

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.7.09

我国猪源和鸡源大肠杆菌抗生素 耐药性相关基因研究进展

周炜¹, 周芷锦¹, 沈红霞¹, 倪柏锋¹, 王彬¹, 陈凯¹,
穆琳¹, 陈勇¹, 张恩宝², 曲道峰², 赵灵燕^{1*}

(1. 浙江省动物疫病预防控制中心, 杭州 311119; 2. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310018)

[收稿日期] 2020-10-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2021)07-0059-10 [中图分类号] S859.796

[摘要] 大肠杆菌作为一种条件致病菌和重要的耐药性指示菌, 国内外已有大量猪源、鸡源大肠杆菌耐药性相关基因的研究报道。受动物种属、地域等来源性差异, 以及耐药机制、亚型等因素的影响, 研究中涉及很多种不同的耐药性相关基因, 且检出率也不尽相同。根据耐受抗菌药物种类, 对这些基因作用机理及分布情况等方面综述, 以期为研究大肠杆菌耐药性产生机制提供依据及参考。

[关键词] 猪源大肠杆菌; 鸡源大肠杆菌; 抗生素耐药性; 耐药基因

Progress on the Antibiotics Resistance Related Genes of *Escherichia coli* from Swine and Chicken in China

ZHOU Wei¹, ZHOU Zhi-jing¹, SHEN Hong-xia¹, NI Bo-feng¹, WANG Bin¹, CHEN Kai¹,
MU Lin¹, CHEN Yong¹, ZHANG En-bao², QU Dao-feng², ZHAO Ling-yan^{1*}

(1. Zhejiang Provincial Center for Animal Disease Prevention and Control, Hangzhou 311119, China;

2. School of Food and Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Corresponding author: ZHAO Ling-yan, E-mail: zhaoly96@163.com

Abstract: As an important indicator and pathogen, a large scale of antibiotics resistance related genes of *Escherichia coli* (*E. coli*) from animals have been reported, both at home and abroad. Due to the differences of animal species and regions, as well as antibiotics resistance mechanism, subtypes and other factors, many kinds of antibiotics resistance related genes were involved, and their detection rates were quite different. In this paper, the mechanism of actions and distributions of these genes were reviewed, according to the types of antibiotic, in order to provide reference for the study of the mechanism of drug resistance in *E. coli*.

基金项目: 浙江省重点科技研发项目 (2018C02024)

作者简介: 周炜, 博士, 从事兽药及畜产品质量安全检测、兽医公共卫生研究。

通讯作者: 赵灵燕, E-mail: zhaoly96@163.com

Key words: swine - driven *E. coli*; chicken - driven *E. coli*; antibiotics resistance; antibiotic resistance genes

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是肠杆菌科细菌中分布最广泛的革兰氏阴性菌,也是兽医临床中常见病原菌之一。自 1885 年德国小儿科医师 Escherich 首次发现大肠杆菌以来,先后有 279 种血清型被证实^[1]。正常情况下,大肠杆菌是动物肠道的共生菌,但当动物机体免疫力低下或菌群失调时,肠侵袭性(EIEC)、肠出血性(EHEC)、肠致病性(EPEC)、肠黏附性(EAEC)、弥散粘附性(DAEC)和肠产毒性(ETEC)大肠杆菌等致病性大肠杆菌可引发宿主肠道、呼吸道、血液系统、生殖系统等多器官系统疾病,例如受到广泛关注的肠出血性家族的 O157:H7 型、O2 血清型等。由于血清型复杂,且极易产生变异和耐药性^[2],大肠杆菌引发的疾病并无理想的疫苗可用于预防,兽医临床多用抗菌药物进行治疗。按照《中华人民共和国兽药典 兽药使用指南 化学药品卷》的分类,目前兽医临床常用于猪、鸡大肠杆菌病防治的药物主要有 β -内酰胺类(阿莫西林、头孢噻吩)、氨基糖苷类(新霉素、安普霉素)、喹诺酮类(恩诺沙星)、磺胺类(磺胺氯哒嗪)、多肽类(硫酸黏菌素)和酰胺醇类(氟苯尼考),以及其他合成抗菌类药物(乙酰甲喹)。在长期抗菌药选择进化过程中,大肠杆菌通过非遗传性耐药/药物耐受^[3]和耐药基因遗传/转移^[4],从而产生水解酶/钝化酶、抗菌药物靶位改变、胞吞/胞吐作用改变、形成生物被膜及细胞膜通透性改变等变化,进而产生抗生素耐药性。因而,大肠杆菌被视作耐药性指示菌和耐药基因库被广泛研究。目前,已有大量关于动物源大肠杆菌耐药性相关基因的研究,但由于各研究者的关注点不同,研究中所检测的耐药基因也不相同。本文拟根据耐受抗菌药物种类,对这些基因作用机理及分布情况等方面进行综述,阐明大肠杆菌的耐药基因类型,分析比较各类耐药基因在全国各地的分离检出率。

1 介导 β -内酰胺类抗菌药物耐受的相关基因

表达产生超广谱 β -内酰胺酶(Extended -

spectrum β -lactamases, ESBLs),是大肠杆菌对 β -内酰胺类药物耐药最主要的机制,还可引起对氨基糖苷类、喹诺酮类药物、多西环素和氟苯尼考等药物耐药,引发了科学界最广泛的关注^[5]。国内兽医界关注的产 ESBLs 基因型主要有:TEM、CTX-M、SHV、OXA。

