

引用格式:

汤起武, 谭胜国, 葛玲瑞, 李运虎, 田清武, 余兴龙. 湘西黄牛粪源大肠埃希菌耐药性分析及多位点测序分型[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 87-94.

TANG Q W, TAN S G, GE L R, LI Y H, TIAN Q W, YU X L. Drug resistance analysis and multi locus sequencing typing of fecal *Escherichia coli* from Xiangxi cattle[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(1): 87-94.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



湘西黄牛粪源大肠埃希菌耐药性分析及多位点测序分型

汤起武¹, 谭胜国¹, 葛玲瑞¹, 李运虎¹, 田清武^{2*}, 余兴龙^{3*}

(1.湖南生物机电职业技术学院动物科技学院, 湖南 长沙 410127; 2.湘西民族职业技术学院成教部, 湖南 吉首 416007; 3.湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为了解湘西黄牛粪源大肠埃希菌的耐药情况, 从湘西黄牛主产区花垣县和凤凰县 6 个不同规模的湘西黄牛养殖场采集黄牛肛门拭子样品, 用麦康凯培养基和大肠埃希菌特异性引物分离、鉴定大肠埃希菌; 采用 K-B 法对分离的大肠埃希菌进行 5 类共 18 种常用抗菌药物的敏感性试验; 利用超高通量荧光定量 PCR 对 16 株多重耐药大肠埃希菌的 7 类共 22 种耐药基因进行检测; 用大肠埃希菌 8 个管家基因对此 16 株分离株进行多位点序列分型(MLST), 并运用 goeBURST 程序和 MEGA 7.0 对其进行 ST 聚类分析和进化树分析。结果表明: 从采集的 206 份黄牛肛门拭子样品中共分离、鉴定出大肠埃希菌 170 株; 分离自各牛场的大肠埃希菌对四环素、多西环素、氨苄西林、复方新诺明和甲氧苄氨嘧啶的耐药性较高, 耐药性最高的牛场对这 5 种抗菌药物的耐药率分别为 29.63%、16.67%、22.22%、16.67%、33.33%, 共有 16 株多重耐药菌, 有 8 种耐药谱型; 有 *acrA-01*(100.00%)、*fox5*(81.25%)、*sul1*(68.75%)、*sul2*(75.00%)、*folA*(100.00%)、*tetR-02*(81.25%)、*int1-1(clinic)*(68.75%)和 *tmpA-01*(50.00%)等 6 类 8 种耐药基因被检出; 共获得 11 种 ST 型, 其中, 有 9 种新的 ST 型; 16 株分离株可分成 2 个克隆群和 7 个单独型; 所有分离株聚集归为 2 个大群, 分别为 2 个分支和 7 个分支。可见, 湘西黄牛粪源大肠埃希菌的耐药性整体偏低, 多重耐药菌主要出现于大型规模养殖场, 且具有一定的复杂性, 应加强对大型规模黄牛养殖场粪源大肠埃希菌耐药性的监控。

关键词: 湘西黄牛; 粪源; 大肠埃希菌; 耐药性; 耐药基因; 多位点测序分型

中图分类号: S852.61⁺²

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)01-0087-08

Drug resistance analysis and multi locus sequencing typing of fecal *Escherichia coli* from Xiangxi cattle

TANG Qiwu¹, TAN Shengguo¹, GE Lingrui¹, LI Yunhu¹, TIAN Qingwu^{2*}, YU Xinglong^{3*}

(1.College of Animal Science and Technology, Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha, Hunan 410127, China; 2.Department of Adult Education, Xiangxi Vocational and Technical College for Nationalities, Jishou, Hunan 416007, China; 3.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: In order to understand the drug resistance of fecal *Escherichia coli* from Xiangxi cattle, anal swab samples of cattle were collected from six Xiangxi cattle farms of different scales in Huayuan County and Fenghuang County, the main production areas of Xiangxi cattle, and *Escherichia coli* was isolated and identified by maconkey medium and

收稿日期: 2021-06-22

修回日期: 2022-01-06

基金项目: 湖南省自然科学基金科教联合项目(2018JJ5050); 湖南生物机电职业技术学院院级项目(20TD06)

作者简介: 汤起武(1987—), 男, 湖南益阳人, 博士研究生, 主要从事细菌耐药性和动物寄生虫研究, 328094949@qq.com; *通信作者, 田清武, 硕士, 副教授, 主要从事动物疾病防控研究, tiqiwu@163.com; *通信作者, 余兴龙, 博士, 教授, 主要从事动物病原分子生物学研究, xlyu999@126.com

Escherichia coli specific primers; the sensitivity test of 18 kinds of common antibiotics in 5 categories was carried out on the isolated *Escherichia coli* by K-B method; 22 drug resistance genes of 7 classes of 16 strains of multidrug resistant *Escherichia coli* were detected by ultra-high throughput fluorescence quantitative PCR; multifocus sequence typing(MLST) of 16 isolates was carried out by 8 housekeeping genes of *Escherichia coli*, and ST cluster analysis and evolutionary tree analysis were carried out by goeBURST program and MEGA 7.0. The results showed that 170 strains of *Escherichia coli* were isolated and identified from 206 cattle anal swab samples; *Escherichia coli* isolated from cattle farms had high resistance to tetracycline, doxycycline, ampicillin, compound sulfamethoxazole and trimethoprim. The resistance rates of these five antibiotics in cattle farms with the highest resistance were 29.63%, 16.67%, 22.22%, 16.67% and 33.33%, respectively. There were 16 multi drug resistant bacteria and 8 drug resistance patterns. Six classes and eight kinds of drug resistance genes were detected, including *acra-01*(100.00%), *fox5*(81.25%), *sul1*(68.75%), *sul2*(75.00%), *folA*(100.00%), *tetr-02*(81.25%), *inti-1(clinic)*(68.75%) and *mpa-01*(50.00%). A total of 11 ST types were obtained, and 9 new ST types were obtained. The 16 isolates were divided into 2 clonal groups and 7 haplotypes. All isolates were clustered into 2 groups, 2 branches and 7 branches, respectively. It could be concluded that the drug resistance of fecal *Escherichia coli* from cattle in Western Hunan was low. Multi drug resistant bacteria mainly appeared in large-scale farms and had a certain complexity. The monitoring of drug resistance of fecal *Escherichia coli* from large-scale cattle farms should be strengthened.

