

• 基础研究 •

内蒙古通辽地区犊牛腹泻大肠埃希菌毒力基因检测及耐药性分析

杨斯琴¹, 王平², 查干哈斯³, 石顺利⁴

1. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古 通辽 028000; 2. 通辽京缘种牛繁育有限责任公司, 内蒙古 通辽 028000; 3. 通辽市农牧科学研究所, 内蒙古 通辽 028000; 4. 通辽市畜牧业发展中心, 内蒙古 通辽 028000

摘要: **目的** 对内蒙古通辽地区犊牛腹泻大肠埃希菌(*E. coli*)的毒力基因进行检测, 并分析其耐药性及耐药基因分布情况。**方法** 采用药敏纸片法检测从腹泻犊牛粪便样品分离鉴定的 82 株致病性 *E. coli* 对 13 种抗菌药物的敏感性, PCR 法检测其 13 种毒力基因和 12 种耐药基因携带情况, 并对其进行系统进化分群。**结果** 82 株致病性 *E. coli* 中 48.78% (40/82)、31.71% (26/82)、14.63% (12/82) 和 4.88% (4/82) 分别属于 A、B1、B2 和 D 群, 优势群系为 A 群(48.78%, 40/82); 共检测到 11 种毒力基因, 未检测到 *tsh* 和 *LT1*, 其中 *irp2*、*fyuA*、*eaeA* 和 *STb* 的检出率较高, 分别为 79.27% (65/82)、63.41% (52/82)、53.66% (44/82) 和 50% (41/82), 其他毒力基因检出率均低于 50%。82 株致病性 *E. coli* 对 13 种抗菌药物的耐药情况严重, 其中对四环素、多西环素和阿莫西林的耐药性普遍较高, 耐药菌株占比分别为 100% (82/82)、97.56% (80/82) 和 90.24% (74/82); 全部菌株表现出多重耐药, 耐 8 种抗菌药物的菌株数最多(16/82, 19.51%)。82 株致病性 *E. coli* 中均检出 12 种耐药基因, 其中 β -内酰胺类(*bla_{TEM}*)、磺胺类(*sul1* 和 *sul2*)、四环素类(*tetB* 和 *tetD*) 和氨基糖苷类(*aadB*) 耐药基因的检出率均高于 70%。**结论** 82 株致病性 *E. coli* 主要属于 A 系统群, 毒力基因和耐药基因检出率较高, 耐药性较高且具有多重耐药现象。本研究为内蒙古通辽地区犊牛大肠埃希菌病的防治及临床用药提供了参考。

关键词: 犊牛; 大肠埃希菌; 毒力基因; 耐药性

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2023)02-0151-07

Detection of virulence genes and analysis of antimicrobial resistance of *E. coli* from calves with diarrhea in Tongliao City, Inner Mongolia Autonomous Region, China

YANG Si-qin*, WANG Ping, CHAGAN Hasi, SHI Shun-li

*College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Minzu University,
Tongliao 028000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: YANG Si-qin, E-mail: 736343718@qq.com

Abstract: **Objective** To detect the virulence gene of *E. coli* from calves with diarrhea in Tongliao City, Inner Mongolia Autonomous Region, China and analyze its antimicrobial resistance as well as the distribution of antimicrobial resistant genes. **Methods** The sensitivities of 82 *E. coli* isolates from the fecal samples of calves with diarrhea to thirteen kinds of antibiotics were determined by disk diffusion test. The carrying statuses of thirteen virulence genes and twelve antimicrobial resistant genes of the *E. coli* isolates were determined by PCR, based on which the phylogenetic background was investigated. **Results** Of the 82 pathogenic *E. coli* isolates, 48.78% (40/82), 31.71% (26/82), 14.63% (12/82) and 4.88% (4/82) belonged to phylogenetic groups A, B1, B2 and D respectively, indicating that the prominent one was group A. A total of 11 virulence genes were detected in 82 isolates. The detection rates of *irp2*, *fyuA*, *eaeA* and *STb* genes were 79.27% (65/82), 63.41% (52/82), 53.66% (44/82) and 50% (41/82) respectively, while those of other virulence genes were less than 50%, and no *tsh* or *LT1* was detected. The 82 isolates were significantly resistant to 13 kinds

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2020LH03010); 内蒙古民族大学博士科研启动基金(BS395).

通信作者: 杨斯琴, E-mail: 736343718@qq.com

of antibiotics, in which the resistant rates to tetracycline, doxycycline and amoxicillin were 100% (82/82), 97.56% (80/82) and 90.24% (74/82) respectively. All the isolates were multidrug resistant, most of which were resistant to eight kinds of antibiotics (16/82, 19.51%). A total of twelve antimicrobial resistant genes were detected in the 82 isolates, in which the positive rates of genes resistant to β -lactams (*bla_{TEM}*), sulfonamide (*sul1* and *sul2*), tetracycline (*tetB* and *tetD*) and aminoglycosides (*aadB*) were more than 70%. **Conclusion** The 82 pathogenic *E. coli* isolates mainly belonged to group A, with high detection rates of virulence gene and antimicrobial resistant gene as well as high and multiple drug resistance. The study provided a reference for the prevention and treatment of and clinical medication of *E. coli*-associated diseases in calves in Tongliao Region.

