

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.03.033

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

李庆周, 马素贞, 孔令汉, 江伟, 王红宁

(四川大学生命科学学院动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室,
生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 调查规模化鸡场中产 CMY-2 大肠杆菌耐药基因与毒力基因的流行现状及共转移情况, 对 549 株来源于鸡场粪样和苍蝇的大肠杆菌进行 bla_{CMY-2} PCR 检测; K-B 法检测耐药表型; PCR 扩增 19 种相关耐药基因和 14 种毒力基因; 接合试验和质粒复制子分型研究耐药基因与毒力基因的共转移. 结果显示: 6.0% (33/549) 大肠杆菌呈 CMY-2 阳性, 且均为多重耐药; 检测到 15 种耐药基因和 4 种毒力基因, 其中 $floR$, bla_{TEM-1} , $sul2$, $sul1$, $traT$, $VagC$ 检出率较高; 63.6% 产 CMY-2 大肠杆菌中 bla_{CMY-2} 基因可通过 $IncA/C$ 或 $IncII$ 质粒与耐药基因和 (或) 毒力基因共转移. 本研究表明规模化鸡场粪样和苍蝇源产 CMY-2 大肠杆菌已成为耐药基因和毒力基因的重要储存库, 携带二者质粒的转移导致耐药与毒力的传播扩散.

关键词: 鸡场; 大肠杆菌; CMY-2; 耐药基因; 毒力基因; 共转移

中图分类号: S8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)02-0417-06

Investigation and co-transfer of resistance genes and virulence genes among *Escherichia coli* producing CMY-2 in large-scale poultry farms

LI Qing-Zhou, MA Su-Zhen, KONG Ling-Han, JIANG Wei, WANG Hong-Ning

(Animal Disease Prevention and Food Safety Key Laboratory of Sichuan Province, Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The co-transfer of resistance genes and virulence genes among CMY-2-producing *Escherichia coli* from large-scale poultry farms in China was investigated. PCR was used to examine the presence of bla_{CMY-2} in 549 *E. coli*. Antimicrobial susceptibilities were tested by diffusion methods. Gene detection and co-transfer were performed for 19 resistance genes and 4 virulence genes by PCR, conjugation experiment, and PBRT. Results showed 6.0% (33/549) isolates with multiple resistance carried bla_{CMY-2} gene. 15 resistance genes and 4 virulence genes were detected with high rate of $floR$, bla_{TEM-1} , $sul2$, $sul1$, $traT$, and $VagC$. Co-transfer of resistance genes and virulence genes by plasmids of $IncA/C$ or $IncII$ was detected in 63.6% CMY-2-positive *E. coli*. This study demonstrated *E. coli* producing CMY-2 has become reservoirs of resistance genes and virulence genes and plasmids coharboring these two factors lead to its dissemination among large-scale poultry farms.

Keywords: Poultry farm; *Escherichia coli*; CMY-2; Resistance genes; Virulence gene; Co-transfer

收稿日期: 2016-03-25

基金项目: 国家蛋鸡产业技术体系岗位科学家项目(CARS-41-K09); 国家重点基础研究计划(2013CB127200)

作者简介: 李庆周(1989-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 从事细菌耐药性研究. E-mail: lqz1130275255@sina.cn

通讯作者: 王红宁. E-mail: whongning@163.com.

1 引言

大肠杆菌(*Escherichia coli*)属于革兰氏阴性肠杆菌科细菌,是一种重要的人兽共患条件致病菌,在特定的条件下可以引起畜禽大肠杆菌疾病,同时危害人类健康.在畜禽养殖过程中,针对大肠杆菌疾病的治疗, β -内酰胺类抗生素是最重要也是使用最多的抗菌药物之一^[1].特别是近年来三代头孢菌素的广泛使用,导致细菌耐药性问题日趋严重.质粒介导 AmpC β -内酰胺酶的产生是大肠杆菌对三代头孢菌素耐药的一个重要机制,由于其可以介导大肠杆菌对所有三代头孢菌素的传播性耐药,且不被酶抑制剂所抑制,自从 1989 年被发现以来就备受关注^[2].目前,已经报道的质粒介导的 AmpC β -内酰胺酶已有 70 余种,其中 CMY-2 在全球范围内最为流行,且在规模化鸡场中被广泛报道^[3].

