

新疆奶牛子宫内膜炎大肠杆菌进化分群及耐药特性研究

马 帅¹, 乔 军¹, 孟庆玲^{1*}, 伍晔晖¹, 王熙凤¹, 郭 晶¹, 蔡扩军², 王登峰³, 才学鹏⁴
(1. 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003; 2. 乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心, 新疆 乌鲁木齐 830063;
3. 新疆畜牧科学院 兽医研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000; 4. 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046)

摘要: 为了探究新疆地区奶牛子宫内膜炎大肠杆菌进化分群及耐药特性, 对新疆奶牛子宫内膜炎临床样品进行大肠杆菌的分离, 采用 PCR 技术对大肠杆菌分离株进行种系分群、耐药基因检测, 测定分离株对抗菌药物的敏感性, 并对产 ESBLs 菌株携带质粒进行了分析。结果显示, 从奶牛临床样品中成功分离到 210 株大肠杆菌; 种群分析表明, B1 群(48.1%) 分布最多, 其次分别是 A 群(28.6%)、C 群(12.9%)、E 群(6.7%)、D 群(3.8%)。210 株分离株对 16 种抗菌药物呈现出不同程度的耐药性, 其中对红霉素的耐药率最高, 为 95.2%, 其次是氨苄西林(83.3%)、庆大霉素(73.8%)、头孢氨苄(71.9%), 而对诺氟沙星耐药率最低, 为 6.2%, 然后是复方新诺明(6.7%)、氯霉素(10.0%)、多西环素(10.5%)。所有的分离株对不同的抗菌药物耐药, 其中多重耐药性主要集中在 4~10 耐, 且耐药表型与基因型基本一致。对产 ESBLs 菌株携带质粒分析表明, 同一质粒可以携带多种耐药基因, 这些质粒可介导菌株的多重耐药。提示新疆地区奶牛子宫内膜炎大肠杆菌流行株已经对多种临床常用药物产生了较严重的耐药性, 且分离株的耐药性与耐药质粒的转移密切相关。

关键词: 奶牛; 子宫内膜炎; 大肠杆菌; 系统进化分群; 耐药性; 质粒
中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2018)07-0116-08

Phylogenetic Grouping and Drug Resistance of *Escherichia coli* from Xinjiang Cows with Endometritis

MA Shuai¹, QIAO Jun¹, MENG Qingling^{1*}, WU Yehui¹, WANG Xifeng¹, GUO Jing¹, CAI Kuojun²,
WANG Dengfeng³, CAI Xuepeng⁴

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2. Animal Disease Control and Diagnosis Center in Urumqi, Urumqi 830063, China;
3. Institute of Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China;
4. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: In order to investigate the phylogenetic grouping and drug resistance of *Escherichia coli* from Xinjiang cows with endometritis, the *E. coli* strains were isolated from clinical samples, the PCR was used to detect the phylogenetic grouping and resistance genes of *E. coli* strains, and the susceptibility to antimicrobial agents and the ESBLs plasmids were tested and analyzed. A total of 210 *E. coli* strains were isolated from dairy cow samples. The phylogenetic grouping analyses showed that the proportions of group B1, A, C, E, D were 48.1%, 28.6%, 12.9%, 6.7% and 3.8%, respectively. The resistance analyses showed

收稿日期:2018-01-19
基金项目:兵团中青年科技创新领军人才计划项目(2016BC001);国家十三五重点研发计划项目子课题(2016YFD0500900);新疆自治区研究生科研创新项目(XJGRI2016040);乌鲁木齐市科技局渝乌科技合作项目(Y161220001)
作者简介:马 帅(1993-),男,河南遂平人,在读硕士研究生,研究方向:病原分子生物学。E-mail:1756260789@qq.com
* 通讯作者:孟庆玲(1969-),女,江苏徐州人,教授,博士,主要从事畜禽病原分子生物学研究。E-mail:xjmlqj@sina.com

that 210 *E. coli* strains possessed different degree resistance to 16 antibacterials, of which the highest rate of erythromycin was 95.2%, followed by ampicillin 83.3%, gentamicin 73.8%, cephalixin 71.9%, the lowest rate was norfloxacin 6.2%, followed by cotrimoxazole 6.7%, chloramphenicol 10.0%, and doxycycline 10.5%. The multidrug resistance range was mostly 4—10 kinds, and the drug resistance phenotype was basically consistent with the genotype. The ESBLs plasmid analyses showed that a plasmid could carry multiple drug-resistant genes, which could mediate the multi-drug resistance of strains. The results signified that the epidemic strains of *E. coli* in Xinjiang cow endometritis had developed severe resistance against drugs used in clinical practice and the drug resistance of the isolates was closely related to the transfer of drug-resistant plasmid.

