

## 浙江省肉鸡源耐药大肠杆菌耐药表型及耐药基因型的分析

宗帅州, 辛丽娜, 白佳琪, 韩剑众, 曲道峰\*

(浙江工商大学 杭州 310018)

**摘要** 从湖州、嘉兴、绍兴 3 市 12 家肉鸡养殖场采集粪便、土壤、污水共 720 份样品,经 16s rRNA 测序鉴定,K-B 法测定耐药表型,PCR 法鉴定耐药基因型与整合子,并通过共现网络分析大肠杆菌耐药性传播风险。分离得到的 234 株大肠杆菌对头孢唑啉、阿奇霉素、四环素与磺胺类抗生素有较高的耐药率,且嘉兴市分离株对其中 17 种抗生素的耐药率均高于其他两市。基因型鉴定结果表明,234 株大肠杆菌中,*aadA1* 的检出率最高为 88.89%,其次分别为 *tet(A)*、*sul1*、*bla<sub>TEM</sub>*,而在 29 种耐药基因中,嘉兴市分离株中有 18 种基因的检出率高于其他两市。I 型整合酶 3 市分离株中的检出率分别为 28.38%(湖州),40.96%(嘉兴),32.47%(绍兴)。结果表明:嘉兴市分离株有相对较高的耐药率与耐药基因检出率,共现网络分析显示在嘉兴市大肠杆菌中 *qnrB* 与 *mph(A)*、*fosA* 与 *bla<sub>TEM</sub>*、*fosA* 与 *sul1*、*sul2* 与 *aadA1* 有较高的共传播风险。本研究调查了浙江省湖州、嘉兴、绍兴 3 市肉鸡养殖环境的耐药情况与传播风险,为保障动物性食品安全与特定耐药基因的重点监测提供理论依据。

**关键词** 肉鸡; 大肠杆菌; 耐药基因; 共现网络

**文章编号** 1009-7848(2023)09-0276-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.029

中国是禽肉消费大国,自 2017 年以来,中国的肉鸡出栏量已超过每年 100 亿只鸡<sup>[1]</sup>。在鸡养殖过程中,大肠杆菌被认为是主要病原体<sup>[2]</sup>。致病性大肠杆菌往往会引起重大传染病,其症状多为呼吸道感染、卵黄囊感染、肠炎、败血症、浆膜炎和输卵管炎等<sup>[3]</sup>。此外,大肠杆菌还能与其它病原体共同作用于宿主,造成混合感染,其高发病率与高死亡率,给畜禽养殖业造成巨大的经济损失<sup>[4]</sup>。目前来看,抗生素仍是治疗大肠杆菌感染的主要手段,然而,在鸡养殖产业中大量使用治疗性抗生素与抗生素生长促进剂已经引发严重的动物源和食源性细菌耐药性问题<sup>[5]</sup>。据高玉斌等<sup>[6]</sup>的报告,2017 年于国内 7 个代表性地区(山西、山东、西藏、云南、新疆、江苏、吉林)养殖场中分离到 130 株鸡源大肠杆菌,对四环素、氨苄西林、磺胺异噁唑、复方新诺明、氟苯尼考的耐药率分别为 91.54%,90.77%,78.13%,79.83%,81.25%。据唐标等<sup>[7]</sup>的报道,2019 年于湖南省部分鸡养殖场中分离到的 146 株大肠杆菌对四环素、氨苄西林、磺胺异噁唑、复方新诺明、氟苯尼考的耐药率分别为

87.7%,85.0%,78.1%,75.3%,67.1%。从以上数据来看,国内鸡源大肠杆菌耐药率处于较高的水平,耐药情况非常严重,而养殖环境中的耐药菌不仅提高畜禽细菌病治疗难度,也可以通过污染水源、土壤传播给人,还可以通过禽类产品加工链进行更广泛的传播<sup>[8]</sup>。我国虽然已经开展动物源细菌耐药性检测,但是仅在省级层面对个别养殖场进行样品采集,对于市级层面的耐药菌研究仍存在很大空缺<sup>[9]</sup>。

本研究对浙江省湖州、嘉兴、绍兴市共 12 家肉鸡养殖场进行粪便与环境样品的采集,通过 16S rRNA 测序进行菌株鉴定,对分离得到的大肠杆菌进行耐药表型与基因型检测,共现网络分析整合子与耐药基因的相关性,揭示耐药基因的传播特点,为鸡源耐药菌的监测提供依据,为当地保证食品安全提供数据支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品采集

2021 年 5 月分别从浙江省 3 市共 12 家养殖场(每市各 4 家养殖场)中,各采集粪便样品 20 份、土壤样品 20 份、污水样品 20 份,共 720 份样品置于无菌样品袋与采样管中。样品采集后均立刻置于低温(2~8℃)样品箱中,待采样结束后运至

收稿日期: 2022-09-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172188)

第一作者: 宗帅州,男,硕士

通信作者: 曲道峰 E-mail: daofeng@mail.zjgsu.edu.cn

实验室进行大肠杆菌分离。

## 1.2 主要试剂

Mueller-Hinton 肉汤、脑心浸液(BHI)培养基、缓冲蛋白胨水(BPW)、细菌琼脂粉,购自青岛海博生物技术有限公司;麦康凯琼脂培养基,购自美国 BD 公司;药敏纸片,购自杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、16S rRNA 通用引物与 50X TAE 缓冲液,购自上海生工生物工程有限公司;2X Taq PCR Master Mix、10 mg/mL 溴化乙锭(EB)、琼脂糖、DL2000 DNA Marker,购自 BBI 生命科学有限公司。

