

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20240805001

王灵舸, 沈留红, 唐俊妮, 等. 奶牛场环境中耐药大肠杆菌的分离及耐药基因遗传环境分析[J]. 生态毒理学报, 2025, 20(1): 329-343

WANG L G, SHEN L H, TANG J N, et al. Isolation of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and analysis of the genetic environment of antibiotic resistance genes from the environment of a dairy farm [J]. Asian journal of ecotoxicology, 2025, 20(1): 329-343

奶牛场环境中耐药大肠杆菌的分离及耐药基因遗传环境分析

王灵舸¹, 沈留红², 唐俊妮³, 韩新锋², 朱成林³, 赵珂^{1, #}, 邹立扣^{1, *}

1. 四川农业大学资源学院, 成都 611130

2. 四川农业大学动物医学院, 成都 611130

3. 西南民族大学食品科学与技术学院, 成都 601225

收稿日期: 2024-08-05 录用日期: 2024-10-14

摘要: 为了解四川某奶牛场环境中大肠杆菌的耐药情况及耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的遗传环境, 对从养殖场采集的样品进行大肠杆菌的分离鉴定, 进行最小抑菌浓度(the minimum inhibitory concentrations, MICs)测定, 并选择多重耐药大肠杆菌进行全基因组测序分析。共采集 36 份样品, 分离得到 18 株大肠杆菌。药敏试验显示大肠杆菌对四环素、阿莫西林的耐药率较高, 且大部分表现为多重耐药。耐药基因检测发现所有大肠杆菌均携带耐药基因 *bla*_{TEM}、*ampC*、*tetA* 和 *qnrA*, 53.33% 的大肠杆菌携带 *bla*_{CTX-M} 基因, 55.55% 的大肠杆菌携带 *tetM* 基因。通过二代全基因组测序, 8 株多重耐药大肠杆菌均检测到大量耐药基因及毒力基因, 对其耐药基因环境进行分析, 发现大肠杆菌 β -内酰胺类耐药基因、四环素类耐药基因上下游环境高度一致, 并存在转座子、插入序列(insertion sequences, ISs)等可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs), 有助于耐药基因在环境中的传播。其中, 发现 *bla*_{CTX-M-15} 基因上下游存在与 WbuC 家族杯状折叠金属蛋白基因关联的保守结构。该研究对奶牛场科学合理使用抗生素, 以及对养殖环境中耐药菌(antibiotic resistant bacteria, ARB)和耐药基因的监测具有重要意义。

关键词: 奶牛场; 大肠杆菌; 耐药性; 耐药基因环境

文章编号: 1673-5897(2025)1-329-15 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Isolation of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* and Analysis of the Genetic Environment of Antibiotic Resistance Genes from the Environment of a Dairy Farm

WANG Lingge¹, SHEN Lihong², TANG Junni³, HAN Xinfeng², ZHU Chenglin³, ZHAO Ke^{1, #}, ZOU Likou^{1, *}

1. College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

3. College of Food Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 601225, China

Received 5 August 2024 accepted 14 October 2024

基金项目: 四川省重大科技专项(2022ZDZX0017); 凉山州科技局项目(23CGZH0006)

第一作者: 王灵舸(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物, E-mail: wlg1263624330@163.com

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: zoulikou@sicau.edu.cn

共同通信作者(Co-corresponding author), E-mail: zkfish@163.com

Abstract: To understand the antibiotic resistance and the antibiotic resistance genes (ARGs) of *Escherichia coli* from a dairy farm in Sichuan Province, *Escherichia coli* strains were isolated from the dairy farm. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined, and whole-genome sequencing of multi-drug resistance strains was implemented. A total of 36 samples were collected, and 18 strains of *Escherichia coli* were isolated. Antimicrobial susceptibility test demonstrated that *Escherichia coli* had high resistance rate to tetracycline and amoxicillin, and most of the strains presented multi-drug resistance. All strains carried *bla*_{TEM}, *ampC*, *tetA* and *qnrA*, 53.33% of strains carried *bla*_{CTX-M}, and 55.55% of strains carried *tetM*. Whole-genome sequencing revealed that a large number of ARGs and virulence genes were identified in all 8 strains of *Escherichia coli*. The analysis of ARGs revealed that the upstream and downstream regions of the β -lactam-resistance genes and tetracycline-resistance genes of *Escherichia coli* were highly identical and harbored mobile genetic elements (MGEs), such as transposons and insertion sequences (ISs), which contributed to the spread of ARGs in the environment. Additionally, there was a highly conserved structure associated with cupin fold metalloprotein gene of WbuC family in the upstream and downstream regions of *bla*_{CTX-M-15}. This study has great significance for the rational utilization of antibiotics in dairy farms and the monitoring of antibiotic resistant bacteria (ARB) and ARGs in the breeding environment.

Keywords: dairy farm; *Escherichia coli*; antibiotic resistance; the genetic environment of antibiotic resistance gene

0 引言

随着我国养殖业的迅速发展,大规模集约化养殖逐渐取代散养式养殖,养殖规模和饲养密度的扩大使空气、水体、粪便和土壤等养殖环境中病原菌数量大大增加^[1]。为了预防与治疗动物感染以及促进动物的生长,大量抗生素被广泛使用。但抗生素进入动物体内时并不能完全被吸收利用,约有40%~90%的常规抗生素以原型或代谢物的形式从人类或动物体排出^[2-3]。由于许多抗生素是相对稳定的分子,很长一段时间内仍能存在于环境中^[4],目前已在 水体、土壤等环境中广泛检出^[5]。亚抑制浓度的抗生素可以作为细菌通信和信号的媒介,对抗生素耐药菌(antibiotic resistant bacteria, ARB)和抗生素耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的产生和传播起到了促进作用^[6-8]。近年来,研究发现 ARGs 在养殖环境中普遍存在,并可以通过质粒、整合子和转座子等可移动性遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)在微生物中广泛传播^[9-12]。

随着奶牛养殖不断朝集约化、现代化发展,牛奶产量极大提高,但奶牛养殖过程很容易受到疾病影响。大多数疾病是由养殖环境中存在的致病菌引发,其中奶牛呼吸道疾病、败血症、腹泻、脑膜炎及乳房炎等疾病均由环境中大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、链球菌和金黄色葡萄球菌等引发^[13]。抗菌药物在养殖场的普遍和大量使用使得病原菌的致病性越来越强,耐药性和多重耐药性也越来越强,为养殖业带来重大隐患。由于四川某地规模化奶牛养殖场奶牛细

菌性疾病频发,本研究对该养殖场不同样本进行大肠杆菌分离鉴定,开展药敏试验,分析菌株耐药现状,并进行耐药基因检测,进一步通过二代全基因组测序进行耐药菌的进化和基因环境研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

MH 肉汤培养基(MHB)、LB 肉汤培养基(LB)、胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)和胰酪大豆胨液体培养基(TSB)购自中国青岛海博生物技术有限公司;伊红美蓝琼脂培养基(EMB)、肠道菌增菌肉汤(EE)购自中国广东环凯生物技术有限公司;四环素($\geq 98\%$, HPLC)、阿莫西林($>90\%$, BR)、头孢噻吩钠($>98\%$, BR)、氧氟沙星($>98.5\%$, BR)、卡那霉素($\geq 750 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$, BR)、庆大霉素($>590 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$, BR)抗生素购自中国大连美仑生物技术有限公司;96 孔细胞培养板购自中国常德比克曼生物科技有限公司。

1.2 试验仪器

MaxQ6000 气浴摇振培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ABI9700 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;DGG-9146A 电热恒温培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;SW-CJ-2F 超净工作台购自中国江苏净化有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样本采集

四川省某奶牛场奶牛存栏 3 000 头,从该奶牛场不同牛舍中分别采集水样本 5 份、牛奶样本 11 份、垫料样本 5 份、饲料样本 4 份、粪便样本 7 份、粪

水样本 2 份及挤奶厅中奶杯拭子样本 2 份,共 36 份样本。

1.3.2 菌株分离鉴定及进化树分析

吸取 1 mL 液体样品或称取 1 g 固体样品分别加入 9 mL 肠道菌增菌液中,37 ℃ 180 r·min⁻¹培养 18~24 h。用接种环蘸取增菌液划线于伊红美蓝琼脂培养基上,37 ℃ 恒温培养 18 h。挑取具有绿色金属光泽的黑心菌落进行纯化,再挑取菌落进行涂片染色镜检,观察菌体形态及染色特性。

将分离得到的疑似大肠杆菌的分离株进行分子鉴定,用无菌棉签蘸取 TSA 琼脂平板上 3~4 个单菌落放入装有 1 mL 无菌水的离心管中涡旋混匀,100 ℃ 金属浴 20 min,12 000 r·min⁻¹离心 5 min,上清液即作为聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)模板备用。菌株 16S rRNA 的 PCR 扩增引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(25 μL):2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,ddH₂O 9 μL,上、下游引物各 1 μL,DNA 模板 1.5 μL。PCR 扩增程序为:预变性 94 ℃ 3 min,变性 94 ℃ 30 s,退火 58 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 1 min,循环数为 35 个,最后延伸 72 ℃ 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,然后送样中国生工生物工程有限公司(上海)测序,测序结果在美国国家生物技术信息中心网站(National Center for Biotechnology Information, NCBI)进行比对分析。并下载同源性相近的序列,用 MEGA11 软件进行分析并构建进化树。