Key words: Calf; *E. coli*; Virulence gene; Antimicrobial resistance

大肠埃希菌(*E. coli*)是人和动物肠道菌群的重要组成部分,通常对宿主无害,但也可能是潜在的致病因子^[1]。某些 *E. coli* 对人和动物具有致病性,称为致病性 *E. coli*,是人兽共患病的病原菌之一,可引起大肠埃希菌病,从而使宿主免疫功能减弱或造成养殖业重大经济损失^[2]。致病性 *E. coli* 主要以家畜、家禽及其制品为主要传播载体,可引起人类食物中毒、泌尿道感染、脑膜炎和败血症,甚至导致死亡^[3]。

根据 CLERMONT 等^[4]建立的分群方法,可将 *E. coli* 分为 A、B1、B2 和 D 4 个系统群。研究表明,在肠外 *E. coli* 中 B2 系统群占优势^[5]。另一项研究表明,B2 和 D 系统群的菌株比 A 和 B1 系统群的菌株具有更多与肠外致病性 *E. coli* (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) 相关的毒力基因^[6]。此外,*E. coli* 的致病性与其携带的毒力基因存在一定的相关性。目前,在牛源致病性 *E. coli* 中发现了多种毒力基因,如黏附素、编码血凝素、铁摄取系统、毒素及黏附蛋白等^[7]。因此,毒力基因的检测可对 *E. coli* 潜在的致病性做出前瞻性判定。

临床上,大肠埃希菌病的治疗以抗菌药物为主。抗菌药物的使用大大提高了动物的生产能力,但随着抗菌药物在畜牧业中的过度使用,其益处已被 *E. coli* 日趋严重的耐药性及多重耐药现象削弱,严重影响了畜牧业的健康发展,同时对畜产品和公共卫生安全造成极大的危害^[8]。有研究表明,动物可通过食物链或直接接触传播耐药性,如动物源耐药基因可通过食物链传给人类或扩散至环境中^[9]。因此,*E. coli* 耐药水平的增加间接给人类健康带来威胁。本研究对内蒙古通辽地区犊牛腹泻病例分离鉴定出的 82 株致病性 *E. coli* 进行了系统发育分群及 13 种抗菌药物的敏感性测定,并采用 PCR 技术检测了 13 种毒力基因携带情况及 12 种耐药基因的分布情况,以期对内蒙古通辽地区犊牛大肠埃希菌病的防控和临床用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株 82 株致病性 *E. coli* 分离自内蒙古通辽周边规模化奶牛场腹泻犊牛病例粪便样品。

1.2 主要试剂 营养琼脂培养基和营养肉汤购自北京奥博星生物技术有限公司;琼脂糖、2 × Tap PCR MasterMix、核酸染料、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DL2000 DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司;药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.3 药敏试验 参照临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)^[10]标准,采用纸片扩散法(K-B 法)对 82 株致病性 *E. coli* 进行 13 种抗菌药物敏感性试验。选用 *E. coli* ATCC25922 作为药敏试验的质控菌。

1.4 分离菌系统进化分群鉴定 CLERMONT 等^[4]针对 *E. coli* 设计了一种新型种群分型方法,也称系统进化分群鉴定方法,即将不同种群 *E. coli* 的 3 个基因 *chuA*、*yjaA* 和 *TspE4*。C2 采用 PCR 方法扩增进行分群,根据 3 种基因扩增结果,可将 *E. coli* 分为 A(*chuA* 和 *TspE4*。C2 均为阴性)、B1(*chuA* 为阴性而 *TspE4*。C2 为阳性)、B2(*chuA* 和 *yjaA* 均为阳性)和 D(*chuA* 为阳性而 *yjaA* 为阴性)群。参考该方法,以提取的 *E. coli* 分离株 DNA 为模板,PCR 法扩增 *chuA*、*yjaA* 和 *TspE4*。C2 基因,判定分离株的系统进化群。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 30 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。引物序列见表 1,引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.5 毒力基因及耐药基因检测 参考文献[1、5、8、11-14]设计并合成 13 种毒力基因引物(见表 2)和 12 种耐药基因引物(见表 3),引物由日本 TaKaRa 公司合成。13 种毒力基因包括血清抗性蛋白(*iss*)、P 菌毛黏附素(*papC*)、铁获得系统(*iucD*)、自主转运蛋白(*tsh*)、HPI 毒力岛(*irp2*、*fyuA*)、Lee 毒力岛(*eaeA*)、毒素(*astA*)、志贺毒素(*stx1*、*stx2*)、不耐热性肠毒素(*LT1*)、耐热性肠毒素(*STb*)、溶血素基因(*hlyA*);12