## 1.3 菌株初筛与鉴定

将采集到的样品接种至 BPW 中,37℃条件下增菌 12 h 后,使用接种环取菌液在麦康凯琼脂培养基上进行划线分离,于 37℃恒温培养箱内培养 18~24 h,挑取可疑菌落(鲜桃红色或微红色,菌落中心呈深桃红色),在 BHI 琼脂培养基上进行划线纯化,再次于 37℃培养 18~24 h 后进行 PCR 鉴定。

本研究采用 16S rRNA 测序技术对分离得到的菌株进行鉴定。按细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒的要求提取经分离纯化后的大肠杆菌疑似菌株。上下游引物采用 16S 通用引物 27F(YMAGAGTTTGATYMTGGCTCAG) 和 1492R(TACCTGTTCACGACTT),将配置好的 PCR 体系(2X Taq PCR Master Mix 25  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L、上游引物 0.5  $\mu$ L、下游引物 0.5  $\mu$ L、模板 DNA 5  $\mu$ L)使用涡旋振荡仪上振荡混匀后低速离心。PCR 扩增条件为 96℃预变 5 min,以 95℃变性 30 s、50℃退火 90 s、72℃延伸 60 s 进行 30 个循环后,最后 72℃再延伸 5 min,PCR 程序结束后于 4℃保存。取 5  $\mu$ L 扩增产物加入 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,电压为 120 V,电泳时长 30 min。经蛋白印迹检测系统下观察琼脂糖凝胶是否在 1 500 bp 处有对应条带,将扩增成功的 PCR 产物送至上海生工股份有限公司进行双向测序,测序结果经 NCBI 数据库 blast 比对鉴定菌株。

## 1.4 药敏试验

本次试验分离得到的大肠杆菌耐药谱根据纸片扩散法(Kindly-Bauer)进行测定,选择 8 大类 20 种抗生素,参照美国临床实验室标准化委员会

(CLSI)标准进行结果判定和质量控制。

## 1.5 耐药基因及整合子的 PCR 鉴定

根据已有文献报道过的引物序列,对常见的 9 大类抗生素耐药基因进行 PCR 鉴定,配置耐药基因扩增体系,扩增条件为:95℃下预变性 5 min,95℃下变性 30 s,对应引物的退火温度 40 s,72℃延伸 40 s,进行 30 个循环;72℃最终延伸 5 min。

根据已有文献报道过的整合酶基因引物,对已被报道过的 3 类整合子进行检测,并对整合酶阳性菌株进行整合子内部基因盒扩增与分析。按各自 PCR 扩增条件扩增后,对成功扩增出条带的整合子基因盒扩增产物送至上海生工股份有限公司进行一代测序,测序结果经 blast<sup>[10]</sup>比对后进行下一步分析。

## 1.6 数据分析

运用 SPSS 16.0<sup>[11]</sup>对试验数据进行统计分析,并通过 Origin 8.0 可视化。耐药基因与可移动元件的相关性通过 R 软件包“vegan”与“psych”进行计算,并适应 Gephi<sup>[12]</sup>实现共现网络图的可视化。

## 2 研究结果

### 2.1 细菌的分离鉴定

3 市采集的 720 份样品经涂板培养与 16S rRNA 鉴定后,共分离得到 234 株大肠杆菌,分离率为 32.5%。按地区来看,3 市大肠杆菌分离率均在 30%以上,分离率从高到低依次为嘉兴(34.6%, 72/240)、绍兴(32.1%, 83/240)、湖州(30.8%, 77/240)。按样本类型来看,3 市养殖场分离出的大肠杆菌主要来源于粪便,分离率均高于其它样本类型,而 3 市粪便样本中分离率最高来自嘉兴,高达 58.8%。其次,3 地土壤样本的分离率均高于污水,土壤分离率最高的样本来自绍兴,为 28.8%。对污水样本而言,分离率最高的为嘉兴 21.3%。

### 2.2 分离株大肠杆菌的耐药表型

根据 CLSI-2020<sup>[13]</sup>和 EUCAST-2020<sup>[14]</sup>制定的关于纸片扩散法药敏试验的 R/I/S 判定折点,对分离株大肠杆菌的药敏试验结果进行判定。由图 1 可知,3 市分离的大肠杆菌对 8 大类,20 种抗生素呈现出不同的耐药表型。其中耐药率最高的为四环素,均在 90%以上,嘉兴市分离株耐药率最高,

表1 大肠杆菌的分离率

采样地点	样品来源	分离率/%
湖州	粪便	53.8(43/80)
	土壤	22.5(18/80)
	污水	16.3(13/80)
小计		30.8(74/240)
嘉兴	粪便	58.8(47/80)
	土壤	27.5(19/80)
	污水	21.3(17/80)
小计		34.6(83/240)
绍兴	粪便	49.8(39/80)
	土壤	28.8(23/80)
	污水	18.8(15/80)
小计		32.1(77/240)
总计		32.5(234/720)