1.1 TEM 型 ESBLs TEM 型 ESBLs 是由 TEM-1 和 TEM-2 广谱酶的编码基因发生 1~4 个氨基酸突变而形成的一系列蛋白酶。目前,已知的 TEM 型酶有 115 种,是目前数量最多的 ESBLs^[6-7]。根据徐英春等^[8]的综述,TEM-1、TEM-2、TEM-13 和属窄谱 β -内酰胺酶,而 TEM-30~36、38~40、44~45、51、59、65、73~78 和 80 属耐酶抑制剂的 β -内酰胺酶,并非 ESBLs。关于动物源大肠杆菌中的 TEM 基因检测,国内的研究通常不细分至亚型。刘雅妮等^[9]对 2010~2011 年间上海地区 296 株猪源大肠杆菌的检测结果表明,52 株产 ESBLs 菌株中 TEM 基因和 CTX-M 基因检出率分别为 88.5% 和 28.8%。曲志娜等^[10]发现,2012 年山东莱西地区的 43 株鸡源产 ESBLs 大肠杆菌中 CTX-M 和 TEM 基因的检出率分别为 93% 和 72%。2019 年,张明亮等^[11]针对豫北地区 21 株猪源大肠杆菌开展了 TEM-1 基因检测,发现检出率为 100%。

1.2 CTX-M 基因型 ESBLs CTX-M 基因型 ESBLs,是 20 世纪 90 年代发现的一类主要作用于头孢类药物的 ESBLs。其对头孢噻吩的水解能力最高,同时可水解氨曲南和头孢曲松,而对头孢吡肟的水解力很弱。截至 2015 年,已知的 CTX-M 基因型 ESBLs 已达 160 种(<http://www.lahey.org/studies/>,2015 年 7 月关闭),按基因同源性其可分为 5 组^[12]:CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8、CTX-M-9 和 CTX-M-25。张成东等^[13]对 2018 年从河南省规模化猪场分离得到的 704 株大肠杆菌的耐药基因进行了研究,CTX-M、CTX-M

-G9 和 CTX-M-G2 的检出率分别为 78.4%、38.4% 和 69.9%，而 CTX-M-G1、CTX-M-G8 和 CTX-M-G25 均未检出。2015 年，杨守深^[14] 等报道了在 213 株闽西地区猪源大肠杆菌中 17.4% 的菌株检出 CTX-M-9G 基因，且均与耐喹诺酮类基因共存。李进福等^[4] 对河南地区 31 株猪源大肠杆菌的研究表明，CTX-M-U 基因检出率为 25.8%，其中 CTX-M-1 和 CTX-M-9 亚群菌株均检出 3 株。杜向党等^[15] 2009 年的研究发现：94 株鸡源大肠杆菌中，CTM-X 型基因携带率分别为 56.4%，CTX-M-9 组 26 株、CTX-M-2 组 14 株、同时携带 CTX-M-9 和 CTX-M-2 组 13 株；46 株猪源大肠杆菌中，25 株检出 CTM-X 型基因，CTX-M-9 组 17 株、CTX-M-2 组 7 株、同时携

带 CTX-M-9 和 CTX-M-2 组 1 株；CTX-M-1、CTX-M-8、CTX-M-25 组均未检出。2016 年，张利锋^[16] 等发现山东某鸡场及其加工场的 373 株大肠杆菌中，有 54.7% 的菌株携带 CTX-M 系列耐药基因，其中 CTX-M-55（属于 CTX-M-G1 组）、CTX-M-65 和 CTX-M-14（属于 CTX-M-G9 组）检出率最高，并检出同于 CTX-M-G9 组的 CTX-M-27 基因。张冬冬等^[17] 2018 年的研究表明，四川地区 29 株产 ESBLs 大肠杆菌中 CTX-M 的检出率为 100%，如图 1 所示，7 种亚型的检出率依次为：CTX-M-65 > CTX-M-55 > CTX-M-14 > CTX-M-79 > CTX-M-27 > CTX-M-15 > CTX-M-123。

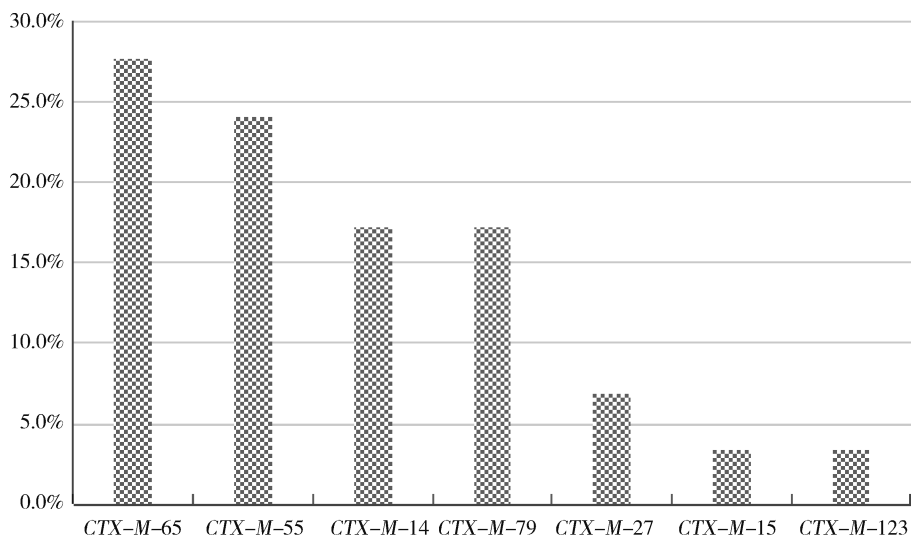


图 1 四川地区 7 种 CTX-M 基因亚型的检出率

Fig 1 Ratios of the 7 kinds of CTX-M gene in Sichuan

1.3 SHV 型基因型 ESBLs SHV 型 β -内酰胺酶是由广谱的 SHV-1 酶编码基因发生 1~4 个氨基酸突变而形成的，一系列可不同程度水解头孢菌素类和氨基糖苷类的蛋白酶。目前已经发现 39 种 SHV 型酶，其中 SHV-1 属窄谱 β -内酰胺酶。李进福等^[4] 发现 2015 年间河南地区 31 株猪源大肠杆菌中 SHV 基因检出率为 61.3%，曲志娜等^[10] 对 2013 年山东莱西地区分离得到的 49 株猪源和 53 株鸡源大肠杆菌的研究发现，产 ESBLs 大肠杆菌的流行