在大肠杆菌中,CMY-2 β -内酰胺酶通常定位于可转移质粒上,例如 IncA/C、IncI1 质粒,这些质粒同时也携带多种其他抗菌药物的耐药基因^[4]以及一些引起细菌致病性的毒力因子^[5],随着质粒的转移,耐药基因及毒力基因在规模化鸡场中共同转移,增加了大肠杆菌疾病感染的风险以及治疗的难度和费用^[6].

近年来,规模化鸡场耐药大肠杆菌在环境、畜禽动物及人之间的传播已经引起了广泛关注^[7].在规模化鸡场中,粪样是耐药性大肠杆菌的重要来源之一,此外,苍蝇作为耐药基因的一个重要储存库,也愈发引起了人们的关注.研究报道表明,苍蝇能够介导细菌耐药性在环境与人之间的传播^[8].但对于规模化鸡场苍蝇中大肠杆菌耐药性的传播研究较少,尤其是耐药基因与毒力基因的共传播.

因此,本研究旨在调查我国 20 个规模化鸡场苍蝇与粪样中产 CMY-2 大肠杆菌耐药基因及毒力基因的流行情况,并对耐药基因与毒力基因的共转移机制进行初步研究,为规模化鸡场大肠杆菌传播控制及疫病防控提供一定的科学依据.

2 材料与方法

2.1 材料

大肠杆菌标准菌株(ATCC 25922)、肺炎克雷伯菌标准菌株(ATCC 700603)、沙门氏菌标准菌株(H 9812)由动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室保存.伊红美蓝培养基,胰蛋白胨,酵母浸出膏,氯化钠,MH 琼脂,营养琼脂,购自北京陆桥技术有限公司.*Xba* I 限制性酶,购自大连宝

生物有限公司.TSA 琼脂,购自北京全式金生物技术有限公司.药敏纸片购自北京欣隆福医药销售有限公司.

2.2 方法

2.2.1 大肠杆菌分离与鉴定 2013 年 9 月至 2015 年 12 月,采集 20 个规模化鸡场粪便样品 396 份、苍蝇样品 238 份,接种于伊红美蓝选择性培养基上,37 °C 培养 16~18 h,挑取金属光泽的单个菌落进行革兰氏染色,并进行 16S rDNA 菌种鉴定.

2.2.2 产 CMY-2 阳性菌株的筛选 将分离鉴定的大肠杆菌菌株接种于含有 8 μ g/mL 头孢西丁的营养琼脂培养基上,37 °C 培养 16~18 h,挑取阳性菌株,采用煮沸法提取细菌基因组 DNA,PCR 扩增 *bla*_{CMY-2} 阳性菌株.PCR 引物为 F:5'-GCCGTT-GCCGTTATCTACC-3', R: 5'-TGTCGCTGC-CGTTGATGA-3';PCR 反应体系为:上下游引物各 1 μ L, Taq Master Mix 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L,用超纯水补充至 25 μ L; PCR 反应程序为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 5 min. 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,测序,并进行 BLAST 比对分析.

2.2.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型 将产 CMY-2 大肠杆菌阳性菌株包埋于小胶块中,裂解,*Xba* I 酶切,并按以下条件于 CHEF-DR III 装置中进行电泳;温度 14 °C,电压 6.0 V/cm,起始缓冲时间 6.76 s,终止缓冲时间 35.38 s,电泳 16.5 h. 结束电泳,用凝胶成像系统采集图像,并用 Quantity One(4.6.2)软件处理分析,确定菌株间的遗传进化关系.

2.2.4 药敏试验 采用 K-B 纸片法检测产 CMY-2 大肠杆菌阳性菌株对 13 种抗菌药物的耐药性,具体步骤参照美国临床实验室标准化委员会 CLSI (2015)推荐的实验操作方法及判定标准.

