

雞白痢沙門氏桿菌之鑑定與抗藥性分析

官南綾^{1*}、涂 堅¹、沈瑞鴻²

¹行政院農業委員會家畜衛生試驗所

²國立中興大學獸醫系

摘要 雞白痢(pullorum disease, PD)的病原為 *Sal. Pullorum*，各年齡層的雞隻都可能感染發病，在二至三週齡雞隻常造成急性爆發，引起重大的經濟損失。不當使用抗生物質進行細菌疾病的治療或是預防性投予，可能造成高抗藥性盛行率及多重抗藥性菌株出現。整合子(integron)是一種細菌產生抗藥性的機制，為可移動的 DNA 組成，其上攜帶的抗藥性基因卡匣可能影響細菌的抗藥性。本研究目的在雞白痢沙門氏菌的鑑定，以及其抗藥性與第一型 integron 之間的關聯。自臨床病例分離得 26 株 *Sal. Pullorum*，其中 42.3% (11/26)沙門氏菌株測得第一型 integron，其大小為 721 bp(*dhfrA25*)、1,000 bp(*aadA1*)及 1,900 bp(*aadA1* 及 *dhfrA12*)。第一型 integron 所攜帶的基因卡匣(gene cassettes)種類包含二種 aminoglycosides 抗藥性基因(*aadA1* 及 *aadA2*)；二種 trimethoprim 抗藥性基因(*dhfrA12* 及 *dhfrA25*)。一株帶有 *dhfr* 基因之菌株對於 sulfamethoxazole/trimethoprim 有抗藥性，10 株帶有 *aadA* 基因之菌株其對於 streptomycin 的最小抑制濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)則有明顯上升的情形，顯示菌株的抗藥性與第一型 integron 的帶有的抗藥性基因卡匣有關。然而，抗藥性基因卡匣的種類僅包含部分菌株的抗藥性，顯示還有其他抗藥機制存在。

關鍵字: 雞白痢沙門氏桿菌、抗藥性、整合子

緒言

雞白痢(pullorum disease)的病原是 *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum-Pullorum* 中的一種生物型(biotype)：Pullorum (以下簡稱 *Sal. Pullorum*)。雞白痢好發於二至三週齡的小雞，臨床症狀主要為下痢，常見雞隻肛門周圍沾連黏稠的白色糞便而得名，其他感染症狀如關節炎、神經症狀或敗血症也很常見[1,14]，在其他鳥種如火雞、鵪鶉及雉雞也有感受性[13]。雞白痢在世界各國都造成養禽產業的損失，主要發生於拉丁美洲、中東、印度等地區及國家，在台灣的有色雞種也時有病例[1,13]。

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum-Pullorum 這個血清型下，因為醣類發酵等生化特性的差異可分為兩種生物型(biotype)：Pullorum

和 *Gallinarum* [13]，*Sal. Pullorum* 及 *Sal. Gallinarum* 需利用 maltose、dulcitol、rhamnose 等醣類發酵及 ornithine decarboxylase(ODC)反應的差異加以區別，然而許多臨床分離的菌株出現不典型的結果，而造成分型的困難[8]。近年有許多文獻著重以分生技術區分兩種生物型，Shah 等人利用兩種生物型在 *rfsB* 基因上 237 及 598 的單點序列差異建立了 allelespecific PCR [12]；Ribeiro 等人則是針對 *speC* 及 *speF* 基因序列設計引子，同樣成功的區分兩種生物型[11]；Paiva 等人則是增幅 *fliC* 的片段後以 *Hinf*I 酶切割，以 RFLP(restriction fragment length polymorphism)技術加以區分[9]。現場對於禽類沙門氏菌症的治療與控制仍是以投予抗菌劑為主，已出現多重抗藥菌株，對於 tetracycline、oxytetracycline、

