

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.11.01

# 河南省部分地区猪源大肠杆菌耐药基因 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 的分子流行病学调查

赵公锦<sup>1</sup>, 彭丽<sup>2</sup>, 方忠意<sup>2</sup>, 吴宁鹏<sup>2</sup>, 李金磊<sup>2</sup>, 李孟<sup>1</sup>, 吴志明<sup>2\*</sup>

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008)

[收稿日期] 2020-05-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 11-0001-07 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 为掌握河南省猪源大肠杆菌耐药基因 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 的分布和流行情况, 对 2013-2018 年从河南省内分离的 856 株大肠杆菌进行 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 等三种耐药基因筛查检测, 调查其分布特征, 并对猪源大肠杆菌耐药基因在郑州、开封、焦作、许昌四个地区的分布和流行趋势进行了分析研究。结果显示, 2013-2018 年 *floR* 基因的检出率一直保持在较高水平, *CTX-M* 基因的检出率持续增长, *mcr-1* 基因的检出率在 2014 年达到最高, 之后逐年下降, 直到 2018 年未检出, 并且不同地区耐药基因的流行趋势有一定差异。

**[关键词]** 猪源大肠杆菌; 耐药基因; 分子流行病学

## Molecular Epidemiological Investigation of Pig-derived *E. coli* Resistance Genes *floR*, *CTX-M*, and *mcr-1* in Parts of Henan Province

ZHAO Gong-jin<sup>1</sup>, PENG Li<sup>2</sup>, FANG Zhong-yi<sup>2</sup>, WU Ning-peng<sup>2</sup>, LI Jin-lei<sup>2</sup>, LI Meng<sup>1</sup>, WU Zhi-ming<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou 450008, China)

Corresponding author: WU Zhi-ming, E-mail: wuzhiming6@sina.com

**Abstract:** To grasp the distribution and prevalence of *floR*, *CTX-M*, *mcr-1* of pig-derived *E. coli* resistance genes in Henan Province, 856 strains of *E. coli* isolated from Henan Province from 2013 to 2018 were screened and tested for three drug resistance genes including *floR*, *CTX-M* and *mcr-1*, and their distribution characteristics were investigated. The distribution and epidemic trends of pig-derived *E. coli* resistance genes in Zhengzhou, Kaifeng, Jiaozuo, and Xuchang were analyzed and studied. The results showed that the detection rate of the *floR* gene had been maintained at a relatively high level from 2013 to 2018. The detection rate of the *CTX-M* gene had continued to increase. The detection rate of the *mcr-1* gene reached its highest level

作者简介: 赵公锦, 硕士研究生, 从事细菌耐药性研究。

通讯作者: 吴志明。E-mail: wuzhiming6@sina.com

in 2014 and then declined year by year, not detected until 2018. And there was a certain difference in the prevalence of drug resistance genes in different regions.

**Key words:** *Escherichia coli*; resistance genes; molecular epidemiology

大肠杆菌病是猪群中常见的细菌性疾病,是危害仔猪健康的重要传染病之一。目前防治该病的主要手段是使用抗菌药物,但由于不规范或滥用抗菌药物现象的存在,导致细菌的耐药现象越来越严重。动物源耐药菌的大量出现与广泛流行,不仅影响到畜禽养殖业的持续健康发展,更严重威胁公共卫生安全。氟苯尼考、头孢噻唑、粘杆菌素是兽医临床治疗大肠杆菌病的常用药物。大肠杆菌对氟苯尼考、头孢噻唑、粘杆菌素的主要耐药基因分别为 *floR*、*CTX - M*、*mcr - 1*, 都是通过质粒在细菌中间进行水平转移的耐药基因<sup>[1-3]</sup>, 对于传播大肠杆菌耐药性具有很大的风险。本研究对 2013 - 2018 年河南省猪源大肠杆菌耐药基因 *floR*、*CTX - M*、*mcr - 1* 的分布特征及流行规律进行了调查,旨在了解河南省猪源大肠杆菌的耐药现状,进一步探索认识其分子流行规律,从而保障公共卫生安全和生态环境安全。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 856 株样本来自 2013 - 2018 年河南省郑州、开封、焦作、许昌四个地区规模化养殖场健康猪的肛门拭子,由河南省兽药饲料监察所分离保存。大肠杆菌质控菌株 ATCC 25922,购自中国兽医药品监察所。