Key words: Cow; Endometritis; *Escherichia coli*; Phylogenetic grouping; Resistance; Plasmid

奶牛子宫内膜炎是奶牛饲养过程中常见的产科病,主要由于奶牛产后子宫内黏膜受损后受外来微生物的入侵,致使奶牛子宫黏膜发生炎症,可降低奶牛繁殖率,影响奶牛生产性能^[1-2]。该病在奶牛场普遍存在,因地理位置和饲养模式的不同,不同奶牛场子宫内膜炎的发病率也存在较大的差异,我国奶牛子宫内膜炎的发病率为 20% ~ 50%^[3]。

病原学调查发现,大肠杆菌是引起奶牛子宫疾病最常见的病原菌之一^[4]。Sheldon 等^[5]认为,从产后奶牛子宫中分离的大肠杆菌主要集中在 A 群和 B1 群,而 A 群和 B1 群的大肠杆菌是与宿主共生的大肠杆菌。目前,防治奶牛子宫内膜炎的主要方法是大量使用抗菌药物。然而,随着抗菌药物的大量使用,大肠杆菌极易产生耐药性,甚至成为人和动物体内耐药决定因子的“贮藏库”。同时,耐药性大肠杆菌可以通过可移动元件中的转座子、质粒等将耐药基因进行水平转移,导致耐药性广泛扩散^[6]。

奶牛子宫内膜炎严重制约着奶牛业的发展,新疆作为我国重要的奶牛养殖基地之一,受到了严重威胁。为了探究新疆地区奶牛子宫内膜炎大肠杆菌分离株的系统分群和耐药特性,本研究对其进行系统进化分群、耐药特性及携带质粒分析,以了解新疆地区奶牛子宫内膜炎大肠杆菌的耐药水平及多重耐药质粒的传播,为临床合理用药提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 临床样品采集

2016 年 9 月至 2017 年 8 月从新疆石河子、奎屯、塔城、乌鲁木齐等地区规模化奶牛场采集患有临床型子宫内膜炎奶牛子宫分泌物样品。样品采集时用干净温水清洗奶牛外阴后用 75% 乙醇棉球擦拭干净,使用直肠检查法触压子宫壁,弃除最初流出阴道内的子宫黏液,收集中间或后面流出的黏液于灭菌离心管中,放入冰盒带回实验室进行细菌分离培养。

1.2 试剂与菌株

16 种药敏纸片和头孢他啶/克拉维酸 (CZV, 30/10 μg)、头孢噻肟/克拉维酸 (CXV, 30/10 μg) 均购于杭州微生物试剂有限公司;伊红美蓝、麦康凯、MH 药敏试验培养基和 LB 营养琼脂培养基购于北京奥博星生物技术有限公司;DNA Marker、PCR 反应试剂、pMD19-T 购于宝生物工程(大连)有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;受体菌株 *E. coli* DH5 α 由石河子大学动物科技学院寄生虫实验室提供;大肠杆菌质控菌 ATCC25922 购自中国兽医药品监察所。

1.3 大肠杆菌分离鉴定

用灭菌接种环沾取少量样品接种到液体 LB 中,在水平摇床培养 8 h;然后在伊红美蓝培养基上划线培养,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细菌培养箱 12 ~ 16 h;挑取平板上呈现紫黑色且有金属光泽的单菌落,划线于麦康凯培养基上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细菌培养箱 12 ~ 16 h;挑取平板上的单菌落,参照文献[7]中 16S rDNA 测序法进行扩增和测序比对。采用引物 16S-F: 5'-GCGGACGGGTGAGTAATGT-3'; 16S-R: 5'-TCATCCTCTCAGACCAGCTA-3',引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.4 大肠杆菌系统进化分群

按照 TIANGEN 公司基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤提取分离菌株的基因组 DNA。设计并合成的相关引物(表 1)与四重 PCR 反应条件及判定标准均参照文献[8]: 首先使用四重 PCR 方法检测 *chuA*、*yjaA*、*TspE4*、*C2* 和 *arpA* 4 种基因的存在和缺失,然后根据所获得的 4 种基因型对大肠杆菌分离株进行系统分群,由于部分分离株需要经过 C 群特异性引物或 E 群特异性引物进一步检测,操作时分别添加内部 *trpA* 对照引物用于控制 DNA 模板,所以第二步分别都是双重 PCR。50 μL PCR 反应体系:

PCR Mixture 19 μL, ddH₂O 19 μL, 模板 DNA 4 μL, 上、下游引物各 1 μL。同时对扩增结果进行测序验证。

表 1 大肠杆菌分群引物

目的基因	引物序列(5'—3')	扩增长度/bp
<i>chuA</i>	F: ATGGTACCGGACGAACCAAC R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288
<i>yjaA</i>	F: CAAACGTGAAGTGTCAAGAG R: AATGCGTTCTCTCAACCTGTG	211
<i>TspE4, C2</i>	F: CACTATTTCGTAAGTTCATCC R: AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152
<i>arpA</i>	F: AACGCTATTGCCAGCTTGC R: TCTCCCATACCGTACGCTA	400
C 群 <i>trpA</i>	F: AGTTTATGCCAGTGCAGAG R: TCTGCGCCGCTACGCCC	219
E 群 <i>arpA</i>	F: GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC R: GAAAAAGAAAAAGAAATTCCTCAAGAG	301
内部 <i>trpA</i>	F: CGGCGATAAAGACATCTTCAC R: GCAACGCGGCCTGCGGAAG	489