2.2.5 耐药基因和毒力基因 PCR 检测 参考相关文献^[3,9-13]已报道的引物,采用 PCR 方法检测 19 种耐药基因(*bla*_{TEM},*bla*_{SHV},*bla*_{OXA},*bla*_{CTX-M},*tetA*,*tetC*,*sul1*,*sul2*,*sul3*,*qnrABCDS*,*aac*(6')-*Ib-cr*,*qepA*,*oqxA*,*rmtB*,*floR*)和 14 种毒力基因(*iutA*,*traT*,*fyuA*,*hlyA*,*VagC*,*papC*,*papEF*,*papAH*,*katP*,*stx1*,*stx2*,*eae*,*espP*,*kpsMTIII*). 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,测序,并进行 BLAST 比对分析.

2.2.6 接合试验与质粒复制子分型 以产 CMY-2 大肠杆菌阳性菌株为供体菌,大肠杆菌 C 600 为

受体菌, 采用膜接合法进行细菌接合转移试验, 用舍头孢西丁 (8 μg/mL) 和利福平 (400 μg/mL) 的双抗平板筛选阳性接合子. 挑取疑似接合子, 进行药敏试验并检测其他耐药基因和毒力基因. 参照 Alessandra Carattoli 等^[14] 报道的方法进行接合子质粒复制子分型 (PBRT), 检测转移质粒的类型.

3 结 果

3.1 大肠杆菌分离与鉴定结果

从规模化鸡场采集的 634 份样品中共分离鉴定出大肠杆菌 549 株, 其中粪样中 367 株, 苍蝇样品中 182 株, 详见表 1.

表 1 规模化鸡场中大肠杆菌来源及数量

Tab. 1 The source and number of *E. coli* in poultry farms

样品来源	样品数量	菌株数量	分离率 (%)
粪样	396	367	92.7
苍蝇	238	182	76.5
总计	634	549	86.6

3.2 产 CMY-2 阳性菌株筛选结果

共检测到 33 株产 CMY-2 大肠杆菌, 阳性率为 6.0%; 其中粪便样品中 21 株, 检出率为 5.7%, 苍蝇样品中 12 株, 检出率为 6.5%. 图 1 显示了部分

产 CMY-2 大肠杆菌阳性菌株 *bla*_{CMY-2} 基因检测结果.

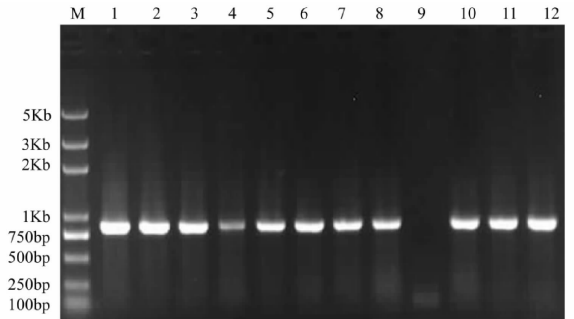


图 1 *bla*_{CMY-2} 基因部分扩增结果. M 为 DNA Maker 1-8, 10-12 泳道为 *bla*_{CMY-2} 基因片段, 9 泳道为阴性对照

Fig. 1 Results of amplification for *bla*_{CMY-2} gene in a part of *E. coli* producing CMY-2.

Lane M; 2 kb DNA ladder, lane (1-8, 10-12); 11 amplified fragments of *bla*_{CMY-2}, lane 9: Negative.

3.3 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型结果

经 Quantity One (4.6.2) 软件分析处理, 把相似性大于或等于 90% 的菌株看作起源相同的分离株^[15]. 由图 2 产 CMY-2 大肠杆菌阳性菌株分型研究可知, 33 株菌株整体相似性较低, 其中来自于具有垂直传播关系的三个鸡场分离的 5 株菌相似性大于 90%, 属于同一克隆, 其他 28 株菌相似性均小于 90%.