1.1.2 试剂耗材 营养琼脂,购自北京陆桥技术股份有限公司;PCR 预混酶,购自康为世纪生物科技有限公司;离心管和 96 孔 PCR 反应板,购自美国 Axygen 公司;50 × TAE、溴化乙锭 (EB),购自索莱宝生物科技有限公司;琼脂糖,购自西班牙 BIO-WEST 公司。

1.1.3 仪器设备 PCR 扩增仪,购自美国 Applied Biosystems 公司;凝胶电泳仪和凝胶电泳成像系统,购自美国 Bio - Rad 公司;恒温培养箱,购自上海一

恒科技有限公司;浊度仪,购自无锡市光明浊度仪厂;立式自动压力蒸汽灭菌锅,购自日本三洋公司;生物安全柜,购自美国 Thermo 公司;离心机,购自德国 Sigma 公司;水浴锅,购自金坛市医疗仪器厂;电冰箱,购自青岛海尔股份有限公司;超低温冰箱,购自美国 Thermo 公司;纯水仪,购自 Milipore 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌培养 将甘油保种冻存的 856 株猪源大肠杆菌从冰箱中取出,放置室温至融化。在生物安全柜里,用一次性无菌接种环蘸取菌液,划线接种于营养琼脂平板上。恒温培养箱中 37 °C 培养 18 h。

1.2.2 模板 DNA 的制备 参照《分子克隆操作指南》,采用煮沸法提取细菌 DNA 模板。具体操作方法如下:上述培养的细菌 4 °C 10000 r/min 离心 5 min;弃上清,用 200 μL 的 TE 缓冲液将沉淀重悬;在 100 °C 水浴中煮 10 min 之后立即放置到 0 °C 冰水混合物中冰浴 10 min,然后 4 °C 12000 r/min 离心 5 min,吸取上清液转移至新的无菌 EP 管中作为 DNA 扩增模板,置 -20 °C 保存备用。

1.2.3 耐药基因的检测 按照李孟等<sup>[4]</sup>建立的同时检测 *floR*、*CTX - M*、*mcr - 1* 三种耐药基因的多重 PCR 检测方法,对 1.2.2 制备的 DNA 模板进行多重 PCR 扩增,扩增产物在浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳。用凝胶成像分析系统对结果进行分析。

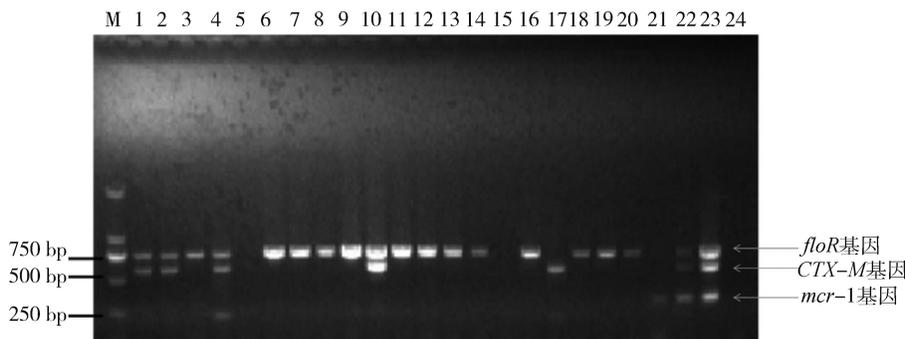
1.2.4 药敏试验 对 856 株猪源大肠杆菌使用药敏检测板检测菌群对氟苯尼考、头孢噻唑、粘杆菌素的临床耐药性,统计耐药情况。

## 2 结果与分析

2.1 猪源大肠杆菌耐药基因 *floR*、*CTX - M*、*mcr - 1* 的检测结果 856 株猪源大肠杆菌中 *floR* 基因检出率为 67.9% (581/856), *CTX - M* 基因检出率为 8.4% (72/856), *mcr - 1* 基因检出率为 27.6%