Keywords: Xiangxi cattle; fecal source; *Escherichia coli*; drug resistance; drug resistance gene; MLST typing

湘西黄牛是中国国家级优良地方品种,被农业部列入国家级品种资源保护名录,并颁发《农产品地理标志登记证书》^[1]。2014年3月,湘西黄牛产业被列为国家精准扶贫农业产业化重点项目。湘西黄牛养殖业在近些年虽然得到了较快的发展,但也存在着地方基层动物防疫条件简陋^[2]、专业技术人才缺乏^[3]、养殖户养殖水平较低^[4]等问题。所有这些问题的存在,使得湘西黄牛的养殖在疾病防控这一环节存在一定的风险。

大肠埃希菌为条件致病菌,在动物和人体中以共生和病原体的形式广泛存在^[5],被认为是人致病菌重要的抗药性基因库^[6],常作为革兰氏阴性指示菌广泛用于抗生素耐药性调查^[7-8]。另外,大肠埃希菌已被证明可与其他细菌物种交换遗传物质^[9],进而传播耐药基因,这些耐药基因还可能传播到人类携带的微生物中,对人类生命健康造成威胁^[10]。本研究中,对湘西黄牛粪源大肠埃希菌的耐药性进行调查和分析,探究湘西黄牛粪源大肠埃希菌对抗菌药物的耐药性及变化趋势,旨在为养殖场(户)合理使用和选择抗菌药物、兽医防疫部门加强监管及维护牛肉食品安全提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集及处理

从湖南湘西凤凰和花垣2个县各选取3个湘西

黄牛养殖场,用灭菌肛拭子采集黄牛的粪样,将沾有粪便的肛拭子置于装有灭菌生理盐水的10 mL离心管中,24 h内带至实验室。分离株编号为养殖场代号+菌株序号+牛的生长阶段(A、B分别代表成年牛和犊牛)。采样的6个养殖场中,大规模养殖场1个,编号为SN,养殖规模1000头左右;小规模养殖场5个,编号分别为YY、BC、BR、CH和NK,养殖规模为30~50头。花垣县的3个养殖场SN、YY、BC分别采集60(成年牛和犊牛各30个)、30、30个样品;凤凰县的3个养殖场BR、CH、NK分别采集30、26、30个样品。该地区小规模养殖场主要从黄牛交易市场购进小牛育肥,故在采样过程中从小规模牛场采集的肛门拭子来源均为成年牛;大规模牛场主要采用自繁自养的模式,故肛门拭子来源既有成年牛,也有犊牛。采样时根据饲养员描述和现场观察,大部分犊牛均有拉稀和使用药物的情况。使用的药物主要有乙酰甲喹、恩诺沙星注射液、樟脑磺酸钠注射液、土霉素预混剂、磺胺氯吡嗪钠可溶性粉和酒石酸泰乐菌素。

1.2 主要试剂和仪器

麦康凯培养基、肉汤琼脂培养基、药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司;Takara PrimerSTAR Max DNA Polymerase和DL2000 DNA Marker购自宝生物工程(大连)有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生物科技(北京)有限公司。生化培

养箱为常州冠军仪器制造有限公司的产品；PCR 仪为美国应用生物系统公司的产品；电泳仪为北京六一生物科技有限公司的产品；凝胶成像系统为上海天能科技有限公司的产品。

1.3 细菌的分离和纯化及鉴定

将采集的肛拭子样品在麦康凯平板上划线，置于 37 °C 恒温箱培养 16 h，挑取单个红色菌落在肉汤琼脂平板上纯化培养 16 h，记录细菌的生长特征。参照文献[11]的方法，用大肠埃希菌特异性引物 ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGC(Fp)和 GGTTTATGCAGCAACGAGACGTC(Rp)进行 PCR 验证。采用煮沸法提取大肠埃希菌基因组 DNA，以提取的 DNA 为模板进行 PCR 试验。PCR 反应体系(25 μL): 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，DNA 模板 1 μL，ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 50 s, 30 个循环; 72 °C 再延伸 5 min。取 5 μL PCR 反应产物，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，用凝胶成像系统观察并记录结果。将验证为大肠埃希菌阳性的菌株增菌培养并加甘油保存。

1.4 细菌的耐药表型鉴定

取 10 μL 大肠埃希菌，添加到 5 mL 肉汤培养基中，于 37 °C 摇床中过夜培养，将培养好的菌液稀释至 0.5 麦氏浓度，再在普通肉汤琼脂培养板上涂板。参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)的标准^[12]，选取临床常见的四环素类、喹诺酮类、β-内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类等 5 类共 18 种抗菌药物进行药敏试验。18 种抗菌药物分别为四环素(TCY)、米诺环素(MNO)、多西环素(DOX)、萘啶酸(NAL)、吡哌酸(PPA)、诺氟沙星(NOR)、加替沙星(GAT)、氨苄西林(SAM)、头孢氨苄(LEX)、头孢呋辛(CXM)、头孢噻肟(CTX)、头孢吡肟(FEP)、链霉素(STR)、庆大霉素(GEN)、卡那霉素(KAN)、妥布霉素(TOB)、复方新诺明(SMZ-TMP)、甲氧苄氨嘧啶(TMP)。