1.5 药物敏感性试验

根据 CLSI 中的 K - B 法对已分离鉴定过的大肠杆菌进行 16 种药物的敏感性试验, 首先将分离株分别接种至 1 mL LB 液体培养基中, 置于 37 ℃ 摇床培养 12 ~ 16 h, 再用灭菌生理盐水将细菌浓度调至 0.5 麦氏浊度, 取 200 μL 均匀涂布于 MH 药敏试验

培养基上, 然后用灭菌镊子夹取药敏纸片贴在培养基表面, 将贴好药敏纸片的平板倒置在 37 ℃ 细菌培养箱内培养 16 ~ 24 h, 大肠杆菌 ATCC25922 作为质控菌。结果判定按照抗菌药物敏感性试验执行标准进行, 即同一株细菌对 3 类或 3 类以上的抗菌药物耐药则判定为多重耐药, 并分析不同进化群与耐药性之间的关系。

1.6 产超光谱 β - 内酰胺酶的检测

根据 CLSI 推荐的大肠杆菌产超光谱 β - 内酰胺酶(ESBLs)的检测方法与判定标准进行, 选取对头孢噻肟或头孢他啶任意一种药物耐药的分离株, 判断为可疑产 ESBLs 大肠杆菌; 表型验证试验按照 CLSI 中的 K - B 纸片扩散法执行, 药敏纸片使用头孢他啶/克拉维酸和头孢他啶、头孢噻肟/克拉维酸和头孢噻肟 2 对药敏纸片。判定标准: 只要其中 1 对未加克拉维酸药敏纸片的抑菌环直径比加了克拉维酸药敏纸片的抑菌环直径小 5 mm, 即可判定是阳性菌株。

1.7 耐药基因检测

耐药基因检测 PCR 体系为 20 μL: ddH₂O 10 μL, PCR Mixture 7 μL, 模板 DNA 2 μL, 上下游引物各 0.5 μL。耐药基因引物参照文献[9-15]设计, 见表 2。

表 2 耐药基因引物序列

目的基因	引物序列(5'—3')	片段大小/bp	退火温度/℃
<i>blaTEM</i>	F: ATCAGCAATAAACCAGC R: CCCGAAGAACGTTTTC	516	54
<i>blaSHV</i>	F: AGGATTGACTGCCTTTTGT R: ATTTGCTGATTTGCTCG	392	54
<i>blaCTX - M</i>	F: TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R: CGATATCGTTGGTGGCCATA	543	56
<i>rmtB</i>	F: TTTCTGCGGGCGATGTAA R: AGTTCTGTTCGATGGTCTTT	523	57
<i>ant(3'') - I a</i>	F: ATCTGGCTATCTTGCTGACA R: TATGACGGGCTGATACTGG	284	54
<i>aac(6') - I b</i>	F: ATGACCTTGCGATGCTCTATGA R: CGAATGCCTGGCGTGTTC	486	54
<i>aph(3') - II a</i>	F: TGA CTGGGCACAACAGACT R: TCAAGAAGCGGATAGAAGGC	717	54
<i>aacC2(aac(3) - II)</i>	F: ACCCTACGAGGAGACTCTGAATG R: CCAAGCATCGGCATCTCATA	384	57
<i>qnrA</i>	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG R: GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516	54
<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA R: TAAATTGGCACCCGTAGGC	417	54
<i>mcr - 1</i>	CLR5 - F: CGGTCACTCCGTTTGTTTC CLR5 - R: CTTGGTCGGTCTGTAGGC	309	52.5

1.8 大肠杆菌产 ESBLs 耐药质粒分析

1.8.1 质粒提取与鉴定 随机挑选 15 株产 ESBLs

的大肠杆菌, 均为多重耐药菌株, 分别接种在 5 mL 含头孢氨苄(LEX, 质量浓度为 30 mg/mL)的 LB 培

培养基中,置于 37 ℃ 水平摇床培养 8~12 h,然后按质粒小量提取试剂盒的操作方法提取质粒,并对提取的质粒 DNA 进行电泳检测。

1.8.2 耐药质粒的转化与筛选 将成功提取的大肠杆菌质粒作为转化对象,吸取 5 μL 质粒转入 *E. coli* DH5α 中吹打混匀,冰上放置 30 min,在 42 ℃ 水浴锅中热激 90 s 后迅速冰浴 5 min,再加入 1 mL 无抗性 LB,置于 37 ℃ 水平摇床培养 1 h,取 100 μL 菌液涂布到含有 LEX 质量浓度为 30 mg/mL 的 LB 琼脂平板上,置于 37 ℃ 温箱中培养 12~16 h。

1.8.3 质粒的耐药性传递鉴定 提取转化子的质粒并与原菌株质粒进行琼脂糖凝胶电泳比对。按照 CLSI 中的 K-B 法对转化子进行药物敏感性试验,并用空白的 *E. coli* DH5α 作对照,判定结果按照抗菌药物敏感性试验执行标准进行。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌的分离与鉴定

从奶牛临床样品中共分离到 210 株大肠杆菌。大肠杆菌在麦康凯培养基上生长出圆形、光滑的红色菌落,在伊红美蓝培养基上形成带有金属光泽的紫黑色菌落;革兰氏染色镜检呈现红色,两端钝圆,呈散在分布的阴性短杆状菌(图 1)。用引物扩增 16S rDNA 后,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,均出现了 202 bp 的目的条带(图 2)。测序结果与 GenBank