基因主要为 CTX-M 和 TEM，而 SHV 基因非主要流行基因。2016 年，张炳亮等^[18] 等在洛阳某猪场分离得到的 17 株致病性大肠杆菌中均未检出 SHV 基因。

1.4 OXA 型基因型 ESBLs 目前已知的 OXA 型 β -内酰胺酶有 40 种，仅 16.1% 的亚型是从大肠杆菌中分离得到的^[11]。OXA-10 和 OXA-35 属窄谱 β -内酰胺酶，OXA-23~27 属碳青霉烯酶。2018 年，张成东等^[13] 在河南地区 704 株猪源大肠杆菌

中,检出 173 株携带 *OXA* 基因的菌株,检出率低于携带 *CTM-X* (552 株) 和 *TEM* (231 株) 基因株,高于 *SHV* 基因株 (18 株)。王豪举^[1]对 2014 ~ 2016 年间重庆地区分离到 854 株鸡源和 493 株猪源大肠杆菌进行的 ESBLs 基因分析,发现尽管仅 1 株猪源菌单纯携带 *OXA-10* 基因,但携带 *OXA-10* 基因的菌株占产 ESBLs 菌株的 9.8%,低于 *TEM* 株 (占比 94.5%) 和 *CTX-M* 株 (占比 26.7%),高于 *SHV* 株 (占比 6.9%)。

尽管各研究中时间、地域、动物种类和探讨的基因亚型各有不同,总体而言,我国产 ESBLs 动物源大肠杆菌中 *TEM* 和 *CTX-M* 为优势基因型。

除上述 4 类基因型外,还有关于 *PER*、*VEB*、*GES*、*CARB*、*IMP*、*VIM*、*DHA*、*PSE* (*PSE-1*)、*BES*、*STO*、*TLA* 等基因的研究报道^[1]。此外,李庆周等^[19]在 2013 ~ 2015 年间四川地区 20 个规模化养鸡场分离得到的 367 株鸡源大肠杆菌进行了研究,发现 33 株产 *CMY-2* 的菌株,在这些菌株中 *TEM-1* 等耐药基因的检出率均在 70% 以上,且表现出对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸 100% 的耐药性。卢亚兰等^[20]分析了 2018 年浙江和陕西地区分离得到的 2 株携带 *NDM-5* 质粒的禽源大肠杆菌的耐药性,2 菌株检出 10 种和 16 种耐药基因,分别在体外表现出对 10 种和 12 种抗菌药物耐药,耐受的药物包括头孢他定、头孢噻唑和氨苄西林等 β -内酰胺。

2 介导氨基糖苷类抗菌药物耐受的相关基因

大肠杆菌对氨基糖苷类药物耐受的基因研究,主要集中在 16S rRNA 甲基化酶和 3 种产氨基糖苷钝化酶的编码基因。16S rRNA 甲基化酶可使菌体 30S 核糖体亚单位中 16S rRNA 位点的某一个或多个碱基发生甲基化,阻断了氨基糖苷类药物与作用靶点的结合,从而产生耐药性。目前,至少已有 *rmtA~E*、*npmA* 和 *armA* 等 7 种 16S rRNA 甲基化酶基因被证实。产氨基糖苷钝化酶的编码基因是:产 O-腺苷转移酶 (aminoglycoside adenylyase, AAD) 基因、产 N-乙酰转移酶 (aminoglycoside

acetyltransferase, AAC) 基因和产 O-磷酸转移酶 (aminoglycoside phosphotransferase, APH) 基因。国内兽医学界关注的 AAC 编码基因亚型最多,包括: *aac(3)-I*、*aac(3)-II*、*aac(3)-III*、*aac(3)-IV*、*aac(6)-I*、*aac(6)-II*、*aacA4*、*aacC2*。AAD 编码基因的研究主要集中于 *aadA1* 和 *aadB* 中,APH 编码基因则主要关注 *aph(3')* 系列。其中, *aph(3')* 系列包括 *aph(2')*、*aph(3')-I*、*aph(3')-IIa*、*aph(3')-III*、*aph(3')-VI* 等亚型。

邓向东^[21]分析了 2012 ~ 2013 年间四川地区 134 株猪源和鸡源大肠杆菌中 *rmtA~rmtE*、*npmA* 和 *armA* 等 7 种 16S rRNA 甲基化酶基因,仅 5 株菌株检出 *rmtB* 基因,其它 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因均未检出。刘河冰^[22]检测了 2008 年间河南郑州地区 120 株鸡源大肠杆菌中 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因,结果表明仅检出 *armA* 和 *rmtB* 基因,两者检出率分别为 2.5% 和 7.5%。

2009 年,孙金福等^[23]对辽宁地区 27 株禽源大肠杆菌进行了检测,发现 *aph(3')-II*、*aadA1* 和 *aacA4* 基因检出率分别为 55.6%、44.4% 和 27.8%。2005 年,马孟根等^[24]分析比较了四川地区 22 株猪源和鸡源大肠杆菌中 *aadA1*、*aadA2*、*aadB*、*aph(3')-II* 和 *acc(3)-Ia* 五种基因的携带率,结果表明 *aadA1* 和 *aph(3')-II* 为优势基因,两者检出率分别为 59.1% 和 54.5%,*acc(3)-Ia* 未检出。朱永江等^[25]所检测的 2015 ~ 2016 年间扬州地区分离得到的 40 株猪鸡源大肠杆菌中,*aac(3)-II* 和 *aac(6')-Ib* 的检出率分别为 17.5% 和 2.5%。