高达 95.31%，其次分别为绍兴市分离株的 94.28%、湖州市分离株的 91.26%。其次，3 市的分

离株也对甲氧苄氨嘧啶、磺胺异噁唑呈现出高度耐药，耐药率均在 80%以上。嘉兴市分离株对这两种抗生素耐药程度比其他两市更严重，对甲氧苄氨嘧啶的耐药率为 92.1%，高于湖州的 87%和绍兴的 84.44%，对磺胺异噁唑的的耐药率为 95.43%，高于绍兴的 92.34%和湖州的 89%。除了上述的 3 种抗生素外，头孢他啶、头孢唑啉、头孢西丁、亚安培南、美罗培南、氨基曲南、阿米卡星、链霉素、庆大霉素、环丙沙星、氯霉素、磷霉素、阿奇霉素、米诺环素这 14 种抗生素的耐药率均为嘉兴市分离株高于其他两市分离株，嘉兴市肉鸡源大肠杆菌耐药程度更高。碳青霉烯类抗生素作为肉鸡养殖中禁用的抗生素，3 市分离株对亚胺培南的耐药率均高于 10%，需要引起重视，而美罗培南的耐药程度较轻，湖州市分离株耐药率为 4.76%，绍兴市分离株耐药率为 8.61%，但嘉兴市分离株耐药率高达 17.63%。

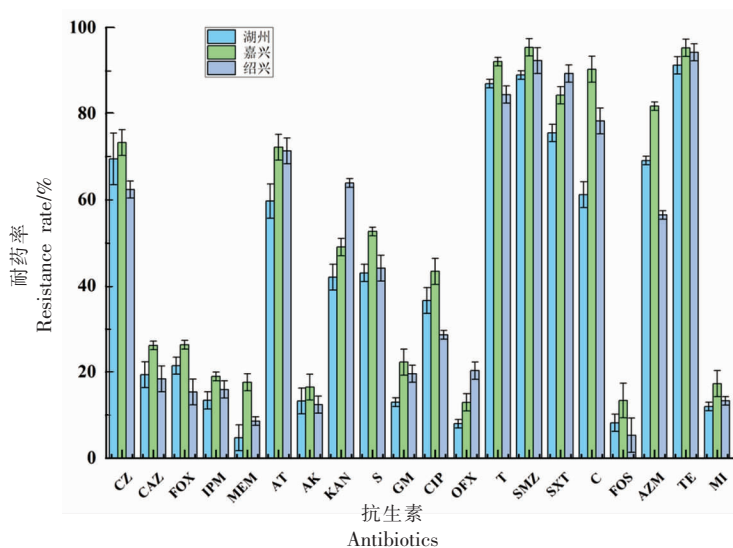


图1 三市大肠杆菌分离株对 20 种抗生素的耐药率

Fig.1 Antibiotic resistance rate of *Escherichia coli* to 20 antibiotics in 3 cities

### 2.3 大肠杆菌的耐药基因型鉴定

本研究分离得到的 234 株大肠杆菌中耐药基因的检出率概况如表 2 所示。 $\beta$ -内酰胺类耐药基因的检出率概况如表 2 所示。 $\beta$ -内酰胺类耐药基因  $bla_{TEM}$  有着非常高的检出率，达到 76.9%，其次分别为  $bla_{CTX-M}$  与  $bla_{SHV}$ ，检出率为 26.06% 与 23.93%，而这 3 种耐药基因均可编码超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (ESBLs)。介导碳青霉烯类耐药的  $bla_{NDM}$  的检出率较低，仅为 0.85%，其编码 B 类碳青霉烯

酶。而编码 A 类与 D 类碳青霉烯酶的基因  $bla_{KPC}$  与  $bla_{OXA}$  均为检出。氨基糖苷类耐药基因中， $aacDA1$  的检出率最高，为 88.89%，其次为  $aphA6$ 、 $aacC$ 、 $aac(6')-Ib-cr$ ，耐药率分别为 21.79%、19.23% 和 11.53%。喹诺酮类耐药基因  $qnrA$ 、 $qnrB$ 、 $qnrD$ 、 $qnrS$  的检出率为 34.19%、21.36%、16.67% 以及 36.75%。磺胺类耐药基因检出率较高的为  $sul1$  与  $sul2$ ，分别为 81.20% 与 23.08%，其余 4 类均在

表 2 抗生素耐药基因检出率

抗生素大类	耐药基因	检出率/%
β-内酰胺类	<i>blaTEM</i>	76.90(180/234)
	<i>blaCTX-M</i>	26.06(61/234)
	<i>blaNDM</i>	0.85(2/234)
	<i>blaSHV</i>	23.93(56/234)
氨基糖苷类	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	11.53(27/234)
	<i>aadA1</i>	88.89(208/234)
	<i>aphA6</i>	21.79(51/234)
	<i>aacC</i>	19.23(45/234)
喹诺酮类	<i>qnrA</i>	34.19(80/234)
	<i>qnrB</i>	21.36(50/234)
	<i>qnrD</i>	16.67(39/234)
	<i>qnrS</i>	36.75(86/234)
磺胺类	<i>sul1</i>	81.20(190/234)
	<i>sul2</i>	23.08%(54/234)
	<i>folp1</i>	8.98(21/234)
	<i>folp2</i>	11.97(28/234)
	<i>folp3</i>	3.41(8/234)
酰胺醇	<i>floR</i>	49.15(115/234)
	<i>cmlA</i>	18.38(43/234)
磷霉素	<i>fosA</i>	20.51(48/234)
	<i>fosB</i>	11.97(28/234)
大环内酯类	<i>mph(A)</i>	70.99(164/234)
	<i>mph(E)</i>	37.18(87/234)
	<i>ermA</i>	8.12(19/234)
四环素类	<i>tet(A)</i>	84.19(197/234)
	<i>tet(B)</i>	29.49(69/234)
	<i>tet(C)</i>	16.67(39/234)