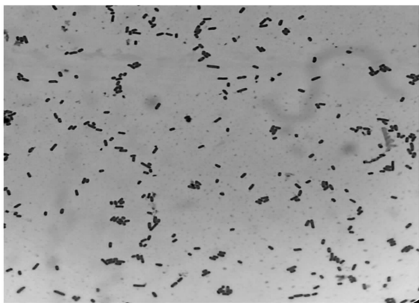
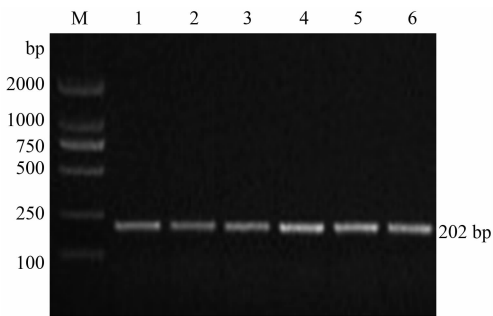


图 1 大肠杆菌革兰氏染色镜检(1 000 ×)



M:DNA Marker DL2000; 1—6:目的片段

图 2 大肠杆菌 16S rDNA PCR 扩增

上的大肠杆菌 16S rDNA 序列比对,同源性均为 99.43%。

2.2 大肠杆菌系统进化分群结果

采用新 Clermont 四重 PCR 系统分型方法对 210 株奶牛子宫内膜炎大肠杆菌进行系统进化分析,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见到 *arpA* (400 bp)、*chuA* (288 bp)、*yjaA* (211 bp)、*TspE4. C2* (152 bp) 的目的条带(图 3)。其中 B1 群(101/210;48.1%)数量最多,其次是 A 群(60/210;28.6%)、C 群(27/210;12.9%)、E 群(14/210;6.7%)、D 群(8/210;3.8%)。

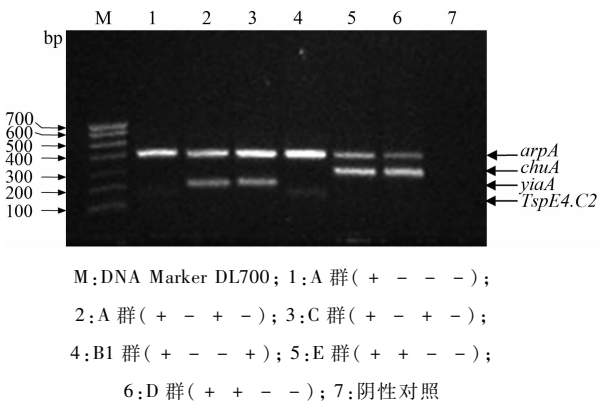


图 3 新 Clermont 四重 PCR 系统分型结果

2.3 药物敏感性试验结果

大肠杆菌各群对 16 种药物呈现不同程度的耐药,其中多重耐药菌株集中在 B1 群,A 群仅对复方新诺明全部敏感,C 群、D 群和 E 群对药物的敏感种类多于 B1 群和 A 群。所有药物中耐药最严重的是红霉素、氨苄西林、庆大霉素、头孢氨苄、链霉素,耐药率分别为 95.2% (200/210)、83.3% (175/210)、73.8% (155/210)、71.9% (151/210)、70.5% (148/210);菌株对诺氟沙星耐药率最低,耐药率为 6.2% (13/210),其次是复方新诺明、氯霉素、多西环素,分别为 6.7% (14/210)、10.0% (21/210)、10.5% (22/210)。多重耐药性严重,主要集中在对 4~10 种药物耐药。多重耐药率高达 98.6% (207/210),其中耐 7 种药物以上的菌株占 67.6% (142/210)(表 3 和图 4)。

2.4 产 ESBLs 菌株表型初筛及确证

通过表型初选结果得出 126 株产 ESBLs 菌株,占总菌数的 60%;对 126 株初筛菌株进行表型确证(图 5),共检测出 55 株产 ESBLs 大肠杆菌,占总菌数的 26.2%。