种耐药基因包括 β -内酰胺类(bla_{TEM} 、 bla_{SHV} 、 bla_{CTX-M})、四环素类($tetA$ 、 $tetB$ 、 $tetD$)、氨基糖苷类[$aac(3)$ -IV、 $aadB$]、喹诺酮类($qnrA$ 、 $qnrB$)和磺胺类($sul1$ 、 $sul2$)。以提取的 82 株致病性 *E. coli* 的 DNA 为模板,对上述 13 种毒力基因(反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 50 s,53 ~ 62 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min)和 12 种耐药基因(反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,54 ~ 65 °C 退火 60 ~ 90 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min)进行 PCR 扩增。扩增产物经胶回收试剂盒回收并送博迈德生物技术有限公司测序,测序结果采用 NCBI-BLAST 比对,鉴定标准按照同源性 $\geq 97\%$ 判定。

表 1 *E. coli* 系统进化分群引物

Tab. 1 Primers used for phylogenetic groups of *E. coli*

基因	引物序列(5'→3')	长度(bp)
<i>chuA</i>	F:GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
	R:TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i>	F:TGAAGTGTGACGAGACGCTG	211
	R:ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
<i>TspE4. C2</i>	F:GAGTAATGTGGGGCATTCA	152
	R:CGCGCCAACAAAGTATTACG	

表 2 *E. coli* 13 种毒力基因引物

Tab. 2 Primers used for 13 kinds of virulence genes of *E. coli*

基因	引物序列(5'→3')	长度(bp)
<i>iss</i>	F:CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323
	R:AGCATTGCCAGACGGCAGAA	
<i>papC</i>	F:TGATATCACGCAGTCAGTAGC	501
	R:CCGGCCATATTCACATAA	
<i>iucD</i>	F:ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	714
	R:CCTGATCCAGATGATGCTC	
<i>tsh</i>	F:ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	824
	R:CTTCCGATGTTCTGAACGT	
<i>irp2</i>	F:AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	413
	R:AACCTCTGATACAGGTGGC	
<i>fyuA</i>	F:GACACGGCTTTATCCTCTGG	296
	R:AGAAGTCTCGCGCTGAAGAG	
<i>eaeA</i>	F:AGGCTTCGTCACAGTTG	570
	R:CCATCGTCACCAGAGGA	
<i>astA</i>	F:TGCCATCAACACAGTATATCC	116
	R:TCAGGTCGCGAGTGACGGC	
<i>stx1</i>	F:ATTCGCTGAATGTCATTGCT	664
	R:ACGCTTCCCAGAATTGCATTA	
<i>stx2</i>	F:GAATGAAGAAGATGTTATAGCGG	281
	R:GGTTATGCCTCAGTCATTATTA	
<i>LT1</i>	F:AATGGCGACAGATTATACCGT	711
	R:TCATAATTCATCCGAATTCTGT	
<i>STb</i>	F:TATTATATTTGGAAGCTTAAGTATTGTTGA	1 087
	R:CATGACACGAAGCGCAG	
<i>hlyA</i>	F:GAGCGAGCTAAGCAGCTTGA	890
	R:CCTGCCCCAGAATAAACTATATC	

表 3 *E. coli* 12 种耐药基因引物

Tab. 3 Primers used for 12 kinds of resistance genes of *E. coli*

基因	引物序列(5'→3')	长度(bp)
<i>bla_{TEM}</i>	F:GTTTCGTGTCGCCCTTATTCC	692
	R:CCGGCTCCAGATTATCAGC	
<i>bla_{SHV}</i>	F:GGGTTATTCTTATTTGTCGC	567
	R:TTAGCGTTGCCAGTGCTC	
<i>bla_{CTX-M}</i>	F:ATGTGCAGYACCAGTAA	536
	R:ACCGCRATATCRTTGGT	
<i>tetA</i>	F:CCTCAATTTCTGCACGGGCT	712
	R:GGCAGAGCAGGAAAGGAAT	
<i>tetB</i>	F:ACCACCTCAGCTTCTCAACG	586
	R:GTAAAGCGATCCCACCACCA	
<i>tetD</i>	F:AAACCATTACGGCATTCTGC	787
	R:GACCGGATACACCATCCATC	
<i>aac(3)-IV</i>	F:ATGTCATCAGCGGTGGAGTG	454
	R:GGAGAAGTACCTGCCCCATCG	
<i>aadB</i>	F:GAGGAGTTGGACTATGGATT	208
	R:CTTCATCGGCATAGTAAAA	
<i>qnrA</i>	F:AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580
	R:TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
<i>qnrB</i>	F:GGMATHGAAATTCGCCACTGC	264
	R:TTTGCGYGYCGCCAGTCAAC	
<i>sul1</i>	F:CGGCGTGGGCTACCTGAACG	433
	R:GCCGATCGCGTGAAGTTCGG	
<i>sul2</i>	F:CGGCATCGTCAACATAACCT	721
	R:TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	