(236/856)。856 株猪源大肠杆菌中有 222 株同时检出两种耐药基因,检出率为 25.9%,其中 153 株同时检出 *mcr-1* 基因和 *floR* 基因,检出率 17.9% (153/856),69 株同时检出 *floR* 基因和 *CTX-M* 基

因,检出率为 8.1% (69/856),没有菌株同时检出 *CTX-M* 基因和 *mcr-1* 基因。30 株猪源大肠杆菌中同时检出三种耐药基因,检出率 3.5%。部分猪源大肠杆菌的 PCR 扩增产物电泳图见图 1。



M: DNA Marker DL2000;1-22:分离菌株;23:阳性对照;24:阴性对照

图 1 部分样品 PCR 扩增产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis of amplified products PCR part of samples

2.2 不同年份猪源大肠杆菌耐药基因 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 的检测结果 以大肠杆菌分离年份统计,2013-2018 年 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 基因的检出率见图 2。结果显示,*floR* 基因的检出率最低为 2014 年的 56.1%、最高为 2015 年的 79.1%,2013-2018 年平均检出率为 69.7%;*CTX-M* 基因的检出率最低为 2013 年的 2.6%,之后持续增长至 2018 年的 18%,平均检出率 9.6%;*mcr-1* 基因的检出率在 2014 年达到最高 44.4%,2018 年检出率下降为零,平均检出率为 24.3%。

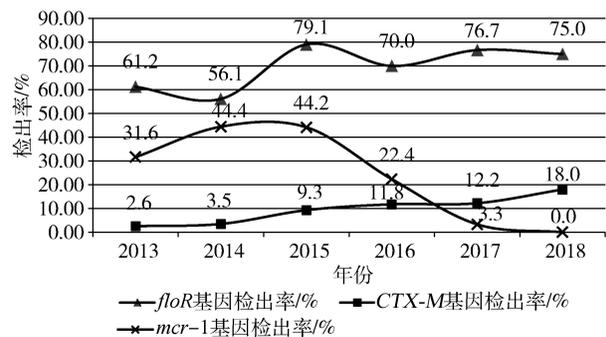


图 2 2013-2018 年 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 耐药基因检出率

Fig 2 The detection rates of *floR*, *CTX-M*, and *mcr-1* resistance genes

2.3 不同地区猪源大肠杆菌耐药基因 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 检测结果 以大肠杆菌来源地统计,郑州、开封、焦作、许昌地区 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 基因检出率结果见图 3。

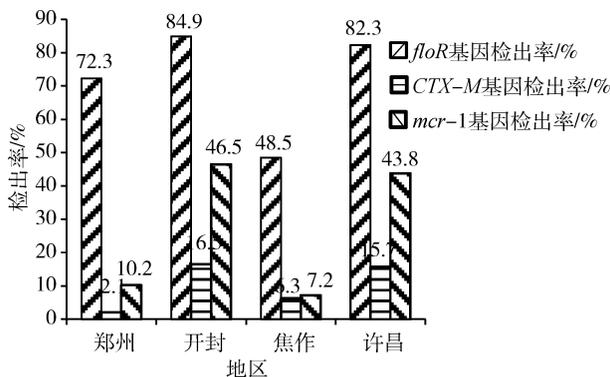


图 3 郑州、开封、焦作、许昌 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 基因检出率

Fig 3 Graphic representation of Zhengzhou, Kaifeng, Jiaozuo, Xuchang *floR*, *CTX-M*, *mcr-1* gene detection rates

结果表明,在郑州地区 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 基因的检出率分别为 72.3%、2.1%、10.2%,在开封地区的检出率分别为 84.9%、16.5%、46.5%,在焦作地区的检出率分别为 48.5%、6.3%、7.2%,在许昌地区检出率分别为 82.3%、15.7%、43.8%。