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

penicillin、aminoglycosides、sulfisoxazole及fluoroquinolones類藥物呈現抗藥性[10]。

整合子(integron)是一種可移動的DNA組成,可攜帶外源性基因卡匣並在不同的菌種間水平傳播,在細菌抗藥性的產生扮演重要的角色,尤其是腸內菌科的細菌。Integron主要的結構如下: *int*基因可轉譯出integron integrase (*IntI*),是一種 site-specific recombinase; integron-associated promoter可啟動之後所攜帶的外源基因的表現; integron-associated recombination site(*attI*)及 cassette-associated recombination sites(*attC*), *attI*是integron integrase可辨識的重組位置, *attI*之後可嵌入外源性基因卡匣(通常是抗藥性基因),而外源性基因卡匣又以 *attC* 連接其他的外源性基因卡匣,因此 *attI*和 *attC*之間常帶有數個外源性基因卡匣,並可形成一由integron integrase調控的環狀結構(circular gene cassette),自由的在不同的integron間移動、進行重組[6]。

*intI*基因序列,目前已知有四型(class I-IV),腸內菌科中普遍帶有第一型integron[6]。而第一型integron的結構上在5端(5' conserved segment, 5' CS)及3端(3' conserved segment, 3' CS)各有一高度保留的序列片段,兩者之間則是變異多端的外源性基因卡匣。因此可針對5' CS及3' CS設計具特異性的引子,檢測菌株是否帶有第一型integron[8]。本研究將針對 *Sal. Pullorum*的抗藥性盛行率及抗藥性菌株間的差異與第一型integron的關聯作探討。

材料及方法

病原分離

病例收集自台灣中南區家禽場,由疑似沙門氏菌病例如敗血症、下痢症狀之弱雞等,從心囊炎、肝壞死灶、肝腫大、異常卵泡等病變進行鈎菌。鈎菌步驟注重檢體表面消毒等無菌操作,並選擇新鮮檢體,降低體表汙染及死後腸道汙染的機會。

細菌鑑定

以血液培養基配合選擇性培養基如MacConkey agar、brilliant green agar (BGA)、xylose lysine deoxycholate(XLD)agar等進行分離,沙門氏菌在

MacConkey agar上,因非乳糖發酵而為無色菌落,在brilliant green agar上呈粉紅-白色菌落,

在XLD agar上是紅色菌落。配合適當的選擇性培養基,挑選出可能是沙門氏菌的菌落經繼代、純化後,以全自動微生物分析系統 Vitek 2 Compact(bioMérieux)系統進行生化鑑定。

血清學鑑定

依據沙門氏菌鑑定標準流程[5],參照Modified Kauffmann-White Scheme,使用標準抗血清檢測體表抗原(somatic antigens)及鞭毛抗原(flagella antigens),依據所測得的抗原結果,確認沙門氏菌分離株的血清型別。若是鑑定為 *Salmonella entericasubsp. enterica* group D(體表抗原1、9及12),則加做maltose、dulcitol等醣類及產氣試驗。*Sal. Pullorum*生物型無法利用maltose及dulcitol,培養於三糖鐵瓊脂(triple sugar iron agar, TSIA)上會產氣。*Sal. Gallinarum*生物型則剛好相反,可利用maltose及dulcitol,培養於TSIA上不會產氣。

分子生物檢測技術

*Sal. Pullorum*及 *Sal. Gallinarum*的非典型菌株無法僅以生化及血清學鑑定,須針對特定基因如 *rfaS*,以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)及定序加以確認, *Sal. Pullorum*在 *rfaS*基因上第237及598的核苷酸為腺嘌呤(adenine), *Sal. Gallinarum*則為鳥嘌呤(guanine)[12]。