表 3 大肠杆菌各进化群药敏试验结果

类别	药物名称	各进化群耐药菌株数/株					菌株总数/株 (n = 210)
		B1	A	C	E	D	
		(n = 101)	(n = 60)	(n = 27)	(n = 14)	(n = 8)	
β-内酰胺类	氨苄西林 (AMP)	75 (35.7)	54 (25.7)	27 (12.9)	11 (5.2)	8 (3.8)	175 (83.3)
	头孢氨苄 (LEX)	69 (32.9)	42 (20.0)	25 (11.9)	10 (4.8)	5 (2.4)	151 (71.9)
	头孢噻肟 (CTX)	35 (16.7)	20 (9.5)	19 (9.0)	6 (2.9)	6 (2.9)	86 (41.0)
	头孢他啶 (CAZ)	43 (20.5)	50 (23.8)	27 (12.9)	1 (0.5)	5 (2.4)	126 (60.0)
氨基糖苷类	庆大霉素 (GEN)	90 (42.9)	52 (24.8)	10 (4.8)	3 (1.4)	—	155 (73.8)
	阿米卡星 (AMI)	66 (31.4)	13 (6.2)	7 (3.3)	4 (1.9)	1 (0.5)	91 (43.3)
	卡那霉素 (KAN)	57 (27.1)	41 (19.5)	27 (12.9)	14 (6.7)	7 (3.3)	146 (69.5)
	链霉素 (STR)	64 (30.5)	41 (19.5)	25 (11.9)	12 (5.7)	6 (2.9)	148 (70.5)
四环素类	四环素 (TET)	13 (6.2)	12 (5.7)	6 (2.9)	4 (1.9)	1 (0.5)	36 (17.1)
	多西环素 (DOX)	11 (5.2)	8 (3.8)	3 (1.4)	—	—	22 (10.5)
氯霉素类	氯霉素 (CHL)	12 (5.7)	3 (1.4)	—	5 (2.4)	1 (0.5)	21 (10.0)
	氟苯尼考 (FFC)	18 (8.6)	9 (4.3)	—	11 (5.2)	—	38 (18.1)
多肽类	多黏菌素 B (POL)	14 (6.7)	7 (3.3)	4 (1.9)	8 (3.8)	1 (0.5)	34 (16.2)
喹诺酮类	诺氟沙星 (NOR)	5 (2.4)	3 (1.4)	—	1 (0.5)	4 (1.9)	13 (6.2)
磺胺类	复方新诺明 (TMP)	10 (4.8)	—	4 (1.9)	—	—	14 (6.7)
大环内酯类	红霉素 (EM)	91 (43.3)	60 (28.6)	27 (12.9)	14 (6.7)	8 (3.8)	200 (95.2)

注:括号内的数字是耐药率(%)。

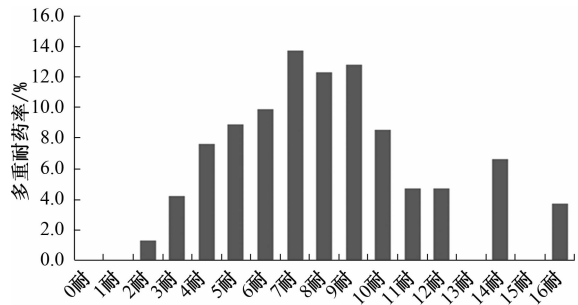


图 4 大肠杆菌多重耐药统计

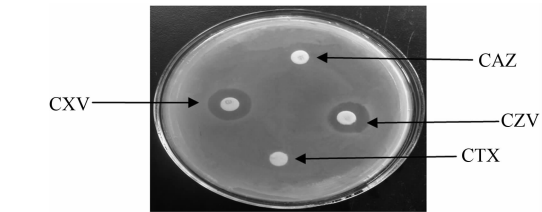
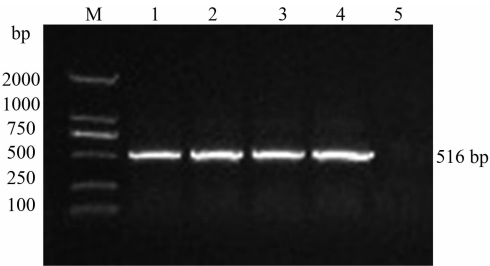


图 5 产 ESBLs 菌株表型确证结果 (阳性)

2.5 耐药基因检测结果

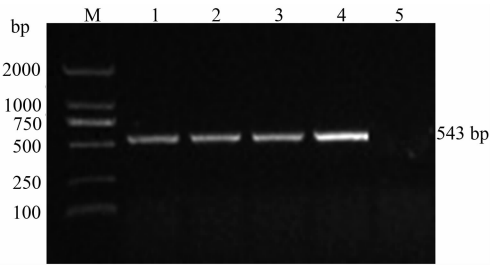
对 210 株大肠杆菌进行相关耐药基因的检
测(图 6—9)。结果表明,11 种耐药基因中,*bla*-
TEM 和 *aac*(6′) - *Ib* 是最流行的耐药基因,检出率为
90.5% (190/210) 和 88.1% (185/210),其次是 *ant*
(3″) - *I a*、*aacC2* (*aac*(3) - *II*)、*blaCTX* - *M*、*aph*
(3′) - *II a*、*rmtB*、*blaSHV*, 分别为 70.0% (147/
210)、64.3% (135/210)、58.1% (122/210)、37.6%
(79/210)、18.6% (39/210)、11.4% (24/210)。 *mcr* -
I、*qnrA* 和 *qnrS* 检出率则相对较低,分别为 7.1%
(15/210)、2.4% (5/210) 和 1.9% (4/210)。耐药