四个地区耐药基因检出率由高到低均为 *floR* > *mcr-1* > *CTX-M*。

2.3.1 2013-2018 年不同地区 *floR* 基因检出率  
2013-2018 年,郑州、开封、焦作、许昌地区大肠杆菌 *floR* 基因检出率见图 4。结果显示,2013-2018 年,郑州地区 *floR* 基因检出率最低为 2013 年的 42.9%,最高为 2017 年的 90.0%,平均检出率为 72.3%;开封地区 *floR* 基因检出率最低为 2013 年的 60.0%,最高为 2018 年的 95.0%,平均检出率为 84.9%;焦作地区 *floR* 基因检出率最低为 2014 年的 33.9%,最高为 2016 年的 60.0%,平均检出率为 48.5%;许昌地区 *floR* 基因检出率最低为 2014 年的 69.4%,最高为 2015 年的 100%,平均检出率为 82.2%。可以看出,焦作地区 *floR* 基因历年检出率均未超过 60.0%,明显低于其他三个地区,除 2013 年外,其他年份的检出率均为 4 个地区最低。

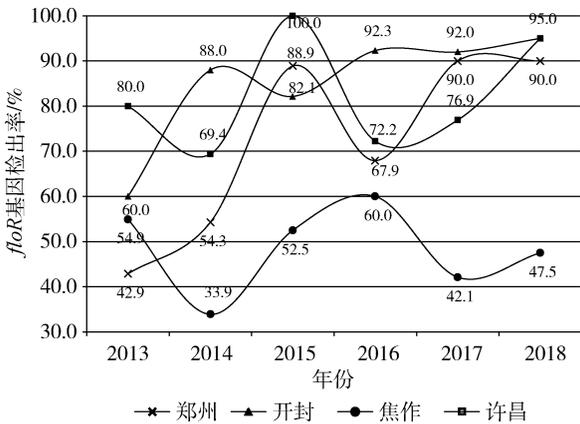


图 4 2013-2018 年郑州、开封、焦作、许昌 *floR* 基因检出率  
Fig 4 The detection rate of *floR* genes in Zhengzhou, Kaifeng, Jiaozuo, and Xuchang

2.3.2 2013-2018 年不同地区 *CTX-M* 基因检出率  
2013-2018 年,郑州、开封、焦作、许昌大肠杆菌 *CTX-M* 基因检出率见图 5。郑州地区 *CTX-M* 基因检出率 2015 年和 2018 年均均为 0,最高为 2017 年的 5.0%,平均检出率为 2.1%;开封地区 *CTX-M* 基因检出率 2014 年为 0,最高为 2016 年的 38.5%,

平均检出率为 16.5%;焦作地区 *CTX-M* 基因检出率 2013 年和 2015 年为 0,最高为 2018 年的 15.0%,平均检出率为 6.3%;许昌地区 *CTX-M* 基因检出率最低为 2017 年的 3.8%,最高为 2018 年的 45.0%,平均检出率为 15.6%。

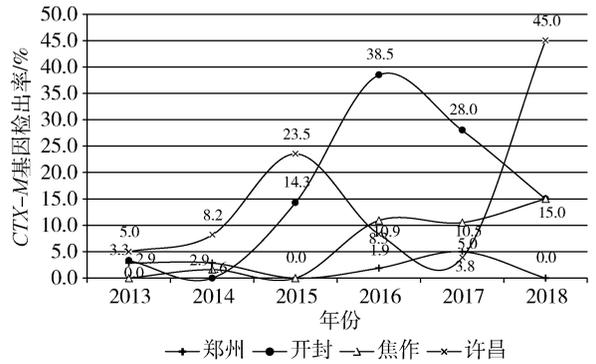


图 5 2013-2018 年郑州、开封、焦作、许昌 *CTX-M* 基因检出率  
Fig 5 The detection rate of *CTX-M* gene in Zhengzhou, Kaifeng, Jiaozuo, and Xuchang

2.3.3 2013-2018 年不同地区 *mcr-1* 基因检出率  
2013-2018 年,郑州、开封、焦作、许昌大肠杆菌 *mcr-1* 基因检出率见图 6。