藥物敏感性試驗

以抗菌劑紙錠瓊脂擴散法(disk agar diffusion method)依照 CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute)標準[4],檢測現場常用的七大類共17種抗菌劑: amoxicillin、ampicillin、cephalothin、ceftiofur、colistin、florfenicol、flumequine、enrofloxacin、streptomycin、neomycin、kanamycin、gentamicin、tetracycline、oxytetracycline、doxycycline、sulfamethoxazole/trimethoprim及sulfonamides。之後參考抗菌劑紙錠瓊脂擴散法的結果,配合檢測各菌株帶有的第一型integron的抗藥性基因分析,針對特定

的抗菌劑，以 SensititreVizion System® (Thermo Scientific) 測試最小抑制濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC)，比較抗藥性的產生與抗藥性基因是否相關。

抗藥基因分析

參考Levesque等人針對5' CS及3' CS設計具特異性的引子及PCR反應條件，檢測菌株是否帶有第一型integron[8]。PCR反應條件簡述如下：先以94°C加熱5分鐘，打開DNA雙股結構，之後以35個循環增幅目標片段，每個循環包含94°C、30秒使DNA變性，60°C、30秒引子黏合，及72°C、1分30秒增幅，最後再以72°C、5分鐘增幅。由於不同菌株間第一型integron上帶有外源性基因卡匣數目及種類不同，針對5' CS及3' CS以PCR方法所增幅出的核酸片段大小也不同，可視情況將72°C增幅的時間延長。本次研究使用商品化套組Fast-Run™ HotStart PCR Kit(Protech Technology)，參考廠商說明書加入適量的引子、待測菌核酸及滅菌水後，依前述條件進行PCR反應，並將PCR產物以1.5%瓊膠(agarose)進行電泳。將增幅片段進行序列分析並與National Center for Biotechnology Information(NCBI)上的基因庫比對，可得知外源性基因卡匣所帶有抗藥性基因為何，是否產新的抗藥性卡匣。

結果

自臺灣中南區禽類沙門氏菌病例分離得29株禽類沙門氏菌，皆分離自雞。生化鑑定皆為*Salmonella* sp.，需加做血清學試驗，其中26株血清學鑑定為*Salmonella entericasubsp. enterica serovar Gallinarum-Pullorum*，3株*Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis*。26株*Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum-Pullorum*加測maltose、dulcitol等醣類及產氣試驗初步確定為*Sal. Pullorum*生物型，檢測其*rfbS*基因確認為*Sal. Pullorum*生物型。

整體而言，近七成菌株對於sulfonamides類；六成以上菌株對於β-lactam類中的amoxicillin及ampicillin具有抗性，對於β-lactam類中的第一代頭孢子素

cephalothin及第三代頭孢子素ceftiofur則尚未有明顯的抗藥性產生；近六成菌株對於aminoglycosides類中的streptomycin及gentamicin產生抗藥性，但對於kanamycin及neomycin仍具有感受性，尤其是neomycin，所有的菌株皆有感受性；對於其他tetracycline類、quinolones類及phenicol類相較之下抗藥性較低，都在三成以下，對於enrofloxacin，所有的菌株皆有感受性(表1及圖1)。接著將26株*Sal. Pullorum*以個別菌株具有的抗藥性種進行統計(表2)，所有菌株至少都對一種以上的抗菌劑產生抗藥性，34.6%(9/26)*Sal. Pullorum*對於四種以下的抗菌劑有抗藥性，34.6%(9/26)菌株對於六種抗菌劑有抗藥性，占大多數。

在抗藥基因分析的部分，42.3%(11/26)*Sal. Pullorum*測得第一型integron(表3)，增幅之核酸片段大小為721bp(*dhfrA25*)、1,000bp(*aadA1*)及1,900bp(*dhfrA12-orfF-aadA2*)。基因卡匣種類包含兩種aminoglycosides抗藥性基因(*aadA1*及*aadA2*)；兩種trimethoprim抗藥性基因(*dhfrA12*及*dhfrA25*)；以及一個功能未明的open reading frame(*orfF*)。僅一株*Sal. Pullorum*帶有二個不同的第一型integron，其餘10株皆指偵測得一種第一型integron。