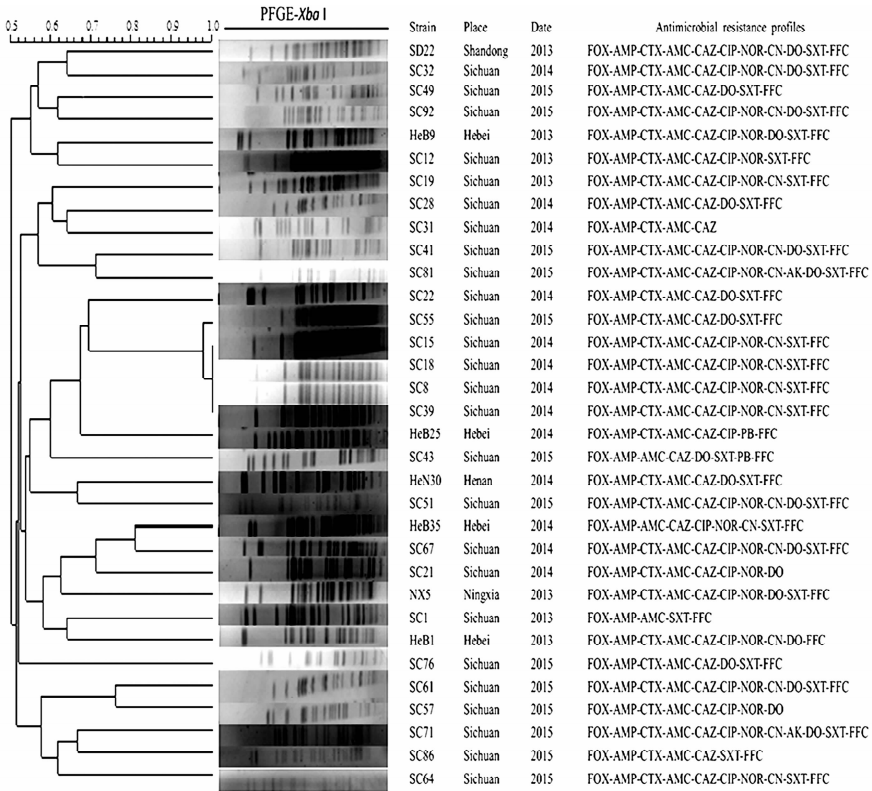


图 2 33 株产 CMY-2 大肠杆菌 X-ba I-PFGE 图谱与耐药谱分析结果

Fig. 2 Results of X-ba I-PFGE typing and resistance profiles of 33 *E. coli* producing CMY-2

3.4 药敏试验结果

由图 3 可知,产 CMY-2 大肠杆菌阳性菌株对氨基西林及阿莫西林克拉维酸耐药率较高(100%/100%),对多粘菌素及亚胺培南耐药率较低(6.1%/0),且所有产 CMY-2 大肠杆菌均表现为多重耐药,其中,25.0%的菌株表现六重耐药,36.1%的菌株表现七重耐药,25.0%的菌株表现八重耐药,耐药谱详见图 2。

3.5 耐药基因和毒力基因检测结果

在产 CMY-2 大肠杆菌阳性菌株中,共检测出 15 种耐药基因,其中 β 内酰胺类耐药基因 *bla*_{TEM-1},四环素耐药基因 *tetA*,磺胺类耐药基因 *sul1*,*sul2* 以及 *floR* 基因检出率较高,分别为 84.8% (28/33),72.7% (24/33),75.7% (25/33),81.8% (27/33)以及 90.9% (30/33)。所有阳性菌株至少携带四种耐药基因,包括 26 个不同的多重耐药基因组合,最为普遍的组合为 *bla*_{CMY-2},*bla*_{TEM-1} 和 *floR*(n=28,84.5%);检测出 *iutA*,*traT*,

VagC,*fyuA* 四种毒力基因,检出率依次为 *traT* (29/33, 87.9%),*iutA* (18/33, 54.5%),*VagC* (24/33, 72.7%),*fyuA* (11/33, 33.3%)。97% (32/33)的阳性菌株至少携带一种毒力基因,其中,18.2% (6/33)阳性菌株同时携带四种毒力基因,详见表 2。

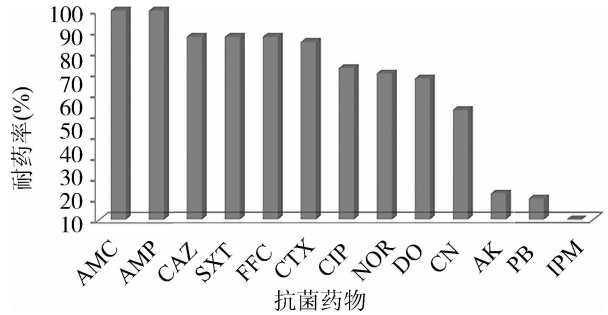


图 3 33 株产 CMY-2 大肠杆菌菌株对 13 种抗菌药物的耐药率(%)
Fig. 3 Resistance rate of 33 *E. coli* isolates producing CMY-2 to 13 antimicrobials (%)