1.5 细菌的耐药基因检测

根据耐药表型结果，对 16 株多重耐药菌进行耐药基因检测，所检基因列于表 1。取 2 mL 过夜培

养的菌液，用试剂盒提取细菌 DNA。抗生素抗性基因检测使用 Wafergen Smartchip 超高通量荧光定量 PCR 系统完成。参照文献[13]的方法，共设置 23 对引物，其中包括 1 对 16S rRNA 内参引物，检测其中抗生素抗性基因(ARGs)的多样性和丰度信息。采用纳升级多样品点样仪(MSND)的 216(samples)×24(assays)模式，将 PCR 反应混合液加到微孔芯片中，随后在 PCR 上进行 qPCR 反应。共运行 1 张芯片，单张芯片运行 16 个样品和 1 个阴性对照。每个样本及阴性对照进行 3 次重复。PCR 反应体系及条件参照文献[14]。使用仪器自带的 qPCR 软件对 qPCR 结果进行自动分析^[15]。

表 1 所检耐药基因的种类及耐药机制

序号	抗菌药物类别	耐药基因名称	耐药机制
1	(氟)喹诺酮类	<i>acrA-01</i> , <i>adeA</i> , <i>cmeA</i>	外排泵
2	氨基糖苷类	<i>Aph</i> , <i>aacC</i> , <i>aadE</i> , <i>spcN-01</i>	抗生素失活
3	β-内酰胺类	<i>mecA</i> , <i>pbp</i> <i>cfiA</i> , <i>fox5</i>	细胞保护 抗生素失活
4	磺胺类	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> <i>folA</i> , <i>dfrA1</i>	细胞保护 抗生素失活
5	四环素类	<i>tetA-01</i> , <i>tetR-02</i> <i>tetO-01</i>	外排泵 细胞保护
6	整合子	<i>cIntI-1(class1)</i> , <i>intI-1(clinic)</i>	整合酶
7	其他	<i>tmpA-01</i> , <i>Trp614</i>	转座酶

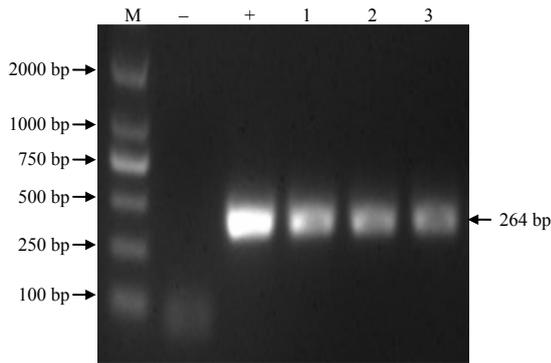
1.6 细菌多位点测序分型

依据网站(https://bigsdB.pasteur.fr/ecoli/primers_used.html)提供的大肠埃希菌多位点序列分型(MLST)引物及条件，合成 8 个管家基因 *dinB*、*icdB*、*pabB*、*polB*、*putP*、*trpA*、*trpB* 和 *uidA*，对 16 株多重耐药大肠埃希菌基因组模板分别进行 PCR 扩增。扩增产物测序后，将结果提交到网站(https://bigsdB.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdB/bigsdB.pl?db=pubmlst_ecoli_seqdef)进行菌株的序列分型。大肠埃希菌 8 个管家基因引物序列和大肠埃希菌特异性引物的合成及 PCR 扩增产物测序均由深圳华大基因科技有限公司完成。分别利用 goeBURST 程序和 MEGA 7.0 对 16 株多重耐药大肠埃希菌分离株进行 ST 聚类分析及进化树分析。

2 结果与分析

2.1 大肠埃希菌的分离结果

从 6 个湘西黄牛养殖场采集的 206 份肛拭子中初步分离得到大肠埃希菌 170 株, 其中 28 株来自犊牛, 142 株来自成年牛。利用大肠埃希菌特异性引物对 170 株初步鉴定的大肠埃希菌进行检测, 结果全部为阳性。部分大肠埃希菌特异性引物检测结果如图 1 所示。



M DNA Maker; “-” 阴性对照; “+” 阳性对照; 1-3 试验菌株。

图 1 部分大肠埃希菌特异性引物检测结果

Fig.1 Detection results of specific primers for *Escherichia coli*

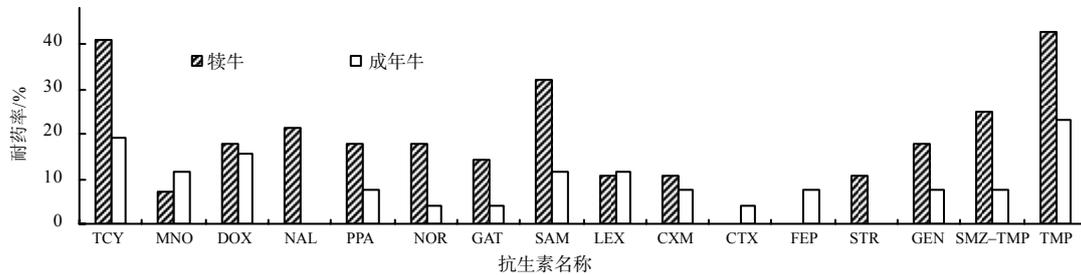


图 2 大型牛场犊牛与成年牛粪源大肠埃希菌的耐药率

Fig.2 Drug resistance rate of *Escherichia coli* from feces of calves and adult cattle in large cattle farm