1.3.3 药敏试验

由于该养殖场通过注射氨苄西林(β -内酰胺类抗生素)、氧氟沙星(喹诺酮类抗生素)、庆大霉素(氨基糖苷类抗生素)治疗奶牛疾病,本研究选择表 1 中 6 种抗生素进行药敏试验。根据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)^[14]标准,以大肠杆菌 ATCC 25922 为质控菌株,采用微量肉汤稀释法测定菌株对 6 种抗生素的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

将待测菌株纯培养物以及质控菌株在 TSA 平板上划线,(36±1) ℃ 培养 16~18 h,用无菌生理盐水制备 0.5 麦氏比浊的菌悬液,再使用生理盐水将菌悬液稀释 100 倍后待用。用已灭菌的双料 MHB 培养基将抗生素稀释成一系列浓度梯度。在 96 孔细胞培养板中分别加入 50 μL 稀释后的菌悬浮液以及 50 μL 含不同浓度抗生素的 MHB 培养基,在空

白的 96 孔细胞培养板中加入 50 μL 菌悬液和 50 μL 双料 MHB 培养基作为阳性对照,使用一次性聚合酶链式反应板膜将其密封,每个样品设置 3 个重复,在(36±1) ℃ 下培养 18 h。将 96 孔细胞培养板置于暗色、无反光物体表面上,撕开封口膜,以 96 孔板中未观察到细菌可见生长的最低抗生素浓度作为 MIC 值,并根据 CLSI 标准对被测菌株进行耐药统计。

1.3.4 耐药基因的 PCR 扩增及其序列分析

对耐药基因进行 PCR 扩增,耐药基因引物信息见表 2。PCR 反应体系(25 μL):2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,ddH₂O 9 μL,上、下游引物各 1 μL,DNA 模板 1.5 μL。PCR 扩增程序为:预变性 94 ℃ 3 min,变性 94 ℃ 30 s,退火 60 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 1 min,循环数为 35 个,最后延伸 72 ℃ 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将未纯化的 PCR 产物送至中国生工生物工程有限公司(上海)测序,并将测序结果在 NCBI 网站进行 Blast 比对分析。

1.3.5 多重耐药大肠杆菌全基因组测序

根据药敏试验及耐药基因 PCR 扩增结果,挑选 8 株不同样本来源、携带多种耐药基因及对 β -内酰胺类抗生素和四环素高浓度耐药的多重耐药大肠杆菌进行二代全基因组测序,菌株信息见表 3。将大肠杆菌在 TSA 平板上划线并置于 37 ℃ 过夜培养,挑取单菌落于 LB 肉汤,37 ℃ 180 r·min⁻¹过夜培养,取 2 mL 菌液到无菌离心管中,室温 10 000 r·min⁻¹离心 5 min,弃除上清液获得菌体沉淀。将菌体沉淀快速冷冻于超低温冰箱(-80 ℃)中。根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒使用说明书提取大肠杆菌 DNA。取 3 μL DNA 样品,1% 琼脂糖凝胶电泳,在 90 V 电压电泳 20 min,检测 DNA 浓度。大肠杆

表 1 抗生素类别和大肠杆菌 MIC 耐药折点

Table 1 Antibiotic classes and MIC breakpoints of <i>Escherichia coli</i>		
抗生素类别	抗生素名称	大肠杆菌 MIC 耐药折点/(mg·L ⁻¹)
四环素类	四环素	≥16
	阿莫西林	≥16
β -内酰胺类	头孢噻唑钠	≥64
	卡那霉素	≥64
氨基糖苷类	庆大霉素	≥16
	氧氟沙星	≥1
喹诺酮类		

表 2 耐药基因引物序列
Table 2 Primer sequences of antibiotic resistance genes

基因	长度/bp	序列	参考文献
<i>bla</i> _{SHV}	713	F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC R: ATCCCGCAGATAAATCACCAC	[15]
<i>bla</i> _{TEM}	254	F: GGGAACCGAGCTGAATGAA R: CAGTGCTGCAATGATACCGC	本研究设计
<i>bla</i> _{CTX-M}	478	F: AAGCACGTCAATGGGACGAT R: CCTTAGGTTGAGGCTGGGTG	本研究设计
<i>amp</i> <i>C</i>	296	F: ACAACTGGCACAATCTCGCT R: CGAATCTCGCTGGATTGGGA	本研究设计
<i>tet</i> <i>A</i>	210	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	[16]
<i>tet</i> <i>M</i>	406	F: GTGGACAAAGGTACAACGAG R: CGGTAAAGTTCGTCACACAC	[16]
<i>arm</i> <i>A</i>	514	F: TGGGGGTCTTACTATTCTGC R: TCTCTTCCATTCCCTTCTC	[17]
<i>qnr</i> <i>A</i>	630	F: CAGCAAGAGGATTTCACG R: AATCCGGCAGCACTATTACTC	[17]
<i>qnr</i> <i>S</i>	200	F: GGCAACGCAACTTTTCACAT R: CGCAAGTTGGCATTGTTGGA	本研究设计

表 3 全基因组测序菌株信息
Table 3 Whole-genome sequencing strain information

菌株	来源
E1	垫料
E2	牛奶(健康)
E3	牛奶(病牛)
E4	饲料
E5	粪水
E6	水
E7	粪便
E8	粪便

菌的二代全基因组测序由中国北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成,采用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台。使用 SPAdes 进行组装,使用 Quast 进行评估。

使用 CARD 数据库(the comprehensive antibiotic resistance database <mcmaster.ca>)以及 VFDB 数据库(virulence factors of bacterial pathogens <mgc.ac.cn>)分别对菌株基因组中所包含的耐药基因和毒力基因进行注释。组装序列比较分析采用 BLASTN 和 EasyFig 2.2.4, EasyFig 所得基因结构图用 Adobe Illustrator 进行完善。采用 ChiPlot([\[lot.online/\]\(https://www.chip-lot.online/\)\)进行耐药基因数据结果可视化,使用 Plasmidfinder 2.1.6 对菌株所携带质粒情况进行分析,采用 PubMLST 网站\(<https://pubmlst.org/>\)对菌株进行多为点序列分型\(MLST\)分析。并将测序结果中大肠杆菌全基因组序列与 NCBI 中现有菌株全基因组序列进行全基因组进化分析,并使用 Enterobase 网站\(Enterobase <\[warwick.ac.uk\]\(http://warwick.ac.uk\)>\)进行数据结果可视化,构建 Grape Tree。](https://www.chip-</p></div><div data-bbox=)

2 结果与分析

2.1 菌株分离情况

菌株分离情况如表 4 所示:共分离得到 18 株大肠杆菌,分离率为 50.00%。每份粪便样本中均分离出大肠杆菌,垫料、饲料、牛奶和粪水样本中不同程度分离出大肠杆菌,奶杯拭子中未分离出大肠杆菌。

2.2 分离菌株 16S rRNA 进化树分析结果

将所分离菌株的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 上序列相似度高的其他来源菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对,运用 MEGA11 软件采用邻接法构建系统发育进化树,结果如图 1 所示。可以看出,部分水样中分离的大肠杆菌与部分粪便样品、饲料样品中分离的大肠杆菌具有较近的亲缘关系。其中,从水样中分离的大肠杆菌 W5 与猪腹泻样品中分离的

表 4 菌株分离情况
Table 4 The state of strain isolation

来源	大肠杆菌	
	数量/株	分离率/%
垫料	2	40.00
粪便	7	100
水	4	80
饲料	2	50.00
粪水	1	50.00
牛奶	2	10.53
奶杯拭子		
总和	18	52.78

大肠杆菌 Sw1(KF918342.1)、从水样中分离的大肠杆菌 W1 与胶州湾表层海水中分离的大肠杆菌 Q1(HM371196.1)、粪水中分离的大肠杆菌 FS1 与大肠杆菌 SDMCC050386(MT020409.1)、从水样中分离的大肠杆菌 W4 与大肠杆菌 GZ9(PP510492.1)有较近的亲缘关系。

2.3 大肠杆菌耐药情况

由图 2 可知,18 株大肠杆菌均对四环素耐药,

耐药率高达 100%。其次为阿莫西林、庆大霉素和氧氟沙星,耐药率分别为 88.89%、83.33% 和 77.78%。大肠杆菌对头孢噻唑钠和卡那霉素的耐药率相对较低,分别为 50.00% 和 55.56%。不同样品分离大肠杆菌耐药情况如表 5 所示,从垫料中分离的菌株对头孢噻唑钠不耐药,耐药率为 0。从粪便中分离的大肠杆菌对头孢噻唑钠耐药率为 42.86%,低于对其他抗生素的耐药率。从水中分离的大肠杆菌大部分对 6 种抗生素耐药,耐药率均在 50.00% 及以上。从粪水、牛奶和饲料中分离的大肠杆菌对 6 种抗生素均耐药。