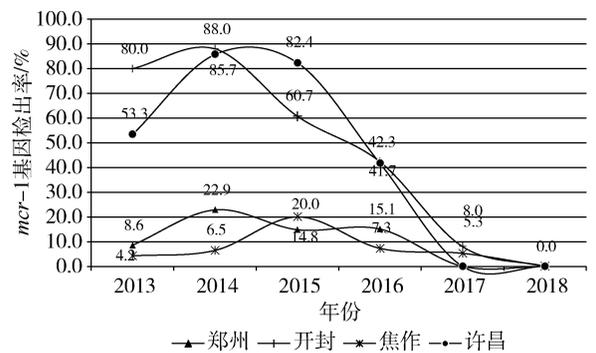


图 6 2013-2018 年郑州、开封、焦作、许昌 *mcr-1* 基因检出率  
Fig 6 The detection rate of *mcr-1* gene in Zhengzhou, Kaifeng, Jiaozuo, and Xuchang

结果显示:4 个地区 *mcr-1* 基因检出率从 2016 年开始呈下降趋势,并在 2018 年均降为 0;郑州地区检出率最高为 2014 年的 22.9%,2017 年检

出率下降为 0, 平均检出率为 10.2%; 开封地区检出率最高为 2014 年的 88.0%, 2018 年检出率下降为 0, 平均检出率为 46.5%; 焦作地区检出率最高为 2015 年的 20.0%, 2017 年检出率下降为 0, 平均检出率为 7.2%; 许昌地区检出率最高为 2014 年的 85.7%, 2017 年检出率下降为 0, 平均检出率为 43.8%。

**2.4 耐药基因与耐药表型相关性分析** 对 856 株猪源大肠杆菌进行药敏检测, 结果显示: 683 株大肠杆菌对氟苯尼考耐药, 耐药率为 79.8%, 耐药菌株中有 581 株携带 *floR* 基因, 携带率为 85.1%; 133 株大肠杆菌对头孢噻呋耐药, 耐药率为 15.5%, 耐药菌株中有 72 株携带 *CTX-M* 基因, 携带率为 54.1%; 266 株大肠杆菌对粘杆菌素耐药, 耐药率为 31.1%, 耐药菌株中有 236 株检出 *mcr-1* 基因, 携带率为 88.7%。

**2.4.1 *floR* 基因检出率和氟苯尼考耐药率比较**

2013-2018 年, 猪源大肠杆菌中 *floR* 基因检出率和氟苯尼考耐药率比较见图 7。数据显示, 2013-2018 年, 分离菌株氟苯尼考耐药率最高为 2015 年的 93.8%, 最低为 2014 年的 59.6%, 平均耐药率为 81.3%, *floR* 基因检出率与其氟苯尼考的耐药率呈正相关。

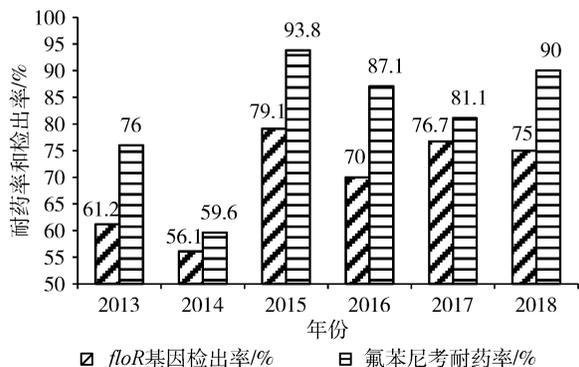


图 7 *floR* 基因检出率和氟苯尼考耐药率比较图

Fig 7 Comparison of *floR* gene detection rate and florfenicol resistance rate

**2.4.2 *CTX-M* 基因检出率和头孢噻呋耐药率比较** 2013-2018 年, 猪源大肠杆菌中 *CTX-M* 基因检出率和头孢噻呋耐药率比较见图 8。数据显示, 2013-2018 年, 分离菌株头孢噻呋耐药率最高为 2017 年的 48.9%, 最低为 2013 年的 3.6%, 平均耐药率为 19.0%, *CTX-M* 基因检出率与其头孢噻呋的耐药率基本呈正相关。