170 株分离菌中, 1 耐占 17.65%, 2 耐占 7.65%, 3 耐占 4.71%, 4 耐占 1.76%, 5 耐占 1.18%。其中, 共有 16 株多重耐药菌, 耐药谱复杂, 有 8 种耐药谱型, 分别为四环素类 + 喹诺酮类 + 磺胺类 (25.00%), 四环素类 + β -内酰胺类 + 氨基糖苷类 (18.75%), 四环素类 + β -内酰胺类 + 磺胺类 (12.50%), 四环素类 + β -内酰胺类 +

2.2 大肠埃希菌的耐药表型鉴定结果

药敏结果显示, 分离自 5 个小规模牛场的大肠埃希菌仅对 TCY、SAM、STR、GEN、TOB、SMZ-TMP、TMP 等 7 种药物表现出耐药性, 耐药率分别为 7.76%、7.76%、2.59%、1.72%、2.59%、6.90%、12.07%, 对其他 11 种药物均为敏感。从大规模牛场分离的细菌耐药性较严重, 除对 KAN 和 TOB 表现敏感外, 其余均检出耐药, 各抗菌药物耐药检出率如下: TCY 为 29.63%、MNO 为 9.26%、DOX 为 16.67%、NAL、PPA 为 12.96%、NOR 为 11.11%、GAT 为 9.26%、SAM 为 22.22%、LEX 为 7.41%、CXM 为 9.26%、CTX 为 1.85%、FEP 为 3.70%、STR 为 5.56%、GEN 为 12.96%、SMZ-TMP 为 16.67%、TMP 为 33.33%。在所检抗菌药物中, 除 TOB 外, 大规模牛场的大肠埃希菌耐药率均高于分离自 5 个小规模牛场大肠埃希菌的综合耐药率。从图 2 可知, 除 MNO、CTX、FEP 外, 大型牛场的耐药菌中, 犊牛源大肠埃希菌的耐药率明显高于成年牛源大肠埃希菌。

磺胺类(12.50%), 四环素类 + 喹诺酮类 + β -内酰胺类 + 氨基糖苷类 + 磺胺类(12.50%), 四环素类 + 喹诺酮类 + β -内酰胺类 + 氨基糖苷类(6.25%), 四环素类 + 喹诺酮类 + 氨基糖苷类 + 磺胺类(6.25%), 喹诺酮类 + β -内酰胺类 + 氨基糖苷类 + 磺胺类(6.25%)。各菌株耐药谱列于表 2。

表 2 16 株多重耐药大肠埃希菌的耐药谱

Table 2 The drug resistance spectrum in 16 multidrug resistant *Escherichia coli* strains

序号	菌株代号	耐药谱	耐药种类数
1	NK15A	四环素类(TCY) + β -内酰胺类(SAM) + 氨基糖苷类(STR) + 磺胺类(SMZ-TMP 和 TMP)	4
2	NK18A	四环素类(TCY) + β -内酰胺类(SAM) + 磺胺类(SMZ-TMP 和 TMP)	3
3	SN5A	四环素类(MNO) + 喹诺酮类(PPA) + β -内酰胺类(CXM 和 FEP) + 氨基糖苷类(GEN)	4

表 2(续)

序号	菌株代号	耐药谱	耐药种类数
4	SN10A	四环素类(TCY) + 喹诺酮类(GAT) + 磺胺类(TMP)	3
5	SN17A	四环素类(TCY, MNO 和 DOX) + β-内酰胺类(SAM) + 磺胺类(SMZ-TMP 和 TMP)	3
6	SN22A	四环素类(TCY 和 DOX) + β-内酰胺类(SAM) + 氨基糖苷类(GEN)	3
7	SN1B	四环素类(TCY) + 喹诺酮类(NAL, PPA 和 NOR) + 氨基糖苷类(SAM, LEX 和 CXM) + 磺胺类(SMZ-TMP 和 TMP)	4
8	SN5B	四环素类(TCY) + 喹诺酮类(GAT) + 磺胺类(SMZ + TMP)	3
9	SN6B	四环素类(TCY, MNO 和 DOX) + 喹诺酮类(NAL, PPA 和 NOR) + 磺胺类(TMP)	3
10	SN13B	四环素类(TCY 和 DOX) + 喹诺酮类(NAL, PPA 和 NOR) + 磺胺类(SMZ-TMP 和 TMP)	3
11	SN14B	喹诺酮类(GAT) + β-内酰胺类(SAM) + 氨基糖苷类(STR) + 磺胺类(SMZ-TMP 和 TMP)	4
12	SN15B	四环素类(TCY 和 DOX) + β-内酰胺类(SAM) + 氨基糖苷类(GEN) + 磺胺类(TMP)	4
13	SN16B	四环素类(TCY) + 喹诺酮类(NAL, PPA, NOR 和 GAT) + β-内酰胺类(SAM, LEX 和 CXM) + 氨基糖苷类(STR 和 GEN) + 磺胺类(SMZ-TMP 和 TMP)	5
14	SN19B	四环素类(TCY 和 DOX) + 喹诺酮类(NAL, PPA, NOR 和 GAT) + β-内酰胺类(SAM, LEX 和 CXM) + 氨基糖苷类(STR 和 GEN) + 磺胺类(SMZ-TMP 和 TMP)	5
15	SN20B	四环素类(TCY) + β-内酰胺类(SAM) + 氨基糖苷类(GEN)	3
16	SN23B	四环素类(TCY) + β-内酰胺类(SAM) + 氨基糖苷类(GEN)	3

