到了70%以上，对青霉素类、氨基糖苷类及磺胺类药物也都达到了很高的耐药水平，这主要跟养殖环境中抗生素的使用有关，特别是临床患病动物，这也说明不同抗生素压力下沙门菌表现出不同的耐药水平（Campioni *et al.*, 2014）。

本研究分离株多重耐药现象严重，至少耐一种抗生素的菌株为89.0%，耐三类或三类以上抗生素的沙门菌比例在51.6%，有11.0%的菌株能够耐受测试的全部六类抗生素，多重耐药菌株比例的增加以及耐药谱的增加已经成为一个严重的公共卫生问题。Aarestrup 对美国、泰国、丹麦的动物性食品和人中分离到的581株沙门菌进行耐药性检测，发现多重耐药菌株广泛分布和传播（Aarestrup *et al.*, 2007）。Pan对中国从1962年到2007年某一血清型沙门菌持续监测发现，耐药谱从1962年的完全不耐药增长到1993年的耐6种抗菌药，再到2007年的耐12种抗菌药（Pan *et al.*, 2009）。本研究的耐药谱中耐药种类最多的模式是：AMP-CRO-GEN-KAN-AMK-CHL-TET-SUL-SXT-

NAL-CHL-LVX-GAT，对16种抗菌药物中的13种都产生了耐药性，并且有三株。多重耐药沙门菌可以通过环境、食物链以及人畜接触在人与人之间或人与动物之间传播，这对畜禽生产和人类健康都造成极大的危害。

随着对耐药机制的深入研究，很多耐药基因被发现，抗生素选择作用加快了耐药基因水平转移的速度和固有频率，从而增加了耐药基因的多样性，引起环境中耐药基因库数据急剧扩增（Gillings *et al.*, 2012）。本研究对沙门菌中两类重要的水平转移元件进行分析，即质粒介导的产ESBLs基因进行分析和 I 型整合子携带的耐药基因情况进行研究。结果表明，携带产ESBLs基因的菌株和不携带该基因的菌株之间对氨苄西林、阿莫西林和头孢曲松的耐药性都存在显著差异（ $P < 0.05$ ），携带产ESBLs基因的菌

株的菌株耐药性明显增加。总共有80（29.3%）株菌至少携带一个产ESBLs基因,而产ESBLs的菌株能抵抗三代头孢类药物,这也说明了动物源沙门菌有对头孢类药物耐药性增加的风险。对整合子检测结果表明,沙门菌整合子主要整合了抗氨基糖苷类药物和磺胺类药物的耐药基因,据相关报道,革兰氏阴性菌 I 型整合子主要插入的基因盒以编码氨基糖苷酸转移酶的*aadA*基因和编码二氢叶酸还原酶的*dhfrA*基因为主（Ahmed *et al.*, 2016; Asgharpour *et al.*, 2014）。二氢叶酸还原酶能竞争性抑制磺胺类药物使细菌对该类药物耐药,氨基糖苷酸转移酶能修饰药物关键作用位点,阻断了药物与细菌16SrRNA结合,使细菌对氨基糖苷类药物耐药。所以整合子在这两类药物的耐药性上发挥很重要的作用。

#### 4.1.3 PCR-HRM 检测方法讨论

鸡白痢和鸡伤寒是家禽最重要的蛋传递性疾病之一,每年造成的经济损失非常可观。欧洲及美国等一些发达国家很早就认识到了该病的重要性,并实施了有效的净化措施,几乎消除了该病的流行和传播（Barrow *et al.*, 2011）。然而在中国和其他一些发展中国家,由于缺乏对该病高效的检测方法和净化手段,该病对养殖业的威胁依然十分严峻（Gong *et al.*, 2013）。国务院颁布的《国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020年)》提出,2015年全国祖代以上种鸡场的鸡白痢沙门菌病达到净化标准,2020年全国所有种鸡场的鸡白痢沙门菌病达到净化标准。为进一步实现《国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020年)》的任务目标,制定种禽场疫病净化技术方案和评估考核管理办法等提供科学依据,全面提高我国种禽健康水平,高效的检测手段是必要的。