2 结果

2.1 药敏试验结果 结果显示,82 株致病性 *E. coli* 对 13 种抗菌药物的耐药性普遍较高,其中对四环素(TE)的耐药菌株占比最高,为 100%;对多西环素(DO)、阿莫西林(AMC)、氨苄西林(AM)、头孢唑肟(CEF)、复方磺胺甲恶唑(SXT)、卡那霉素(K)、阿米卡星(AMI)、链霉素(S)和多黏菌素 B(PB)的耐药菌株占比为 62. 20% ~ 97. 56%;而对氧氟沙星(OFL)、庆大霉素(GM)和环丙沙星(CIP)较为敏感,其敏感菌株占比分别为 76. 83%、69. 51% 和 51. 22%。见表 4。多重耐药统计结果显示,全部菌株耐 3 种及以上药物,多重耐药菌株占比为 100%。其中,耐 8、9、10 和 11 种抗菌药物的菌株较多,占比分别为 19. 51% (16 / 82)、14. 63% (12 / 82)、17. 07% (14 / 82) 和 13. 41% (11 / 82);对 8 种抗菌药物耐药的分离株最多,为 19. 51% (16 / 82)。见图 1。表明,该地区犍牛腹泻病例分离的 82 株致病性 *E. coli* 多重耐药现象严重,临床用药建议进行药敏试验,选择敏感性药物进行治疗。

表 4 82 株致病性 *E. coli* 药敏试验结果

Tab. 4 Drug sensitivity test results of 82 pathogenic *E. coli* isolates

药物名称	敏感		中介		耐药	
	菌株数	占比(%)	菌株数	占比(%)	菌株数	占比(%)
氨基糖苷类						
K	18	21.95	3	3.66	61	74.39
S	28	34.15	0	0.00	54	65.85
AMI	23	28.05	1	1.22	58	70.73
GM	57	69.51	0	0.00	25	30.49
多肽类						
PB	17	20.73	14	17.07	51	62.20
四环素类						
TE	0	0.00	0	0.00	82	100.00
DO	0	0.00	2	2.44	80	97.56
喹诺酮类						
OFL	63	76.83	0	0.00	19	23.17
CIP	42	51.22	0	0.00	40	48.78
磺胺类						
SXT	11	13.41	3	3.66	68	82.93
β-内酰胺类						
AM	9	10.98	2	2.44	71	86.59
CEF	13	15.85	0	0.00	69	84.15
AMC	7	8.54	1	1.22	74	90.24

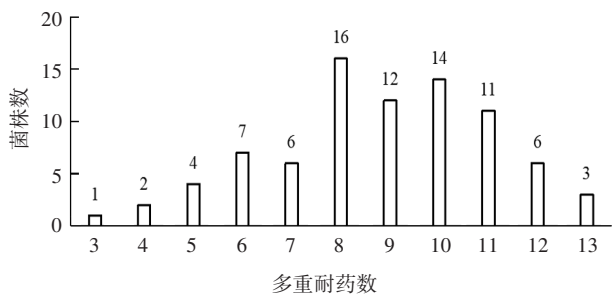


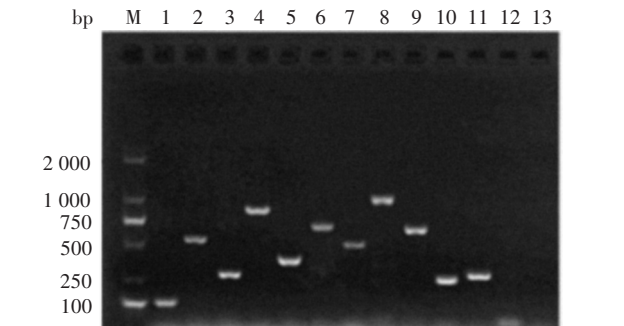
图 1 82 株致病性 *E. coli* 的多重耐药情况

Fig. 1 Multiple drug resistance of 82 pathogenic *E. coli* isolates

2.2 系统进化分群结果 利用 *E. coli* 分子分群的 *chuA*、*yiaA* 和 *TspE4*、*C2* 基因对 82 株致病性 *E. coli* 进行 PCR 扩增,结果显示,82 株致病性 *E. coli* 中有 40 株 (40 / 82, 48.78%) 属于 A 群,为优势群系;26 株 (26 / 82, 31.71%) 属于 B1 群,12 株 (12 / 82, 14.63%) 属于 B2 群,剩余 4 株 (4 / 82, 4.88%) 属于 D 群。表明分离的 82 株致病性 *E. coli* 以 A + B1 群为主,而 B2 和 D 群分离率较低。

2.3 毒力基因检测结果 利用 PCR 法对 82 株致病性 *E. coli* 进行 13 种毒力基因扩增,结果显示,82 株致病性 *E. coli* 携带 11 种毒力基因,见图 2,总检出率为 84.6% (11 / 13)。其中,*irp2* 检出率最高,为 79.27% (65 / 82),其次为 *fyuA*、*eaeA* 和 *STb*,检出率分别为