括号内为所耐的抗菌药物。

2.3 大肠埃希菌耐药基因的检测结果

以大肠埃希菌耐药基因检出的相对拷贝数所绘的热图如图 3 所示。从图 3 可知,在所检测的 22 种耐药基因中共有 8 种耐药基因被检出,分别是 *acrA-01*(100.00%)、*fox5*(81.25%)、*sul1*(68.75%)、*sul2*(75.00%)、*folA*(100.00%)、*tetR-02*(81.25%)、*intI-1(clinic)*(68.75%)、*tnpA-01*(50.00%)。检出的耐药基因分别属于氟喹诺酮类(*acrA-01*)、β-内酰胺类(*fox5*)、磺胺类抗菌药物(*sul1*、*sul2*、*folA*)和四环素类(*tetR-02*)等 4 类抗生素耐药基因类型,且整合子

(*intI-1(clinic)*)和转座子(*tnpA-01*)均有不同程度的检出。可见,16 株菌的耐药机制包含有外排泵(*acrA-01*、*tetR-02*)、抗生素失活(*fox5*、*folA*)、细胞保护(*sul1*、*sul2*)、整合酶(*intI-1(clinic)*)、转座酶(*tnpA-01*)等 5 种类型。图 3 也显示, *acrA-01* 基因在所有样品中均丰度较高, *tetR-02*、*sul2*、*tnpA-01*、*intI-1(clinic)*等 4 种基因在大型牛场来源的部分样品中丰度较高,而在小规模牛场来源的 2 个样品中丰度较低。

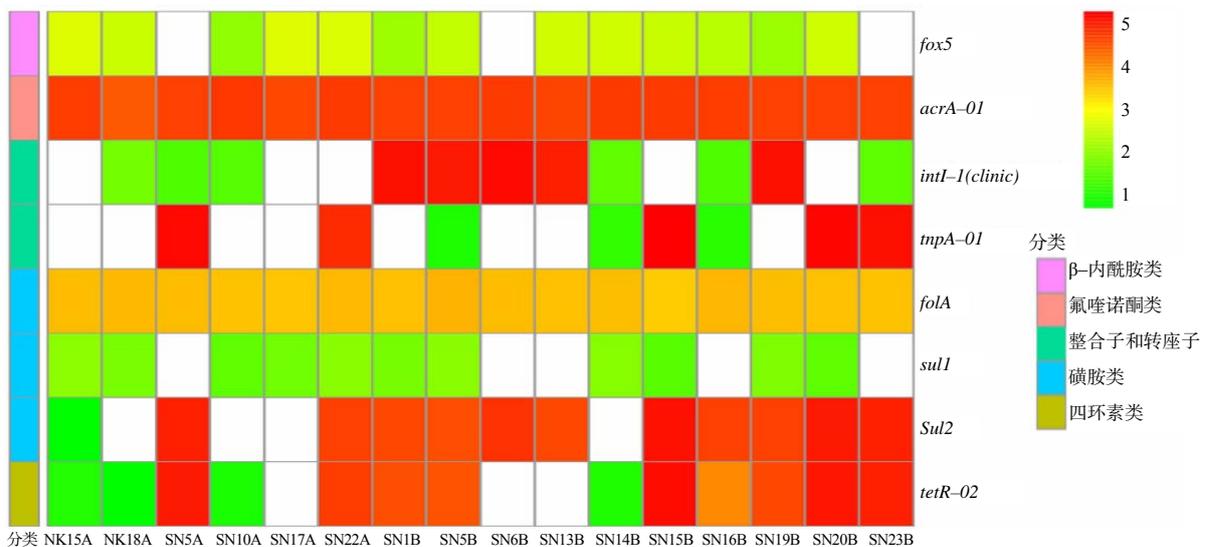


图 3 16 株多重耐药大肠埃希菌的耐药基因检出情况

Fig.3 Detection of drug resistance genes in 16 strains of multidrug resistant *Escherichia coli*

2.4 MLST 结果

16株多重耐药菌中,仅有3株菌能够在网站分型 (https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_ecoli_seqdef&page=sequenceQuery), 分别是 SN6B 的分型为 ST186, SN5A、SN23B 的分型为 ST570,其余 13 株菌共有 9 种新的等位基因组合,为新的 ST 型。将 9 种新的 ST 型分别命名为 STn-1 至 STn-9, 优势 ST 型为 STn-7, 占 18.75%。各等位基因序列已上传至 NCBI, 72 个基因登录号为 MZ063546 至 MZ063553 共 8 个及 MZ146386 至

MZ146449 共 64 个。新 ST 型的等位基因号及组合列于表 3。ST 聚类分析显示, 16 株分离株分成 2 个克隆群和 7 个单独型, 其中克隆 1 群和克隆 2 群各含有 2 个 ST 型, 各占分离株的 12.50% 和 18.75%; 其余 ST 型均为单独型, 占分离株的 68.75%。进化树分析(图 4)显示, 16 株大肠埃希菌分别位于 2 个大分支上, 共有 9 个小分支: 第 1 个大分支有 2 个小分支, 共 3 种 ST 型; 第 2 个大分支有 7 个小分支, 共 8 种 ST 型。