表 2 规模化鸡场中产 CMY-2 大肠杆菌菌株特征及耐药基因与毒力基因

Tab. 2 Characteristics, other resistance genes and virulence genes of *E. coli* isolated from poultry farms

菌株	来源	地点	其他耐药基因	毒力基因
SC1	粪样	鸡场 1	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>tetA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
SC19	粪样	鸡场 3	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>fyuA</i>
SD22	粪样	鸡场 4	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC39	粪样	鸡场 8	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i>
HeB35	粪样	鸡场 10	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
SC21	粪样	鸡场 5	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul1</i> , <i>tetA</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i>
NX5	粪样	鸡场 12	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
HeN30	粪样	鸡场 11	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i>
HeB1	粪样	鸡场 9	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
SC18	粪样	鸡场 7	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i>
HeB9	粪样	鸡场 6	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
SC12	粪样	鸡场 2	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>qnrD</i> , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
SC8	粪样	鸡场 2	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC31	粪样	鸡场 13	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>sul1</i> , <i>tetA</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC57	粪样	鸡场 16	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul1</i> , <i>tetA</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
SC67	粪样	鸡场 17	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>VagC</i>
SC81	粪样	鸡场 18	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i> , <i>rmtB</i>	<i>traT</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
SC43	粪样	鸡场 15	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrD</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i>
SC28	粪样	鸡场 5	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>qnrD</i> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i>
SC86	粪样	鸡场 20	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>qnrD</i> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>tetC</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i>
SC61	粪样	鸡场 16	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i> , <i>fyuA</i>
SC71	苍蝇	鸡场 18	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i> , <i>rmtB</i>	-
SC76	苍蝇	鸡场 19	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i>
SC49	苍蝇	鸡场 15	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC92	苍蝇	鸡场 20	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>qnrB</i> , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC51	苍蝇	鸡场 16	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC64	苍蝇	鸡场 16	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC41	苍蝇	鸡场 14	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC22	苍蝇	鸡场 3	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>oxxA</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC15	苍蝇	鸡场 16	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i>
SC32	苍蝇	鸡场 14	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i>
HeB25	苍蝇	鸡场 15	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>qnrS</i> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>floR</i>	<i>iutA</i> , <i>traT</i> , <i>VagC</i> , <i>fyuA</i>
SC55	苍蝇	鸡场 16	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>traT</i>

3.6 接合转移和质粒复制子分型结果

共筛选到 21 株 *bla*_{CMY-2} 阳性接合子, 接合转移效率为 $10^{-3} \sim 10^{-8}$, 其中 18 株定位于 *IncI1* 质粒, 3 株定位于 *IncA/C* 质粒, 11 株接合子同时携带 *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-55}, *tetA*, *sul2*, *aac*(6')-*Ib-cr*, *floR* 基因中的一种或几种, 3 种毒力基因 *iutA*、*traT* 和 *VagC* 分别在 7 株、2 株和 1 株接合子中被检测到, 值得注意的是, 8 株接合子同时携带多种耐药基因和毒力基因, 详见表 3。

表 3 接合子特征及共转移耐药基因与毒力基因

Tab. 3 Characteristics of transconjugants with co-transferred resistance genes and virulence genes

