

论著

沙门菌传代中(氟)喹诺酮类抗生素筛选株药敏性及相关基因突变和表达

牛沁雅¹,李珂婷¹,曹晨阳¹,盛焕精¹,李伟¹,崔生辉²,李凤琴³,杨保伟¹

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院,陕西杨凌 712100; 2.中国食品药品检定研究院,北京 102629; 3.国家食品安全风险评估中心,北京 100021)

摘要:目的 研究在不同浓度(氟)喹诺酮类抗生素存在条件下,沙门菌在传代时得到的筛选株中与耐药性相关部分基因的变异和表达水平变化规律及其与耐药性间的关联性。方法 使用含有一定浓度(氟)喹诺酮类抗生素的肉汤培养基对沙门菌进行培养,在含有相同浓度同类抗生素的平板上划线筛选突变株,微量肉汤稀释法测定筛选株的药敏性,聚合酶链式反应(PCR)结合DNA测序确定喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region,QRDR)基因突变,实时荧光定量PCR(real-time qPCR)法检测外排泵AcrAB-TolC编码基因表达水平。结果 沙门菌(ATCC 14028s)在含有不同代、不同浓度(氟)喹诺酮类抗生素的LB培养基中培养、筛选后,筛选株对抗生素耐受性均有不同程度增加。萘啶酮酸第5~7代筛选株 $gyrA$ 突变,发生Asp87Tyr变异;环丙沙星第4~7代筛选株 $gyrA$ 突变,发生Asp87Asn变异;加替沙星、左氧氟沙星和德拉沙星第1~7代筛选株 $gyrA$ 中均未检出核苷酸突变。随着抗生素浓度增加,各抗生素相应筛选株中外排泵AcrAB-TolC编码基因表达水平较原始菌株增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),第7代菌株 $acrAB-tolC$ 表达量间差异无统计学意义($P > 0.05$)。(氟)喹诺酮类抗生素对不同代筛选株的最小抑菌浓度(MIC)与其对沙门菌(ATCC 14028s)的MIC值比值、 $gyrA$ 突变、 $acrAB-tolC$ 表达水平与抗生素作用浓度和筛选代数间呈正相关。结论 在(氟)喹诺酮类抗生素作用下,沙门菌可通过QRDR基因突变及增加 $acrAB-tolC$ 表达适应抗生素胁迫环境;新一代(氟)喹诺酮类抗生素作用于沙门菌时,菌株QRDR靶位点突变概率降低;多次重复作用后,菌株 $acrAB-tolC$ 表达量虽然增加,但表达量间差异无统计学意义($P > 0.05$),避免了因突变导致耐药性的进一步增强。

关键词:沙门菌;药敏性;喹诺酮耐药决定区;多重耐药泵

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)05-0484-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.05.003

Antimicrobial susceptibility, variation and relative expression of relative genes of *Salmonella* screened from different quinolone and fluoroquinolonesNIU Qinya¹, LI Keting¹, CAO Chenyang¹, SHENG Huanjing¹, LI Wei¹,
CUI Shenghui², LI Fengqin³, YANG Baowei¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Shaanxi Yangling 712100, China; 2. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 3. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To study the mutation and expression of genes of *Salmonella* when screened by different concentrations of quinolone and fluoroquinolones during propagation and their relation with antibiotic resistance. **Methods** *Salmonella* strain was cultured in broth medium and screened on nutrition plate with different concentration of quinolone and fluoroquinolones. Antimicrobial susceptibility of the screened subculture was tested by broth microdilution method, mutation of genes in quinolone resistance-determining region (QRDR) was detected using polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing method, and expression level of the encoding genes of multi-drug associated efflux pump AcrAB-TolC was detected by real-time qPCR. **Results** Antibiotic resistance level of the subcultures screened from LB plate with quinolone and fluoroquinolones inducement increased in different extents. Mutation of Asp87Tyr in $gyrA$ in QRDR was detected from the fifth to the seventh generation of nalidixic acid screened strains. Mutation of Asp87Asn in $gyrA$ in QRDR was detected from the fourth to the seventh generation of ciprofloxacin screened strains. No amino acid

收稿日期:2020-09-18

基金项目:国家自然科学基金(31671956)

作者简介:牛沁雅 女 硕士生 研究方向为食品安全和食源性致病菌防控 E-mail: nqy736461094@163.com

通信作者:杨保伟 男 教授 研究方向为食品安全和致病菌防控 E-mail: ybw090925@163.com

mutation was detected from *gyrA* in the first to the seventh generation of gatifloxacin, levofloxacin and delafloxacin screened strains. Compared to the expression level of the multi-drug efflux pump AcrAB-TolC encoding genes of the original strain, those of the screened strains had significantly ($P < 0.05$) increased resistance. No significant difference was detected among the expression level of AcrAB-TolC encoding genes in the seventh generation of screened strains. The ratio of the minimal inhibitory concentrations (MICs) of the screened strains and that of *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028s), gene variation and relative expression level of *acrAB-tolC* of *Salmonella* significantly positive correlated with subculture generation and antibiotic concentration. **Conclusion** Under the selective pressure of antibiotics, *Salmonella* strain could adapt the stress environment through QRDR mutation and increase the expression level of multi-drug efflux pump AcrAB-TolC. When the next generation fluoroquinolone was used, the mutation frequency of QRDR decreased. After subcultured several times, the expression level of *acrAB-tolC* of the screened strains increased, however, no significant difference was detected among the expression level, which avoided the antibiotic resistance of *Salmonella* to be further increased.