本论文针对鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的分子特点,选取可以区分彼此以及其他 D 血清群沙门菌的 *rfbS* 基因作为分子靶标,利用高分辨率溶解曲线方法成功建立了高效快速的检测方法。靶标基因的选择是至关重要的步骤,*rfb* 基因家族很早就 PCR 作为靶标基因应用于区分沙门菌 A、B、C2 和 D 血清群,其中 *rfbS* 基因编码泊雷糖合成酶,独特存在于 D 血清群沙门菌中（Verma *et al.*, 1988）。通过之前的文献报道和我们测序比对发现,*rfbS* 基因在 237 位点和 598 位点有规律性的变化。具体来说,在 237 位点,所有鸡白痢沙门菌的核苷酸都是 G,而其他血清 D 群的沙门菌包括鸡伤寒沙门菌核苷酸都为 A;然而在 598 位点,所有鸡伤寒沙门菌的核苷酸都是 A,而其他血清 D 群的沙门菌包括鸡白痢沙门菌核苷酸都为 G,并且在这个位点上伴随着氨基酸从丙氨酸到苏氨酸的变化。很明显,*rfbS* 基因的这种单个核苷酸多态性可以做为很

好的分子靶标去检测鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌 (Shah *et al.*, 2005)。

本研究中, 鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌最低检测限分别为 34 copies/ $\mu$ L 和 42 copies/ $\mu$ L, 该检测的灵敏度是普通 PCR 检测的 100 倍以上, 之前也有文献报道, 使用 LC green, Eva Green 等饱和染料荧光定量 PCR 的检测灵敏性是 TaqMan 荧光定量 PCR 的 10 倍以上, 这主要得益于饱和染料的特性和新型荧光定量 PCR 机器检测的灵敏性, 新型饱和染料对 PCR 反应无抑制作用, 可以高浓度添加使染料完全均匀插入到 DNA 双链中, 并且反应过程中不会像常用的 SYB Green 一样发生重排, 所以能真是准确反应 PCR 扩增和熔解的过程, 另外, 现在机器对荧光采集密度较高, 能准确记录细小的温度变化 (Yu *et al.*, 2015)。另外, 本研究选取了同属异种、同科异属和其他科的细菌测试引物的特异性, 结果证实特异性为 100%, 该结果与 NCBI Blast 比对结果都表明, 该引物和该靶标基因的特性能够特异性区分鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌。

本研究对临床分离到已鉴定的 33 株鸡白痢沙门菌、鸡伤寒沙门菌和肠炎沙门菌鉴定结果表明, 该方法能够成功从中鉴定出 22 株鸡白痢沙门菌和 7 株鸡伤寒沙门菌, 与传统血清学鉴定结果一致, 表明该方法可以应用临床检验。本研究首次成功的利用 PCR-HRM 技术区分了鸡白痢沙门菌、鸡伤寒沙门菌和其他菌株, 其操作方便, 检测时只需要在 PCR 反应中加入饱和荧光染料; 简化了临床检验的流程并且大大缩短了检测时间, 与传统国标鉴定方法相比时间节省了 2/3; 并且该方法具有高通量、低成本的特点, 一次最多可以检验 384 个样本。与传统 PCR 后电泳开放操作相比, 本方法从 PCR 过程到 HRM 分析实现了真正的闭管操作, 整个过程 PCR 产物无需再转入其他装置, 避免了交叉污染, 并且可以完成定量分析。该方法无需特异性的探针, 无需测序, 使用简便, 并且检验过程中不消耗 PCR 产物, 可以进一步进行下游分析。其特异性强, 能够很好的从肠炎沙门菌和鸡伤寒沙门菌以及其他细菌中区分鸡白痢沙门菌, 解决了传统检测方法鉴别鸡白痢沙门菌准确率低的问题。灵敏度高, 最低检测下限能达到 34 copies/ $\mu$ L 和 42 copies/ $\mu$ L。在鸡白痢沙门菌和鸡伤寒沙门菌的快速诊断中展示了广阔的应用前景。

## 4.2 总结

对广东省鸡肉、猪肉及兽医临床样品进行沙门菌流行情况研究，发现广东省动物源食品中沙门菌污染率高，优势血清型为鼠伤寒沙门菌、科瓦利斯沙门菌、德比沙门菌和阿贡纳沙门菌，其中鸡肉中优势血清型为科瓦利斯，该血清型在家禽和人类均有爆发历史，在国内缺乏数据。猪肉和临床中优势血清型为鼠伤寒沙门菌，该血清型沙门菌是全球危害最严重的血清型之一。说明广东省动物源沙门菌污染情况较复杂，存在很大的食品安全风险。