10%以下,未检出 *sul3*。酰胺醇类耐药基因 *floR*、*cmlA* 的检出率为 49.15%与 18.38%,未检出 *cfr*。而磷霉素耐药基因检出率整体较低,*fosA* 与 *fosB* 的耐药率分别为 20.51%与 11.97%。大环内酯类耐药基因中检出率最高的为 *mph(A)* 70.99%,其次为 *mph(E)* 的 37.18%,*ermA* 最低,为 8.12%。四环素类耐药基因中,检出率最高为 *tet(A)*,高达 84.1%。*tet(B)* 与 *tet(C)* 的检出率相对较低,为 29.49%与 16.67%。

### 2.4 大肠杆菌分离株耐药基因检出率地域性差异

进一步分析 8 大类抗生素耐药基因检出率的地域性差异,由图 2 可知,四环素耐药基因 *tet(A)*、氨基糖苷类耐药基因 *aadA1*、磺胺类耐药基因 *sul1* 在 3 市均有较高的检出率,且 3 市之间检出率相差不大,而 *ermA* 在 3 市分离株中检出率均低于 20%,*bla<sub>NDM</sub>*、*folp3* 的检出率低于 10%,处于较低的水平。在检出的 29 种耐药基因中,嘉兴市分离的大肠杆菌有 18 种耐药基因的检出率高于其他两市,分别为 *tet(B)*、*mph(E)*、*mph(A)*、*qnrA*、*qnrD*、*qnrS*、*ac(6′)-Ib-cr*、*aacC*、*aadA1*、*bla<sub>CTX-M</sub>*、*bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>NDM</sub>*、*folp1*、*folp3*、*dfrA27*、*floR*、*cmlA*、*catA1*、*fosA*、*fosB*,其中 *bla<sub>NDM</sub>* 仅在嘉兴市分离株中被检出。而四环素耐药基因 *tet(A)*、大环内酯类耐药基因 *ermA*、喹诺酮类耐药基因 *qnrB*、氨基

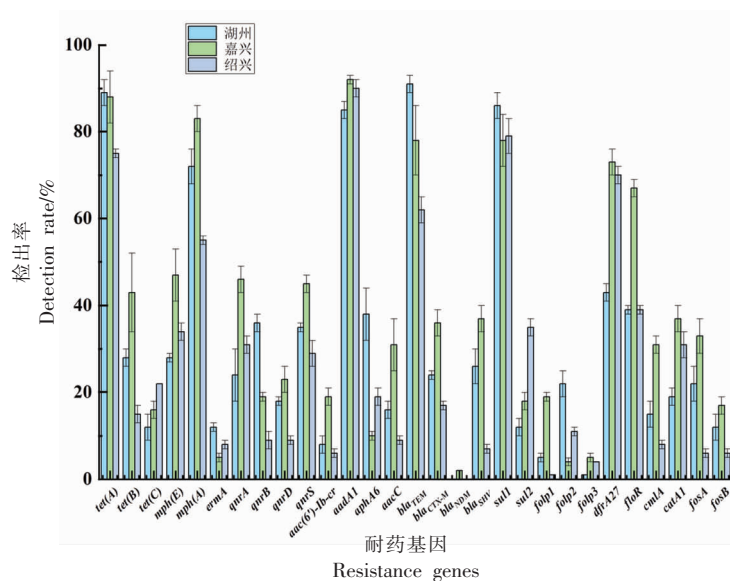


图 2 3 市大肠杆菌分离株耐药基因检出率

Fig.2 Detection rate of antibiotic resistance genes of *Escherichia coli* in 3 cities

糖苷类耐药基因 *aphA6*、 $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>TEM</sub>*、磺胺类耐药基因 *sul1* *folp2* 的检出率均为湖州市最高。绍兴市分离株的 *tet(C)*、*sul2* 检出率高于其他两市。根据耐药基因的检出率分布来看,耐药基因在嘉兴市流行率更高,嘉兴市的耐药情况相比于其他两市更严重。

### 2.5 3市整合子地域性分布差异

对3市分离到的大肠杆菌进行整合酶基因PCR鉴定,I型整合酶基因 *intI1* 阳性大肠杆菌共80株,II型整合酶基因 *intI2* 共15株,未检出 *intI3*,且未在同一株菌中同时检出 *intI1* 与 *intI2*。如图3所示,*intI1* 在湖州、嘉兴、绍兴市的检出率分别为28.38% ( $n=21$ )、40.96% ( $n=34$ )、32.47% ( $n=25$ ),而 *intI2* 的检出率较低,在湖州、嘉兴、绍兴市的检出率为6.76% ( $n=5$ )、3.61% ( $n=3$ )、9.09% ( $n=7$ )。对检出整合酶的大肠杆菌进行进一步分析,对整合子内部可变区进行PCR扩增,并对扩增产物进行测序分析。通过测序鉴定,在29株 *intI1* 阳性大肠杆菌中共检出3种不同类型的基因盒序列(*dfrA17-aadA5-sul1-tetR-aadA1-aadA22-aadA23-aadB-aadA1-cmlA6*),在4株 *intI2* 阳性大肠杆菌中检出1种基因盒序列(*dfrA1-sat2-aadA1*)。其中的I型整合子包含两种甲氧苄啉耐药基因 *dfrA17*、*dfrA1*,一种卡那霉素耐药基因 *aadB*,4种链霉素耐药基因 *aadA1*、*aadA22*、*aadA23*、*aadA5*,以及一种氯霉素耐药基因 *cmlA6*。而II型整合子基因盒序列为一个甲氧苄啉耐药基因 *dfrA1*,一个链丝霉素耐药基因 *sat2* 和一个链霉素耐药基因 *aadA1*。