Key words: *Salmonella*; antimicrobial susceptibility; quinolone resistance-determining region; multidrug efflux pump

沙门菌(*Salmonella*)是一种广泛寄生于人和动物肠道的革兰阴性菌,也是引起腹泻疾病的重要病原菌之一。全球每年有9400万例肠胃炎病例和155000例死亡均与沙门菌有关^[1-2]。在我国,每年约有300万例沙门菌感染。目前,沙门菌导致的疾病治疗中,抗生素依然是最直接、有效的首选药物。然而,使用抗生素所产生的耐药问题却日益严重,对动物、人类健康及公共卫生安全造成极大威胁^[3-4]。

(氟)喹诺酮类抗生素是一类人工合成的抗菌药,是沙门菌病治疗中使用最多的抗生素之一。自20世纪60年代萘啶酮酸被发明后,该类药物已经历4代发展,于其药效基团第6位加入氟原子得到系列氟喹诺酮类药物,提高了药效,降低了其对细菌的最小抑菌浓度(minimum inhibition concentration, MIC)^[5]。第二代、第三代、第四代氟喹诺酮类抗生素分别以环丙沙星、左氧氟沙星和加替沙星为代表,目前备受关注的新型氟喹诺酮类药物为德拉沙星。随着(氟)喹诺酮类药物的革新,其抗菌活性明显提升,抗菌谱更为广泛,副作用降低^[6]。由于动物养殖和临床治疗中长期依赖和使用(氟)喹诺酮类抗生素,沙门菌对该类药物的耐受性明显提高。目前认为,介导沙门菌对(氟)喹诺酮类药物耐药的主要机制为:①沙门菌染色体喹诺酮耐药决定区编码基因突变,即*gyrA*和*gyrB*编码的DNA解旋酶亚基以及*parC*和*parE*编码的拓扑异构酶IV亚基氨基酸序列突变改变酶的空间结构,导致细菌耐药;②细胞膜通透性改变、外排泵表达量的增加导致细菌对(氟)喹诺酮类药物在内的抗生素吸收减少而耐药,如*acrAB-tolC*编码的能量依赖型外排系统AcrAB-TolC外排增加后,可将细胞内抗生素外排至胞外进而降低药物敏感性^[7];③耐药质粒携带*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*和*aac(6')-Ib-cr*等基因的编码产物导致包括(氟)喹诺酮类抗生素在内的抗生

素水解或钝化而产生耐药^[7-10]。

目前,国内外对沙门菌耐药性、流行病学的研究报道较多,有学者研究了环丙沙星作用下沙门菌药敏性的变化情况及耐药机理,但沙门菌在不同代(氟)喹诺酮类抗生素作用下药敏性的变化速度及相关基因变异规律并不明确^[11-15],因此,本研究选取了不同代(氟)喹诺酮类抗生素代表药物,在沙门菌传代过程进行胁迫筛选,探究随着(氟)喹诺酮类药物的革新及传代代数的增加,筛选株的药敏性及相应耐药机制的变化规律,为遏制或减缓多重耐药性加剧提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

沙门菌标准菌株(ATCC 14028s)分别用于抗生素体外筛选、药敏性、喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region, QRDR)相关编码基因突变和*acrAB-tolC*表达水平测定。

1.1.2 主要仪器与试剂

电泳仪(Mini-sub Cell)、凝胶成像系统、聚合酶链式反应(PCR)仪、实时荧光定量PCR(real-time qPCR)仪均购自美国Bio-Rad,超微量核酸分析仪(杭州奥盛仪器有限公司),超纯水机,立式压力蒸汽灭菌器,微量移液器,隔水式恒温培养箱,百分之一天平,超净工作台,生物安全柜(美国NUAIRE),小型台式高速离心机,-20和-80℃超低温冰箱。

Ex TaqTm DNA Polymerase、DL 2000 Marker、Loading Buffer、反转录试剂盒、Premix Ex Taq均购自宝生物工程(大连)有限公司,细菌总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]。Luria-Bertani(LB)琼脂、LB肉汤、Mueller-Hinton(MH)琼脂、MH肉汤、萘啶酮酸(nalidixic acid, NAL)、阿米卡星(amikacin, AMK)、氨苄西林(ampicillin,

AMP)、磺胺异噁唑(sulfisoxazole, SUL)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、四环素(tetracycline, TET)均购自北京陆桥技术股份有限公司,加替沙星(gatifloxacin, GAT,美国LKT Laboratory),环丙沙星(ciprofloxacin, CIP,美国Sigma Aldrich),德拉沙星(delaflaxacin, DELA,北京源叶生物科技有限公司),左氧氟沙星(levofloxacin, LEFO,百灵威科技有限公司),XLT4琼脂及其添加剂均购自美国BD。

1.1.3 引物

QRDR基因 $gyrA$ 、 $gyrB$ 、 $parC$ 和 $parE$,外排泵编码基因 $acrA$ 、 $acrB$ 和 $tolC$,沙门菌属特异性基因 $invA$ 扩增和测序引物序列及扩增片段如表1所示。

表1 PCR扩增和测序用引物

Table 1 Primers for PCR amplification and sequencing

引物名称	序列(5'-3')	片段大小/bp	参考文献
$gyrA$	F:ACGTATTGGGAATGACTGG	191	[16]
	R:GGACTGCGCGTCAATAGAAC		
$gyrB$	F:CAAACCTGGCGACTGTCAGG	212	[16]
	R:AGCCCAGCGCGGTGATCAGC		
$parC$	F:CGTCTATGCGATGTCAGAGC	265	[16]
	R:TAACAGCAGCTCGGCGTATT		
$parE$	F:GTCAATGTGCGGCATTGT	242	[16]
	R:ATCCCTTCCACAAGGAACA		
16S rRNA	F:AAAGCGTGGGAGCAAACAG	369	[16]
	R:CCGCTGGCAACAAAGGATAA		
$acrA$	F:CGGCTGTTCTGATGCTCTCA	885	[16]
	R:GCCCTGTTGTGAACACAGTA		
$acrB$	F:AAGAGCAGGCATCACTAGAC	768	[16]
	R:CGCTTCGGACATCACGTAATA		
$tolC$	F:CAGACGCTGATCCTCAATAC	702	[16]
	R:TGCTGATGGAGGCGTTAATA		
$invA$	F:GTGAAATTATGCCACGTTTCGGGCAA	285	[17]
	R:TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		

1.2 方法

1.2.1 抗生素体外筛选

采用抗生素浓度递增法对沙门菌(ATCC 14028s)进行体外传代筛选。具体方法为:将适量供试菌株纯培养物接种至抗生素浓度为 $0.5 \times \text{MIC}$ 的LB肉汤培养基中, 37°C 、 120 r/min 培养 $24\sim 48\text{ h}$ 。肉汤培养物划线接种至含有同浓度同种抗生素的MHA平板, 37°C 培养 $24\sim 48\text{ h}$ 。从MHA平板上挑取一个单菌落,同时接种至相应抗生素浓度分别为 0.5 和 $1 \times \text{MIC}$ 的LB肉汤培养基, 37°C 、 120 r/min 培养 $24\sim 48\text{ h}$ 。抗生素浓度为 $0.5 \times \text{MIC}$ 的LB肉汤培养物用于real-time qPCR检测,抗生素浓度为 $1 \times \text{MIC}$ 的LB肉汤培养物划线接种至抗生素浓度相同的MHA平板上继续培养,以此类推,即进行 0.5 、 1 、 2 、 4 、 8 、 16 、 $32 \times \text{MIC}$ 共7个抗生素浓度的7代筛选。不同抗生素各获得7代筛选株,菌株命名为:抗生素英文名称首字母-代数,即:萘啶酮酸筛选株