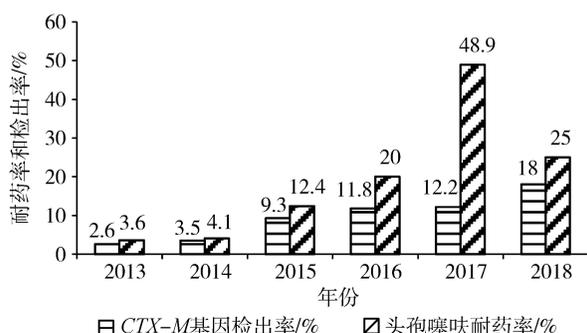


图 8 *CTX-M* 基因检出率和头孢噻呋耐药率比较图

Fig 8 Comparison of *CTX-M* gene detection rate and ceftiofur resistance rate

**2.4.3 *mcr-1* 基因检出率和粘杆菌素耐药率比较**

2013-2018 年, 猪源大肠杆菌中 *mcr-1* 基因检出率和粘杆菌素耐药率比较见图 9。数据显示, 2013-2018 年, 分离菌株粘杆菌素耐药率最高为 2015 年的 55%, 最低为 2018 年的 0, 平均耐药率为 27.9%, *mcr-1* 基因检出率与其粘杆菌素的耐药率呈正相关。

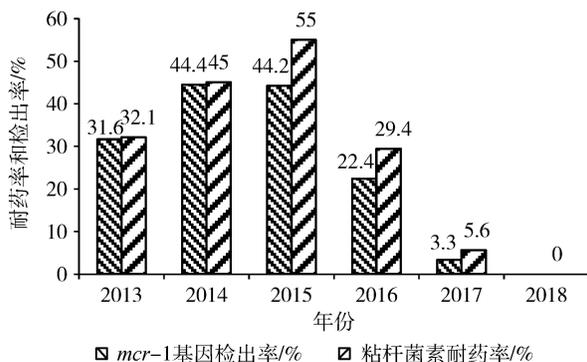


图 9 *mcr-1* 基因检出率与多粘菌素耐药率比较图

Fig 9 Comparison of detection rate of *mcr-1* gene and polymyxin resistance rate

### 3 讨论与结论

调查显示,856 株猪源大肠杆菌中 *floR* 基因检出率为 67.9%, *CTX-M* 基因检出率为 8.4%, *mcr-1* 基因检出率为 27.6%, 其中, *floR* 基因检出率最高, 并且 2013-2018 年检出率居高不下, 李颖颖<sup>[5]</sup> 的研究表明 *floR* 基因已经成为传播介导大肠杆菌耐药的主要基因, 说明河南省内的猪源大肠杆菌对氟苯尼考耐药性已经达到较严重程度; *CTX-M* 基因的检出率低于李进福<sup>[6]</sup> 的研究结果 (25.81%), 但 2013-2018 年检出率逐年增高; 2013-2015 年河南地区 *mcr-1* 基因的检出率呈上升趋势, 与李振斌<sup>[7]</sup> 研究结果一致, 但从 2016 年开始检出率大幅下降, 直至 2018 年下降为 0, 这可能与我国在 2016 年农业部第 2428 号公告中规定停止硫酸黏菌素用于动物促生长政策有关。

不同地区耐药基因的流行趋势也有一定差异, 焦作地区 *floR* 基因平均检出率明显低于其他地区; 相对于整体水平的持续增长, 郑州地区 *CTX-M* 基因检出率一直稳定在较低水平; 开封和许昌地区 *mcr-1* 基因检出率明显高于郑州和焦作, 这些差异可能与各地用药习惯不同有关。

通过统计 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 基因在其耐药菌中的携带率, 发现 *floR* 基因在氟苯尼考耐药菌株中的携带率为 85.1%, 低于郭树源等<sup>[8]</sup> 2015 年对山东地区耐氟苯尼考菌株 *floR* 基因携带率的研究结果 (100%); *CTX-M* 基因在头孢噻唑耐药菌中的携带率为 54.1%, 与杨守深等<sup>[9]</sup> 2018 年在福建地区分离的头孢噻唑耐药菌株中 *CTX-M* 基因携带率 50.1% 的结果相近; *mcr-1* 基因在粘杆菌素耐药菌中携带率较高 (88.7%), 导致 *mcr-1* 流行的主要原因在于质粒介导的传播方式<sup>[10]</sup>。

本研究调查了河南省 4 个地区 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 三种耐药基因的流行情况, 结果表明河南地区氟苯尼考耐药基因 *floR* 呈现大流行状况; 头孢噻唑耐药基因 *CTX-M* 流行情况比较轻微, 但呈增长