在多族耐药基因比较的研究中,张炳亮^[18]的研究结果显示 2016 年洛阳地区 17 株猪源大肠杆菌 *aac(3)-II* 基因检出率 88.2%,高于其他所测试的 β -内酰胺类、四环素类和大环内酯类药物的耐药基因。2019 年,张明亮^[11]等的研究发现 *aadA1* 和 *aph(3')-IIa* 的检出率分别为 57.1% 和 76.2%,低于其所试的 2 种四环素和 1 种 β -内酰胺类耐药基因,但高于酰胺醇类和磺胺类耐药基因。

3 介导喹诺酮类抗菌药物耐受的相关基因

对喹诺酮类耐药基因的研究主要集中于:质粒介导的喹诺酮类耐药基质(plasmid mediated quinolone resistance, PMQR)和喹诺酮作用靶位基因决定区的突变基因(Quinolone resistance determining regions, QRDQ)。其中,PMQR 基因族又主要包括 *qnr* 系列、*aac(6')* - *Ib* - *cr*、*oqxA/B* 和 *qepA*。严格地,*oqxAB*和 *qepA* 均是质粒介导的外排泵基因^[26]。

qnr 基因通过保护 DNA 促旋酶和拓扑异构酶 IV 不受药物的抑制来降低菌体对喹诺酮类药物敏感性,已有报道的 *qnr* 主要包括 *qnrA*、*B*、*S*、*C*、*D*、*VC* 等。杨守深等^[14]的研究发现,在 2015 年福建地区分离得到的 213 株猪源大肠杆菌中 37 株检出 *CTX-M-9G* 基因,97.3% 的菌株还携带有 *qnr* 基因,其中 *qnrS*、*qnrB* 和 *qnrA* 基因检出率分别为 73.0%、37.8% 和 5.4%,*oqxA*、*oqxB* 和 *qepA* 的检出率则依次为 70.3%、75.7% 和 18.9%。*aac(6')* - *Ib* - *cr* 基因易被误读为 EBSLs 编码基因,其中“-*cr*”系指环丙沙星耐药(Ciprofloxacin resistance),是氨基糖苷乙酰转移酶的新型变异基因编码的灭活酶。南海辰等^[27]对 2010~2013 年间新疆地区的 183 株畜源大肠杆菌耐药基因的检测结果表明,*aac(6')* - *Ib* - *cr* 的检出率呈现出一定的动物种属差异,猪、羊和牛源的检出率分别为 5.0%、22.9% 和 12.5%。由于猪源、羊源和牛源大肠杆菌菌株数分别为 79 株、96 株和 8 株,*aac(6')* - *Ib* - *cr* 在不同物种间检出率的差异可能受样本量影响。

喹诺酮类药物作用靶位是 DNA 促旋酶和拓扑异构酶 IV, DNA 促旋酶由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码,拓扑异构酶 IV 则由 *parC* 和 *parE* 基因编码。因而,QRDQ 系列基因的研究围绕这 4 个基因开展。张艳芳等^[28]的研究发现, DNA 促旋酶的 *GyrA* 和 *GyrB* 亚基上发生的氨基酸替代与喹诺酮类药物产生耐药性有关。张秀英^[29]等利用中药处理耐喹诺酮类药物的大肠杆菌,可使 *GyrA* 和 *ParC* 亚基从耐药状态恢复至敏感状态。

4 介导四环素类抗菌药物耐受的相关基因

已知的四环素类耐药基因,根据其耐药机制可分为 3 大类^[30-31]:①外排泵基因,通过编码膜相关蛋白,加速四环素排出细胞浆外。包括:*tet(A)* ~ *tet(E)*、*tet(G)*、*tet(H)*、*tet(J)*、*tet(K)*、*tet(L)*、*tet(V)*、*tet(Y)*、*tet(Z)*、*tet(30)*、*tet(31)*、*tet(33)*、*tet(35)*、*tet(38)*、*tet(39)*、*otr(B)*、*otr(C)*、*tcr* 和 *tetA(P)*。②核糖体保护蛋白基因,通过编码核糖体保护蛋白,使核糖体免受四环素作用。包括:*tet(M)*、*tet(O)*、*tet(Q)*、*tet(S)*、*tet(T)*、*tet(W)*、*tet(32)*、*otr(A)* 和 *tetP(B)*。③灭活/钝化四环素基因,通过编码灭活或钝化四环素的酶而发挥作用。包括:*tet(X)*、*tet(34)* 和 *tet(37)*。

2018 年,王学君^[31]对贵州地区 783 株猪源大肠杆菌中四环素耐药基因携带率进行了研究,发现 *tetA*、*tetB*、*tetC* 和 *tetD* 等 4 种外排泵基因检出率分别为 92.6%、41.5%、58.8% 和 58.6%,核糖体保护蛋白基因 *tetM* 的检出率为 70.1%,灭活/钝化四环素基因 *tetX* 的检出率为 78.8%。李进福等^[4]对 2015 年间河南地区 31 株猪源大肠杆菌的外排泵基因(*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetK*、*tetL*)和核糖体保护蛋白基因(*tetM*、*tetO*、*tetW*)两类耐药基因进行检测,*tetA* 和 *tetM* 基因为优势基因,两者检出率分别为 87.1% 和 54.8%。6 株 *tetL* 基因检测阳性,*tetC* 和 *tetO* 各有 1 株呈阳性,未检出 *tetB*、*tetK* 和 *tetW* 基因。在张炳亮^[18]等 2015 年的研究中,猪源大肠杆菌中 *tetA* 检出率为 70.6%,而 *tetC* 则未检出。2018 年,李蕴玉等^[32]对唐山和秦皇岛地区 22 株鸡源大肠杆菌中 *tetA* 和 *tetB* 基因进行了检测,两者的检出率均在 80% 以上。2016 年,张雅为等^[33]在辽宁阜新地区 33 株鸡源大肠杆菌中 *tetB*、*tetC*、*tetM*、*tetK* 和 *tetL* 等 5 种四环素耐药基因分析中,33.3% 菌株检出 *tetK* 基因,*tetL*、*tetB*、*tetC*、*tetM* 检出率在 15% ~ 30% 之间,*tetA* 基因均未检出。