2.4 大肠杆菌多重耐药情况

由图 3 可知,18 株大肠杆菌中,15 株为多重耐药菌株,多重耐药率为 83.33%,耐药种类为一重至四重耐药。其中,2 株(11.11%)为一重耐药,1 株(5.56%)为二重耐药,1 株(5.56%)为三重耐药、14 株(77.78%)为四重耐药。18 株大肠杆菌共产生 8 种耐药谱,如表 6 所示。其中,阿莫西林-头孢噻唑钠-氧氟沙星-卡那霉素-庆大霉素-四环素(AMX-CS-OFX-KANA-GEN-TET)($n=7$)为优势耐药谱。

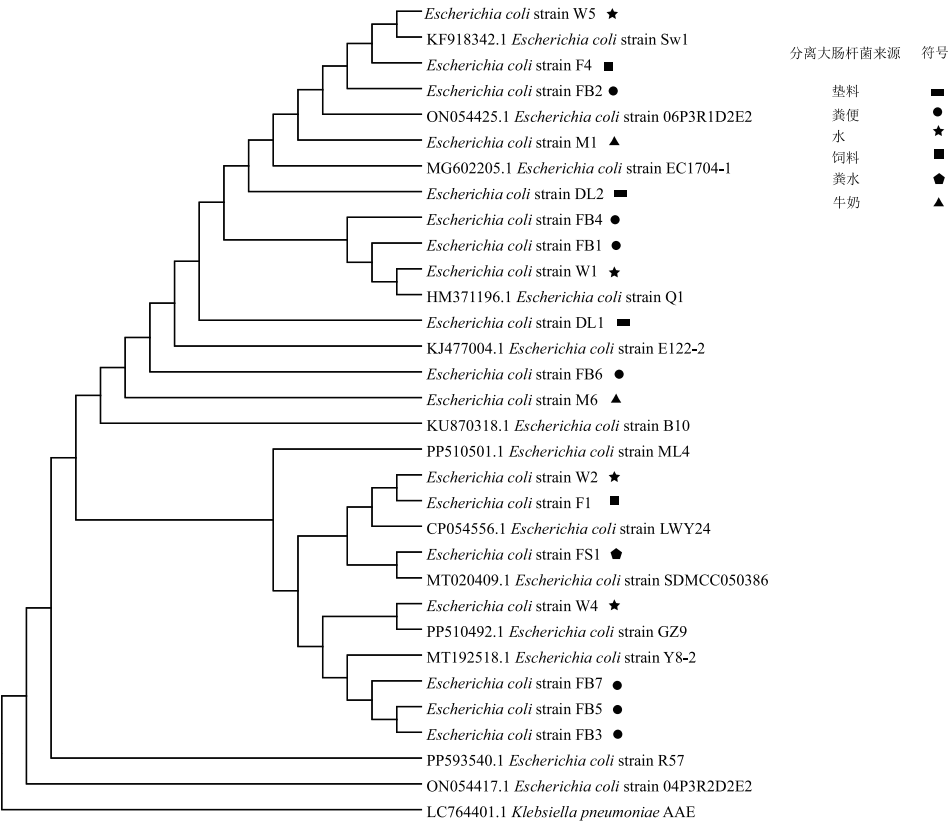
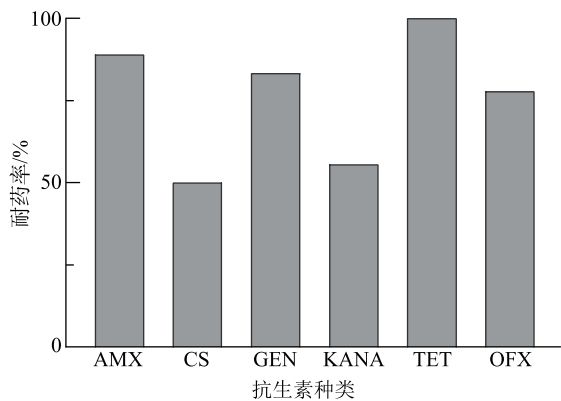


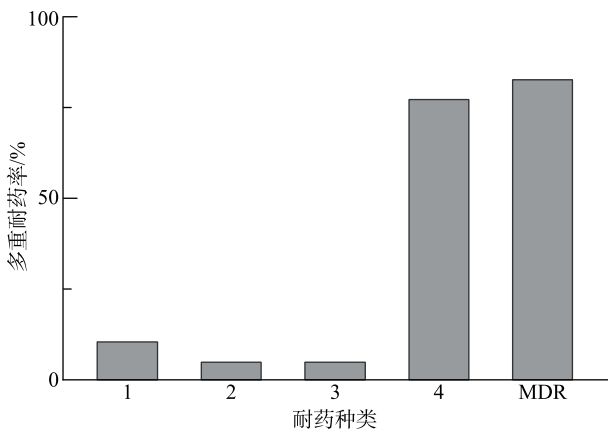
图 1 分离菌株 16S rRNA 基因系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene isolates



注:AMX 表示阿莫西林;CS 表示头孢噻唑钠;GEN 表示庆大霉素;
KANA 表示卡那霉素;TET 表示四环素;OFX 表示氧氟沙星;下同

图 2 大肠杆菌耐药性

Fig. 2 Frequency of antibiotic resistance of *Escherichia coli*



注:MDR 为多重耐药(multi-drug resistance)。

图 3 大肠杆菌多重耐药情况

Fig. 3 The multi-drug resistance of *Escherichia coli*

表 5 不同样品分离大肠杆菌耐药情况

Table 5 The antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from different samples

来源	耐药菌株数量	抗生素的耐药率/%					
		TET	AMX	CS	OFX	KANA	GEN
垫料	2	100	100	0	50.00	50.00	50.00
粪便	7	100	85.71	42.86	71.43	57.14	85.71
粪水	1	100	100	100	100	100	100
水	4	100	75.00	50.00	75.00	50.00	75.00
牛奶	2	100	100	100	100	100	100
饲料	2	100	100	100	100	100	100

表 6 大肠杆菌抗生素耐药谱

Table 6 The antibiotic resistance profile of *Escherichia coli*

耐药谱	菌株数	耐药率/%
TET	2	11.11
AMX-TET	1	5.55
AMX-OFX-GEN	1	5.55
AMX-KANA-GEN-TET	1	5.55
AMX-OFX-KANA-GEN	2	11.11
AMX-CS-OFX-GEN-TET	2	11.11
AMX-OFX-KANA-GEN-TET	2	11.11
AMX-CS-OFX-KANA-GEN-TET	7	38.89

表 7 大肠杆菌耐药基因检出情况

Table 7 The detection of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli*

基因	耐药基因类型	阳性率/%
<i>bla</i> _{SHV}	β -内酰胺类	11.11
<i>bla</i> _{TEM}		100
<i>bla</i> _{CTX-M}		53.33
<i>ampC</i>		100
<i>tetA</i>	四环素类	100
<i>tetM</i>		55.55
<i>armA</i>	氨基糖苷类	
<i>qnrA</i>	喹诺酮类	100
<i>qnrS</i>		16.67

2.5 PCR 扩增耐药基因

利用特异性引物对 9 个耐药基因 *bla*_{SHV}^[15]、*bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M}、*ampC*、*tetA*^[16]、*tetM*^[16]、*armA*、*qnrA*^[17]和 *qnrS* 进行 PCR 扩增,分别得到特异性条带与目的基因的目的片段大小一致。将 PCR 阳性产物克隆进行测序分析,结果如表 7 所示,18 株大肠杆菌

均携带 *bla*_{TEM}、*ampC*、*tetA* 和 *qnrA* 基因,阳性率为 100%,其中 53.33% 菌株携带 *bla*_{CTX-M} 基因,11.11% 菌株携带 *bla*_{SHV} 基因,55.55% 菌株携带 *tetM* 基因。16.67% 菌株携带 *qnrS* 基因。

根据 PCR 结果,对每个菌株进行耐药基因统计(表 8),发现每个菌株均携带多个耐药基因,50% 的

大肠杆菌同时携带 *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M}、*ampC*、*tetA*、*tetM* 和 *qnrA* 基因,22.22% 的大肠杆菌携带 *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M}、*ampC*、*tetA*、*tetM* 和 *qnrA* 基因。

2.6 多重耐药大肠杆菌耐药基因与毒力基因携带情况

通过对 8 株大肠杆菌测序结果进行组装,组装结果如表 9 所示。8 株大肠杆菌组装连续序列(contigs)个数最小为 117 个,最大为 586 个;最大 contigs 长度最低为 311 898 bp,最高为 312 579 bp;N50 最低为 92 282,最高为 120 074;总长度最低为 4 810 142 bp,最高为 5 350 005 bp。

表 8 大肠杆菌耐药基因携带情况

Table 8 The carriage status of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli*