### 2.6 嘉兴市耐药基因与可移动元件的共现网络分析

经耐药表型的鉴定分析,对所检测的20种抗生素中,嘉兴市大肠杆菌分离株对其中17种的耐药率高于其他两市。而耐药基因型的鉴定分析表明,在所检测的29种耐药基因中,嘉兴市大肠杆菌分离株共有18种耐药基因的检出率高于其他两市,且嘉兴市分离株中I型整合酶的检出率也高于其他两市。说明在嘉兴市中耐药基因分布广泛,且随移动元件进一步传播的风险更大,为此,我们对嘉兴市分离株中整合酶、耐药基因、整合子中插入序列进行共现网络分析,每个节点代表一

个可移动元件或耐药基因,两点之间的连接线代表其同一株菌中共现,连接线越粗表明共现的频率越高。结果如图4,其中8个耐药基因 *tet(A)*、*sul1*、*sul2*、*floR*、*aadA1*、*tet(B)*、*tet(C)* 以及 *bla<sub>TEM</sub>* 处于共现网络的中心,这些耐药基因与其余耐药基因或可移动元件的相关性更强,是耐药性传播过程中其主要作用的几种耐药基因,需要进行重点监测。*qnrA-mph(A)*、*fosA-sul1*、*fosA-bla<sub>TEM</sub>*、*sul2-aadA1*,这4组耐药基因之间共现频率较高,它们分别介导喹诺酮与大环内酯类抗生素,磷霉素与磺胺类、磷霉素与 $\beta$ -内酰胺类、磺胺类与氨基糖苷类耐药,表明在嘉兴市分离株中这几种耐

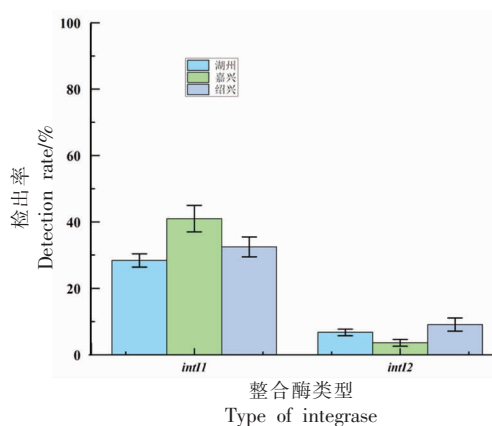


图3 3市大肠杆菌分离株整合酶基因检出率  
Fig.3 Detection rate of integrase genes of *Escherichia coli* in 3 cities

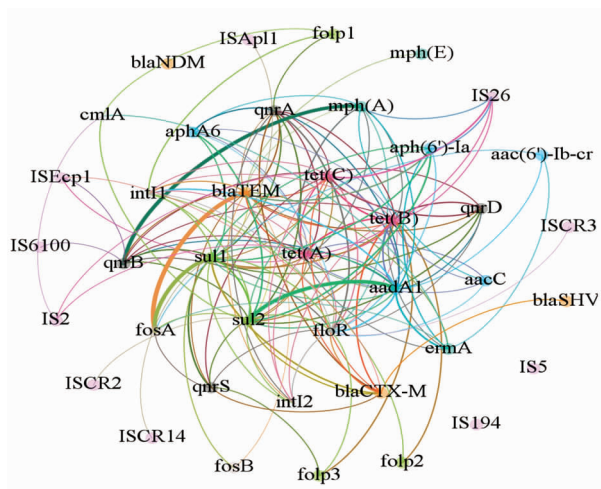


图4 嘉兴市耐药基因与可移动元件共现网络分析  
Fig.4 Co-occurrence analysis of ARGs and MGE in Jiaxing

药表型很可能同时出现。而 I 型整合酶与 *sul1*、*bla<sub>TEM</sub>*、*tet(C)*、*sul2*、*tet(B)*、*floR* 存在共现关系,说明这几类耐药基因随 I 型整合子传播的风险较大。