N1-N7、环丙沙星筛选株C1-C7、加替沙星筛选株G1-G7、左氧氟沙星筛选株L1-L7、德拉沙星筛选株D1-D7。

1.2.2 药物敏感性测定

采用美国临床实验室标准化委员会(Clinical Laboratory Standard Institute, CLSI)^[18]推荐的微量肉汤稀释法测定抗生素对筛选株的MIC,按照CLSI标准判读药敏结果并确定耐药表型。药敏测定中使用大肠埃希菌(ATCC 25922和ATCC 35218),粪肠球菌(ATCC 29212)作为标准质控菌株。

1.2.3 PCR扩增和基因序列比对分析

采用煮沸法^[19]制备DNA模板。PCR扩增程序为: 94°C 预变性 10 min ; 94°C 变性 1 min , 55°C 退火 1 min , 72°C 延伸 1 min , 35 个循环; 72°C 延伸 10 min ;退火温度随耐药基因扩增引物序列组成进行调整。扩增后,取 $3\ \mu\text{L}$ PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统观察拍照,确定条带位置。剩余产物低温条件送上海桑尼生物科技有限公司测序,测序结果使用Primer premier 5软件翻译成氨基酸,提交基因库使用BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)在线比对。每一次测序后,比对确定原始菌株待测基因的氨基酸序列未发生任何突变,表明本次扩增、测序结果无误。再将同批测得的筛选株的碱基及氨基酸序列与原始菌株相应的序列进行比对,确定碱基突变位点及对应氨基酸突变类型。扩增和序列分析过程使用未经抗生素筛选的沙门菌(ATCC 14028s)作为参比菌株。

1.2.4 real-time qPCR检测

使用1.2.1中获得的菌液提取总RNA,具体按照RNA提取试剂盒操作说明进行。获得总RNA后反转录,具体按照反转录试剂盒操作说明进行。以菌株的16S rRNA为内参基因,以反转录合成的cDNA为模板,检测筛选株外排泵编码基因 $acrAB$ - $tolC$ 各组成基因的表达水平。real-time qPCR反应条件为: 95°C 预变性 30 s ; 95°C 变性 5 s , 54°C 退火 45 s , 72°C 延伸 32 s ,循环 50 次; 72°C 延伸 10 min 。检测中以未经抗生素筛选的沙门菌(ATCC 14028s)为对照菌株。

1.3 统计学分析

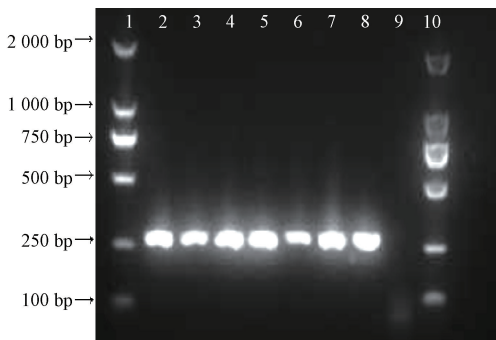
根据目的基因扩增结果,分别计算循环阈值差值(ΔCt)、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 及 $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$,试验结果以 $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ 表示相对表达量。计算方法如下: ΔCt (目的基因)=Ct值(目的基因)-Ct值(内参基因), $\Delta\Delta\text{Ct}$ (筛选株目的基因)= ΔCt (筛选株目的基因)- ΔCt (对照株目的基因)。

使用 Microsoft Office Excel 2010 对试验所得数据进行基本处理和作图,使用 IBM SPSS Statistics Version 22 进行方差分析(Duncan 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义),结果以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) 表示,同时进行 Spearman 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 筛选株鉴定和药物敏感性

采用沙门菌属特异性基因 *invA* 扩增引物对不同抗生素筛选获得的菌株进行鉴定,电泳后均可在高于 250 bp 处检测到目的片段,与预期片段 285 bp 大小相符。测序结果表明这些片段均为 *invA* 基因,部分扩增结果见图 1。



注:1、10 为 DNA markers DL 2000;2、8 为阳性对照即沙门菌(ATCC 14028s);9 为阴性对照;3~7 分别为萘啶酮酸、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星及德拉沙星的第 7 代筛选株

图 1 沙门菌 *invA* 基因 PCR 产物电泳图

Figure 1 PCR fragment of *invA* gene

沙门菌(ATCC 14028s)对四环素、氨苄西林、磺胺异噁唑、阿米卡星和氯霉素等 5 种抗生素均敏感或中度敏感,经过不同代(氟)喹诺酮类抗生素对传代菌株筛选后,发现这些抗生素对第 7 代筛选株的 MIC 值不变或有不同程度上升,部分抗生素对筛选突变株的 MIC 值增加 4 倍,见表 2。由此可见,传代后抗生素筛选得到的突变株协同耐药水平有所增加。

表 2 抗生素对沙门菌(ATCC 14028s)及其传代筛选株的 MIC($\mu\text{g/mL}$)

Table 2 Minimal inhibitory concentration of antibiotics

抗生素	沙门菌(ATCC 14028s)	N7	C7	G7	L7	D7
四环素	8	8	16	8	16	16
氨苄西林	8	16	16	16	16	16
磺胺异噁唑	256	512	512	512	512	512
阿米卡星	4	4	8	4	8	4
氯霉素	4	8	8	16	8	16

2.2 筛选株 QRDR 靶点突变检测

对不同代(氟)喹诺酮类抗生素筛选株 *gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE* 基因序列分析结果表明:萘啶酮