耐药基因	菌株数	携带率/%
<i>bla</i> _{TEM} - <i>ampC</i> - <i>tetA</i> - <i>qnrA</i>	1	5.55
<i>bla</i> _{TEM} - <i>ampC</i> - <i>tetA</i> - <i>tetM</i> - <i>qnrA</i>	1	5.55
<i>bla</i> _{TEM} - <i>ampC</i> - <i>tetA</i> - <i>qnrA</i> - <i>qnrS</i>	2	11.11
<i>bla</i> _{TEM} - <i>bla</i> _{CTX-M} - <i>ampC</i> - <i>tetA</i> - <i>qnrA</i>	9	50.00
<i>bla</i> _{TEM} - <i>bla</i> _{CTX-M} - <i>ampC</i> - <i>tetA</i> - <i>tetM</i> - <i>qnrA</i>	4	22.22
<i>bla</i> _{TEM} - <i>bla</i> _{CTX-M} - <i>bla</i> _{SHV} - <i>ampC</i> - <i>tetA</i> - <i>qnrA</i>	1	5.55

表 9 8 株大肠杆菌 contigs 组装结果

Table 9 Assembly results of contigs of 8 *Escherichia coli* strains

编号	组装 contigs	最大长度/bp	N50	总长/bp
E1	117	311 898	120 074	4 856 789
E2	124	312 579	109 825	4 854 682
E3	126	312 254	94 464	4 855 315
E4	123	312 175	94 464	4 855 859
E5	124	311 967	109 811	4 810 142
E6	122	312 254	102 623	4 852 621
E7	122	311 967	120 074	4 853 600
E8	586	311 898	92 282	5 350 005

对 8 株对 β -内酰胺类抗生素耐药大肠杆菌耐药基因的检测结果见图 4。如图 4 可知,8 株大肠杆菌中检出了 16 类 74 种耐药基因,其中 67 种耐药基因的检出率为 100%,包括 β -内酰胺类耐药基因:*ampC*、*ampH*、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{TEM-1};氨基糖苷类耐药基因:*AAC(3)-II d*、*aadA*、*aadA2*、*aadA23*、*aadA25*、*ANT(3'')-II a*、*APH(3')-I a*、*acrD*、*baeR*、*baeS*、*cpxA*、*kdpE*;多肽类耐药基因:*rosA*、*rosB*、*eptA*、*bacA*、*pmrF*、*ugd*、*yojI* 等。耐药基因 *tetA* 的检出率为 87.5%,*bla*_{LAP-2}、*blaZ*、*rpoB*、*rpoB2*、*lmrD* 和 *mexI* 基因检出率最低,为 12.5%。

对二代全基因组组装序列进行毒力基因注释,发现 8 株大肠杆菌之间毒力基因数量为 223 ~ 236 个,常见毒力基因主要包括粘附类(*elfA*、*elfD*、*elfC*、*ompA* 等)、效应因子传输系统(*aec15*、*aec16*、*eivA*、*espR1* 等)、免疫调节(*galF*、*gndA*、*rfbK1*、*ugd*)、侵袭(*tia*、*ibeC*、*ibeB*)、动力(*cheA*、*flgB*、*flhA*、*motA* 等)和营养/代谢因子(*entA*、*fepA*、*iucC* 等)。其中,8 株大肠杆菌均携带毒力基因 *iucD*、*hlyE* 和 *ompA*,这些毒力基因有助于细菌在犊牛肠道中定植以及血液中的持续存在,增强其致病性^[18]。8 株大肠杆菌均携带

irp2 基因,其是耶尔森氏菌强毒力岛(high pathogenicity island, HPI)的标志基因,与致病性大肠杆菌的毒力密切相关^[19-20]。

2.7 多重耐药大肠杆菌菌株全基因组进化分析

采用 PubMLST 网站对从 NCBI 下载的分离于其他动物样本的大肠杆菌全基因组序列与本研究中大肠杆菌全基因组序列进行多为点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析,发现 8 株菌均为 ST2 型,使用 Plasmidfinder 2.1.6 对 8 株大肠杆菌所携带质粒情况进行分析发现 8 株菌均携带 ColpVC、IncFIA、IncFIB 和 IncFIC 质粒。以上表明,该 ST2 型大肠杆菌在该养殖场中广泛传播,并存在于不同环境中。

通过将分离的 8 株大肠杆菌与 NCBI 上不同地区其他动物来源大肠杆菌(牛源、猪源、鸡源、羊源、马源等)、食品源大肠杆菌和环境分离的大肠杆菌(土壤源、水源)进行全基因组进化分析,构建 Grape Tree,结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出分离的 8 株大肠杆菌聚在一簇,相比其他菌株,它们与图 5 中红色方框中的美国分离出的 1 株马源大肠杆菌(GCA_016988915.1)、1 株新西兰土壤源大肠杆菌

(GCA_029584345.1)、1 株澳大利亚水源大肠杆菌(GCF_025643435.1)、1 株中国成都分离的水源大肠杆菌(GCF_003667425.1)、2 株中国四川分离的鸭源大肠杆菌(GCF_024971815.1、GCF_024971795.1)、1 株瑞士猪源大肠杆菌(GCA_018357445.1)、1 株牛源大肠杆菌(GCF_001268525.1)和 1 株中国广东分离出的食品源大肠杆菌(GCF_025909835.1)具有较近的亲缘关系。

2.8 多重耐药大肠杆菌中 β -内酰胺类、四环素类耐药基因环境分析

由于 8 株大肠杆菌对 β -内酰胺类和四环素类抗

生素耐药、具有较高的 MIC 值并携带 β -内酰胺类耐药基因和四环素耐药基因。对 8 株大肠杆菌进行 β -内酰胺类耐药基因与四环素类耐药基因环境分析,发现 8 株菌株的基因环境是一致的。因此,下文选择其中 1 株菌株 E8 的二代全基因组测序进行全面筛查,找到携带 β -内酰胺类耐药基因 *ampC*、*ampH*、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{TEM-1} 和四环素耐药基因 *tetA*、*tetM* 的片段,并从 NCBI 下载部分全基因组数据与菌株 E8 的部分序列进行了上下游基因环境情况的比对和分析,结果如下图 6 ~ 10。

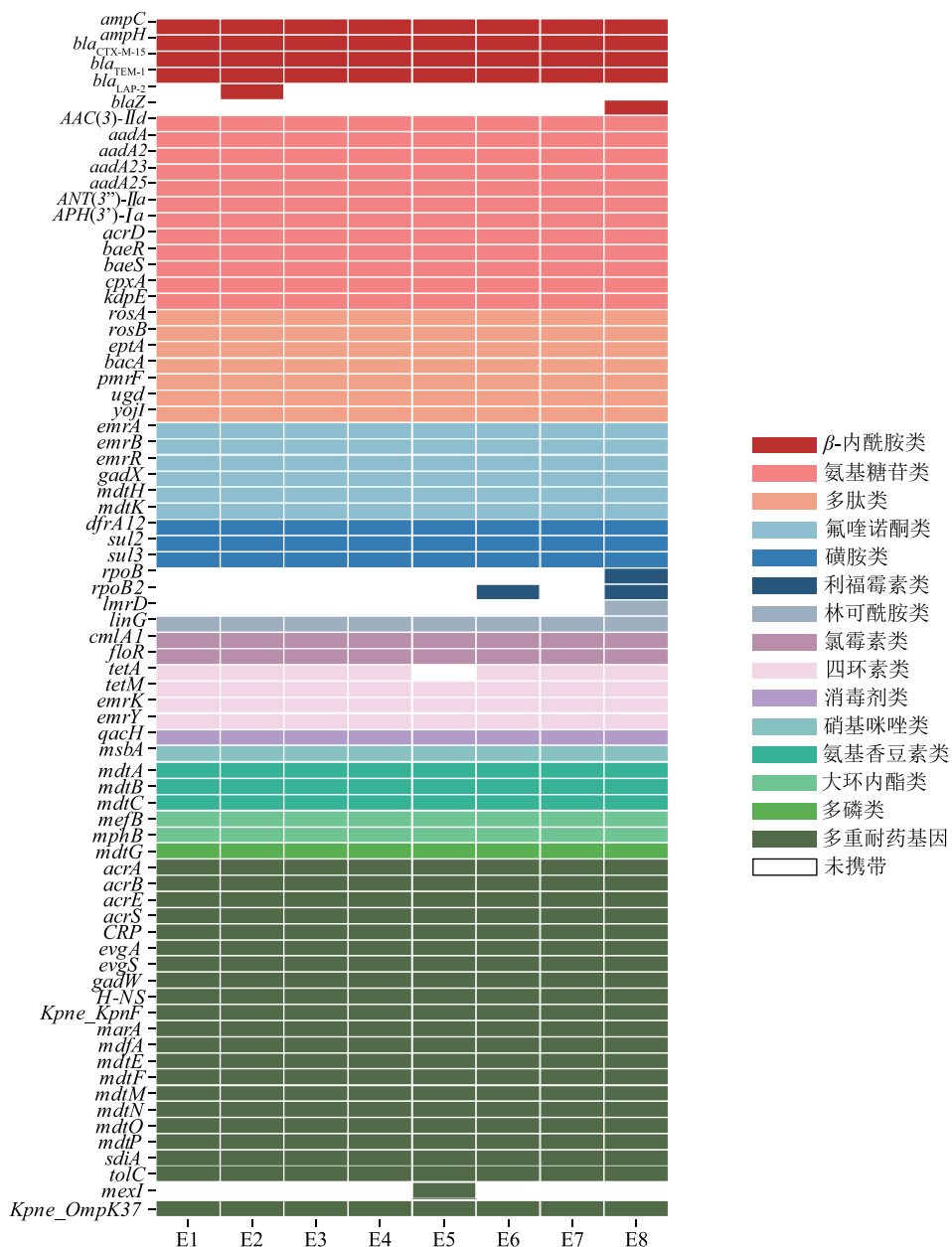


图 4 大肠杆菌耐药基因携带情况

Fig. 4 The carriage status of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli*