分组	质粒编号	质粒不相容群	共转移耐药基因	共转移毒力基因
A	SC28-1	<i>IncI1</i>	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	<i>traT</i>
	SC92-1	<i>IncI1</i>	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>floR</i>	<i>traT</i>
	HeB35-15	<i>IncI1</i>	<i>floR</i>	<i>traT</i>
	HB25-9	<i>IncI1</i>	<i>floR</i>	<i>iutA</i>
	SC12-1	<i>IncI1</i>	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>floR</i>	<i>traT</i>
	SC57-7	<i>IncI1</i>	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	<i>traT</i>
	SD22-3	<i>IncA/C</i>	<i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	<i>VagC</i>
	SC19-1	<i>IncA/C</i>	<i>sul2</i> , <i>floR</i>	<i>iutA</i>
	SC86-5	<i>IncI1</i>	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	—
	B	SC21-2	<i>IncI1</i>	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>
SC1-2		<i>IncA/C</i>	<i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>floR</i>	—
SC55-2		<i>IncI1</i>	—	<i>traT</i>
C	SC76-2	<i>IncI1</i>	—	<i>traT</i>
	SC71-2	<i>IncI1</i>	—	—
	SC61-1	<i>IncI1</i>	—	—
	SC8-8	<i>IncI1</i>	—	—
D	HeN30-2	<i>IncI1</i>	—	—
	SC67-3	<i>IncI1</i>	—	—
	SC41-2	<i>IncI1</i>	—	—
	SC64-2	<i>IncI1</i>	—	—
	SC51-1	<i>IncI1</i>	—	—

注: A 组: 同时携带耐药基因与毒力基因; B 组: 仅携带耐药基因; C 组: 仅携带毒力基因; D 组: 不携带耐药基因与毒力基因。

4 讨论

本研究对我国 20 个规模化鸡场粪便与苍蝇样品中产 CMY-2 大肠杆菌的耐药基因与毒力基因进行了调查, 并对耐药与毒力的传播机制进行了初步研究. *bla*_{CMY-2} 基因的检出率为 6.0%, 与 2013 年郭玉芳等^[16] 的报道(2.09%) 相比有明显增加, 说明 *bla*_{CMY-2} 基因在规模化鸡场中呈上升趋势. 值得注意的是, 本研究首次在中国规模化鸡场苍蝇大肠杆菌中检测到 *bla*_{CMY-2} 基因, 检出率为 6.5%, 在某种程度上说明苍蝇能够携带耐药基因在鸡场中传播. 此外, 本研究中 *bla*_{CMY-2} 阳性菌株均表现为多重耐药, 且各种抗菌药物的耐药基因呈现出一定的

流行性, *bla*_{TEM-1}, *tetA*, *sul1* 和 *sul2* 检出率较高, 表明这些基因是编码细菌对其相应抗菌药物耐药的主要流行基因, 这与其他相关研究相一致^[17].

毒力基因是导致细菌致病性的一个重要因素, 可以与耐药基因共存于细菌中, 增加细菌危害^[18]. Yang 等^[12] 报道了鸡病料分离产 CTX-M 大肠杆菌中毒力基因的广泛存在. 但关于规模化鸡场中产 CMY-2 大肠杆菌毒力基因的报道相对较少. 本研究在 32 株产 CMY-2 大肠杆菌中检测到 4 种与大肠杆菌致病性相关的毒力基因, 苍蝇来源的 12 株阳性菌株中, 11 株检测到毒力基因的存在, 且有 9 株同时携带两种以上的毒力基因和多种耐药基因, 表明在规模化鸡场中苍蝇已成为耐药基因和毒力基因的一个重要储存库, 也暗示着苍蝇可能成为一种重要的传播媒介.

尽管已经证实了细菌中耐药基因与毒力基因的广泛存在, 但对二者关系的认识依旧较少, 目前一个公认事实是, 质粒转移是介导细菌耐药与毒力传播的一个重要机制^[19]. 本研究获得了 21 株 *bla*_{CMY-2} 阳性接合子, 质粒复制子分型显示, *IncI1* 质粒在调查菌株中广泛流行, 这与 Guo 等^[3] 调查的广东省动物源产 CMY-2 大肠杆菌中流行质粒 (*IncA/C*) 明显不同, 可能是与样品来源以及地域分布有关. 此外, *IncI1* 质粒和 *IncA/C* 质粒介导 *bla*_{CMY-2} 基因与耐药基因 *bla*_{TEM-1}、*bla*_{CTX-M-55}、*aac*(6')-*Ib-cr*、*tetA*、*sul2*、*floR* 和毒力基因 *iutA*、*traT*、*VagC* 中的一种或几种共转移. 尤其是 *traT* 基因, 表现出较高的转移频率(80.0%), 这可能与通常定位于可转移质粒上有关^[20]. 值得注意的是, 本研究首次在产 CMY-2 大肠杆菌 *IncI1* 质粒上发现一个 *bla*_{CMY-2}-*bla*_{TEM-1}-*bla*_{CTX-M-55}-*floR*-*traT* 耐药基因与毒力基因共转移组合, 但传播机制仍需进一步研究证实.