酸第 5~7 代筛选株 *gyrA* 基因第 259 位碱基 G 均变异为 T,对应的氨基酸突变均为 Asp87Tyr;未在其他代筛选株 *gyrA* 基因和所有筛选株其他 3 种基因中检出突变。环丙沙星第 4~7 代筛选株 *gyrA* 基因中第 259 位碱基 G 均变异为 A,对应的氨基酸突变均为 Asp87Asn;未在其他代筛选株 *gyrA* 基因和所有筛选株其他 3 种基因中检出突变。均未在加替沙星 G1-G7 代、左氧氟沙星 L1-L7 代和德拉沙星 D1-D7 代筛选株的 4 种基因中检出突变。研究表明,*gyrA* 基因突变可被用做沙门菌对(氟)喹诺酮类抗生素敏感性下降的分子标志,即在萘啶酮酸和环丙沙星等代数较低的(氟)喹诺酮类抗生素作用下,传代代数增加后 *gyrA* 基因第 259 位碱基突变可导致 GyrA 第 87 位氨基酸突变,为发生频率最高、最为常见的突变位点。同时表明,随着(氟)喹诺酮类抗生素药物的不断革新、药物代谢动力学改善、抗菌活性提升,在保证高效杀菌效果的同时,不易导致致病菌靶标编码基因突变(表 3)。

表 3 不同代萘啶酮酸和环丙沙星筛选株 *gyrA* 突变和对应氨基酸变异

Table 3 Mutation of *gyrA* in different generational inducers that induced by nalidixic acid and ciprofloxacin

菌株编号	核苷酸突变位点	氨基酸突变位点	菌株编号	核苷酸突变位点	氨基酸突变位点
N1	—	—	C1	—	—
N2	—	—	C2	—	—
N3	—	—	C3	—	—
N4	—	—	C4	G259A	Asp87Asn
N5	G259T	Asp87Tyr	C5	G259A	Asp87Asn
N6	G259T	Asp87Tyr	C6	G259A	Asp87Asn
N7	G259T	Asp87Tyr	C7	G259A	Asp87Asn

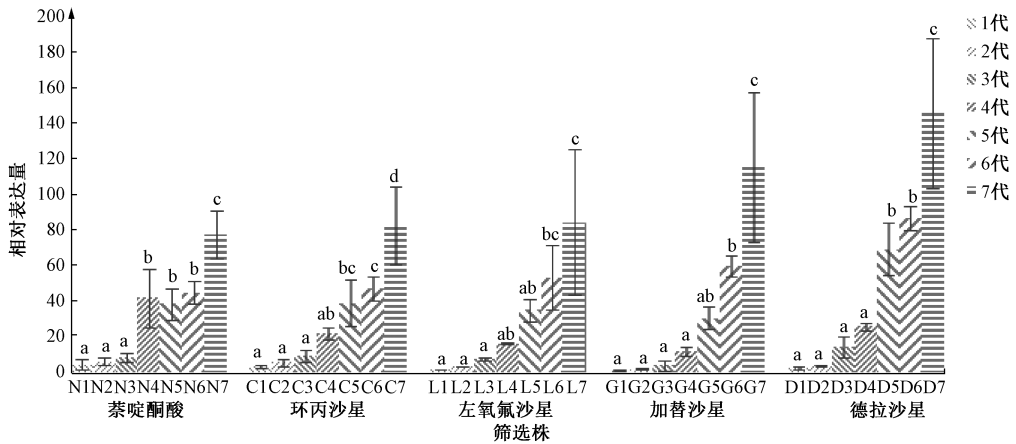
注:—表示未发生核苷酸突变和氨基酸突变

2.3 筛选株多重耐药泵 AcrAB-TolC 编码基因表达

筛选株外排泵 AcrAB-TolC 编码基因 *acrA*、*acrB*、*tolC* 的表达水平 real-time qPCR 检测结果表明:萘啶酮酸 N1-N7 筛选株 *acrA* 表达量分别为对照菌株沙门菌(ATCC 14028s)的 4.6、6.2、8.5、42.0、38.7、45.3、78.0 倍,环丙沙星 C1-C7 筛选株的 *acrA* 表达量分别为对照菌株的 3.5、5.9、9.2、22.0、39.4、47.5、83.0 倍,左氧氟沙星 L1-L7 筛选株的 *acrA* 表达量分别为对照菌株的 1.7、3.7、7.8、16.5、35.2、53.4、84.9 倍,加替沙星 G1-G7 筛选株的 *acrA* 表达量分别为对照菌株的 1.3、2.1、4.0、12.0、30.8、59.7、115.9 倍,德拉沙星 D1-D7 筛选株的 *acrA* 表达量分别为对照菌株的 2.7、4.0、14.5、25.9、69.8、86.9、146.3 倍。不同代(氟)喹诺酮类抗生素对传代菌株筛选后,筛选株 *acrA* 表达量随传代代数的增加而增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。除左氧氟沙星外,其他供试抗生素第 7 代

筛选株 *acrA* 表达量均高于同一抗生素其他代筛选株中该基因的表达量,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),见图2。表明筛选株 *acrA* 的表达量与抗生素

浓度和菌株传代代数密切相关,菌株可能通过提高外排泵编码蛋白 *AcrA* 的表达量增加细胞内抗生素外排,导致菌株耐药性增强。



注: N1-N7、C1-C7、L1-L7、G1-G7 和 D1-D7 为沙门菌(ATCC 14028s)经过萘啶酮酸、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星及德拉沙星筛选后的菌株;图中不同字母表示差异有统计学意义,相同字母表示差异无统计学意义,下同

图2 *acrA* 相对表达量

Figure 2 Relative expressing level of *acrA*

萘啶酮酸 N1-N7 筛选株 *acrB* 表达量分别为对照菌株沙门菌(ATCC 14028s)的 10.2、13.1、20.9、42.7、79.6、156.0、254.9 倍,环丙沙星 C1-C7 筛选株的 *acrB* 表达量分别为对照菌株的 4.9、12.4、19.7、47.6、90.9、131.3、258.1 倍,左氧氟沙星 L1-L7 筛选株的 *acrB* 表达量分别为对照菌株的 4.4、8.5、21.4、37.5、53.7、99.5、193.2 倍,加替沙星 G1-G7 筛选株的 *acrB* 表达量分别为对照菌株的 3.7、14.0、26.5、62.2、85.9、196.6、268.1 倍,德拉沙

星筛选株 D1-D7 的 *acrB* 表达量分别为对照菌株的 6.3、9.0、16.5、46.4、106.4、122.8、279.5 倍。在不同代(氟)喹诺酮抗生素作用下,筛选株的 *acrB* 表达量随传代代数增加而增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。除加替沙星外,其他供试抗生素第7代筛选株 *acrB* 表达量均高于同一抗生素其他代菌株中该基因的表达量,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),见图3。结果表明,*acrB* 的表达量与抗生素浓度和菌株传代代数密切相关。