对分离到的 273 株沙门菌进行了 16 种常用抗菌药物敏感性实验，发现广东省动物源沙门菌对四环素类、磺胺类和青霉素类抗菌药物耐药严重，耐三类或三类以上抗生素菌株比例在 51.6%，并且出现了一定比例对头孢西丁、头孢曲松、左氟沙星和加替沙星耐药的菌株；29.3% 的菌株至少携带一个产 ESBLs 基因，9.5% 的菌株扩增到整合子基因盒，其中 *aadA2-dfrA12* 检出率最高。说明广东省动物源沙门菌耐药严重，对头孢类药物、磺胺类及氨基糖苷类药物耐药性水平转移风险很高。

首次建立了鸡白痢和鸡伤寒沙门菌 PCR-HRM 检测方法，该方法特异性为 100%，最低检测限分别为 34copies/ $\mu$ L 和 42 copies/ $\mu$ L，灵敏度是普通 PCR 的 100 倍以上，并且该方法操作简便，检测时只需要在 PCR 反应中加入饱和荧光染料，从 PCR 扩增到结果判定全过程机器一次完成，耗时 2 小时以内，可同时检测 384 个样品。PCR-HRM 高效、灵敏、特异、高通量和低成本的特点，为家禽中鸡白痢和鸡伤寒沙门菌的快速诊断和净化提供方法学支撑。

## 致 谢

本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，在本论文完成之际，我谨向我的导师廖明教授表示最崇高的敬意和诚挚的谢意！感谢廖老师在科研和生活的指导和关怀。廖老师思维开阔、治学严谨、高瞻远瞩、诲人不倦，这些高尚的品质和严谨的作风时刻激励着我不断前进，是我做人做事的指路明灯。

特别感谢张建民老师在论文的选题、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。张老师细致严谨、一丝不苟的工作作风，严于律己、宽厚待人的处事态度使我受益匪浅，在此致以最诚挚的敬意！

感谢徐成刚老师对我学习和生活上的积极引导，徐老师胸怀广阔、待人热情，在两年的学习中给我指明了方向。

感谢本实验室元文宝教授、樊惠英教授、曹伟胜副教授、焦培荣老师、贾伟新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！

感谢博士后冯赛祥，在读硕士研究生符颖、丰舟、林一村、周琪、杨开杰，本科生詹泽强、林嘉特、梁德媚、王少君、熊俊垚、黄腾，实验员张俊静、谢淑敏、林丽芳等给予的热情帮助。

此外，特别感谢广东省农科院动物卫生研究所嘎利兵嘎博士和刘志成老师、张春红老师、沈海燕老师在实验的设计和仪器的使用中给予的无私帮助。

最后，我要特别感谢我的家人，感谢他们多年来对我的理解和支持！

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研究示范，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-42-G09）；农业科研杰出人才及其创新团队-重大动物疫病防控，现代农业人才支撑计划项目（农财发（2012）160号）；2014年广东省特支计划杰出人才E15237；广东省“三高”农业专项资金粤财农（2015）141号等项目资助，特此表示感谢。

## 参 考 文 献

- 朱超, 许学斌等编. 沙门菌属血清型诊断[M]. 上海: 同济大学出版社, 2009.
- 辛朝安, 陈溥言, 廖明等编. 禽病学(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- 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.
- Ahmed H A, El-Hofy F I, Shafik S M, *et al.*. Characterization of Virulence-Associated Genes, Antimicrobial Resistance Genes, and Class 1 Integrons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Isolates from Chicken Meat and Humans in Egypt[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2016.
- Alcaine S D, Warnick L D, Wiedmann M. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*[J]. *J Food Prot*, 2007,70(3):780-790.
- Ambler R P. The structure of beta-lactamases[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1980,289(1036):321-331.
- Anderson J F, Parrish T D, Akhtar M, *et al.*. Antibiotic resistance of enterococci in American bison (*Bison bison*) from a nature preserve compared to that of *Enterococci* in pastured cattle[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008,74(6):1726-1730.
- Andersson P, Harris T, Tong S Y, *et al.*. Analysis of bla(SHV) codon 238 and 240 allele mixtures using Sybr green high-resolution melting analysis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009,53(6):2679-2683.
- 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.
- Arlet G, Barrett T J, Butaye P, *et al.*. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: Prevalence and epidemiology[J]. *Microbes and Infection*, 2006,8(7):1945-1954.
- 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]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2016.
- Arora D, Kumar S, Jindal N, *et al.*. Prevalence and epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum from poultry in some parts of Haryana, India[J]. *Vet World*, 2015,8(11):1300-1304.
- Asgharpour F, Rajabnia R, Ferdosi S E, *et al.*. Investigation of class i integron in *salmonella infantis* and its association with drug resistance[J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2014,7(5):e10019.