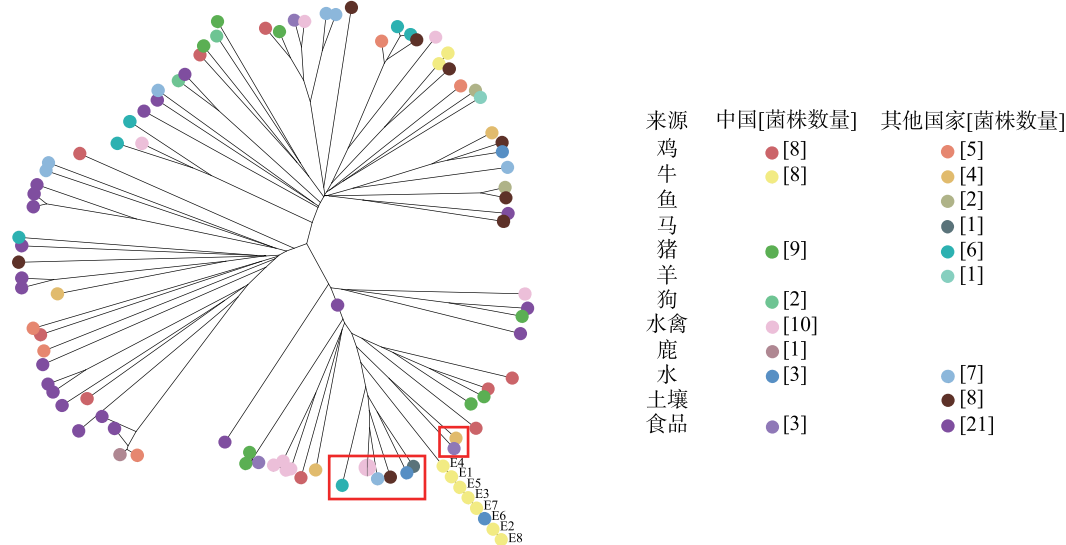


图 5 不同来源大肠杆菌全基因组进化分析

Fig. 5 The evolutionary analysis of the complete genomes of *Escherichia coli* derived from diverse sources

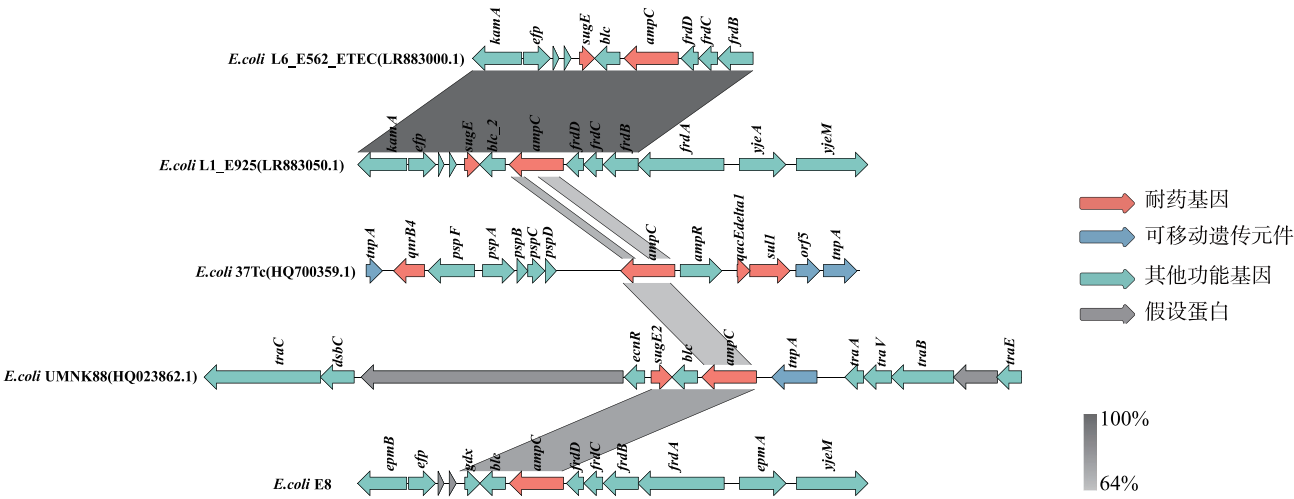


图 6 *ampC* 基因上下游结构情况

Fig. 6 The structural characteristics of the upstream and downstream sequences of the *ampC* gene

从图 6 中可以看出大肠杆菌 E8 中 *ampC* 基因上游存在编码外膜脂蛋白的基因 *blc*,下游存在延胡索酸还原酶(*frdABCD*)操纵子,与大肠杆菌 L6_E562_ETEC(LR883000.1)和 L1_E925 (LR883050.1)中 *ampC* 基因环境具有高度相似性。*frdABCD* 的转录终止子具有发夹结构,它能消减 RNA 聚合酶的功效,是 *ampC* 基因的转录衰减子,在这种衰减调控作用下呈低水平表达^[21-22]。与大肠杆菌 E8 不同的是,人源大肠杆菌 37Tc(HQ700359.1)中 *ampC* 基因的下游存在 *ampR* 基因,该基因是 *ampC* 操纵子中的 1 种基因,产生的 AmpR 蛋白本身并不与 β -内酰胺类抗生素发生作用,但它在诱导产生 AmpC 酶中

是必需的调控因子^[23]。而猪源大肠杆菌 UMNK88 (HQ023862.1)中 *ampC* 基因的下游存在转座子 *tnpA*,有利于 *ampC* 基因的广泛传播。

从图 7 可以发现,不同来源的大肠杆菌中 *bla*_{CTX-M-15} 基因上下游基因存在差异性。大肠杆菌 E8 中, *bla*_{CTX-M-15} 基因的正方向上存在相同类型的插入序列 *ISEcp1*,在 *bla*_{CTX-M-15} 基因的反方向上发现了 1 个 WbuC 家族的杯状折叠金属蛋白,与从湿地分离的大肠杆菌 TREC4(MN158990.1)中 *bla*_{CTX-M-15} 基因上下游环境相似,而野猪源大肠杆菌 P16-1 (LC567054.1)中 *bla*_{CTX-M-15} 基因下游存在转座子 *tnpA*、*tnpR*。

从图8可以发现,大肠杆菌 E8 中, bla_{TEM-1} 基因上游存在耐药基因 $floP$, 下游存在转座子 $tnpR$ 。E8 中 bla_{TEM-1} 基因的上下游环境与其他菌株存在较大差异, 腹腔积液中分离的大肠杆菌 YD472(KR078259.1) 中 bla_{TEM-1} 基因上游存在插入序列 IS , 下游存在氨基糖苷类耐药基因 $rmtB$ 以及转座子 tnp 。下游或上游常常存在转座酶基因 $tnpR$ 或插入序列 IS , 更有利于该基因在菌株间的广泛传播。J53(MK878892.2) 也存在转座子 $Tn3$ 与插入序列 $IS26$ 。临床分离大肠杆菌 1540(AM886293.1) 中 bla_{TEM-1} 基因上下游存在大量转座子或插入序列。不同来源大肠杆菌中 bla_{TEM-1} 基因的下游或上游常常存在转座酶基因或插入序列, 更有利于该基因在菌株间的广泛传播。

从图9可以看到, 大肠杆菌 E8 中 $ampH$ 基因下游存在 $sbmA$ 、 $yaiW$ 、 $yaiY$ 、 $yaiZ$ 、 $ddlA$ 基因, 这一现象同时存在于其他4株菌株中。大肠杆菌 E8 中 $ampH$ 基因上游存在插入序列 $ISEcp1$, 牛源大肠杆

菌 E92(NZ_CP119734.1) 中 $ampH$ 基因上游存在插入序列 $IS5$, 而另外2株菌株 $ampH$ 基因上游不存在可移动遗传原件, 因此 $ampH$ 基因环境在不同来源菌株中有较大差别。