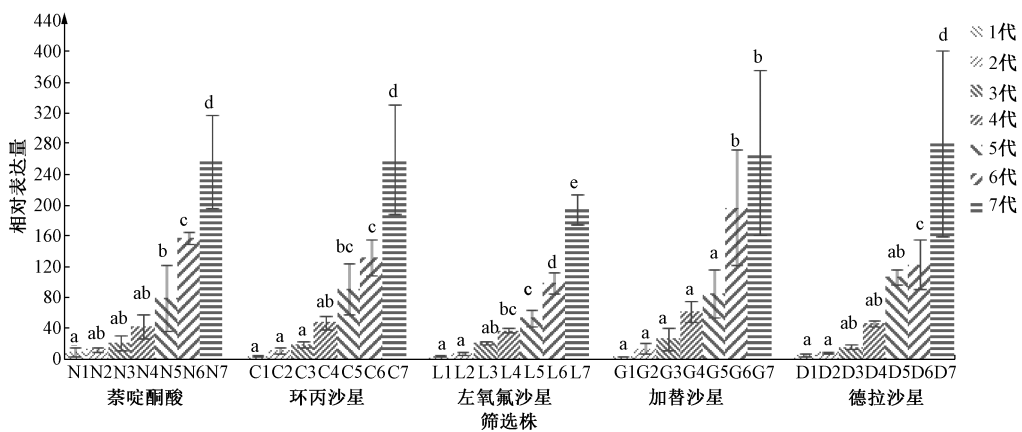


图3 *acrB* 相对表达量

Figure 3 Relative expression level of *acrB*

萘啶酮酸 N1-N7 筛选株的 *tolC* 表达量分别为对照菌株沙门菌(ATCC 14028s)的 2.9、3.7、3.8、8.9、13.1、57.4、130.3 倍,环丙沙星 C1-C7 筛选株的 *tolC* 表达量分别为对照菌株的 1.4、3.8、8.9、12.1、15.8、35.7、99.2 倍,左氧氟沙星 L1-L7 筛选株的 *tolC* 表达

量分别为对照菌株的 1.1、2.1、4.5、10.4、13.2、34.6、57.4 倍,加替沙星 G1-G7 筛选株的 *tolC* 表达量分别为对照菌株的 1.8、3.3、8.6、21.2、51.0、87.4、123.5 倍,德拉沙星 D1-D7 筛选株的 *tolC* 表达量分别为对照菌株的 1.9、2.1、3.4、9.7、22.0、37.0、88.8 倍。与

acrA、*acrB* 相同,在不同供试抗生素作用下,*tolC* 表达量随传代代数的增加而增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。除加替沙星外,其他抗生素第 7 代筛选株 *tolC* 表达量均高于同一抗生素其他代菌株中该基因

的表达量,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 4。结果表明,筛选株外排泵组成基因 *tolC* 的表达量与抗生素浓度、菌株传代代数相关,可通过 *TolC* 表达量的明显增加提高对药物的耐受性。

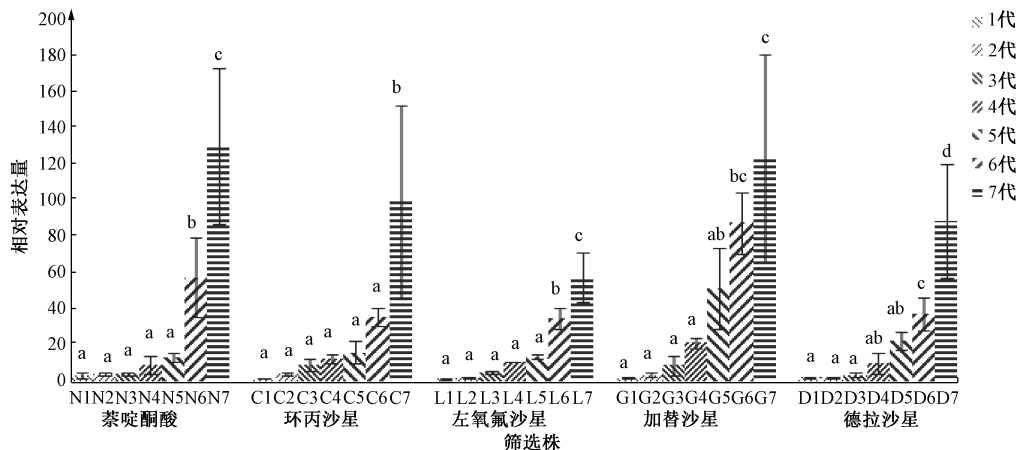


图 4 *tolC* 表达量

Figure 4 Relative expression level of *tolC*

2.4 相关性分析

相关性分析及聚类分析结果见图 5,图中 Spearman 相关性系数为 0.4~1,即蓝色表示相关性相对较低。萘啶酮酸、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星及德拉沙星不同代筛选株 *acrAB-tolC* 组成基因的相对表达量(N_acrA 、 N_acrB 、 N_tolC 、 C_acrA 、 C_acrB 、 C_tolC 、 L_acrA 、 L_acrB 、 L_tolC 、 G_acrA 、 G_acrB 、 G_tolC 、 D_acrA 、 D_acrB 、 D_tolC)与(氟)喹诺酮类抗生素作用浓度、菌株传代代数间呈正相关($r = 0.96 \sim 1$),即随着传代次数和抗生素作用浓度增加,筛选株 *acrAB-tolC* 整体表达水平增加。(氟)喹诺酮类抗生素作用浓度、菌株传代代数和萘啶酮酸、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星及德拉沙星对不同代筛选株的 MIC 与相应抗生素对沙门菌(ATCC 14028s)的 MIC 值的比值(依此表示不同代筛选株的药敏性变化)呈正相关($r = 0.61 \sim 0.98$),与 *gyrA* 突变也呈正相关关系($r = 0.87$),即随着菌株传代次数和萘啶酮酸、环丙沙星浓度增加,筛选株耐药性增强、*gyrA* 突变概率增加。由于左氧氟沙星、加替沙星和德拉沙星筛选株中并未检出 *gyrA* 突变,无法对突变和抗生素作用浓度及传代代数间的相关性进行分析,但筛选株药物敏感性仍然与左氧氟沙星、加替沙星、德拉沙星的浓度及传代代数密切正相关。