5 介导酰胺醇类抗菌药物耐受的相关基因

关于酰胺醇类耐药基因的研究主要集中在 *cat*、*clmA* 和 *flor* 三种基因,此外还有一些关于 *fexA*、*cfr*、*pexA* 和 *estd1136* 的报道。*cat* 基因负责编码氯霉素乙

酰转移酶,使菌体对氯霉素和甲砒霉素耐药,但对氟苯尼考没有作用。*cat* 基因可以分为 A 型和 B 型,其中 A 型又有 *catI* ~ *IV*、*catA* ~ *D*、*catP*、*catS*、*catQ* 等 16 种亚型,B 型有 *cat* 和 *catB2* 种亚型。*cmlA* 和 *flor* 均是外排泵蛋白基因,前者只介导氯霉素和甲砒霉素耐药,而后者则还可以介导对氟苯尼考耐药^[34]。

2019 年,张明亮^[11]等在豫北地区 21 株猪源大肠杆菌中发现 4 株 *cat1* 基因阳性,检出率 19.0%。同年,吴方达^[35]发现福建地区的 17 株耐氟苯尼考的大肠杆菌,*flor* 基因检出率为 100%。罗永乾^[34]对 2014 ~ 2016 年间重庆地区 393 株鸡源、194 株猪源和 108 株牛源大肠杆菌中 *cat*、*clmA*、*flor*、*pexA*、*cfr*、*fexA* 和 *fexB* 基因进行了检测,695 株菌中各基因总的检出率依次为:*flor* (58.7%) > *cat* (37.0%) > *cfr* (0.9%),*pexA*、*fexA* 和 *fexB* 均未检出。

6 介导多粘菌素耐受的相关基因

大肠杆菌耐多粘菌素基因包括:*arnBCDTEF* 基因和 *mcr* 系列基因。*arnBCDTEF* (亦作 *pmrHFI-JKLM*) 操纵子,其通过脂质 A 的共价修饰,减少菌体细胞外膜的净负电荷,从而降低对带正电荷的多粘菌素的吸附。*mcr* 系列基因属磷酸乙醇胺转移酶编码基因,同样通过减少菌体细胞外膜的净电荷而产生耐药性^[36]。自 2015 年沈建忠院士团队首次报道 *mcr-1* 以来,先后又发现了 *mcr2* ~ *mcr5* 等基因^[37],但兽医学界尚主要关注 *mcr-1* 基因。祝瑶^[36]对 2016 年东三省 732 株动物源大肠杆菌进行了 *mcr-1* 基因携带率检测,发现 *mcr-1* 基因在 294 株鸡源大肠杆菌中的检出率为 15.3%,255 株猪源菌株中检出率为 9.4%。

7 介导磺胺类抗菌药物耐受的相关基因

磺胺类药物主要作用于细菌的二氢蝶酸合成酶(Dihydropteroate synthase, DHFAS)。因而,对大肠杆菌磺胺类药物耐药的研究主要集中于 DHFAS 突变基因 *folp* 及 DHFAS 替代基因。兽医学界主要关注于后者中的 *sul1*、*sul2* 和 *sul3* 基因亚型。2018 年,方结红^[38]对浙江地区生猪屠宰环节分离得到的 350 株大肠杆菌的检测发现,34 株菌检出 *sul1*、

sul2 和 *sul3* 基因。其中,17 株菌存在 2 ~ 3 种基因共存,*sul1*、*sul2* 和 *sul3* 基因对阳性菌株的贡献率分别为 58.8%、47.1% 和 38.2%。李庆周^[19]等发现在 2013 ~ 2015 年间四川地区 20 个规模化养鸡场分离得到的产 *CMY-2* 的大肠杆菌中,*sul1*、*sul2* 和 *sul3* 基因检出率为 84.8%、72.7% 和 36.4%。

8 介导多重药物耐受的相关基因

除前述的 7 类药物的耐药基因外,国内兽医学界还对 *cfr* (chloramphenicol - florfenicol resistance) 基因、外膜通道蛋白和被膜等有关的耐药性编码基因进行了研究。

cfr 基因,是因耐受氟苯尼考和氯霉素而得名的 2kb 左右的小基因,但后经证实其可通过产物 - 甲基化转移酶使药物结合位点发生改变,而可同时介导五类抗生素耐药。除 *cfr* 基因外,大肠杆菌中还存 *AcrR* 和 *Mar* 等与多重耐药有关的基因^[39]。*AcrAB*、*ACREF*、*EmrAB*、*Ecr* 和 *QacE* 等均需于大肠杆菌的主动外排系统,其中 *AcrAB - TolC* 外排系统是最主要的。*AcrR*、*MarA*、*MppA*、*SdiA*、*Rob* 和 *SoxS* 等调控基因因子,可作用于 *AcrAB - TolC* 外排系统,调节大肠杆菌的外排效能,形成耐药。马红霞等对 *rob*^[40]、*SdiA*^[41] 基因的研究表明,这 2 种基因的高水平表达时,均可形成多重耐药。