依照抗藥性基因分析的結果，遂挑選sulfamethoxazole/trimethoprim(SXT)及streptomycin二種藥物進行MIC試驗(表3)：對於SXT有抗藥性者，100%(3/3)第一型integron上帶有*dhfr*基因，沒有*dhfr*基因者對於SXT則皆具感受性；對於streptomycin有抗藥性者，則90.9%(10/11)第一型integron上帶有*aadA*基因，有一株不具*aadA*基因但卻對streptomycin有抗藥性。同樣針對另外15株沒有第一型integron的*Sal. Pullorum*進行SXT及streptomycin的MIC試驗(表4)：所有的菌株對於SXT皆有感受性；然而在streptomycin的結果則沒有一致性，只有13.3%(2/15)的菌株具感受性，其餘菌株的MIC皆在32 µg/mL以上。

討論

65.4%(17/26)*Sal. Pullorum*是對五種以上的

抗菌劑有抗藥性的多重抗藥性(表2)。本次菌株主要來自臺灣中南部,相較於近年翁等人針對台灣傳統市場有色雞的沙門氏菌調查,174株沙門氏菌中,半數對於ampicillin、colistin、doxycycline、florfenicol、nalidixic acid及sulfamethoxazole/trimethoprim等具有抗藥性,且為多重抗藥菌株[3]。郭等人針對嘉南地區的養禽場調查,也顯示多數菌株對於sulfamethoxazole/trimethoprim、lincomycin/spectinomycin、tetracycline、ampicillin等抗菌劑有抗藥性[2]。顯示臺灣現場已存有多重抗藥菌株,而產生抗藥性的藥物種類差異則與地區性或各禽場間的使用情形有關。

菌株獲得抗藥性基因卡匣是產生抗藥性的一種重要途徑,integron的特性可造成抗藥性在環境菌、正常菌叢及臨床分離株間,廣泛且跨菌種的水平傳播。本次研究中,僅有一株*Sal. Pullorum*同時帶有二種第一型integron,其上分別帶有*aadA1*及*dhfrA25*,多數菌株只有偵測得一種第一型integron。只有一株*Sal. Pullorum*的integron上同時有三種基因卡匣(*dhfrA12-orfF-aadA2*)。而這些卡匣的種類包含*aadA1*、*aadA2*、*dhfrA12*、*dhfrA25*及*dhfrA12-orfF-aadA2*在多種腸內菌科細菌中被測得,已是世界性廣泛分布[6,7],本次研究未偵測得新型基因卡匣。

本次研究中所測得的第一型integron帶有的*dhfr*基因卡匣(*dhfrA12*及*dhfrA25*)可轉譯出dihydrofolate reductase,可分解trimethoprim[7],故三株帶有*dhfr*基因之菌株對於治療常用的抗菌劑組合sulfamethoxazole/trimethoprim皆有抗藥性。10株帶有*aadA*基因(*aadA1*及*aadA2*),可轉譯出

aminoglycoside(3")adenyltransferase具有分解streptomycin和spectinomycin的能力[7]。這些菌株對於streptomycin皆有抗藥性。比較26株*Sal. Pullorum*的MIC試驗的結果會發現耐人尋味的差異,在SXT的部分,具有*dhfr*基因者對於SXT皆產生抗藥性,反之則無,足見菌株抗藥性與第一型integron的帶有的抗藥性基因卡匣有關。然而在streptomycin的部分,*aadA*基因的有無對於抗藥性的產生沒有絕對的一致性,顯示尚存有其他抗藥機制。細菌產生抗藥性的機制繁複,第一型integron乃是其中一環。