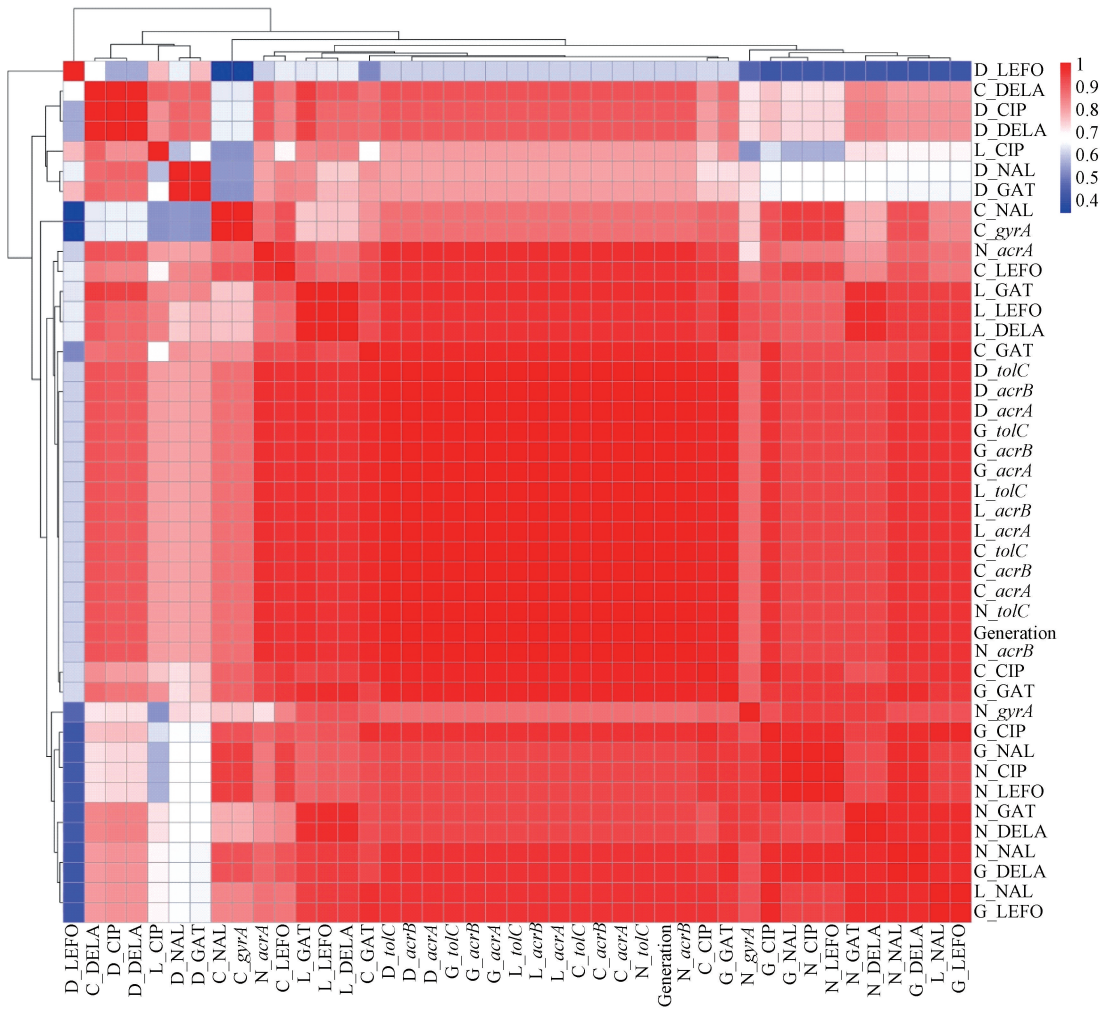
3 讨论

沙门菌种类复杂,血清型繁多,是导致全球性胃肠炎病例的主要因素之一。(氟)喹诺酮类抗生素则是治疗食源性沙门菌病的有效药物,但抗生素

的不当和过量使用却造成全球面临菌株耐药的危机,因此,探究抗生素作用于致病菌导致其变异的规律对药物使用、菌株耐药性的防控都有着积极有益的影响^[20]。

致病菌对某种特定抗生素耐药性的增加往往伴随着协同耐药水平的增强。龚子鉴等^[21]使用头孢曲松体外作用淋球菌后,发现头孢曲松对菌株 ATCC 49226 和 ZSSY 00205 生长变异株的 MIC 值增加了 125 倍,筛选得到的菌株对青霉素、四环素、红霉素、喹诺酮等的协同耐药水平增加。王琴琴等^[22]发现美罗培南作用后菌株 ATCC 19606 对替加环素、亚胺培南、阿米卡星、左氧氟沙星仍处于敏感状态,对头孢吡肟交叉耐药。本研究结果显示,沙门菌(ATCC 14028s)经萘啶酮酸、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星及德拉沙星 5 种(氟)喹诺酮类抗生素胁迫筛选后,菌株对其他类抗生素的敏感性不变或有不同程度的下降。可见,单一抗生素的多次反复使用可导致菌株不同程度的协同耐药水平增加。由于在疾病治疗或动物饲养健康预防过程中同种抗生素多次使用的事实,预示着当前食品安全与公共卫生领域亟待解决的耐药性问题肯定与此有关,相关部门应对动物饲养和疾病临床治疗中抗生素的正确使用提供进一步的指导。

(氟)喹诺酮类抗生素作用靶位点结构改变是引起沙门菌耐药的主要原因之一。QRDR 区编码基因的突变可以修饰靶蛋白并导致氨基酸置换,进而改变解旋酶和拓扑异构酶活性位点的空间结构和理化性质,促使沙门菌等对(氟)喹诺酮类药物产



注:C_NAL为萘啶酮酸对环丙沙星筛选株的MIC与其对沙门菌(ATCC 14028s)MIC的比值,其他以此类推;N_acrA为萘啶酮酸筛选株的acrA相对表达量,其他以此类推

图5 菌株传代代数、筛选株药敏性、*gyrA*突变和AcrAB-TolC编码基因表达水平相关性分析
Figure 5 Correlation among generation of the subcultures, antibiotic susceptibility, *gyrA* mutation and expression level of AcrAB-TolC encoding genes