### 3 讨论

多年来,抗生素作为促进畜禽生长、预防和治疗细菌性疾病的药物被广泛用于畜禽养殖业<sup>[14]</sup>,然而,抗生素的不合理使用对养殖环境中的细菌造成了长期的选择性压力<sup>[15]</sup>,导致了动物源性耐药菌大量出现,并可借助质粒、整合子等可移动元件跨种属传播耐药基因<sup>[16]</sup>,而耐药菌又可通过动物性食品生产链传播给相关工作人员或通过食品商品传播给消费者,严重影响食品卫生与安全<sup>[17]</sup>。大肠杆菌是广泛存在于人体肠道与畜禽养殖环境中的一种条件致病菌,同时也是极为重要的耐药基因“储存库”<sup>[18]</sup>。本研究在浙江省湖州、嘉兴、绍兴三市共分离得到 234 株大肠杆菌对磺胺类、四环素有较高的耐药率,其他研究中江苏省鸡源大肠杆菌对复方新诺明与四环素的耐药率为 75%与 85%,山东省鸡源大肠杆菌对这两类抗生素的耐药率为 93.33%与 100%,说明复方新诺明与四环素的耐药率在多个地区均处于较高水平,这可能与这两种药物在养殖过程中大量使用有关。在 3 市中,嘉兴市分离株对美罗培南的耐药率最高,为 17.63%,而其他研究中湖南省养殖场分离的大肠杆菌对美罗培南的耐药率为 0%<sup>[19]</sup>,在新疆分离的鸡源大肠杆菌对美罗培南的耐药率为 85.71%<sup>[20]</sup>,这表明美罗培南的耐药率在各地差异较大,这可能与养殖过程中的用药量差异有关。本研究中 3 市大肠杆菌分离株对环丙沙星的耐药率均在 20%以上,且嘉兴市最高,超过了 40%,而其他研究中从某养殖场分离的大肠杆菌对氟喹诺酮类抗生素的耐药率均在 40%以上<sup>[21]</sup>,从江苏泰州地区分离的大肠杆菌对环丙沙星的耐药率为 51.9%<sup>[22]</sup>,从腹泻猪源分离的大肠杆菌对氟喹诺酮类抗生素的耐药率达到了 60%<sup>[23]</sup>,表明全国范围内不同地区间大肠杆菌对氟喹诺酮类抗生素存在不同程度的耐药性,而我国于 2016 年禁用了 4 种喹诺酮类药物在养殖业中使用,说明氟喹诺酮类抗生素耐药基因已广泛传播。

本研究中四环素类耐药基因 *tet(A)* 与磺胺类耐药基因 *sul1* 的总体检出率较高,*tet(B)* 在嘉兴市检出率较高,而 *sul2* 在绍兴市检出率较高,与表型结果相一致,嘉兴市大肠杆菌分离株中的耐药基因与可移动元件的共现网络分析表明,四环素耐药基因与磺胺类耐药基因是嘉兴市肉鸡养殖场中非常重要的耐药基因,处于共现网络的中心,能与其它多种耐药基因发生共传递。其它研究中,在贵州地区分离的猪源大肠杆菌中 *tet(A)* 的检出率为 92.6%,*tet(B)* 为 41.5%<sup>[24]</sup>;在河南地区分离的猪源大肠杆菌 *tet(A)* 的检出率为 87.1%,*tet(B)* 为 0%<sup>[25]</sup>;而在唐山及秦皇岛地区分离的鸡源大肠杆菌 *tet(A)* 的检出率为 86.4%,*tet(B)* 为 81.8%<sup>[26]</sup>。*tet(A)* 在全国畜禽源大肠杆菌的检出率均处于较高的水平,*tet(B)* 的检出率则有着明显的地域性差异,随着耐药基因的不断传播,*tet(B)* 在各地的检出率仍有提高的风险。除此之外, $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>TEM</sub>* 在湖州市大肠杆菌分离株中的检出率达到了 91%,嘉兴与绍兴分离株的耐药率分别为 78%、62%。对比其它研究中,昆明某养殖场分离的鸡源大肠杆菌 *bla<sub>TEM</sub>* 为 77%<sup>[27]</sup>;采集于河南某养殖场中的猪源大肠杆菌 *bla<sub>TEM</sub>* 检出率为 77%<sup>[28]</sup>;分离自上海地区的猪源大肠杆菌 *bla<sub>TEM</sub>* 的检出率为 88.5%<sup>[29]</sup>;分离自山东莱西的鸡源大肠杆菌 *bla<sub>TEM</sub>* 的检出率为 72%<sup>[30]</sup>。*bla<sub>TEM</sub>* 可介导 ESBLs 的产生,且 TEM 型酶有 115 种,是目前数量最多的 ESBLs<sup>[31]</sup>,由此对青霉素类、头孢菌素及单环酰胺类抗生素产生耐药性<sup>[32]</sup>,给临床治疗带来了巨大威胁。而共现网络分析表明,*bla<sub>TEM</sub>* 与磷霉素耐药基因 *fosA* 有较高的共转移频率,有研究报道 *fosA3* 常通过质粒与 ESBLs 基因共转移,且与 IS26 相关,这与本研究结果相一致。而磷霉素可用于对产 ESBLs 大肠杆菌的治疗<sup>[33]</sup>,但随着这两种基因的共转移,产 ESBLs 大肠杆菌对磷霉素耐药率不断提高,大大削弱了磷霉素对其的治疗效果。

### 4 结论

本研究从 720 份肉鸡源样品中分离鉴定出 234 株大肠杆菌,通过对表型与基因型的鉴定,发现大肠杆菌对养殖过程中常用的四环素、磺胺类、头孢类抗生素具有较高的耐药率,*tet(A)*、*sul1*、