基因的检测结果与耐药表型基本一致。



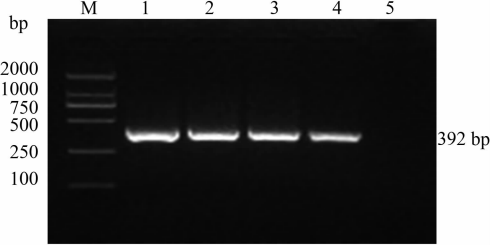
M:DNA Marker DL2000; 1—4:目的基因; 5:阴性对照

图 6 *blaTEM* 基因 PCR 产物电泳



M:DNA Marker DL2000; 1—4:目的基因; 5:阴性对照

图 7 *blaCTX-M* 基因 PCR 产物电泳



M:DNA Marker DL2000; 1—4:目的基因; 5:阴性对照

图 8 *blaSHV* 基因 PCR 产物电泳

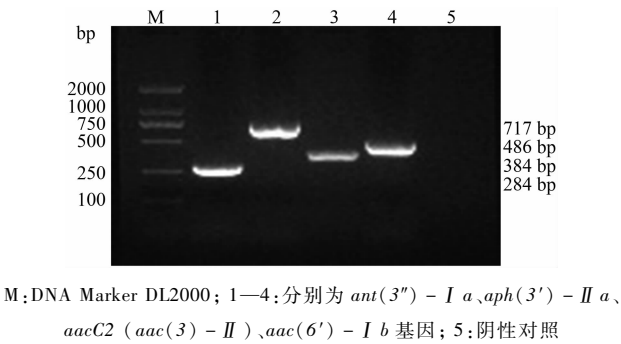


图 9 *ant*(3'') - *I a*、*aph*(3') - *II a*、*aacC2* (*aac*(3) - *II*)、*aac*(6') - *I b* 基因 PCR 产物电泳

2.6 大肠杆菌产 ESBLs 耐药质粒分析

选取的 15 株产 ESBLs 大肠杆菌均能分离出质粒。质粒转化后,有 8 株菌在含 LEX 的固体 LB 培养基上生长出少量菌落,其他菌株没有菌落生长,总转化率为 53.3%。提取转化成功后的转化子质粒并与原菌株质粒进行电泳检测,通过质粒电泳图谱发现转化子含有原菌株部分或全部的质粒条带,且

多数原菌株质粒与转化子质粒都有 23.13 kb 的条带(图 10),将提取的转化子质粒再次转入到 *E. coli* DH5 α 中,得到了相同的转化子,同时 3 次连续转化后的结果均相同。

E. coli DH5 α 作为基因工程菌,对所有抗菌药物不产生抗性,因此耐药质粒转化后,转化子所表现的耐药性是耐药质粒的抗性水平。对 8 株携带有 ESBLs 质粒的转化子进行药物敏感性试验,试验结果与供体菌比较可知,8 株转化子对 16 种供试药物的耐药率与供体菌具有一定的相似性,转化子不仅对部分 β -内酰胺类药物产生耐药性,对其他供试药物也表现出与供体菌类似的耐药性,并且均表现出对 3 种及以上药物耐药(表 4)。供体菌和转化子对氨苄西林、庆大霉素、头孢氨苄的转移率均为 100%,其他药物的转移率则相对较低(表 5),表明通过转化,质粒可以携带 1 个至数个耐药基因,可以将供体菌的耐药性部分或全部转移。

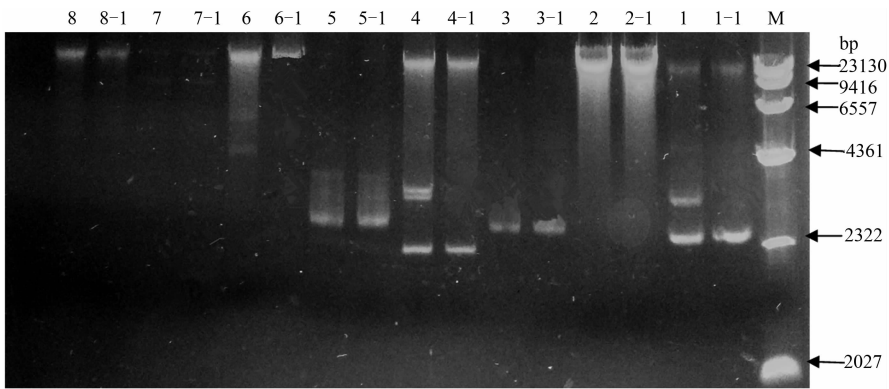


图 10 转化子质粒与原菌株质粒电泳图谱

表 4 供体菌与转化子的耐药表型

菌株	供体菌	转化子
1	STR - GEN - AMP - AMI - CTX - EM - LEX	STR - GEN - AMP - LEX
2	STR - GEN - AMP - LEX - CAZ - KAN - POL - DOX - EM	GEN - AMP - LEX
3	GEN - AMP - LEX - DOX - CAZ - EM	GEN - AMP - LEX - DOX
4	GEN - AMP - LEX - STR - EM - CTX - TET - KAN - NOR	GEN - AMP - LEX - CTX
5	GEN - AMP - LEX - EM - KAN - NOR - AMI - POL - EM	GEN - AMP - LEX - POL
6	GEN - AMP - LEX - AMI - STR - CTX - KAN - NOR - CTX - CAZ - EM	GEN - AMP - LEX - AMI - CAZ - KAN
7	GEN - AMP - LEX - KAN - AMI - CAZ - EM	GEN - AMP - LEX - KAN - AMI - CAZ
8	GEN - AMP - LEX - CTX - KAN - AMI - STR - EM	GEN - AMP - LEX - AMI - STR