總結而言,此次研究分離六成*Sal. Pullorum*對於五種以上抗菌劑有多重抗藥性,對照前人的調查結果也有類似的結果[2,3],顯示多重抗藥菌株已在現場存在一段時間。現場常用的抗菌劑中,對sulfonamides、ampicillin、amoxicillin、gentamicin、colistin約有八成抗藥性;其他類別抗菌劑的抗藥性都在三成以下,部分抗菌劑如enrofloxacin、neomycin則皆具感受性。65.4%*Sal. Pullorum*帶有第一型integron,主要帶有*dhfr*基因及*aadA*基因,確實影響到菌株的抗藥性。實際上,細菌性疾病的治療上無法避免使用抗菌劑,而過度及錯誤的投予,可能造成高抗藥性盛行率及多重抗藥性菌株出現,影響到控制成效及治療成本。所以必須謹慎考慮抗菌劑的使用時機,或是由生產管理、生物防治方面著手,降低細菌性疾病發生的機會,進而從源頭降低抗菌劑的使用量。

誌謝

本研究承蒙所內計畫支應相關經費(103農科-10.1.1-衛-H1(7)),使研究得以順利進行。

雞白痢沙門氏桿菌之鑑定與抗藥性分析

表1、26株*Sal. Pullorum*之藥物敏感性試驗結果

Antimicrobial agents	Number of isolates		
	Resistant (%)	Intermediate (%)	Susceptible (%)
<u>β-lactam</u>			
Amoxicillin	19 (73.1)	0 (0)	7 (26.9)
Ampicillin	19 (73.1)	1 (3.8)	6 (23.1)
Ceftiofur	1 (3.8)	6 (23.1)	19 (73.1)
Cephalothin	1 (3.8)	6 (23.1)	19 (73.1)
<u>Phenicol</u>			
Florfenicol	2 (7.7)	2 (7.7)	22 (84.6)
<u>Polypeptides</u>			
Colistin	8 (30.8)	16 (61.5)	2 (7.7)
<u>Tetracycline</u>			
Tetracycline	2 (7.7)	0 (0)	24 (92.3)
Oxytetracycline	1 (3.8)	3 (11.6)	22 (84.6)
Doxycycline	8 (30.8)	0 (0)	18 (69.2)
<u>Quinolones</u>			
Enrofloxacin	0 (0)	0 (0)	26 (100)
Flumequine	4 (15.4)	2 (7.7)	20 (76.9)
<u>Aminoglycosides</u>			
Streptomycin	24 (92.3)	0 (0)	2 (7.7)
Neomycin	0 (0)	0 (0)	26 (100)
Kanamycin	1 (3.8)	2 (7.7)	23 (88.5)
Gentamicin	18 (69.2)	0 (0)	8 (30.8)
<u>Sulfanamides</u>			
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim	4 (15.4)	0 (0)	22 (84.6)
Sulfonamides	21 (80.8)	0 (0)	5 (19.2)

表2、26株*Sal. Pullorum*之個別菌株與其產生抗藥性統計

Number of antimicrobial agents	Number of isolates (%)
1	4 (15.4)
2	2 (7.7)
3	0 (0)
4	3 (11.5)
5	5 (19.2)
6	9 (34.6)
7	1 (3.8)
8	0 (0)
9	1 (3.8)
10	1 (3.8)

表3、具有第一型integron之*Sal. Pullorum*與MIC結果

Integron			MIC ^a (μ g/mL)	
Inserted cassette	Size (bp)	Number of isolates (s)	SXT ^b	Streptomycin
<i>dhfrA12-orfF-aadA2</i>	1900	1	>4 (R)	>64 (R)
<i>aadA1</i>	1000	7	<0.12 (S)	>64 (R)
<i>aadA1</i>	1000	1	0.25 (S)	>64 (R)
<i>aadA1, dhfrA25</i>	1000, 721	1	>4 (R)	>64 (R)
<i>dhfrA25</i>	721	1	>4 (R)	>64 (R)