本研究结果表明规模化鸡场产 CMY-2 大肠杆菌多重耐药严重, 且流行性增加, 特别是苍蝇源大肠杆菌 *bla*_{CMY-2} 基因的检出, 是首次在中国鸡场报道, 证实了苍蝇已成为耐药基因的一个重要储存库. 多种耐药基因与毒力基因广泛共存, 且可以定位于相同质粒上, 通过质粒实现在鸡场与环境以及人之间的传递, 所以对规模化鸡场产 CMY-2 大肠杆菌中耐药基因与毒力基因进行实时监测, 可为耐药性传播及疾病防控提供参考.

参考文献:

[1] Trott D. β -lactam resistance in gram-negative patho-

- gens isolated from animals [J]. *Curr Pharma Des*, 2013, 19: 239.
- [2] Rubin J E, Pitout J D. Extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase and AmpC producing *Enterobacteriaceae* in companion animals [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 170: 10.
- [3] Guo Y F, Zhang W H, Ren S Q, *et al.* IncA/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China [J]. *PloS one*, 2014, 9: e96738.
- [4] Philippon A, Arlet G, Jacoby G A. Plasmid-determined AmpC-type-beta-lactamases [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46:1.
- [5] Habeeb MA, Haque A, Iversen A, *et al.* Occurrence of virulence genes, 16S rRNA methylases, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in CTX-M-producing *Escherichia coli* from Pakistan [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33: 399.
- [6] Fricke W F, McDermott P F, Mammel M K, *et al.* Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar kentucky isolates from poultry [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 5963.
- [7] Blaak H, Van hoek A H, Hamidjaja A R A, *et al.* Distribution, Numbers, and Diversity of ESBLs-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment [J]. *PloS one*, 2015, 10(8): e0135402.
- [8] Soli-Gines M, Gonzalez-lopez J J, Cameron-Veas K, *et al.* Houseflies (*Musca domestica*) as Vectors for Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Spanish Broiler Farms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(11): 3604.
- [9] 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 Pathog Dis*, 2011, 8(12):1241.
- [10] Kilani H, Abbassi M S, Ferjani S, *et al.* Occurrence of *bla*_{CTX-M-1}, *qnrB1* and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 5:38.
- [11] Messaia Y, Iabadenea H, Benhassine T, *et al.* Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria) [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2008, 56(5):319.
- [12] Yang Y, Zhang A, Li C, *et al.* Characteristics of Plasmids Coharboring 16SrRNA Methylases, CTX-M, and Virulence Factors in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Chickens in China [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2015, 12(11): 873.
- [13] Gow S P, Waldner C L. Antimicrobial resistance and virulence factors *stx1*, *stx2*, and *eae* in generic *Escherichia coli* isolates from calves in western Canadian cow-calf herds [J]. *Microb Drug Resist*, 2009, 15(1):61.
- [14] Carattoli A, Bertini A, Vill L, *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing [J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 63: 219.
- [15] 程茵,王红宁,张安云,等. 禽源沙门氏菌不同检测方法比较及分型研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2014, 51(3): 598.
- [16] 郭玉芳,赵秋云,郭芮,等. 动物源产 CMY-2 大肠杆菌流行病学调查研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(10): 47.
- [17] 武瑞兵,高玉敏,王鹏翔,等. 牛肉源大肠杆菌的耐药性检测及相关耐药基因分布[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(2): 452.
- [18] Koga V L, Scandorieiro S, Vespero E C, *et al.* Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among *Escherichia coli* Isolated from Conventional and Free-Range Poultry [J]. *Biomed Res Int*, 2015: 618752.
- [19] Venturini C, Beatson S A, Djordjevic S P, *et al.* Multiple antibiotic resistance gene recruitment onto the enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence plasmid [J]. *FASEB J*, 2010, 24: 1160.
- [20] Sukupolvi S, O'Connor C D. *Trat* lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1990, 54: 331.