MdtM 编码一种大肠杆菌细胞膜蛋白,可非特异性增加抗菌药物的泵出效率,从而介导多重耐药。刘婵婵^[37]在 81 株人源大肠杆菌中,发现 54 株携带有 *MdtM* 基因的菌株,表现出多重耐药性。*ompF* 编码大肠杆菌外膜蛋白(OMPs)中的一种亲水性非特异孔道蛋白,王艺凝等^[42]的研究表明 *ompF* 基因通过对被膜及排出泵的作用,而影响大肠杆菌的耐药性水平。

9 展望

综上所述,大肠杆菌不同的耐药表型对应不同的耐药基因,同样的耐药表型也可能对应不同的耐药基因,因而在研究目标区域流行的耐药基因时,需注意三方面因素的影响:首先,各类药物耐药机制和基因亚型均具多样性,选择哪些基因进行研究

分析就显得尤为重要。其次,从微观层面的基因、蛋白表达,到宏观的耐药表型,还有很多因素在发挥影响,尤其是当目标菌株已表现出多重耐药时,耐药基因与表型是否完全一一对应,需审慎地总结。其三,因指示菌与致病菌/继发感染菌的差异、药物剂型/佐剂的差异等诸多因素影响,体外试验的耐药性与体内试验结果并不完全一致。

国内兽医学界对动物源大肠杆菌各类耐药性相关基因进行深入研究。其中, β -内酰胺类和氨基糖苷类的相关耐药基因研究较多。氨基糖苷类和四环素类药物很少用于畜禽大肠杆菌感染的防治,但两类药物的耐药基因检出率很高,这可能与 2 方面原因有关:1、依据原《中华人民共和国农业部公告第 168 号》,氨基糖苷类的越霉素 A 预混剂、潮霉素 B 预混剂、硫酸安普霉素预混剂、盐酸林可霉素及硫酸大观霉素预混剂、硫酸新霉素预混剂、硫酸安普霉素;四环素类的土霉素钙和金霉素(饲料级)预混剂,允许作为促动物生长使用。在长期低剂量的四环素类药物压力作用下,与动物共生的大肠杆菌自身产生了耐药性。2、其他种类细菌产生的相关耐药基因,通过质粒、整合子、转座子等可移动遗传元件横向迁移至大肠杆菌内,再通过繁殖扩增,使这些耐药基因得以纵向传播。

随着国家兽药规范化使用行动和遏制动物源细菌耐药性行动的逐步实施与推进,《中华人民共和国农业农村部公告第 194 号》等法规的相继颁布与实施,以及养殖主体生物防控意识的不断增强,动物源细菌耐药性必将逐步减轻。

参考文献:

[1] 王豪举. 重庆地区畜禽大肠埃希菌耐药性与 ESBLs 基因分析[D]. 北京:中国农业大学,2018.
Wang H J. Drug resistance patterns and ESBLs gene analysis in *Escherichia coli* isolated from livestock in Chongqing area [D]. Beijing: China agricultural university, 2018.

[2] 冯皓媛,李宇涵,李玲,等. 流浪犬源大肠埃希菌对氟喹诺酮类和氨基糖苷类药物的耐药性检测[J]. 动物医学进展,

2019,40(11):134-136.

Feng H Y, Li Y H, Li L, et al. Detection of Fluoroquinolones and Aminoglycosides resistance in stray dog - derived *Escherichia coli* [J]. Progress in Veterinary medicine, 2019,40(11):134-136.

- [3] 吕亮东,赵国屏. 细菌药物耐受[J]. 微生物学通报,2019,46(2):301-310.
Lü L D, Zhao G P. Drug tolerance in bacteria[J]. Microbiology China, 2019,46(2):301-310.
- [4] 李进福,丁海峰,李小申,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 S, et al. Detection and analysis of *Escherichia coli* resistance gene in recessive infection of pigs in Henan province[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2017,46(9):144-148.
- [5] 刘保光,栗俞程,汪保英,等. CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶研究进展[J]. 河南农业科学,2019,48(12):1-7.
Liu B G, Li Y C, Wang B Y, et al. Research progress of CTX-M Type extended-spectrum β -lactamases [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2019,48(12):1-7.
- [6] Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe[J]. Clin Microbiol Infect, 2008,14(S1):144-153.
- [7] Rao L L, Lv L C, Zeng Z L, et al. Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003-2012[J]. Vet. Microbiol., 2014,172(3):534-541.
- [8] 徐英春,赵锐,陈民钧. 医院内革兰阴性杆菌产生 β -内酰胺酶特点[J]. 中华医院感染学杂志,2003,13(12):1197-1120.
Xu Y C, Zhao Y, Cheng M J. Characteristics of β -lactamases produced by Gram negative bacilli in hospita[J]. Chin J Nosocomiol, 2003,13(12):1197-1120.
- [9] 刘雅妮,商军,郭士博. 猪源分离大肠埃希菌产 ESBLs 的基因型及耐药性分析[J]. 中国兽药杂志,2011,45(9):19-22.
Liu Y N, Shang J, Guo S B. Analysis of ESBLs genotype and antimicrobial resistance of ESBLs-producing *Escherichia coli* from pigs[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2011,45(9):19-22.
- [10] 曲志娜,张颖,李玉清,等. 鸡、猪大肠杆菌 ESBLs 基因型检测及耐药性分析[J]. 中国农学通报,2013,29(8):50-54.
Qu Z N, Zhang Y, Li Y Q, et al. Genotype detection of ESBLs