表 5 供体菌与转化子对 16 种抗菌药物的耐药情况

药物	供体菌(8 株)		转化子(8 株)		转移率/%
	耐药数量/株	耐药率/%	耐药数量/株	耐药率/%	
AMP	8	100	8	100	100
LEX	8	100	8	100	100
CTX	4	50.0	1	12.5	25.0
CAZ	4	50.0	2	25.0	50.0
GEN	8	100	8	100	100

续表 5 供体菌与转化子对 16 种抗菌药物的耐药情况

药物	供体菌(8 株)		转化子(8 株)		转移率/%
	耐药数量/株	耐药率/%	耐药数量/株	耐药率/%	
AMI	4	50.0	2	25.0	50.0
KAN	6	75.0	2	25.0	33.3
STR	5	62.5	2	25.0	40.0
TET	1	12.5	0	0	0
DOX	2	25.0	1	12.5	50.0
CHL	0	0	0	0	0
FFC	0	0	0	0	0
POL	1	12.5	0	0	0
NOR	3	37.5	0	0	0
TMP	0	0	0	0	0
EM	8	100	0	0	0

3 结论与讨论

大肠杆菌是奶牛子宫内膜炎重要的致病菌之一,对奶牛产业造成严重的经济损失。Clermont 等^[8]使用四重 PCR 系统分群方法将大肠杆菌分为 A、B1、B2、C、D、E、F 和 clade I 8 个进化群。根据大肠杆菌系统发育研究结果,肠外致病性大肠杆菌主要分布在 B2 和 D 群,而共生性大肠杆菌则集中在 B1 和 A 群^[16]。本研究将 210 株分离株共分成 B1 群(48.1%)、A 群(28.6%)、C 群(12.9%)、E 群(6.7%)和 D 群(3.8%)5 个群,且多重耐药菌株主要集中在 B1 群,A 群仅对复方新诺明敏感。与曾莉^[17]报道的 3 种不同来源大肠杆菌分为 A 群(45%)、B1 群(16%)、F 群(14%)、D 群(6%)、C 群(3%),未检出 E 群和 B2 群的进化结果相比,本试验分离大肠杆菌主要集中在 A 群,检测出 E 群而未检测出 B2 群。王一昊^[3]对产后奶牛子宫内膜炎大肠杆菌系统发育分析发现,主要为 B1 群,其次是 A 群和 D 群,没有分离到 B2 群,并推断 A 群可能是主要的致病菌,而 B1 群是原住大肠杆菌或潜在的条件致病菌。Iranpour 等^[18]发现,分离自医院病人尿路感染的大肠杆菌中 B2 群(39.3%)分布最多,其次是未分型成功(27.1%)、E 群(9.3%)、C 群(6.4%)、clade I 群(6.4%)、B1 群(5%)、F 群(2.9%)和 D 群(2.9%)。本试验中各进化群检出率与以上报道存在差异性,可能是由于地理位置和菌株来源的不同所造成。

药敏试验结果显示,分离株对大环内酯类、氨基糖苷类、β-内酰胺类耐药率较高,而对其他类药物耐药率较低。产 ESBLs 大肠杆菌占到总数的 26.2%。多重耐药菌株主要集中在 4~10 耐,多重耐药率高达 98.6%。Malinowski 等^[19]对 99 株分离自奶牛子宫内膜炎大肠杆菌耐药性进行分析,发现分离株对诺

氟沙星最敏感,其次是庆大霉素,敏感率分别为 100% 和 96%。韩淑芳等^[20]从山西某奶牛场 25 份奶样中分离得 18 株金黄色葡萄球菌,发现对 9 种抗生素产生普遍耐药性,其中对阿莫西林耐药率最高,达 77.8%。冯世文等^[21]分析 2016 年采自 25 个广西猪场腹泻仔猪的 200 份样品,分离得 103 株致病性大肠杆菌,发现 2016 年广西猪源致病性大肠杆菌以广谱耐药为主,多为 11 重耐药以上,占 74.8%。Laarem 等^[22]从新鲜的生鸡肉样本中分离出 29 株大肠杆菌,其中耐四环素的菌株占 96.6%。本研究中分离株的药物敏感性试验与前人的研究结果存在差异,可能是因为临床用药及样品来源的不同所致。对 *blaTEM*、*blaCTX-M*、*blaSHV* 多种耐药基因检测发现,同时在 39 株携带 *rmtB* 基因的大肠杆菌中检测出 *blaTEM*、*blaCTX-M* 基因。在检测的 4 种氨基糖苷类修饰酶基因中,*aac(6′)-Ib* 分布最多,为 88.1%。其他耐药基因检出率较少,但耐药基因之间存在交叉耐药,本试验耐药表型与耐药基因的检出率基本符合。建议临床上选择敏感性高的药物如诺氟沙星、复方新诺明、氯霉素等。Zhao 等^[23]对内蒙古地区奶牛子宫内膜炎大肠杆菌耐药基因检测,仅检测出 *blaTEM* 基因(100%),未发现 *blaCTX-M*、*blaSHV*。底丽娜^[24]报道新疆不同动物源耐药基因检出情况,32 株牛源大肠杆菌中 *blaTEM* 和 *rmtB* 检出率分别为 15.63% 和 50%,其中 4 株分离株同时带有 *blaTEM* 和 *rmtB* 基因。与以上研究相比,新疆地区奶牛子宫内膜炎大肠杆菌普遍存在耐药性,且耐药基因检出率较高,耐药问题更严峻,需引起重视。