表 3 新 ST 型的等位基因号及组合

Table 3 Allele number and compose of new ST type

ST 型	菌株编号	等位基因号							
		<i>polB</i>	<i>putP</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uidA</i>	<i>dinB</i>	<i>icdA</i>	<i>pabB</i>
STn-1	NK15A	25	65	3	10	26	53	135	65
STn-2	NK18A	154	163	66	210	23	48	86	44
STn-3	SN10A	82	37	3	10	5	28	2	55
STn-4	SN17A	82	174	3	10	74	69	2	55
STn-5	SN20B, SN22A	32	208	4	10	16	7	135	5
STn-6	SN1B	151	42	21	210	78	46	36	38
STn-7	SN5B, SN13B, SN14B	6	3	3	52	78	1	135	2
STn-8	SN15B	32	208	4	10	16	7	98	5
STn-9	SN16B, SN19B	151	42	21	210	38	46	36	38

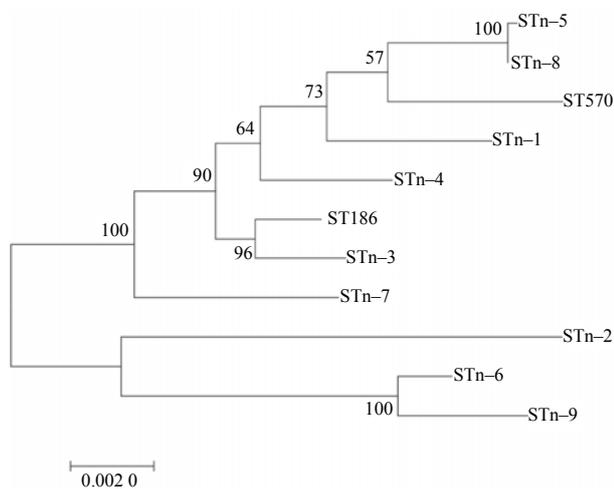


图 4 16 株多重耐药大肠埃希菌株进化树分析结果

Fig.4 Phylogenetic tree analysis of 16 multidrug resistant strains

3 结论与讨论

与其他食用动物粪便中的大肠埃希菌相比,来自牛粪便中的共生大肠埃希菌往往对抗生素的耐药性较小^[16]。轩慧勇等^[17]对新疆奎屯地区不同团场牛源大肠埃希菌进行临床常用抗菌药物的耐药情

况调查发现,各团场多重耐药均以 1 耐、2 耐为主。需要注意的是, 牛场细菌耐药性的发生与养殖规模、饲养方式、牛的年龄等息息相关。GULLIKSEN 等^[18]、HILL 等^[19]研究证实, 相比于散养牛和小型牛场分离的大肠埃希菌, 大型规模养牛场分离的细菌更容易产生耐药性。牛场耐药性的发生与药物使用有直接关系。ALEXANDER 等^[20]研究显示, 饲喂抗生素生长促进剂的牛的粪便中细菌的耐药性也随之增高; BERGE 等^[21]证实了与未接受抗生素治疗的犊牛大肠埃希菌耐药性相比, 接受抗生素治疗的犊牛中分离的大肠埃希菌耐药性倍增。牛的年龄与耐药性的发生也息息相关, 多项研究^[22-23]证实小牛犊的耐药性比成年牛的更强。BERGE 等^[22]对来自美国加州、俄勒冈州和华盛顿州的 38 个农场的粪便样本分离大肠埃希菌并对分离菌进行耐药性检测的结果显示, 来自犊牛牧场的大肠埃希菌分离株的多重抗菌耐药性最高, 而来自饲养场奶牛、奶牛和肉牛的分离株的多重抗菌耐药性逐渐降低。DEFRANCESCO 等^[23]对来自发病牛场和正常农场

的小牛大肠埃希菌进行耐药性测试, 结果其耐药水平和多重耐药性均高于成年牛。本研究中, 采样自小型牛场的大肠埃希菌耐药性普遍较低, 而大型牛场牛源细菌耐药性偏高, 这与前人的研究结果基本一致。由于大的畜群比小的畜群更容易出现疾病问题, 导致抗菌药物使用频繁, 不合理的使用抗菌药物将导致细菌耐药性的产生, 加之大型牛场的人员流动更频繁, 促进了耐药基因的传播。犊牛在饲养期间由于天气、消化不良等原因导致腹泻, 使得抗菌药物使用频率较高, 在大型牛场出现犊牛细菌耐药性比成年牛相对偏高。本次采样在冬季和春初进行, 由于受低温影响, 犊牛普遍腹泻, 药物使用频率较高, 耐药性的发生与临床情况也相吻合。

随人或动物粪便排到体外的抗性细菌是环境中抗菌药物抗性基因的主要来源。本研究中, 检测到的 8 种耐药基因中, *acrA-01*、*folA* 在所有多重耐药样品中均有检测到。*acrA* 属于药物周质融合蛋白, 与药物质子转运体 *AcrB* 和外膜通道蛋白 *ToIC* 共同组成 *AcrAB-ToIC* 外排泵系统。该系统是大肠埃希菌的最主要多重药物外排系统, 其高水平表达可表现出对多种化合物的耐药, 外排底物包括氟喹诺酮类、四环素类、氯霉素等。*folA* 属于二氢叶酸还原酶的染色体基因, 该基因突变会使二氢叶酸合成酶过量表达, 表现出对甲氧苄啶的耐药^[24]。对照耐药表型, 16 株多重耐药菌中, 有 13 株菌表现出了对甲氧苄啶的耐药, 从而导致耐药性的产生。

fox5 为 β -内酰胺酶中的 C 类酶, 大部分大肠埃希菌均能产生该类酶^[25], 它们都能水解青霉素和头孢菌素, 诱导调控细胞壁合成和利用相关基因的表达。本研究中, β -内酰胺类抗菌药物中的头孢类抗菌药物出现耐药可能与 *fox5* 基因有关。

tetR-02 为四环素阻遏基因, 能够调控 *tetA* 的转录, 当机体环境中存在四环素时, *tetR* 与四环素结合, 导致 *tetA* 的转录启动。王丽等^[26]对不同宿主来源香港海鸥菌的耐药基因进行分析, 结果 *tetA*、*tetR* 检出率分别为 72.7%、68.2%。本研究中, *tetA* 的检出率为 0, 而 *tetR-02* 的检出率为 81.25%。综合分析牛场用药情况, 牛场的四环素主要为预混剂, 在牛场的使用频率较少, 所以 *tetA* 的转录可能并未启动。