如图10所示, 大肠杆菌 E8 中基因 $tetA$ 下游存在基因 $tetR$, $tetA$ - $tetR$ 结构同时存在于直肠拭子分离大肠杆菌 A117(MN807687.1)、牛源大肠杆菌 H4H(FJ621586.1) 与人类和牛共生大肠杆菌 JML034(BFND01000213.1) 中, 并存在高度相似性。 $tetA$ 编码的 TetA 外排泵的表达是通过 $tetR$ 编码的四环素反应性抑制因子 TetR 来控制的, TetR 严密调控 TetA mRNA 的表达。 $tetA$ - $tetR$ 结构于不同菌株中, 上下游基因环境有较大不同, A117(MN807687.1) 下游存在氨基糖苷类抗生素耐药基因 $aph(6)$ - I d、 $aph(3'')$ - I 和磺胺类耐药基因 $sul3$, H4H(FJ621586.1) 和 JML034(BFND01000213.1) 下游存在耐药基因 $strB$ 、 $strA$ 与 $sul2$ 。

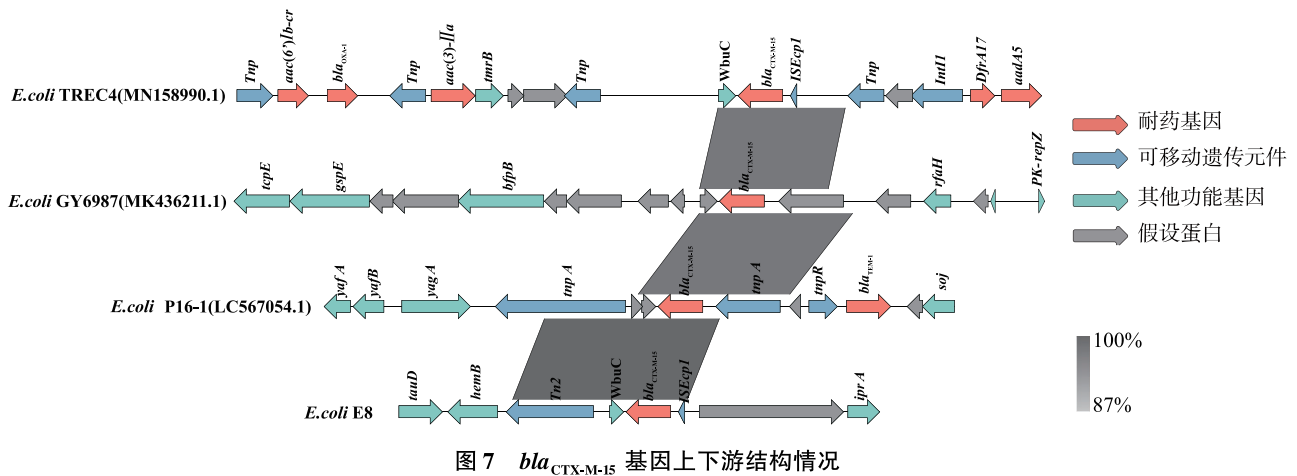


图7 $bla_{CTX-M-15}$ 基因上下游结构情况

Fig. 7 The structural status of the upstream and downstream regions of the $bla_{CTX-M-15}$ gene

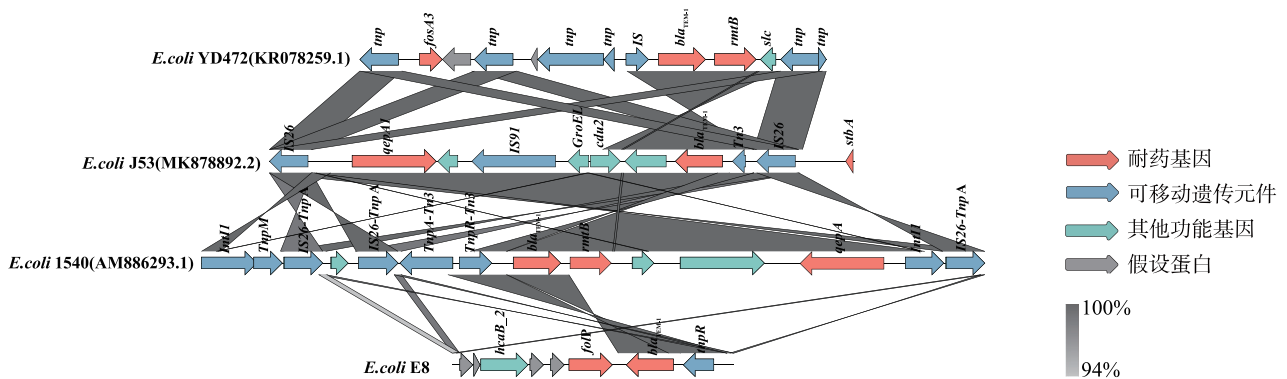


图8 bla_{TEM-1} 基因上下游结构情况

Fig. 8 The structural profile of the upstream and downstream regions of the bla_{TEM-1} gene

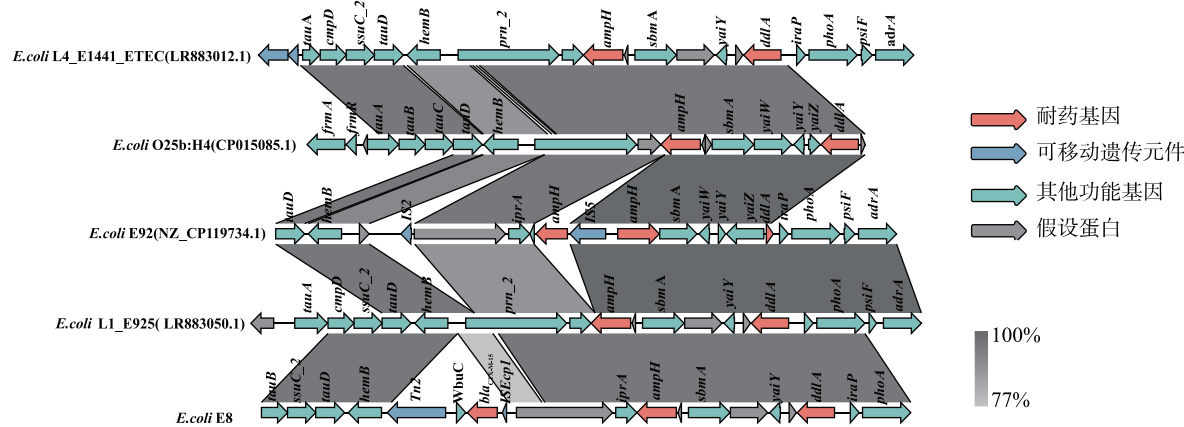


图 9 *ampH* 基因上下游结构情况

Fig. 9 The structural landscape of the upstream and downstream domains of the *ampH* gene

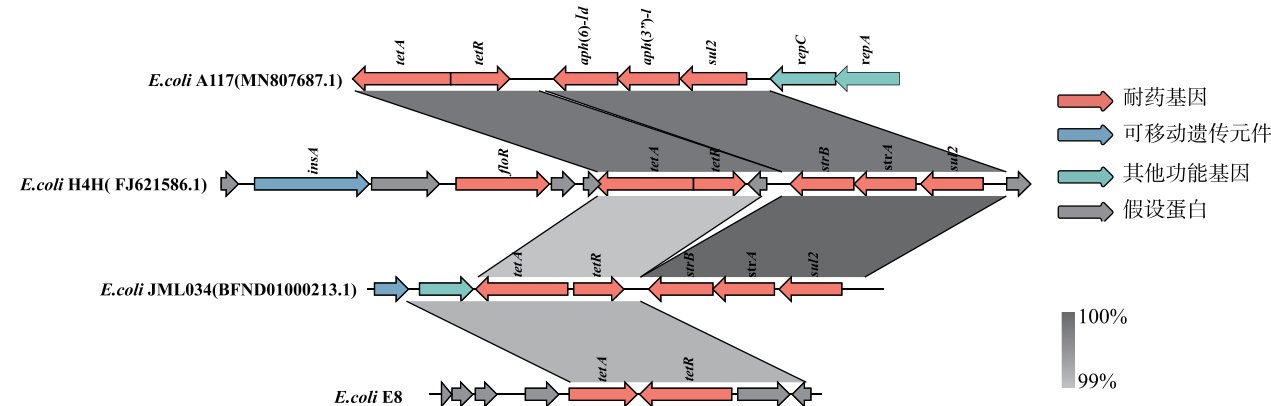


图 10 *tetA* 基因上下游结构情况

Fig. 10 The structural complex of the upstream and downstream domains of the *tetA* gene

图 11 中,大肠杆菌 E8 的 *tetM* 基因下游存在 *IS* 插入序列以及耐药基因 *emrE*。不同来源大肠杆菌中 *tetM* 的上下游结构有较大差别, B6CTX (OZ026763.1)与鸭源大肠杆菌 TW4(MK293945.1)中 *tetM* 上下游均存在转座子 *tnp*, SH19PTE6 (MW423609.1)中 *tetM* 上游存在 *bla*_{TEM-1b} 基因及转座子 *tnpR*、*tnpA*,下游存在插入序列 *IS26* 及转座子 *tnpA*。*tetM* 基因上下游可移动遗传元件十分丰富,有利于其的广泛传播。