a =MIC: Minimum inhibitory concentration

b=SXT: Sulfamethoxazole/Trimethoprim

R = resistant; S = susceptible

表4、不具第一型integron之*Sal. Pullorum*與MIC結果

Number of isolates(s)	MIC ^a (μ g/mL)	
	SXT ^b	Streptomycin
2	<0.12 (S)	16 (S)
4	<0.12 (S)	32 (I)
3	<0.12 (S)	\geq 64 (R)
1	0.25 (S)	32 (I)
5	0.25 (S)	\geq 64 (R)

a = MIC: Minimum inhibitory concentration

b = SXT: Sulfamethoxazole/Trimethoprim

R = resistant; I = intermediate; S = susceptible

雞白痢沙門氏桿菌之鑑定與抗藥性分析

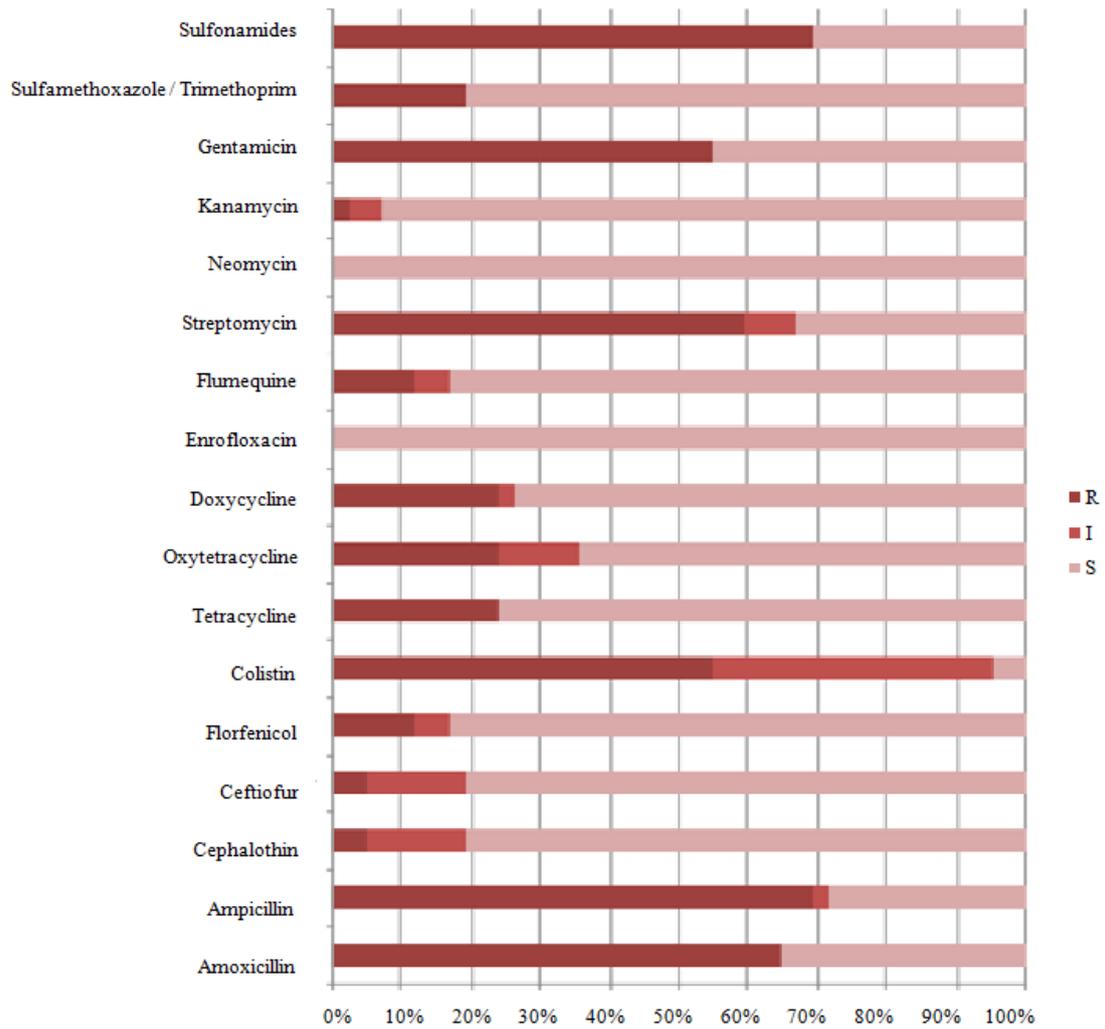


圖1、26株*Sal. Pullorum*之藥物敏感性試驗結果：S代表感受性（susceptible）；I代表中間性（intermediate）；R代表抗藥性（resistant）。