生不同程度的耐药^[23]。现有研究表明,GyrA编码基因突变最为常见、突变频率最高的位点为Ser83→Phe、Tyr或Ala,Asp87→Gly、Asn或Tyr^[24-25]。KUANG等^[26]分析了从上海收集的3680株沙门菌中179株环丙沙星耐药株,发现其QDRDs中GyrA突变主要为Ser83Phe(53.6%)、Asp87Asn(35.8%)和Asp87Tyr(16.8%)。本研究沙门菌(ATCC 14028s)被不同(氟)喹诺酮类抗生素胁迫筛选后,其GyrA中检出的突变与YANG等^[27]、YIN等^[28]、葛琨等^[29]、MAKA等^[30]报道的结果相同或相似,萘啶酮酸筛选株从第5代开始GyrA第87位氨基酸Asp突变为Tyr,环丙沙星筛选株从第4代开始GyrA第87位氨基酸Asp突变为Asn。但本研究并未在左氧氟沙星、加替沙星以及德拉沙星筛选株中检出氨基酸突变。一方面表明,随着(氟)喹诺酮类抗生素的不断和连续作用,沙门菌可以通过靶点变异适应抗生素胁迫;另一方面,表明随着该类药

不断革新,抗生素抗菌谱扩大,抗菌活性提升,杀菌能力增加的同时,又不易导致菌株靶点发生变异。据文献报道,QRDR区*gyrB*和*parE*基因突变频率较低^[31],本研究均未在5种抗生素筛选株的*parC*、*gyrB*和*parE*中检出突变,这可能由于这些位点在抗生素的作用或胁迫下发生变异的频率较低,也可能是传代数不足导致突变没有发生。因此,尚需进一步开展(氟)喹诺酮类抗生素胁迫作用于沙门菌产生突变的规律研究来揭示抗生素筛选与突变发生的相关性规律。

至于外排泵介导的耐药性,DUMONT等^[32]利用荧光光谱及质谱分析测定细胞内抗生素累积量,证明了外排泵的存在会影响抗生素的高浓度积累;VERGALLI等^[33]也通过荧光光谱法证明了这一点。本研究结果显示,菌株传代过程中,随着同一抗生素对菌株的不断胁迫作用,筛选株AcrAB-TolC各编码基因的表达量与对照组比较均明显增加,差异有

统计学意义($P < 0.05$),表明菌株可以通过外排胞内物以适应耐药环境和胁迫,这一结果与多数文献报道一致。OKANDA 等^[34]研究了伤寒沙门菌和甲型副伤寒沙门菌对喹诺酮的耐药机制,发现所有受试菌外排泵活性的增强是其产生喹诺酮耐药性的主要原因之一,其中 AcrAB-TolC 外排泵可能是左氧氟沙星的一个重要抗性因素。SHEN 等^[35]研究了 27 株耐(氟)喹诺酮类药物沙门菌外排泵调节基因的表达水平,结果显示 AcrAB-TolC 外排泵在介导喹诺酮耐药性方面发挥了有效作用,直接导致沙门菌的耐药性和多重耐药性。除此之外,杨保伟等^[36]、顾新杰等^[37]、BLAIR 等^[38]开展的研究也证实了这一点。

AcrAB-TolC 中,细胞质膜泵蛋白 AcrB 和外膜通道蛋白 TolC 分别连接于膜融合蛋白 AcrA 的 C 端与 N 端,AcrAB-TolC 复合物主要由 AcrA 稳定,AcrA:AcrB:TolC 之间可能的化学计量为 6:3:3,可见 AcrA 在外排泵复合物中占有主导作用^[39-41]。本研究发现,不同代抗生素第 7 代筛选株的 *acrA* 表达量随着抗生素作用次数的增加而整体增加,其中萘啶酮酸、环丙沙星、左氧氟沙星作为前 3 代(氟)喹诺酮类抗生素的代表,作用于菌株后,*acrA* 表达量基本趋于稳定;第 4 代加替沙星与新型抗生素德拉沙星作用后 *acrA* 的表达量增加,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 *acrA* 相同,不同代(氟)喹诺酮类抗生素筛选株 *acrB*、*tolC* 的表达量间差异也无统计学意义($P > 0.05$)。即(氟)喹诺酮类抗生素的革新对菌株的抑杀程度不断提高,但对其外排泵的表达水平并没有产生明显影响。

基于以上结果,对不同代筛选株中 *gyrA* 基因的突变以及其 *acrAB-tolC* 组成基因的表达水平与抗生素作用浓度、菌株代数之间进行了相关性分析,发现 *gyrA* 突变和 *acrAB-tolC* 表达水平均与抗生素作用浓度和传代次数呈正相关,随着萘啶酮酸、环丙沙星作用浓度和传代次数增加,菌株会通过 *gyrA* 突变及外排泵 *acrAB-tolC* 基因表达增加适应高抗生素浓度的选择性压力。随着抗生素结构的不断革新,左氧氟沙星、加替沙星、德拉沙星筛选株并未发现基因突变现象,但与原始菌株比较,其外排泵 *acrAB-tolC* 组成基因的表达水平增加。由此可见,在早期(氟)喹诺酮类抗生素作用下,菌株可通过抗生素靶点变异及提高外排泵表达水平适应生存环境,进而产生耐药性;随着抗生素不断革新和抗菌活性的提升,它们作用于沙门菌时不易导致菌株抗生素靶点发生变异,菌株可能主要通过外排泵基因的表达耐受高浓度药物。