通过对以上两大类、6 个耐药基因的环境进行比较,发现本研究分离的 8 株大肠杆菌与其他来源的大肠杆菌基因环境存在较大差别,但这些耐药基因上游或下游常常存在转座子或插入序列,促进这些耐药基因的传播。其中,发现 *bla*_{CTX-M-15} 基因与上游的插入序列 *ISEcp* 和下游的 *WbuC* 家族杯状折叠金属蛋白组成 1 个高度保守结构,这在其他来源

大肠杆菌中也有发现。

3 讨论

大肠杆菌是存在于环境中的条件致病菌,常常引发养殖场中奶牛乳房炎^[24-25]、犊牛腹泻^[26]、呼吸道疾病^[27]等疾病,为养殖场带来巨大经济损失。本研究从 36 份样品中共分离得到 18 株大肠杆菌,大肠杆菌分离率为 52.78%。江婉琳等^[28]对新疆阿克苏地区奶牛粪便样品进行大肠杆菌的分离鉴定,发现大肠杆菌分离率为 50.50%,与本研究中大肠杆菌分离率相近。郝若晨等^[29]对海南奶源和养殖环境样本中大肠杆菌总分离率为 41.6%,低于本研究大肠杆菌的分离率。不同养殖场的影响因素复杂,大肠杆菌的分离情况也不同。

由于抗生素的不合理使用,多重耐药大肠杆菌频繁检出。大肠杆菌多重耐药机制复杂,主要与多

药外排系统过表达、多重耐药质粒传播和生物被膜的形成有关^[30-34]。本研究发现,从该养殖场采集的样品中分离的大多数菌株同时对阿莫西林(β -内酰胺类抗生素)、庆大霉素(氨基糖苷类抗生素)、氧氟沙星(喹诺酮类抗生素)和四环素(四环素类抗生素)耐药,具有严重的多重耐药现象,多重耐药率为83.33%。该养殖场多重耐药大肠杆菌的出现,可能与长期通过对奶牛注射氨苄西林、氧氟沙星、庆大霉素治疗疾病有关。除了对该养殖场常用的几种抗生素高度耐药外,本研究中分离的菌株对养殖业中常用但该养殖场不常用的四环素耐药也较为严重,对分离的多重耐药基因的四环素耐药基因 *tetM* 的基

因环境进行分析,发现 *tetM* 基因下游存在 *IS* 插入序列,这表明该养殖场分离大肠杆菌对四环素耐药的产生可能是由于菌株捕获环境中携带四环素耐药基因的质粒所导致。与四环素、阿莫西林、庆大霉素和氧氟沙星的耐药率相比,大肠杆菌对头孢噻呋钠(0.00%)敏感,对卡那霉素(55.56%)的耐药率相对较低。江婉琳等^[28]对新疆阿克苏地区粪源大肠杆菌研究发现,对青霉素、头孢噻吩的耐药率分别为96.1%和60.8%,多重耐药率为78.43%。不同地区不同菌株的耐药情况不同,这种耐药性差异可能是由于不同地区养殖过程中所使用抗生素的种类与频次不同造成的。

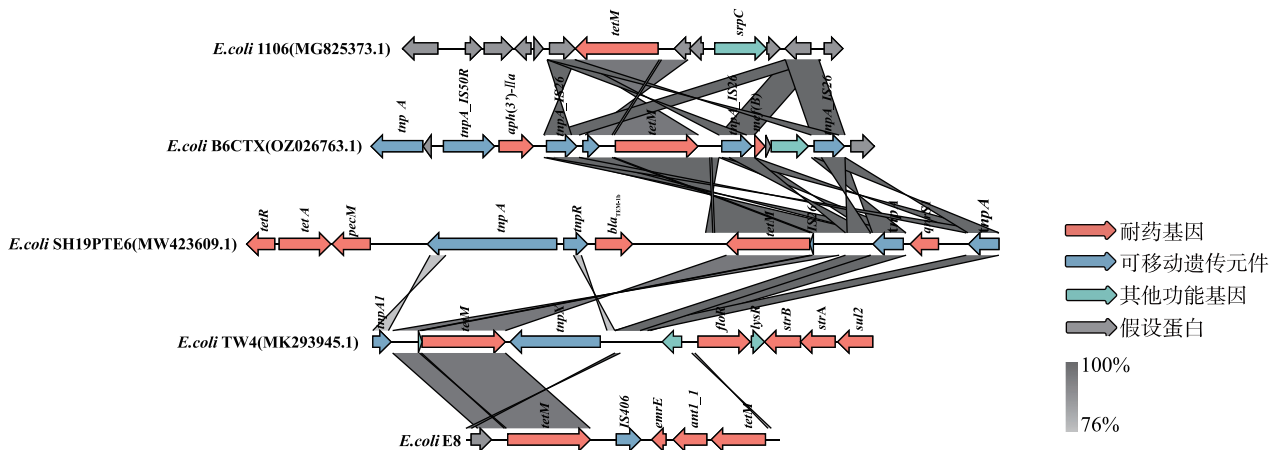


图 11 *tetM* 基因上下游结构情况

Fig. 11 The structural status of the upstream and downstream segments of the *tetM* gene

本研究对 β -内酰胺类、四环素、喹诺酮类和氨基糖苷类耐药基因类进行检测,发现所有大肠杆菌均携带 *bla*_{TEM}、*ampC*、*tetA* 和 *qnrA* 基因,阳性率为100%,携带 *bla*_{CTX-M} 基因的阳性率为53.33%。ZHAO等^[35]对内蒙古奶牛子宫内膜炎大肠杆菌耐药基因检测,检测出 *bla*_{TEM} 基因(100%),未发现 *bla*_{CTX-M}、*bla*_{SHV}。崔艳丽等^[36]对山东青岛地区鸭源大肠杆菌进行耐药基因检测,发现 *tetA*、*qnrS*、*bla*_{CTX-M} 基因流行率较高,依次为83.33%、79.17%和47.92%,与本研究结果相似。

本研究对8株大肠杆菌全基因组二代测序结果进行注释分析,共注释到16类74种耐药基因、12类243个毒力基因。研究报道 *ompA* 是不同毒力基因中的流行率最高、最常见的基因,它在生物膜形成、维持膜完整性和抗生素转运中发挥着重要作用,这会加强细菌的抗生素耐药性^[37]。目前,已有一些

关于基因敲除技术的研究表明, *iucD* 和大肠杆菌的致病力存在着某种联系^[38]。本研究中8株大肠杆菌均携带 *ompA* 和 *iucD* 基因,这可能与其耐药性与致病性有关。有研究表明,四环素类、氨基糖苷类和 β -内酰胺类的耐药基因主要属于可移动的耐药基因,而位于质粒上的耐药基因可通过接合、转化、转导等方式导致菌株的多重耐药问题更为严重^[39-40]。本研究中8株菌均携带 ColpVC、IncFIA、IncFIB 和 IncFIC 质粒。有研究显示携带 AMR 基因的质粒主要在典型的 Inc 组质粒上^[41]。Inc F 组质粒是大小在45~200 kb的低拷贝接合质粒,Inc F 质粒上最常见的耐药基因有编码 ESBLs、碳青霉烯酶、氨基糖苷类修饰酶的基因^[42]。这些质粒不仅会对细菌的生存做出贡献,其介导的耐药机制也是抗生素耐药性增加的原因。

对大肠杆菌中 β -内酰胺类耐药基因和四环素

耐药基因所在片段进行分析,发现这些耐药基因上游或下游存在转座子基因、插入序列,这有利于耐药基因的传播。其中,在许多不同的物种中发现了 *bla*_{CTX-M-15} 基因上下游的高度保守结构, *bla*_{CTX-M-15} 基因的正方向上存在插入序列 *ISEcp1*, *bla*_{CTX-M-15} 基因的反方向上存在 WbuC 家族杯状折叠金属蛋白^[43]。WbuC 家族蛋白可能含有组氨酸残基作为金属结合配体,据报道与 O 抗原生物合成有关^[44]。研究发现,这一独特基因簇中的耐药基因并不局限于 *bla*_{CTX-M},最近也有报道称 *mcr-9* 基因之后出现了 WbuC 基因^[45]。因此,对 WbuC 基因的功能研究具有一定的意义。

4 结束语

奶牛场中分离得到的大肠杆菌大多是多重耐药菌株,且对 β -内酰胺类抗生素及四环素类具有较高的耐药性。多重耐药大肠杆菌在不同环境中广泛流行并携带多种耐药基因及毒力基因,其中 β -内酰胺类耐药基因及四环素类耐药基因上下游存在可移动遗传元件,有利于耐药基因在养殖环境的传播,需要注重对养殖环境中耐药菌和耐药基因的传播的研究和控制。该养殖场应定期消毒处理,加强耐药菌的监测并合理使用抗生素,这将有助于降低细菌耐药性传播风险。