- 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 serovar indiana in henan, china[J]. PLoS One, 2015,10(12):e144532.
- Barrow P A, Freitas N O. Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: A review[J]. Avian Pathology, 2011,40(1):1-13.
- Barua H, Biswas P K, Talukder K A, *et al.*. Poultry as a possible source of non-typhoidal Salmonella enterica serovars in humans in Bangladesh[J]. Veterinary Microbiology, 2014,168(2-4):372-380.
- Bass L, Liebert C A, Lee M D, *et al.*. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian Escherichia coli[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999,43(12):2925-2929.
- Berchieri A J, Iba A M, Barrow P A. Examination by ELISA of sera obtained from chicken breeder and layer flocks showing evidence of fowl typhoid or pullorum disease[J]. Avian Pathology, 1995,24(3):411-420.
- Bingga G, Liu Z, Zhang J, *et al.*. High resolution melting curve analysis as a new tool for rapid identification of canine parvovirus type 2 strains[J]. Mol Cell Probes, 2014,28(5-6):271-278.
- Boontham P, Soontomrak R. Intra-Abdominal infections: Prevalence and risk factors of ESBLs infections[J]. J Med Assoc Thai, 2015,98(11):1097-1103.
- Boyd D, Cloeckert A, Chaslus-Dancla E, *et al.*. Characterization of variant Salmonella genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002,46(6):1714-1722.
- Bratchikov M, Mauricas M. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for Salmonella spp. Genotyping HRM application for Salmonella spp. Subtyping[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011,71(3):192-200.
- Brinas L, Moreno M A, Teshager T, *et al.*. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli strains from healthy and sick animals in Spain in 2003[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005,49(3):1262-1264.
- Brown D G, Swanson J K, Allen C. Two host-induced Ralstonia solanacearum genes, acrA and dinF, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence[J]. Appl Environ Microbiol, 2007,73(9):2777-2786.

- Burke L, Hopkins K L, Meunier D, *et al.*. Resistance to third-generation cephalosporins in human non-typhoidal *Salmonella enterica* isolates from England and Wales, 2010-12[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014,69(4):977-981.
- Cai Y, Tao J, Jiao Y, *et al.*. Phenotypic characteristics and genotypic correlation between *Salmonella* isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016,222:56-64.
- Cai Y, Tao J, Jiao Y, *et al.*. Phenotypic characteristics and genotypic correlation between *Salmonella* isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016,222:56-64.
- Cai Y, Tao J, Jiao Y, *et al.*. Phenotypic characteristics and genotypic correlation between *Salmonella* isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016,222:56-64.
- 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.
- Capuano F, Mancusi A, Capparelli R, *et al.*. Characterization of drug resistance and virulotypes of *Salmonella* strains isolated from food and humans[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2013,10(11):963-968.
- Chen S, Cui S, Mcdermott P F, *et al.*. Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007,51(2):535-542.
- Cheng J C, Huang C L, Lin C C, *et al.*. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR[J]. *Clinical Chemistry*, 2006,52(11):1997-2004.
- Chiu C H, Su L H, Chu C. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: Epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004,17(2):311-322.
- Choi D, Chon J W, Kim H S, *et al.*. Incidence, antimicrobial resistance, and molecular characteristics of nontyphoidal salmonella including Extended-Spectrum beta-Lactamase producers in retail chicken meat[J]. *J Food Prot*, 2015,78(11):1932-1937.
- 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.