63.41% (52 / 82)、53.66% (44 / 82) 和 50% (41 / 82);*iucD*、*astA*、*stx2*、*hlyA*、*papC*、*stx1* 和 *iss* 的检出率分别为 47.56% (39 / 82)、46.34% (38 / 82)、40.24% (33 / 82)、32.93% (27 / 82)、26.83% (22 / 82)、21.95% (18 / 82) 和 15.85% (13 / 82);82 株 *E. coli* 均未检测到毒力基因 *tsh* 和 *LT1*。此外,含有 7、6、5、4、3 和 2 种毒力基因的菌株分别有 6、11、9、16、28 和 8 株;仅含 1 种毒力基因的菌株有 4 株。表明该地区致病性 *E. coli* 的毒力基因携带情况复杂,其中毒力基因 *irp2*、*fyuA*、*eaeA* 和 *STb* 的携带率较高。



M: DL2000 DNA marker; 1 ~ 13: 分别为 *astA*、*eaeA*、*fyuA*、*hlyA*、*irp2*、*iucD*、*papC*、*STb*、*stx1*、*stx2*、*iss*、*LT1*、*tsh*。

图 2 13 种毒力基因的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR results of 13 virulence genes

2.4 耐药基因检测结果 采用 PCR 法对 82 株致病性 *E. coli* 进行 12 种耐药基因扩增,结果显示,氨基糖苷类耐药基因 *aadB* 和 *aac(3)-IV* 的检出率分别为 75.6% (67 / 82) 和 2.4% (2 / 82);四环素类耐药基因 *tetB* 的检出率最高,为 91.5% (75 / 82),而 *tetD* 和 *tetA* 的检出率分别为 70.7% (58 / 82) 和 31.7% (26 / 82);喹诺酮耐药基因 *qnrA* 和 *qnrB* 的检出率分别为 43.9% (36 / 82) 和 40.2% (33 / 82);磺胺类耐药基因 *Sul1* 和 *Sul2* 的检出率较高,分别为 86.6% (71 / 82) 和 100% (82 / 82); β -内酰胺类耐药基因 *bla_{TEM}*、*bla_{SHV}* 和 *bla_{CTX-M}* 的检出率分别为 100% (82 / 82)、69.5% (57 / 82) 和 39% (32 / 82)。见图 3。表明,12 种耐药基因广泛分布于该地区犍牛腹泻致病性 *E. coli* 中。

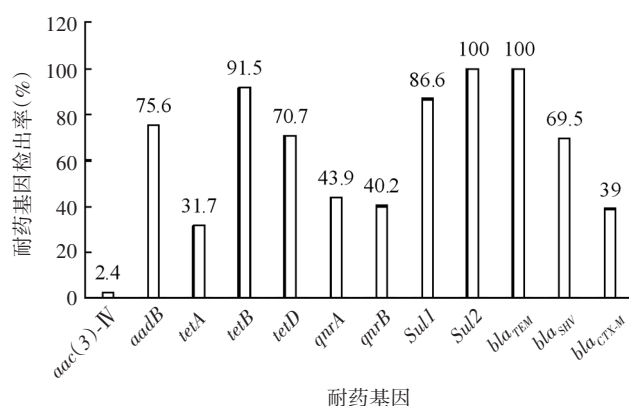


图 3 82 株致病性 *E. coli* 的耐药基因检出率

Fig. 3 Detection rates of resistance genes in 82 pathogenic *E. coli* isolates

3 讨论

E. coli 是临床上分离率较高的菌株^[15],可对多种动物造成感染而出现各种临床症状和病理变化,其发病率和死亡率较高,给养殖业带来严重经济损失。因此,了解并分析内蒙古通辽地区 *E. coli* 的系统分群、毒力基因携带情况以及耐药性和耐药基因分布具有重要意义。本研究对分离的 82 株致病性 *E. coli* 进行了系统分群分析,发现分离株主要属于 A 群 (40 / 82, 48.78%), B1 群占 31.71% (26 / 82),而 B2 群和 D 群分离率较低。陈亚强等^[16]报道,重庆地区禽源 *E. coli* 优势系统分群为 A 群 (48 / 93, 51.61%);许腾林等^[17]报道,不同动物源 ExPEC 中优势系统群为 A 群 (28 / 53, 52.8%)。本研究中优势系统群与以上报道一致。

E. coli 的毒力因子种类繁多,这些毒力因子与 *E. coli* 的致病性存在一定的相关性,毒力基因的携

带在一定程度上可以加强 *E. coli* 的致病性^[18]。本研究结果显示,毒力基因 *irp2*、*fyuA*、*eaeA* 和 *STb* 的检出率较高,分别为 79.27% (65 / 82)、63.41% (52 / 82)、53.66% (44 / 82) 和 50% (41 / 82),其他毒力基因的检出率低于 50%。本研究中 *irp2* 和 *fyuA* 的检出率低于贾青辉等^[19]和高光平等^[20]报道的该毒力基因的检出率;而 *eaeA* 和 *STb* 的检出率高于刘丽娟等^[21]和张金宝等^[22]报道的该毒力基因的检出率。表明 *E. coli* 毒力基因携带情况因其不同地区、不同动物来源而存在差异。根据毒力基因检测结果,认为内蒙古通辽地区牛场粪便存在潜在危害,需加强对粪便处理,以免产生威胁公共安全的问题。