- and antibiotic resistance analysis in *E. coli* strains from Chickens and Pigs [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29 (8):50-54.
- [11] 张明亮, 周玲玲, 连凯琪. 豫北地区猪源大肠杆菌耐药性及基因多态性分析[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(4):16-22.
Zhang M L, Zhou L L, Lian Q K, et al. Analysis of drug resistance and genetic polymorphism of *Escherichia coli* isolated from pigs in north of Henan province [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 53(4):16-22.
- [12] Pitout J D, Hossain A, Hanson N D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-lactamases produced by *Escherichia coli* and klebsiella spp [J]. J Clin Microbiol, 2004, 12:5715-5721.
- [13] 张成东, 曲久燕, 李德喜, 等. 河南省规模化猪场 ESBLs 大肠杆菌耐药基因检测及分析 [J]. 江西农业学报, 2019, 31 (3):10-15.
Zhang C D, Qu J Y, Li D X, et al. Detection and analysis of ESBLs drug-resistant genes in *Escherichia coli* from large-scale pig farms in Henan province [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2019, 31(3):10-15.
- [14] 杨守深, 庄艺超, 华雪妃, 等. 闽西地区猪源大肠杆菌耐药基因 blaCTX-M-9G 的流行性分析 [J]. 中国兽医科学, 2018, 48(5):658-663.
Yang S S, Zhuang Y C, Hua X F, et al. Investigation of blaCTX-M-9G resistance gene in *Escherichia coli* isolated from pig origin in the west of Fujian province [J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 48(5):658-663.
- [15] 杜向党, 焦显芹, 莫娟, 等. 鸡猪源大肠杆菌 CTX-M 型 ESBLs 的分子检测 [J]. 华北农学报, 2009, 24(2):90-93.
Du X D, Jiao X Q, Mo J, et al. Molecular detection of CTX-M type ESBLs genes among *Escherichia coli* strains isolated from diseased chickens and pigs [J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica, 2009, 24(2):90-93.
- [16] 张利锋, 齐静, 罗成旺, 等. 鸡源大肠杆菌 β -内酰胺类药敏及 blaCTX-M 基因携带状况的探讨 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(9):1153-1155.
Zhang L F, Qi J, Lou C W, et al. Discussion of antimicrobial resistances and β -lactamases CTX subtypes of *Escherichia coli* strains isolated from chickens [J]. Lab Med Clin, 2016, 13(9):1153-1155.
- [17] 张冬冬, 王红宁. 鸡源大肠杆菌中耐药基因 blaCTX-M 的水平转移研究 [J]. 四川畜牧兽医, 2018, 5:26-28.
Zhang D D, Wang H N. Study on the horizontal transfer of blaCTX-M resistance gene in *Escherichia coli* producing ESBLs from chicken [J]. Sichuan Animal Husbandry and veterinary medicine, 2018, 5:26-28.
- [18] 张炳亮, 王文文, 杨国栋, 等. 洛阳地区规模化猪场大肠杆菌耐药基因检测及耐药性分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, 5:125-128.
Zhang B L, Wang W W, Yang G D, et al. Detection and analysis of drug resistance genes of *Escherichia coli* in large scale pig farms in Luoyang [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and veterinary medicine, 2018, 5:125-128.
- [19] 李庆周, 马素贞, 孔令汉, 等. 规模化鸡场中产 CMY-2 大肠杆菌耐药基因与毒力基因的调查及共转移研究 [J]. 四川大学学报(自然科学版), 2017, 54(2):417-422.
- [20] Li Q Z, Ma S Z, Kong L H, et al. Investigation and co-transfer of resistance genes and virulence genes among *Escherichia coli* producing CMY-2 in large-scale poultry farms [J]. Journal of Sichuan University (Natural science edition), 2017, 54(2):417-422.
- [21] 卢亚兰, 代正云, 陈凌云, 等. 两株 blaNDM-5 基因介导的碳青霉烯耐药禽源大肠杆菌 ST10 和 ST354 耐药性 [J]. 微生物学通报, 2020, 4(76):1837-1846.
- [22] Lu Y L, Dai Z Y, Cheng L Y, et al. Two carbapenem-resistant avian *Escherichia coli* strains ST10 and ST354 mediated by bla-NEM-5 gene [J]. Microbiology China, 2020, 4(76):1837-1846.
- [23] 邓向东. 四川省畜禽动物瓶大肠杆菌质粒介导 16S rRNA 甲基化酶耐药基因检测 [D]. 雅安:四川农业大学, 2014.
Deng X D. The detection of plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes in *Escherichia coli* isolates from livestock animals in Sichuan Province [D]. Ya'an: Sichuan agriculture university, 2014.
- [24] 刘河冰. 鸡大肠杆菌 16S rRNA 甲基化酶的质粒定位及 rmtB 基因的遗传背景 [D]. 郑州:河南农业大学, 2010.
Liu H B. Location of 16S rRNA methylase genes among *Escherichia coli* strains isolated from chickens and genetic background of rmtB [D]. Zhengzhou: Henan agriculture university, 2010.
- [25] 孙金福, 何利昆, 耿莉, 等. 禽大肠埃希菌耐药谱及氨基糖苷类耐药基因分子流行病学调查 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 45 (6):6-8.
Sun J F, He L K, Geng L, et al. Antibiotics resistance and molecular epidemiology of aminoglycoside resistant gene in avian pathogenic *E. coli* [J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2009, 45(6):6-8.