參考文獻

1. 呂榮修。禽病診斷彩色圖譜。台北，中華民國養雞協會會刊雜誌社，199-209。1995。
2. 郭亭君。嘉南地區六個禽場之沙門氏菌特性分析。國立嘉義大學。微生物免疫與生物藥學系研究所。碩士論文。2012。
3. 翁嘉伶。台灣傳統市場有色肉雞沙門氏菌血清型及抗藥性之研究。國立中興大學獸醫公共衛生學研究所。碩士論文。2009。
4. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing MS100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013.
5. Grimont P. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. 2007.
6. Gillings MR. Integrons: Past, Present, and Future. Microbiol Mol Biol Rev 78: 257-77, 2014.
7. Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. Drug Resist Updat 1: 109-119, 1998.
8. Levesque, C, Piche L, Larose C, Roy PH. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 39: 85-191, 1995.
9. Paiva JB CJ, Silva MD, Almeida MA, Angela HL, Berchieri JA. Molecular differentiation of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by RFLP of *fliC* from Brazilian isolates. Braz J Poult Sci 11: 271-6, 2009.
10. Parveen S, Taabodi M, Schwarz JG, Oscar TP, Harter-Dennis J, White DG. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. J Food Prot 70: 2466-72, 2007.
11. Ribeiro SA, de Paiva JB, Zotesso F, Lemos MV, Berchieri JA. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum. Braz J Microbiol 40: 184-8, 2009.
12. Shah DH, Park JH, Cho MR, Kim MC, Chae JS. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella* Gallinarum from *Salmonella* Pullorum: serotype-specific *rfbS* sequence polymorphism. J Microbiol Methods 60: 169-77, 2005.
13. Shivaprasad H. Pullorum disease and fowl typhoid. Disease of Poultry. 13th ed. Iowa, USA: Ames 678-693, 2013.
14. Shivaprasad H. Fowl typhoid and pullorum disease. Rev Sci Tech 19:405-24, 2000.

Identification of *Sal. Pullorum* and Analysis of Antimicrobial Resistance

NL Kuan^{1*}, C Tu¹, JH Shein²

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan¹
Department of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University²

Abstract The etiological agent of pullorum disease is *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum*-Pullorum biovar Pullorum (*Sal. Pullorum*), which incurs significant economic losses in the poultry industry worldwide. Increasing use of antimicrobial agents for disease treatment or prevention may be responsible for the rising incidence of drug resistant strains. Drug use presumably selects for integrons (mobile DNA elements) which may contain one to several resistant gene cassettes; these are implicated in the spread of antibiotic resistance markers from one bacterial strain or species to another. In this study, 26 isolates of *Sal. Pullorum* were included, and 42.3% (11/26) of isolates carried class I integrons of various sizes: 721 bp, 1,000 bp, and 1,900 bp. These integrons contained gene cassettes encoding resistance to aminoglycosides (*aadA1* and *aadA2*) and trimethoprim (*dhfrA12* and *dhfrA25*). All of the 3*dhfr*-positive isolates were resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim; the 10 *aadA*-positive isolates were increased in the minimum inhibitory concentration of streptomycin. The results indicated that types of resistant gene cassettes reflected the relevant resistances in *Sal. Pullorum* isolates.

Keywords: *Sal. Pullorum*, antimicrobial resistance, integron.