- Donado-Godoy P, Clavijo V, Leon M, *et al.*. Counts, serovars, and antimicrobial resistance phenotypes of Salmonella on raw chicken meat at retail in Colombia[J]. *J Food Prot*, 2014,77(2):227-235.
- 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]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004,48(10):4012-4015.
- Edwards P R, Hermann G J. Two new salmonella types: Salmonella corvallis and salmonella colorado[J]. *Journal of Bacteriology*, 1949,58(1):111-112.
- Fischer J, Schmogger S, Jahn S, *et al.*. NDM-1 carbapenemase-producing Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013,68(12):2954-2956.
- 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. 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.
- Gillings M R, Stokes H W. Are humans increasing bacterial evolvability?[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2012,27(6):346-352.
- 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.
- Gong J, Xu M, Zhu C, *et al.*. Antimicrobial resistance, presence of integrons and biofilm formation of Salmonella Pullorum isolates from Eastern China (1962-2010)[J]. *Avian Pathology*, 2013,42(3):290-294.
- Hamada K, Tsuji H. Salmonella Brandenburg and S. Corvallis involved in a food poisoning outbreak in a hospital in Hyogo Prefecture[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2001,54(5):195-196.
- Hill H R, Augustine N H, Pryor R J, *et al.*. Rapid genetic analysis of x-linked chronic granulomatous disease by high-resolution melting[J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2010,12(3):368-376.
- Hsu Y M, Tang C Y, Lin H, *et al.*. Comparative study of class 1 integron, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various Salmonella serovars from humans and animals[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2013,36(1):9-16.

- Hu W S, Lin J F, Lin Y H, *et al.*. Outer membrane protein STM3031 (Ail/OmpX-like protein) plays a key role in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009,53(8):3248-3255.
- 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.
- Jin D, Luo Y, Zhang Z, *et al.*. Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012,330(1):72-80.
- Kang M S, Kwon Y K, Jung B Y, *et al.*. Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum* based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011,147(1-2):181-185.
- 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*, 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]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2006,53(4):194-196.
- Kuang D, Zhang J, Meng J, *et al.*. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of *salmonella* *agona* isolated from humans and other sources[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014,11(11):844-849.
- Kumarasamy K K, Toleman M A, Walsh T R, *et al.*. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2010,10(9):597-602.
- Kwon H J, Park K Y, Yoo H S, *et al.*. Differentiation of *Salmonella enterica* serotype *gallinarum* biotype *pullorum* from biotype *gallinarum* by analysis of phase 1 flagellin C gene (*fliC*)[J]. *J Microbiol Methods*, 2000,40(1):33-38.
- 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 A S, Ong D C, Wong J C, *et al.*. High-resolution melting analysis for the rapid detection of fluoroquinolone and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS One*, 2012,7(2):e31934.

- Levesque C, Piche L, Larose C, *et al.*. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995,39(1):185-191.
- Li J, Zhao G H, Lin R, *et al.*. Rapid detection and identification of four major *Schistosoma* species by high-resolution melt (HRM) analysis[J]. *Parasitology Research*, 2015,114(11):4225-4232.
- Li Y C, Pan Z M, Kang X L, *et al.*. Prevalence, characteristics, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* in retail pork in Jiangsu province, eastern China[J]. *J Food Prot*, 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.
- Lin J. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014,5.
- Linam W M, Gerber M A. Changing epidemiology and prevention of *Salmonella* infections[J]. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2007,26(8):747-748.
- Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, *et al.*. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2016,16(2):161-168.
- Lopes G V, Michael G B, Cardoso M, *et al.*. Identification and characterization of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Derby isolates carrying a new aadA26 gene cassette in a class 1 integron obtained at pig slaughterhouses[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014,356(1):71-78.
- Majowicz S E, Musto J, Scallan E, *et al.*. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2010,50(6):882-889.
- Mao X D, Jun-Feng H U. Estimation on disease burden of foodborne non-typhoid salmonellosis in China using literature review method[J]. *Chinese Journal of Disease Control & Prevention*, 2011.
- Mohamed T, Zhao S, White D G, *et al.*. Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky isolated from pre- and post-chill whole broilers carcasses[J]. *Food Microbiology*, 2014,38:6-15.
- 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.

- Pan Z, Wang X, Zhang X, *et al.*. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Pullorum isolates in China from 1962 to 2007[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009,136(3-4):387-392.
- Park M K, Choi K S, Kim M C, *et al.*. Differential diagnosis of *Salmonella gallinarum* and *S. Pullorum* using PCR-RELP[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2001,2(3):213-219.
- Parvej M S, Nazir K H, Rahman M B, *et al.*. Prevalence and characterization of multi-drug resistant *Salmonella Enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum and Gallinarum from chicken[J]. *Vet World*, 2016,9(1):65-70.
- Parvej M S, Nazir K H, Rahman M B, *et al.*. Prevalence and characterization of multi-drug resistant *Salmonella Enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum and Gallinarum from chicken[J]. *Vet World*, 2016,9(1):65-70.
- Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010,300(6):371-379.
- Price E P, Smith H, Huygens F, *et al.*. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007,73(10):3431-3436.
- Ribeiro S A, de Paiva J B, Zotesso F, *et al.*. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009,40(1):184-188.
- 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.
- Shah D H, Park J H, Cho M R, *et al.*. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: Serotype-specific *rfbS* sequence polymorphism[J]. *J Microbiol Methods*, 2005,60(2):169-177.
- Shah D H, Park J H, Cho M R, *et al.*. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: Serotype-specific *rfbS* sequence polymorphism[J]. *J Microbiol Methods*, 2005,60(2):169-177.
- 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.