研究表明,在人类和动物医学中长期和过度使用抗菌药物是导致细菌耐药性增加的重要因素^[23]。本研究药敏试验结果显示,分离的 82 株致病性 *E. coli* 对 13 种抗菌药物均有不同成程度的耐药,全部菌株对 3 种及以上药物呈现耐药,主要以 8 ~ 11 种耐药为主。分离株中对四环素类、 β -内酰胺类和氨基糖苷类中的卡那霉素(K)、阿米卡星(AMI)、链霉素(S)和多黏菌素 B(PB)的耐药菌株均占 60% 以上,表明抑菌效果不明显,临床用药建议不使用或谨慎使用。82 株致病性 *E. coli* 对氧氟沙星(OFL)、庆大霉素(GM)和环丙沙星(CIP)较为敏感,敏感菌株占 50% 以上,但耐药性依然存在。因此,在大肠埃希菌性犍牛腹泻时可选择该 3 种药物或联合用药。张星星等^[24]报道,新疆犍牛源 *E. coli* 表现出严重的多重耐药现象,主要以 3 ~ 7 种耐药为主,且对氨苄西林(AM)、链霉素(S)和四环素(TE)的耐药菌株占比较高,分别为 71.4%、66% 和 55.3%。刘勃兴等^[25]报道,河北省犍牛腹泻 *E. coli* 多重耐药现象严重,分离的菌株全部对 2 种及以上药物耐药,且耐 10 种及以上药物的菌株占 34%。表明犍牛源 *E. coli* 多重耐药现象普遍存在,且各个国家及地区的检测结果存在差异,这可能是各个国家、地区对抗菌药物的使用情况和饲养管理模式不同导致的。此外,抗生素治疗是降低感染致病性 *E. coli* 导致的畜禽发病率和死亡率的主要治疗方法,谨慎使用抗菌药物对保持其在动物及人类治疗中的应用具有重要意义。

据研究,耐药基因是细菌先天具有的,也可通过质粒和转座子等获得并传播^[26]。*E. coli* 通常携带多种耐药质粒,在抗生素选择压力下,易将这些质粒转移给其他细菌,并使其产生耐药性或耐药谱变得更广,且耐药基因可通过与动物直接接触或通过畜产品生产链或农业中使用动物粪便肥料而间接传播给人类^[27]。本研究中 β -内酰胺类耐药基因 *bla_{TEM}* 和

磺胺类耐药基因 *Sul1* 和 *Sul2* 的检出率较高,分别为 100% (82/82)、86.6% (71/82) 和 100% (82/82)。多数研究报道,以上 3 种耐药基因检出率均较高^[8,28]。表明 *E. coli* 易对磺胺类和 β -内酰胺类药物产生耐药性。此外,在不耐药菌株中也检测到了氨基糖苷类耐药基因,因此耐药性与耐药基因的相关性仍需进一步研究。耐药基因检测结果的差异可能与不同国家、不同地区 *E. coli* 的不同抗生素压力所致。

本研究检测并分析了内蒙古通辽地区犍牛腹泻致病性 *E. coli* 的药物敏感性、毒力基因和耐药基因的携带情况,结果显示,分离株对 13 种药物均具有不同程度的耐药,存在多重耐药现象,且毒力基因和耐药基因携带情况复杂,可能对公共卫生安全具有潜在危害。因此,应规范使用抗菌药物,并加强对粪便的处理。