磺胺类药物的抗药性机制是由质粒介导的靶

酶改变, 靶酶改变往往是由耐药基因 *sul1*、*sul2* 介导的^[27]。*sul1*、*sul2* 在大肠埃希菌中检出率很高, 并使细菌表现出对磺胺类耐药, 二者在临床中检出率相近^[24,28]。本研究中, 此 2 种耐药基因的检出率接近, 分别为 68.75%和 75.00%。

*int1-1(clinic)*和 *tnpA-01* 基因分别为整合子和转座子, 属于可移动基因, 它们可以在同种或不同种微生物的质粒或染色体上进行转移^[29]。抗药基因可以插入到可移动遗传元件中, 与其他抗药性基因形成一个抗药性基因簇, 从而导致宿主同时获得许多不相关药物的耐药性^[30]。本研究中, 耐药基因的出现与抗菌药物的使用基本相符, 但可移动遗传元件导致的多重抗药性的产生必须要引起重视。

耐药基因的检出率也存在与抗菌药物的使用频率不一致的情况, 如 16 株多重耐药菌中介导甲氧苄啶耐药的 *folA* 基因的检出率为 100.00%, 而只有 13 株细菌表现出耐药表型, 这种情况属于存在抗性基因, 但不表达表型抗性, 也属于正常现象^[31]。耐药基因分度显示, *tetR-02*、*tnpA-01*、*int1-1(clinic)*、*sul2* 等 4 种基因的丰度在犊牛来源样品中偏高, 这可能与临床中犊牛药物的使用频率过高有关。

MLST 技术常用于细菌进化和分子流行病学调查研究分析^[32-33]。本研究中, MLST 分型结果显示, 16 株分离株有 11 种 ST 型, 且 11 种 ST 型有 9 种为新的分型。吴少鹏等^[34]利用 MLST 技术分析从山东省某地区 4 个健康奶牛养殖场分离得到的 171 株大肠埃希菌的 ST 型, 共分为 8 种 ST 型。江婉琳等^[35]对新疆克拉玛地区健康成年荷斯坦奶牛的新鲜粪便分离的 55 株大肠埃希菌进行 ST 型鉴定, 分离株中存在 24 种 ST 型, 其中有 15 种新的 ST 型。本研究中, 16 株细菌仅有 3 株细菌获得了 2 种分型, 其余 13 株细菌获得 9 种新的分型。9 种新的 ST 型中, 各 ST 型的等位基因均能从巴斯德系统中得到比对, 只是各等位基因之间进行了新的组合, 并没有新的等位基因出现。江婉琳等^[35]研究中, 新的 ST 型中有新的等位基因出现, 说明不同来源、不同品种的牛源大肠埃希菌 ST 型差异性较大, 湘西黄牛粪源大肠埃希菌丰富多样。ST 聚类分析显示, 16 株黄牛粪源大肠埃希菌有 2 个克隆群, 占分离株的 31.25%, 还有 7 个单独型。进化树显示, 2 个大的分支有 9 个小分支, 各分支细菌株数差异不大。综合 ST 分型、ST

聚类分析、进化树分析结果,本研究分离的大肠埃希菌具有一定的复杂性。

本研究结果表明,湘西黄牛粪源大肠埃希菌的耐药性整体偏低,多重耐药菌主要出现于大型规模养殖场,且具有一定的复杂性,应加强对大型规模黄牛养殖场粪源大肠埃希菌的耐药性监控。

参考文献:

- [1] 孙鑫,李剑波,伍佰鑫,等.不同月龄湘西黄牛的生产性能和屠宰性能及肉品质[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2019,45(6):632-635.
- [2] 麻文济.凤凰县湘西黄牛产业的现状及对策[J].中国畜禽种业,2008,4(5):81-84.
- [3] 宋峻,杨俊华,陈朝晖.永顺县发展湘西黄牛产业的现状思考[J].基层农技推广,2015,3(2):78-80.
- [4] 谢自江.从龙山看湘西黄牛的发展[J].湖南畜牧兽医,2014(2):35-36.
- [5] SWARTZ M N. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin[J]. Clinical Infectious Diseases, 2002, 34(Supplement_3): S111-S122.
- [6] MCEWEN S A. Antibiotic use in animal agriculture: what have we learned and where are we going?[J]. Animal Biotechnology, 2006, 17(2): 239-250.
- [7] 羊云飞.牦牛、牧民源大肠杆菌分离鉴定、耐药基因检测、PFGE分析及耐药性传递的研究[D].雅安:四川农业大学,2011.
- [8] MASSOT M, DAUBIÉ A S, CLERMONT O, et al. Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years[J]. Microbiology(Reading, England), 2016, 162(4): 642-650.
- [9] BLAKE D P, HUMPHRY R W, SCOTT K P, et al. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 1087-1097.
- [10] 杨承霖,吴聪明,王爽,等.四川省食品动物源大肠埃希菌产ESBLs菌株 bla_{CTX-M} 基因的分子流行特征[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2020,46(4):456-460.
- [11] 汤起武.猪场大肠杆菌耐药与用药相关性研究[D].长沙:湖南农业大学,2014.
- [12] CLSI M100—2019 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement[S].
- [13] ZHU Y G, JOHNSON T A, SU J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. PNAS, 2013, 110(9): 3435-3440.
- [14] CUI E P, GAO F, LIU Y, et al. Amendment soil with biochar to control antibiotic resistance genes under unconventional water resources irrigation: proceed with caution[J]. Environmental Pollution, 2018, 240: 475-484.
- [15] CHEN Q L, AN X L, LI H, et al. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil[J]. Environment International, 2016, 92/93: 1-10.
- [16] DUSE A N, WALLER K P, EMANUELSON U, et al. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(1): 500-516.
- [17] 轩慧勇,高超,林亚军,等.新疆奎屯地区不同团场牛源大肠杆菌耐药情况比较[J].中国畜牧兽医,2016,43(8):2150-2155.
- [18] GULLIKSEN S M, JOR E, LIE K I, et al. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(10): 5057-5066.
- [19] HILL A E, GREEN A L, WAGNER B A, et al. Relationship between herd size and annual prevalence of and primary antimicrobial treatments for common diseases on dairy operations in the United States[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2009, 88(4): 264-277.
- [20] ALEXANDER T W, YANKE L J, TOPPE, et al. Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(14): 4405-4416.
- [21] BERGE A C B, ATWILL E R, SISCHO W M. Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2005, 69(1/2): 25-38.
- [22] BERGE A C, HANCOCK D D, SISCHO W M, et al. Geographic, farm, and animal factors associated with multiple antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from cattle in the western United States[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2010, 236(12): 1338-1344.
- [23] DEFRANCESCO K A, COBBOLD R N, RICE D H, et al. Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks[J]. Veterinary Microbiology, 2004, 98(1): 55-61.
- [24] 张卓然,夏梦岩,倪语星.微生物耐药的基础与临床[M].北京:人民卫生出版社,2007.

(下转第119页)

- 学工业出版社, 2005.
- [2] 刘珊珊, 尹元元, 闫利华, 等. 吴茱萸药用植物资源调查[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(9): 5-9.
- [3] LIU S S, LIU Z X, WEI H, et al. Chemical compositions, yield variations and antimicrobial activities of essential oils from three species of *Euodiae Fructus* in China[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 138: 111481.
- [4] 杨占南, 何前松, 彭全材, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定疏毛吴茱萸挥发性化学成分[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2501-2505.
- [5] LIU Y, CHEN L X, ZHANG R N, et al. Efficacy and safety of elemene combined with chemotherapy in advanced gastric cancer: a meta-analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(11): e19481.
- [6] ISLAM A U S, HELLMAN B, NYBERG F, et al. Myrcene attenuates renal inflammation and oxidative stress in the adrenalectomized rat model[J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4492.
- [7] 田正凤, 罗青云, 左照江. 罗勒烯在香樟抗高温胁迫中的作用[J]. 植物生理学报, 2020, 56(3): 547-555.
- [8] 夏克坚, 任宇红, 聂丽娟, 等. β -水芹烯的合成与应用[J]. 南昌大学学报(理科版), 2001, 25(4): 380-382.
- [9] 宗朕, 程磊, 陈卓静, 等. 食品用萜类化合物的生物合成研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(9): 22-27.
- [10] 黎丹, 曹亮, 李顺祥, 等. 不同采收期对吴茱萸品质的影响[J]. 中南药学, 2015, 13(8): 858-862.
- 责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳 正
-
- (上接第 94 页)
- [25] DESHPANDE L M, JONES R N, FRITSCH T R, et al. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program(2000-2004)[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2006, 12(4): 223-230.
- [26] 王丽, 王玲, 郭辉杰, 等. 不同宿主来源香港海鸥菌耐药表型和耐药基因分析[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(6): 907-911.
- [27] SKÖLD O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends[J]. *Drug Resistance Updates*, 2000, 3(3): 155-160.
- [28] 黄金伟, 陈苏伟, 黄建胜, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌 *sul1*、*sul2* 基因与复方新诺明耐药关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(6): 618-620.
- [29] POIREL L, CATTOIR V, SOARES A, et al. Novel Ambler class A β -lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(2): 631-637.
- [30] WAX R G, LEWIS K, SALYERS A A, et al. 细菌抗菌药性: 第 2 版[M]. 刘玉庆, 白华, 胡明, 等, 译. 北京: 化学工业出版社, 2012.
- [31] ROSENGREN L B, WALDNER C L, REID-SMITH R J. Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(5): 1373-1380.
- [32] 罗力文, 鄢明辉, 游春苹, 等. 细菌分型方法研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(7): 836-841.
- [33] 张淑红, 杨广珠, 赖泽冰, 等. 华南地区食品中非 O157 致泻大肠杆菌分布特点及分型研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(3): 266-273.
- [34] 吴少鹏, 王国华, 赵效南, 等. 山东省某地区奶牛源大肠埃希菌的血清型、耐药特性及分子特性[J]. 微生物学报, 2020, 60(3): 486-498.
- [35] 江婉琳, 马勋, 王静, 等. 新疆克拉玛依地区奶牛源致病性大肠杆菌的血清型、系统进化群及 MLST 分析[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(4): 1414-1422.
- 责任编辑: 邹慧玲
英文编辑: 柳 正