趋势; 粘杆菌素耐药基因 *mcr-1* 在政策监管下检出率已经降为 0; 并且不同地区耐药基因的流行趋势有一定差异。

### 参考文献:

- [1] Zhao W H, Hu Z Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria[J]. Crit Rev Microbiol, 2013, 39(1): 79-101.
- [2] Yu J, Jing H, Lai S, et al. Etiology of diarrhea among children under the age five in China: Results from a five-year surveillance[J]. J Infect, 2015, 71(1): 19-27.
- [3] Norman Anders, Hansen Lars H, Sørensen Søren J. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2009, 364(1527).
- [4] 李孟, 李金磊, 申水莹, 等. 猪源大肠杆菌 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 耐药基因多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(7): 1-7.  
Li M, Li J L, Shen S Y, et al. Multiplex PCR detection of *floR*, *CTX-M*, and *mcr-1* resistance genes in swine *E. coli* [J]. Chinese Journal of Veterinary Drugs, 2019, 53(7): 1-7.
- [5] 李颖颖. 鸡源大肠杆菌氟苯尼考耐药基因 *floR* 检测及传播机制的初步研究[D]. 扬州大学, 2016.  
Li Y Y. *floR* detection and transmission mechanism of chicken-derived *E. coli* fluorophenicol resistance gene [D]. Yangzhou University, 2016.
- [6] 李进福, 丁海峰, 李小冉, 等. 河南地区猪呼吸道隐性感染大肠杆菌耐药基因检测及分析[J]. 河南农业科学, 2017, 46(9): 144-148.  
Li J F, Ding H F, Li X R, et al. Detection and analysis of resistance genes of *Escherichia coli* in swine respiratory tract occult infection in Henan Province [J]. Henan Agricultural Science, 2017, 46(9): 144-148.
- [7] 李振斌, 姜雯, 宋传周, 等. 猪禽源大肠埃希菌和沙门菌对黏菌素的耐药性及 MCR-1 耐药基因检测[J]. 动物医学进展, 2018, 39(12): 20-26.  
Li Z B, Jiang W, Song C Z, et al. Drug resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from swine and poultry to colistin and detection of MCR-1 resistance genes [J]. Advances in Animal Medicine, 2018, 39(12): 20-26.

- [8] 郭树源, 李代军, 张红娜, 等. 猪源耐氟苯尼考大肠杆菌的耐药性及 floR 基因的序列分析[C]//中国畜牧兽医学动物福利与健康养殖分会成立大会暨首届规模化健康与福利养猪高峰学术论坛论文集. 山东农业大学动物科技与动物医学院; 中国畜牧兽医学动物福利与健康养殖分会筹委会, 2015: 74 - 82.
- Guo S Y, Li D J, Zhang H N, *et al.* Drug resistance and sequence analysis of floR gene of florfenicol - resistant *E. coli* from pigs[C]//Chinese Society of Animal Science and Veterinary Medicine Proceedings of the Founding Conference of the Animal Welfare and Healthy Breeding Branch and the First Large - scale Health and Welfare Pig Breeding Academic Forum. Shandong Agricultural University Animal Science and Veterinary Medicine School; Preparatory Committee of the Animal Welfare and Healthy Breeding Branch of the Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015: 74 - 82.
- [9] 杨守深, 曾雪花, 林敏, 等. 猪源大肠杆菌耐药性及超广谱  $\beta$  - 内酰胺酶流行性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(1): 45 - 50.
- Yang S S, Zeng X H, Lin M, *et al.* Antibiotic resistance of pig - derived *Escherichia coli* and extended - spectrum  $\beta$  - lactamase epidemic analysis[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(1): 45 - 50.
- [10] 韩天飞, 刘娜, 张青青, 等. 七类常见抗菌药耐药机制及耐药基因国内流行现状[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(11): 53 - 58.
- Han T F, Liu N, Zhang Q Q, *et al.* Seven common antimicrobial resistance mechanisms and the status of resistance genes in China [J]. Chinese Animal Quarantine, 2019, 36(11): 53 - 58.

(编辑:李文平)