参考文献

- [1] SUBEDI M, LUITEL H, DEVKOTA B, *et al.* Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal [J]. BMC Veter Res, 2018, 14 (113): 1-6.
- [2] HORNSEY M, BETTS J W, MEHAT J W, *et al.* Characterization of a colistin-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* ST69 isolate recovered from a broiler chicken in Germany [J]. J Med Microbiol, 2019, 68 (1): 111-114.
- [3] MELLATA M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends [J]. Foodborne Pathog Dis, 2013, 10 (11): 916-932.
- [4] CLERMONT O, BONACORSI S, BINGEN E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (10): 4555-4558.
- [5] ZHANG D, ZHANG Z, HUANG C, *et al.* The phylogenetic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis [J]. J Dairy Sci, 2018, 101 (1): 572-580.
- [6] LAN T. Antimicrobial susceptibility, phylotypes, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis in five provinces of China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020. (in Chinese)
兰图. 奶牛乳房炎生乳中大肠杆菌耐药性、毒力基因和基因分型的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [7] LU T, SEO H, MOXLEY R A, *et al.* Mapping the neutralizing epitopes of F18 fimbrial adhesin subunit FedF of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) [J]. Veter Microbiol, 2019, 230: 171-177.
- [8] ABO-AMER A E, SHOBRAK M Y, ALTALHI A D. Isolation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from farm chickens in Taif, Saudi Arabia [J]. J Global Antimicrob Resist, 2018, 15: 65-68.
- [9] GHANBARPOUR R, AFLATOONIAN M R, ASKARI A, *et al.* Domestic and game pigeons as reservoirs for *Escherichia coli* harboring antimicrobial resistance genes [J]. J Global Antimicrob Resist, 2020, 22: 571-577.
- [10] CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals (CLSI supplement VET08) [M]. 4th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [11] CHENG D, SUN H, XU J, *et al.* PCR detection of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and / or diarrhea in China [J]. Veter Micro-biol, 2006, 115 (4): 320-328.
- [12] SHIN S W, BYUN J W, JUNG M, *et al.* Antimicrobial resistance, virulence genes and PFGE-profiling of *Escherichia coli* isolates from South Korean cattle farms [J]. J Microbiol, 2014, 52 (9): 785-793.
- [13] CATTOIR V, POIREL L, ROTIMI V, *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60 (2): 394-397.
- [14] ZHAO X S, SUN Y, JI X, *et al.* Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from dogs [J]. Chin J Zoonoses, 2014, 30 (3): 268-272. (in Chinese)
赵相胜, 孙洋, 纪雪, 等. 犬源大肠杆菌分离鉴定及耐药性分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30 (3): 268-272.
- [15] GAO J, BARKEMA H W, ZHANG LM, *et al.* Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms [J]. J Dairy Sci, 2017, 100 (6): 4797-4806.
- [16] CHEN Y Q, LIAO M. The epidemiological investigation and drug resistance analysis of avian pathogenic *Escherichia coli* in some regions of Chongqing city from 2016 to 2017 [J]. Chin J Prevent Veter Med, 2019, 41 (1): 24-28. (in Chinese)
陈亚强, 廖明. 2016 年 ~ 2017 年重庆地区禽源大肠杆菌流行病学调查及耐药性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41 (1): 24-28.
- [17] XU T L, XING G L, JIANG C G, *et al.* Phylogenetic group, antimicrobial resistance and pathogenic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from wine, chicken and mink [J]. Chin J Prevent Veter Med, 2018, 40 (5): 386-391. (in Chinese)
许腾林, 邢桂玲, 姜成刚, 等. 猪、鸡与貂源肠外致病性大肠杆菌菌型、耐药性与致病性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40 (5): 386-391.
- [18] BESSALAH S, FAIRBROTHER J M, SALHI I, *et al.* Antimicrobial resistance and molecular characterization of virulence genes, phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy camel-calves in Tunisia [J]. Compar Immunol Microbiol Infect Dis, 2016, 49: 1-7.
- [19] JIA Q H, ZHANG Z X, LI Y Y, *et al.* Analysis of virulence genes and drug resistance of the pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken in Hebei province [J]. Chin J Prevent Veter Med, 2018, 40 (5): 401-405. (in Chinese)
贾青辉, 张召兴, 李蕴玉, 等. 河北地区鸡源致病性大肠杆菌毒力基因检测与耐药性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40 (5): 401-405.
- [20] GAO G P, ZHU L X, WANG H H, *et al.* Detection of virulence gene and resistance gene and analysis of drug sensitivity of *Escherichia coli* in fur-bearing animal [J]. Chin J Veter Sci, 2019, 39 (4): 671-677. (in Chinese)