耐药质粒是导致细菌产生耐药性的一个重要因素,耐药基因可通过耐药质粒转导、转化和结合等方式进行水平传播。有研究报道,产 ESBLs 基因中的 *CTX-M*、*TEM*、*SHV* 和氨基糖苷类中的 *rmtB* 基因通

常由质粒介导,这些基因可同时在同一质粒上,并可通过转化进行传播和扩散^[12,25]。本试验对质粒介导的 ESBLs 基因进行研究,成功获得了 8 株转化子,转化子含有原供体菌全部或部分质粒条带,均呈现出不同程度的耐药性,对头孢类药物耐药的菌株也对氨基糖苷类药物耐药。

参考文献:

- [1] 贾知锋,王纯洁,敖日格乐,等. 产后奶牛子宫内致病菌的分离、毒力基因检测及耐药性分析[J]. 中国农业大学学报,2017,22(2):67-72.
- [2] 赵红霞. 奶牛子宫内膜炎致病大肠杆菌的分离、鉴定及耐药性研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.
- [3] 王一昊. 产后奶牛子宫内大肠杆菌系统发育、毒力因子和耐药性的研究[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [4] Sheldon I M, Cronin J, Goetze L, et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle[J]. Biology of Reproduction, 2009, 81(6):1025-1032.
- [5] Sheldon I M, Rycroft A N, Dogan B, et al. Specific Strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice[J]. PLoS One, 2010, 5(2):e9192.
- [6] Blair J M A, Webber M A, Baylay A J, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(1):42-51.
- [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] Clermont O, Christenson J K, Denamur E, et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups[J]. Environmental Microbiology Reports, 2013, 5(1):58-65.
- [9] Colom K, Pérez J, Alonso R, et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA-1} genes in Enterobacteriaceae[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 223(2):147-151.
- [10] 张济培,谭华龙,韦庆兰,等. 广东地区家禽源大肠杆菌对 β -内酰胺类药物的耐药性及耐药基因检测[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(9):2487-2492.
- [11] Xia L N, Tao X Q, Shen J Z, et al. A survey of β -lactamase and 16S rRNA methylase genes among fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates and their horizontal transmission in Shandong, China[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2011, 8(12):1241-1248.
- [12] 孙慧,雷战,邹金峰,等. 山东地区禽源致病性大肠杆菌氨基糖苷类药物耐药性及耐药基因的检测[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(9):1279-1282.
- [13] 张安云,王红宁,周万蓉,等. 多重 PCR 对大熊猫和野生动物肠道分离菌氨基糖苷类抗生素耐药基因检测研究[C]//中国畜牧医学学会家畜传染病学分会. 第六届理事会第二次会议暨教学专业委员会第六届代表大会论文集. 北京:中国农业出版社,2006:620-623.
- [14] Colobatiu L, Tabaran A, Flonta M, et al. First description of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and β -lactamase encoding genes in non-typhoidal *Salmonella* isolated from humans, one companion animal and food in Romania[J]. Gut Pathogens, 2015, 7(1):16.
- [15] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study[J]. Lancet Infectious Diseases, 2016, 16(2):161-168.
- [16] Basu S, Mukherjee S K, Hazra A, et al. Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli*: Nalidixic acid and ciprofloxacin resistance, virulent factors and phylogenetic background[J]. Journal of Clinical & Diagnostic Research, 2013, 7(12):2727-2731.
- [17] 曾莉. 不同来源大肠杆菌 ESBLs 基因分子流行病学研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.
- [18] Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, et al. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method[J]. Biomed Research International, 2015, 2015(4):846219.
- [19] Malinowski E, Lassa H, Markiewicz H, et al. Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli*, from the uteri of cows with metritis/endometritis[J]. Veterinary Journal, 2011, 187(2):234-238.
- [20] 韩淑芳,刘一飞,王国艳,等. 某奶牛场牛乳源金黄色葡萄球菌的分离鉴定与耐药性调查[J]. 山西农业科学, 2016, 44(11):1696-1698, 1728.
- [21] 冯世文,李军,潘艳,等. 广西猪源致病性大肠杆菌对抗菌药物的耐药性变化分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(2):350-356.
- [22] Laarem M, Barguigua A, Nayme K, et al. Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence genes in avian *Escherichia coli* isolates from Algeria[J]. J Infect Dev Ctries, 1972, 11(2):143-151.
- [23] Zhao H X, Zhao J L, Shen J Z, et al. Prevalence and molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from dairy cattle with endometritis in China[J]. Microbial Drug Resistance, 2014, 20(2):162-169.
- [24] 底丽娜. 新疆不同动物源大肠杆菌耐药性调查及其相关耐药基因检测[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2014.
- [25] 余婷. 牛源大肠杆菌 16S rRNA 甲基化酶基因的检测及扩散机制的研究[D]. 银川:宁夏大学,2015.