- Slinger R, Bellfof D, Desjardins M, *et al.*. High-resolution melting assay for the detection of *gyrA* mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007,57(4):455-458.
- Stephens A J, Inman-Bamber J, Giffard P M, *et al.*. High-resolution melting analysis of the *spa* repeat region of *Staphylococcus aureus*[J]. *Clinical Chemistry*, 2008,54(2):432-436.
- Stokes H W, Hall R M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: Integrons[J]. *Molecular Microbiology*, 1989,3(12):1669-1683.
- Tedde A, Laura P A, Bagnoli S, *et al.*. Interleukin-10 promoter polymorphisms influence susceptibility to ulcerative colitis in a gender-specific manner[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2008,43(6):712-718.
- Thai T H, Hirai T, Lan N T, *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.
- Usha G, Chunderika M, Prashini M, *et al.*. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella* spp. At a tertiary hospital in Durban, South Africa[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008,62(1):86-91.
- Vaisvila R, Morgan R D, Posfai J, *et al.*. Discovery and distribution of super-integrons among pseudomonads[J]. *Molecular Microbiology*, 2001,42(3):587-601.
- Verma N K, Quigley N B, Reeves P R. O-antigen variation in *Salmonella* spp.: Rfb gene clusters of three strains[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988,170(1):103-107.
- 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.
- Weill F X, Demartin M, Tande D, *et al.*. SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004,42(6):2432-2437.
- Wittwer C T, Reed G H, Gundry C N, *et al.*. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. *Clinical Chemistry*, 2003,49(6 Pt 1):853-860.
- Wolff B J, Thacker W L, Schwartz S B, *et al.*. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008,52(10):3542-3549.

- Wu H, Wang Y, Wu Y, *et al.*. Emergence of beta-lactamases and extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Salmonella* in retail raw chicken in China[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2015,12(3):228-234.
- 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]. *J Infect Dev Ctries*, 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, 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 S, Ramachandran P, Rothman R, *et al.*. Rapid identification of biothreat and other clinically relevant bacterial species by use of universal PCR coupled with high-resolution melting analysis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009,47(7):2252-2255.
- Yu H Q, Cai X Q, Lin Z X, *et al.*. Rapid and specific detection of porcine parvovirus using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis[J]. *BMC Veterinary Research*, 2015,11:46.
- 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 H, Lin X Y, 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.

## 附录：硕士期间科研成果及获奖情况

### 科研成果：

1. **Xingxing Ren**, Chenggang Xu, Keqi Cui, Zhou Feng, Ying Fu, Miao li, Jianmin Zhang, Ming Liao. Prevalence and molecular characterization of Salmonella species throughout an integrated broiler supply chain in China, *Epidemiology and Infection*. (Minor Revision)
2. **Xingxing Ren**, Ying Fu, Miao li, Zhou Feng, Chenggang Xu, Jianmin Zhang, Ming Liao. High resolution melting (HRM) analysis: A novel method for rapid identification of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum, *Veterinary Microbiology*. (submitted)
3. Shumin Xie, Weixin Jia, Yicun Lin, Kaixiang Xing, **Xingxing Ren**, Wenbao Qi, Ming Liao. Third Wave of Influenza A(H7N9) Virus from Poultry, Guangdong Province, China, 2014–2015, *Emerging Infectious Diseases*. 2015 21, 1657-1660.

### 专利：

张建民，任行星，廖明，徐成刚，符颖，林嘉特：一种快速检测鸡白痢沙门氏菌的PCR-HRM引物及其应用。公开号：105296635

廖明，任行星，张建民，徐成刚，詹泽强，梁德媚：一种快速检测鸡伤寒沙门氏菌的PCR-HRM引物及其应用。公开号：105296636

### 获奖情况：

2014年华南农业大学学业一等奖学金

2015年华南农业大学学业一等奖学金