- 高光平, 朱利霞, 王洪彬, 等. 毛皮动物源大肠杆菌毒力和耐药基因检测及药物敏感性分析[J]. 中国兽医学报, 2019, 39 (4): 671-677.
- [21] LIU L J, MA G Q, ZHANG S Z, *et al.* Classification and drug resistance analysis of pathogenic *Escherichia coli* in diarrhea piglets [J]. Chin Animal Husbandry & Veter Med, 2018, 45 (10): 2876-2884. (in Chinese)
- 刘丽娟, 马光强, 张胜沾, 等. 仔猪腹泻致病性大肠杆菌分型鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (10): 2876-2884.
- [22] ZHANG J B, MA C F, YU T, *et al.* Detection of virulence genes and antimicrobial resistance analysis of *Escherichia coli* isolated from dairy cows mastitis in Ningxia [J]. Chin J Animal Veter Sci, 2016, 47 (1): 177-182. (in Chinese)
- 张金宝, 马春芳, 余婷, 等. 宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌毒力基因检测和耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47 (1): 177-182.
- [23] ZHANG Z X, LI P, LI Y Y, *et al.* Analyzing phylogenetic groups, drug resistance phenotypes, and drug resistance genotypes of *Escherichia coli* isolates causing salpingoperitonitis in layer chicken [J]. Chin J Prevent Veter Med, 2019, 41 (9): 885-890. (in Chinese)
- 张召兴, 李佩国, 李蕴玉, 等. 致蛋鸡卵黄性腹膜炎大肠杆菌分子分群、耐药表型及耐药基因型检测与分析[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41 (9): 885-890.
- [24] ZHANG X X, QIAO J, MENG Q L, *et al.* Phylogenetic analysis and resistance characteristics of *Escherichia coli* from calves in Xinjiang [J]. J Domestic Animal Ecol, 2016, 37 (6): 60-64. (in Chinese)
- 张星星, 乔军, 孟庆玲, 等. 新疆牦牛源大肠杆菌系统进化及其耐药特性[J]. 家畜生态学报, 2016, 37 (6): 60-64.
- [25] LIU B X, ZHAO A Q, LIU C C, *et al.* Pathogenicity and drug resistance of diarrhea *Escherichia coli* in calves in Hebei province [J]. Chin J Prevent Veter Med, 2020, 42 (2): 133-138. (in Chinese)
- 刘勃兴, 赵安奇, 柳翠翠, 等. 河北省犊牛腹泻大肠杆菌致病性及耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42 (2): 133-138.
- [26] JIANG Z M, AI C M, WANG Y R, *et al.* Risk assessment of antibiotic-resistant bacteria in foods: A review [J]. Food Sci, 2019, 40 (5): 282-288. (in Chinese)
- 姜竹茂, 艾春梅, 王晔茹, 等. 食品中耐药细菌风险评估的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40 (5): 282-288.
- [27] AMER M M, MEKKY H M, AMER A M, *et al.* Antimicrobial resistance genes in pathogenic isolated from diseased broiler chickens in Egypt and their relationship with the phenotypic resistance characteristics [J]. Veter World, 2018, 11 (8): 1082-1088.
- [28] YU Z N, WANG J, HO H, *et al.* Prevalence, antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of China [J]. J Global Antimicrob Resist, 2020, 22: 94-101.

收稿日期: 2022-05-28 编辑: 王佳凤

(上接第 150 页)

- [14] DUNCAN C J A, THOMPSON B J, CHEN R, *et al.* Severe type I interferonopathy and unrestrained interferon signaling due to a homozygous germline mutation in STAT2 [J]. Sci Immunol, 2019, 4 (42): aav7501. DOI: 10.1126/sciimmunol.aav7501.
- [15] BRISSE M, HUANG Q, RAHMAN M, *et al.* RIG-I and MDA5 protect mice from pichinde virus infection by controlling viral replication and regulating immune responses to the infection [J]. Frontiers Immunol, 2021, 12: 801811. DOI: 10.3389/fimmu.2021.801811.
- [16] LIU M, GUO S, HIBBERT J M, *et al.* CXCL10 / IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2011, 22 (3): 121-130.
- [17] COLASANTI T, STEFANANTONI K, FANTINI C, *et al.* The prostacyclin analogue iloprost modulates CXCL10 in systemic sclerosis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (17): ijms231710150. DOI: 10.3390/ijms231710150.
- [18] SPENCER CLINTON J L, TRAN L L, VOGT M B, *et al.* IP-10 and CXCR3 signaling inhibit Zika virus replication in human prostate cells [J]. PloS One, 2020, 15 (12): e0244587. DOI: 10.1371/journal.pone.0244587.
- [19] MURSALIN M H, COBURN P S, MILLER F C, *et al.* C-X-C chemokines influence intraocular inflammation during bacillus endophthalmitis [J]. Investigative Ophthalmol & Visual Sci, 2021, 62 (14): 14.
- [20] FERREIRA H, MENDES M A, DE MATTOS BARBOSA M G, *et al.* Potential role of CXCL10 in monitoring response to treatment in Leprosy patients [J]. Frontiers Immunol, 2021, 12: 662307. DOI: 10.3389/fimmu.2021.662307.
- [21] DEYMIER S, LOUVAT C, FIORINI F, *et al.* ISG20: an enigmatic antiviral RNase targeting multiple viruses [J]. FEBS Open Bio, 2022, 12 (6): 1096-1111.
- [22] MERSINOGLU B, CRISTINELLI S, CIUFFI A. The impact of epitranscriptomics on antiviral innate immunity [J]. Viruses, 2022, 14 (8): v14081666. DOI: 10.3390/v14081666.
- [23] KANG D, GAO S, TIAN Z, *et al.* ISG20 inhibits bluetongue virus replication [J]. Virologica Sinica, 2022, 37 (4): 521-530.
- [24] WEISS C M, TROBAUGH D W, SUN C, *et al.* The interferon-induced exonuclease ISG20 exerts antiviral activity through upregulation of type I interferon response proteins [J]. MSphere, 2018, 3 (5): 00209-18. DOI: 10.1128/mSphere.00209-18.
- [25] CHEN X, SUN D, DONG S, *et al.* Host interferon-stimulated gene 20 inhibits pseudorabies virus proliferation [J]. Virologica Sinica, 2021, 36 (5): 1027-1035.

收稿日期: 2022-06-11 编辑: 王佳凤