- [26] 马孟根, 王红宁, 余勇, 等. 大肠埃希氏菌和沙门菌氨基糖苷耐药基因 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(4):277-283.
- Ma M G, Wang H N, Yu Y, et al. Development of PCR method for detection of aminoglycoside resistance genes of *Escherichia coli* and *Salmonella* [J]. Chinese journal of veterinary science and technology, 2005, 35(4):277-283.
- [27] 朱永江, 吕文新, 吴铁花, 等. 40 株动物源性大肠杆菌耐药性分析及氨基糖苷修饰酶耐药基因的检测[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 11:115-117.
- Zhu Y J, Lu W X, Wu T H, et al. Analysis of drug resistance and detection of aminoglycoside modifying enzyme resistance genes in 40 strains of *Escherichia coli* from animals [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and veterinary medicine, 2017, 11:115-117.
- [28] 张文慧. *aac(6')-Ib-cr* 基因对氟喹诺酮类药物耐药的作用研究[D]. 广州:华南农业大学, 2016.
- Zhang W H. Characteristic of the *aac(6')-Ib-cr* gene on Fluoroquinolone resistance [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [29] 南海辰, 底丽娜, 夏利宁. 新疆多源喹诺酮类耐药大肠杆菌耐药基因检测及分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(20):4096-4108.
- Nan H C, Di L N, Xia L N. Detection and analysis of resistance genes in Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates from different livestock in Xinjiang [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(20):4096-4108.
- [30] 张艳芳, 方瑞, 孟晓侯, 等. 圈养虎源大肠杆菌 QRDR 基因检测及分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 8:124-127.
- Zhang Y F, Fang Y, Meng X Y, et al. Detection and analysis of QRDR gene in *Escherichia coli* from captive tiger [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and veterinary medicine, 2017, 8:124-127.
- [31] 张秀英, 宋立, 赵晖, 等. 中药制剂对大肠杆菌耐药性逆转的作用研究[J]. 中国兽药杂志, 2012, 47(9):11-14.
- Zhang X Y, Song L, Zhao F, et al. Study on the reversal effect of the *E. coli*'s resistance by Chinese traditional medicine [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2012, 47(9):11-14.
- [32] 严剑芳. 四环素耐药菌和耐药基因在禽畜粪便、堆肥和土壤中的分布[D]. 上海:华东师范大学, 2015.
- Yang J F. Distribution of tetracycline resistant bacteria and tetracycline resistant genes in the livestock feces, compost and soil [D]. Shanghai: East China normal university, 2015.
- [33] 王学君. 贵州省猪源大肠杆菌四环素耐药水平和耐药基因相关性研究[D]. 贵阳:贵州大学, 2018.
- Wang X J. The study on the relationship between the Tetracyclines resistances and the resistance gene of *Escherichia coli* in Guizhou province [J]. Guiyang: Guizhou university, 2018.
- [34] 李蕴玉, 葛成, 焦贺静, 等. 唐山和秦皇岛地区肉鸡源致病性大肠杆菌耐药性与耐药基因的检测[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019, 12:67-69.
- Li Y Y, Ge C, Jiao H J, et al. Detection of drug resistance and drug resistance genes of pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers in Tangshan and Qinhuangdao [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and veterinary medicine, 2019, 12:67-69.
- [35] 张雅为, 高锋, 刘耀川, 等. 阜新某鸡场大肠埃希菌四环素类药物敏感性试验及耐药基因检测[J]. 动物医学进展, 2017, 38(10):118-121.
- Zhang Y W, Gao F, Liu Y C, et al. Tetracycline sensitivity test and drug resistance gene detection of *Escherichia coli* in one chicken farm of Fuxin [J]. Progress in veterinary medicine, 2017, 38(10):118-121.
- [36] 罗永乾. 动物源大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌耐药表型与氯霉素类抗菌药物耐药基因型的研究[D]. 重庆:西南大学, 2017.
- Luo Y C. The research of resistance phenotype and Chloramphenicol resistance gene in *E. coli*, *Salmonella* and *S. aureus* from livestock [D]. Chongqing: Southwest university, 2017.
- [37] 吴方达. 不同菌属的氟苯尼考耐药特点及 *floR* 基因的序列分析[J]. 中国农学通报, 2019, 35(2):122-126.
- Wu F D. Florfenicol resistance and sequence analysis of *floR* gene in different bacteria [J]. Chinese agricultural science bulletin, 2019, 35(2):122-126.
- [38] 祝瑶. 动物源大肠杆菌多粘菌素耐药基因 *mcr-1* 的流行病学及传播机制研究[D]. 北京:中国农业大学, 2019.
- Zhu Y. The study on epidemiology and dissemination mechanism of Colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* from animal origin [D]. Beijing: Chinese agricultural university, 2019.
- [39] 刘婵婵. 丁香酚对多重耐药大肠杆菌的抑菌活性及其机制研究[D]. 西安:陕西科技大学, 2019.
- Liu C C. Study on antimicrobial activity and mechanism of eugenol against multi-drug resistant *Escherichia coli* [D]. Xi'an: Shanxi university of science and technology, 2019.
- [40] 方结红. 生猪屠宰厂大肠杆菌磺胺耐药基因 *sul1*、*sul2* 和 *sul3*

的传播与适应性机制研究[D]. 杭州:浙江工商大学, 2018.

Fang J H. Research on the dissemination and fitness mechanism of *Escherichia coli* Sulfonamide resistant genes Sul1, Sul2 and Sul3 in a pig slaughterhouse[D]. Hanzhou: Zhejiang Gongshang university, 2018.

- [41] 佟海山, 李乾学, 邓彦宏, 等. 大肠杆菌多重耐药调节基因 AcrR 和 MarR 突变[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(7): 10 - 12.

Tong H D, Li Q X, Deng Y H, *et al.* The mutation of multidrug resistant regulation genes AcrR and MarR in *Escherichia coli*[J].

Chinese journal of veterinary medicine, 2007, 43(7): 10 - 12.

- [42] 马红霞, 刘玉堂, 伞治豪. 不同动物源大肠杆菌多重耐药调控基因 *rob* 的同源性分析[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(12): 1035 - 1040.

Ma H X, Liu Y T, San J H. Homology analysis of multidrug - resistance regulating gene *rob* of *Escherichia coli* from different animal species[J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2007, 37(12): 1035 - 1040.

(编辑:侯向辉)