*bla<sub>TEM</sub>*、*mph* (A)、*aadA1* 在 3 市中均有较高的检出率。对整体耐药情况比较严重的嘉兴市分离株大肠杆菌的共现网络分析表明, *qnrA*–*mph* (A)、*fosA*–*sul1*、*fosA*–*bla<sub>TEM</sub>*、*sul2*–*aadA1* 这 4 组耐药基因存在较高的耐药频率, 需要对这 7 种耐药基因进行重点监测。本研究对保障动物性食品安全, 控制耐药性传播提供了理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] ZHAI R, FU B, SHI X, et al. Contaminated in-house environment contributes to the persistence and transmission of NDM-producing bacteria in a Chinese poultry farm [J]. *Environment International*, 2020, 139: 105715.
- [2] IBRAHIM R A, CRYER T L, LAFI S Q, et al. Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors [J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 159.
- [3] KABIR, LUTFUL S M. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010, 7(1): 89–114.
- [4] 刘凯迪, 罗华东, 王琳琳, 等. 东南沿海地区水禽源大肠杆菌耐药表型及耐药基因型的调查 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(12): 12.  
LIU K D, LUO H D, WANG L L, et al. Investigation on drug resistant phenotype and genotype of *Escherichia coli* from waterfowl in southeast coastal China [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(12): 12.
- [5] HG A, GF A, GC A, et al. Confronting ceftolozane-tazobactam susceptibility in multidrug-resistant *Enterobacteriales* isolates and whole-genome sequencing results (STEP Study) – science direct [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2021, 57(2): 106259.
- [6] 高玉斌, 赵格, 邹明, 等. 我国不同区域鸡源大肠杆菌的致病性与耐药性分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55(3): 5.  
GAO Y B, ZHAO G, ZOU M, et al. Analysis of virulence gene carrying and drug resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in different regions of China [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 55(3): 5.
- [7] 唐标, 陈凌云, 罗怡, 等. 2019 年浙江和福建沙门氏菌和弯曲杆菌的耐药性分析 [J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(12): 8.  
TANG B, CHEN L Y, LUO Y, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolated from Zhejiang and Fujian province in 2019 [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(12): 8.
- [8] TISEO K, HUBER L, GILBERT M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030 [J]. *Antibiotics*, 2020, 9(12): 918.
- [9] 唐标, 郝运, 林家辉, 等. 浙江省 2 市动物源大肠埃希菌及肠球菌耐药性比较和分析 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2021, 47(5): 13.  
TANG B, HAO Y, LIN J H, et al. Comparison and analysis of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus* isolated from animals in Jinhua city and Taizhou city of Zhejiang province [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2021, 47(5): 13.
- [10] ALTSCHUL S F. Basic local alignment search tool (BLAST) [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 215(3): 403–410.
- [11] KRISTOPHER J. PREACHER, ANDREW F. HAYES. SPSS and SAS procedures for estimating indirect effects in simple mediation models [J]. *Behavior Research Methods Instruments & Computers*, 2004, 36(4): 717–731.
- [12] BASTIAN M, HEYMANN S, JACOMY M. Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks [C]. *Proceedings of the Third International Conference on Weblogs and Social Media. ICWSM 2009*, 2009, 62(8): 17–20.
- [13] KENNETH K, DARYL D P, MARY M, et al. 1450. Frequency of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among respiratory pathogens impacts first-line beta-lactam susceptibility: Potential role for ceftolozane/tazobactam (C/T) and/or imipenem/relebactam (I/R) [J]. *Open Forum Infectious Diseases*, 2020, 7(1): S1
- [14] CHENG G, NING J, AHMED S, et al. Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production [J]. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2019, 8(1): 158–171.
- [15] FANG H, HAN L X, CUI Y L, et al. Changes in