参考文献

- [1] DENG X L, RAN L, WU S Y, et al. Laboratory-based surveillance of non-typhoidal *Salmonella* infections in Guangdong Province, China[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, 9(4): 305-312.
- [2] 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.
- [3] YANG X J, WU Q P, HUANG J H, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* isolated from raw vegetables in China[J]. *Food Control*, 2020, 109: 1-6.
- [4] WANG L, HUO X T, QI W Z, et al. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* Typhimurium using nickel nanowire bridge for electrochemical impedance amplification[J]. *Talanta*, 2020, 211: 1-10.
- [5] VAN BAMBEKE F, MICHOT J M, VAN ELSERE J, et al. Quinolones in 2005: an update[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2005, 11(4): 256-280.
- [6] SUAIFAN G A R Y, MOHAMMED A A M. Fluoroquinolones structural and medicinal developments (2013-2018): Where are we now? [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2019, 27(14): 3005-3060.
- [7] HORIYAMA T, YAMAGUCHI A, NISHINO K. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(7): 1372-1376.
- [8] CRUMP J A, SJÖLUND-KARLSSON M, GORDON M A, et al. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(4): 901-937.
- [9] AZARGUN R, BARHAGHI M H S, KAFIL H S, et al. Frequency of DNA gyrase and topoisomerase IV mutations and plasmid-mediated quinolone resistance genes among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections in Azerbaijan, Iran [J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2019, 17(11): 39-43.
- [10] YASSINE I, RAFEI R, OSMAN M, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: mechanisms, detection, and epidemiology in the Arab countries [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2019, 76: 1-12.
- [11] ZHANG C Z, REN S Q, CHANG M X, et al. Resistance mechanisms and fitness of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis mutants evolved under selection with ciprofloxacin *in vitro* [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9113.
- [12] YANG C P, LI H H, ZHANG T, et al. Study on antibiotic susceptibility of *Salmonella* Typhimurium L forms to the third and fourth generation cephalosporins [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 3042.
- [13] CEBRIAN L, RODRÍGUEZ J C, ESCRIBANO I, et al. Effect of exposure to fluoroquinolones and beta-lactams on the *in vitro* activity of other groups of antibiotics in *Salmonella* spp. [J]. *APMIS*, 2006, 114(7/8): 523-528.
- [14] 王嘉炜,肖英平,杨华,等. 鸡肉源沙门氏菌血清型、药敏性及部分耐药基因研究 [J]. *食品科学*, 2017, 38(15):

- 140-146.
- [15] 黄巾凌, 王嘉炜, 牛沁雅, 等. 沙门氏菌中与萘啶酮酸和环丙沙星抗性相关基因及突变的检测分析[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 320-330.
- [16] CHEN S, CUI S H, 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]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(2): 535-542.
- [17] TIMMONS C, DOBHALL S, FLETCHER J, et al. Primers with 5' flaps improve the efficiency and sensitivity of multiplex PCR assays for the detection of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7[J]. *Journal of Food Protection*, 2013, 76(4): 668-673.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard[S]. 2nd ed. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
- [19] TIKHONOVA E B, YAMADA Y, ZGURSKAYA H I. Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC [J]. *Cell Chemical Biology*, 2011, 18(4): 454-463.
- [20] 施开创, 李凤梅, 邹联斌, 等. 鸡源致病性沙门氏菌的分离鉴定及血清型和药物敏感性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(8): 2160-2168.
- [21] 龚子鉴, 赖维, 黄朝伟, 等. 耐头孢曲松淋球菌菌株的体外人工诱导及多重耐药现象[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(2): 68-70.
- [22] 王琴琴, 蔡兴东, 吴义, 等. 鲍曼不动杆菌体外诱导耐药及其诱导前后交叉耐药和呼吸耗氧率分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 852-859.
- [23] CASIN I, BREUIL J, DARCHIS J P, et al. Fluoroquinolone resistance linked to GyrA, GyrB, and ParC mutations in *Salmonella enterica* Typhimurium isolates in humans [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9(11): 1455-1482.
- [24] PREETHI B, RAMANATHAN K. Molecular level understanding of resistance to nalidixic acid in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium associates with the S83F sequence type [J]. *European Biophysics Journal*, 2016, 45(1): 35-44.
- [25] YANG B W, QIAO L P, ZHANG X L, et al. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China[J]. *Food Control*, 2013, 32(1): 228-235.
- [26] KUANG D, ZHANG J M, XU X B, et al. Emerging high-level ciprofloxacin resistance and molecular basis of resistance in *Salmonella enterica* from humans, food and animals [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 280(5): 1-9.
- [27] YANG B W, XI M L, CUI S H, et al. Mutations in gyrase and topoisomerase genes associated with fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars from retail meats [J]. *Food Research International*, 2012, 45(2): 935-939.
- [28] YIN M Y, YANG B W, WU Y, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* serovar in retail meats in market place in Uighur, Xinjiang, China [J]. *Food Control*, 2016, 64(12): 165-172.
- [29] 葛琨, 武运, 杨保伟, 等. 乌鲁木齐牛羊源沙门氏菌对喹诺酮类药物的耐药状况及相关基因分析[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 107-112. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201704018.
- [30] MAKA Ł, MAĆKIWI E, STASIAK M, et al. Ciprofloxacin and nalidixic acid resistance of *Salmonella* spp. isolated from retail food in Poland [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 276(3): 1-4.
- [31] 周海波. 副溶血性弧菌耐药性调查及对喹诺酮类药物耐药变异特征的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [32] DUMONT E, VERGALLI J, CONRAUX L, et al. Antibiotics and efflux: combined spectrofluorimetry and mass spectrometry to evaluate the involvement of concentration and efflux activity in antibiotic intracellular accumulation [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(1): 58-65.
- [33] VERGALLI J, ATZORI A, PAJOVIC J, et al. The challenge of intracellular antibiotic accumulation, a function of fluoroquinolone influx versus bacterial efflux [J]. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 198.
- [34] OKANDA T, HAQUE A, EHARA T. Characteristics of resistance mechanisms and molecular epidemiology of fluoroquinolone-nonsusceptible *Salmonella enterica* serovar typhi and paratyphi a isolates from a tertiary hospital in Dhaka, Bangladesh [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2018, 24(10): 1460-1465.
- [35] SHEN J L, YANG B W, GU Q, et al. The role of AcrAB-TolC efflux pump in mediating fluoroquinolone resistance in naturally occurring *Salmonella* isolates from China [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2017, 14(12): 728-734.
- [36] 杨保伟, 盛敏, 席美丽, 等. 沙门氏菌抗生素抗性机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 39(9): 1497-1484.
- [37] 顾新杰. 靶向 AcrB 外排蛋白的喹啉衍生物的设计、合成以及逆转耐药活性的研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [38] BLAIR J M A, RICHMOND G E, PIDDOCK L J V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance [J]. *Future Microbiology*, 2014, 9(10): 1165-1177. DOI: 10.2217/fmb.14.66.
- [39] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2002: 36-42.
- [40] 侯慧慧. 大肠杆菌的 AcrAB-TolC 多药外排泵及其调控研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(12): 1932-1937. DOI: 10.13344/j. microbiol. china. 2008. 12. 027.
- [41] MIKOŁOSKO J, BOBYK K, ZGURSKAYA H I, et al. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA [J]. *Structure*, 2006, 14(3): 577-587.