- soil microbial community structure and function associated with degradation and resistance of carbendazim and chlortetracycline during repeated treatments[J]. *The Science of the Total Environment*, 2016, 572(deca1): 1203–1212.
- [16] HE T, WANG R, LIU D, et al. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(9): 1.
- [17] LISA, BARCO, SIMONE, et al. *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* counts on poultry carcasses along the slaughter processing line, factors influencing the counts and relationship between visual faecal contamination of carcasses and counts: a review[J]. *EFSA Supporting Publications*, 2014, 11(8): 636.
- [18] PHONGPAICHIT S, WUTTANANUPAN K, SAMASANTI W. Class 1 integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* isolates from human stools[J]. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 2008, 39(2): 279.
- [19] 唐标, 陈怡飞, 陈聪, 等. 2019年湖南省部分地区鸡, 鸭, 猪源大肠杆菌耐药性调查[J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53(4): 54–60.
- TANG B, CHEN Y F, CHEN C, et al. Investigation of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from chickens, ducks and pigs in some areas of Hunan Province in 2019[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 53(4): 54–60.
- [20] 刘聚祥, 李宏娟, 李占雷, 等. 我国部分地区鸡致病性大肠杆菌的耐药性检测与分析[J]. *河北农业大学学报*, 2007, 30(5): 5.
- LIU J X, LI H J, LI Z L, et al. Resistance detection and analysis of pathogenic to *Escherichia coli* antimicrobials in chicken farms[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2007, 30(5): 5.
- [21] 刘艳红, 吕淑霞, 李颖, 等. 大肠杆菌耐药性及氟苯尼考耐药基因 *floR* 的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(1): 4.
- LIU Y H, LV S X, LI Y, et al. Investigation of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *floR* gene[J]. *Science and Technology*, 2017, 53(1): 4.
- [22] 王婧, 刁小龙, 陈晓兰, 等. 猪源大肠埃希菌喹诺酮类耐药基因的检测与分析[J]. *甘肃农业大学学报*, 2020, 55(2): 7.
- WANG J, DIAO X L, CHEN X L, et al. Detection and analysis of resistance genes in quinolones-resistant *Escherichia coli* isolated from swine[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2020, 55(2): 7.
- [23] 张俊丰, 陈琳, 魏冬霞, 等. 92株猪腹泻大肠杆菌的耐药性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2010(11): 153–156.
- ZHANG J F, CHEN L, WEI D X, et al. Analysis of resistance for 92 diarrheal *Escherichia coli* isolate from pig farms[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010(11): 153–156.
- [24] 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]. 贵州: 贵州大学, 2018.
- WANG X J. Investigation on tetracycline resistance and antibiotics resistance gene correlation of *Escherichia coli* in Guizhou province [D]. Guizhou: Guizhou University, 2018.
- [25] 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 swine in Henan province[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2017, 46(9): 144–148.
- [26] 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(6): 67–69.
- LI Y Y, GE C, JIAO H J, et al. Detection of antibiotics resistance and resistance genes of pathogenic *Escherichia coli* from broilers in Tangshan and Qinhuangdao[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2019(6): 67–69.
- [27] 吴海滨, 杨娟, 周杰珑, 等. 鸡源大肠杆菌的分离鉴定及耐药特性分析[J]. *黑龙江畜牧兽医: 下半月*, 2017(5): 97–99.
- WU H B, YANG J, ZHOU J L, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Escherichia coli* from chicken[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(5): 97–99.
- [28] 张青娟, 许峰, 王克领, 等. 猪源产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶大肠杆菌的耐药性调查与耐药基因型分析[J]. *养猪*, 2019, 4(4): 105–109.
- ZHANG Q X, XU F, WANG K L, et al. Investigation of antibiotics resistance and genotype analysis of ESBLs producing *Escherichia coli* from swine[J]. *Swine Production*, 2019, 4(4): 105–109.
- [29] 刘雅妮, 商军, 郭士博. 猪源分离大肠埃希菌产 ES-



- BLs 的基因型及耐药性分析[J]. 中国兽药杂志, 2012, 45(9): 255-259.
- LIU Y N, SHANG J, GUO S B. Genotypes and antibiotics resistance analysis of ESBLs producing *Escherichia coli* from swine[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 45(9): 255-259.
- [30] 曲志娜, 张颖, 李玉清, 等. 鸡、猪大肠杆菌 ES-  
BLs 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.
- [31] 周炜, 周芷锦, 沈红霞, 等. 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[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(7): 59-68.
- ZHOU W, ZHOU Z J, SHEN H X, et al. Progress on the antibiotics resistance related Genes of *Escherichia coli* from swine and chicken in China[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(7): 59-68.
- [32] SMILINE A S G, VIJAYASHREE J P, PARAMASIVAM A. Molecular characterization of plasmid-encoded  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  and  $bla_{CTX-M}$  among extended spectrum beta-lactamases[ESBLs] producing *Acinetobacter baumannii*[J]. British Journal of Biomedical Science, 2018, 75(4): 200-202.
- [33] OLIVIER C, MARIE L, SOPHIE V, et al. The CTX -M -15 -producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 61(5): 1024-1028.

### Analysis of Antibiotic Resistance Phenotype and Genotype of *Escherichia coli* from Broilers in Zhejiang Province

Zong Shuaizhou, Xin Lina, Bai Jiaqi, Han Jianzhong, Qu Daofeng\*  
(Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

**Abstract** 720 samples of feces, soil and sewage were collected from 12 broiler farms in Huzhou, Jiaxing and Shaoxing cities in this study. 234 isolates of *Escherichia coli* were identified by 16s rRNA sequencing, antibiotic-resistant phenotypes were determined by K-B (Kirby-Bauer), antibiotic-resistant genotypes and integrons were identified by PCR. The transfer risk of antibiotic resistance of *Escherichia coli* was analyzed by co-occurrence network. 234 isolates of *Escherichia coli* were highly resistant to cefazolin, azithromycin, tetracycline and sulfonamides, and the resistance rate of isolates in Jiaxing to 17 antibiotics was higher than that in the other two cities. The results of genotype identification showed that the detection rate of *aadA1* was the highest among the 234 strains of *Escherichia coli*, which was 88.89%, followed by tet (A), *sul1* and  $bla_{TEM}$ , respectively. Among the 29 antibiotic resistance genes, the detection rate of 18 genes in Jiaxing was higher than that in the other two cities. The detection rates of type I integrase in Huzhou, Jiaxing and Shaoxing were 28.38%, 40.96% and 32.47%, respectively. The results showed that the antibiotic resistance rate and the detection rate of antibiotic resistance genes of isolates in Jiaxing were relatively high. Co-occurrence network analysis showed that there was a high risk of co-transfer of *qnrB* and *mph(A)*, *fosA* and  $bla_{TEM}$ , *fosA* and *sul1*, *sul2* and *aadA1* in *E. coli* in Jiaxing. In summary, this study investigated antibiotic resistance and transmission risk in three cities of Zhejiang Province, providing scientific guidance for ensuring animal food safety and monitoring key specific antibiotic resistance genes.

**Keywords** broiler; *Escherichia coli*; resistance genes; co-occurrence network