通信作者简介: 邹立扣(1979—),男,博士,教授,主要研究方向为微生物资源利用、细菌耐药性、畜禽养殖污染控制与粪污资源化。

共同通信作者简介: 赵珂(1982—),女,博士,教授,主要研究方向为微生物资源利用、养殖废弃物资源化等。

5 参考文献

- [1] 柴同杰, 赵云玲, 刘文波, 等. 鸡舍环境耐药细菌气溶胶及其向环境传播的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(3): 209-214.
CHAI T J, ZHAO Y L, LIU W B, et al. The resistance against antibiotics of bacteria from a poultry house and their spreading to surroundings of the house[J]. Chinese journal of preventive veterinary medicine, 2003, 25(3): 209-214.
- [2] CHUNG H S, LEE Y J, RAHMAN M M, et al. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish[J]. Science of the total environment, 2017, 605: 322-331.
- [3] YANG L, SHEN Y B, JIANG J Y, et al. Distinct increase in antimicrobial resistance genes among *Escherichia coli* during 50 years of antimicrobial use in livestock production in China[J]. Nature food, 2022, 3(3): 197-205.
- [4] GAZE W H, KRONE S M, JOAKIM LARSSON D G, et al. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistance[J]. Emerging infectious diseases, 2013, 19(7): e120871.
- [5] 杜实之. 环境中抗生素的残留、健康风险与治理技术综述[J]. 环境科学与技术, 2021, 44(9): 37-48.
DU S Z. Research progress on antibiotic pollution, health risks and treatment technology in environments[J]. Environmental science & technology, 2021, 44(9): 37-48.
- [6] DAVIES J, SPIEGELMAN G B, YIM G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations[J]. Current opinion in microbiology, 2006, 9(5): 445-453.
- [7] 丁曼琳, 陈文碧, 张菲阳, 等. 亚抑制浓度抗生素对细菌水平基因转移的研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2022, 45(5): 447-450.
DING M L, CHEN W B, ZHANG F Y, et al. Research progress of horizontal gene transfer induced by sub-inhibitory concentration of antibiotics in bacteria[J]. Journal of southwest medical university, 2022, 45(5): 447-450.
- [8] ZHAO Y F, JIN R X, CHEN Y H, et al. Constructed wetlands as neglected fixed source of microplastics and antibiotic resistance genes in natural water bodies? [J]. Science of the total environment, 2023, 902: 166474.
- [9] HE Y, YUAN Q B, MATHIEU J, et al. Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment[J]. NPJ clean water, 2020, 3: 4.
- [10] ZHAO Y, YANG Q E, ZHOU X, et al. Antibiotic resistance in the livestock and aquaculture industries: status and solutions[J]. Critical reviews in environmental science and technology, 2021, 51(19): 2159-2196.
- [11] THOMAS C M, NIELSEN K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. Nature reviews microbiology, 2005, 3(9): 711-721.
- [12] LI H K, LIU B H, LI M Y, et al. Livestock and poultry breeding farms as a fixed and underestimated source of antibiotic resistance genes[J]. Environmental science and pollution research international, 2024, 31(37): 49916-49931.
- [13] 周小平, 王建东. 宁夏某规模化奶牛场犊牛呼吸道疾病病原菌分离鉴定及敏感药物鉴定[J]. 动物医学进展, 2023, 44(4): 139-144.
ZHOU X P, WANG J D. Isolation and identification of pathogens and screening of sensitive drugs for calf respiratory

- atory diseases in a large-scale dairy farm in Ningxia[J]. Progress in veterinary medicine, 2023, 44(4): 139-144.
- [14] MOYA-SALAZAR J, HUARCAYA J, VAZQUEZ D, et al. Quality and performance of Papanicolaou test using the clinical and laboratory standards institute (CLSI) EP12-A2 guidelines: a single-center study in Peru[J]. Journal of cytology, 2023, 40(2): 81-87.
- [15] TEWARI R, MITRA S, GANAIE F, et al. Dissemination and characterisation of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases and metallo- β -lactamases from livestock and poultry in Northeast India: a molecular surveillance approach [J]. Journal of global antimicrobial resistance, 2019, 17: 209-215.
- [16] ZHANG C M, DU C, XU H, et al. Occurrence of tetracycline-resistant fecal coliforms and their resistance genes in an urban river impacted by municipal wastewater treatment plant discharges[J]. Journal of environmental science and health, part A, 2015, 50(7): 744-749.
- [17] CIESIELCZUK H, HORNSEY M, CHOI V, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants[J]. Journal of medical microbiology, 2013, 62(Pt 12): 1823-1827.
- [18] 操义恒, 马雪, 张丽媛, 等. 致犊牛脑炎大肠杆菌分离鉴定、耐药性及毒力基因检测[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(7): 1411-1417, 1423.
- CAO Y H, MA X, ZHANG L Y, et al. Isolation and identification of *E.coli* causing calf encephalitis and detection of drug resistance and virulence gene[J]. Chinese journal of veterinary science, 2022, 42(7): 1411-1417, 1423.
- [19] 金文杰, 郑志明, 秦爱建, 等. 禽致病性大肠杆菌中耶尔森菌强毒力岛的分子流行病学调查[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(10): 787-790.
- JIN W J, ZHENG Z M, QIN A J, et al. Molecular epidemiological investigation of *Yersinia* high-pathogenicity island in avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Veterinary science in China, 2006, 36(10): 787-790.
- [20] 王姣姣, 孙武文, 陈龙, 等. 吉林省部分地区犊牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定与强毒力岛(HPI)相关序列分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(9): 58-61.
- WANG J J, SUN W W, CHEN L, et al. Isolation and identification of *Escherichia coli* and the analysis of related sequences of high pathogenicity island (HPI) in calf diarrhea disease in partial areas of Jilin Province [J]. Heilongjiang animal science and veterinary medicine, 2016 (9): 58-61.
- [21] BERGSTRÖM S, LINDBERG F P, OLSSON O, et al. Comparison of the overlapping frd and ampC operons of *Escherichia coli* with the corresponding DNA sequences in other Gram-negative bacteria[J]. Journal of bacteriology, 1983, 155(3): 1297-1305.
- [22] GRUNDSTRÖM T, JAURIN B. Overlap between ampC and frd operons on the *Escherichia coli* chromosome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982, 79(4): 1111-1115.
- [23] 王锦娜, 邵海枫. 大肠埃希菌高产 AmpC 酶的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(2): 167-171.
- WANG J N, SHAO H F. Progress on AmpC hyperproduction in *Escherichia coli*[J]. Journal of medical post-graduates, 2006, 19(2): 167-171.
- [24] CHENG J, ZHOU M, NOBREGA D B, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* mastitis on two large Chinese dairy farms[J]. Journal of dairy science, 2021, 104(1): 762-775.
- [25] ISMAIL Z B. Mastitis vaccines in dairy cows: recent developments and recommendations of application[J]. Veterinary world, 2017, 10(9): 1057-1062.
- [26] 杨静, 吴玉, 斯那白木, 等. 昆明地区某奶牛场致犊牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(3): 465-471.
- YANG J, WU Y, SI N, et al. Isolation, identification and biological characteristics of *Escherichia coli* from diarrhea of calves in a dairy farm in Kunming[J]. Chinese journal of veterinary science, 2024, 44(3): 465-471.
- [27] 朱利霞, 王洪彬, 赵希艳, 等. 牛细菌性呼吸道疾病研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(14): 63-66.
- ZHU L X, WANG H B, ZHAO X Y, et al. Research progress on bovine bacterial respiratory diseases [J]. Heilongjiang animal science and veterinary medicine, 2019 (14): 63-66.
- [28] 江婉琳, 徐双军, 刘雨欣, 等. 新疆阿克苏地区奶牛粪源大肠杆菌分型与耐药性分析[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(12): 2434-2443.
- JIANG W L, XU S J, LIU Y X, et al. Genotyping and drug resistance analysis of *Escherichia coli* from cow feces in Aksu area, Xinjiang[J]. Chinese journal of veterinary science, 2022, 42(12): 2434-2443.
- [29] 郝若晨, 唐敏嘉, 刘光亮, 等. 海南省奶源和养殖环境主要肠杆菌科细菌的分布及基因分型[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(12): 5184-5197.
- HAO R C, TANG M J, LIU G L, et al. Distribution and genotyping of major Enterobacteriaceae bacteria in milk sources and dairy farm environment of Hainan Province [J]. Acta veterinaria et zootechnica sinica, 2023, 54(12): 5184-5197.

- [30] MUNITA J M, ARIAS C A. Mechanisms of antibiotic resistance[J]. Microbiology spectrum, 2016, 4(2): 10.1128.
- [31] 刘五高, 丁友法, 刘爱霞, 等. 质粒介导的耐药基因水平传播研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(8): 1288-1292, 1296.
- LIU W G, DING Y F, LIU A X, et al. Research progress of plasmid-mediated drug resistance gene horizontal transmission[J]. Chinese journal of health laboratory technology, 2015, 25(8): 1288-1292, 1296.
- [32] BAKER K S, DALLMAN T J, FIELD N, et al. Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species [J]. Nature communications, 2018, 9(1): 1462.
- [33] ANTONELLI G, CAPPELLI L, CINELLI P, et al. Strategies to tackle antimicrobial resistance: the example of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(9): 4943.
- [34] 杨跃飞, 马文杰, 彭时龙, 等. 禽源大肠杆菌多重耐药机制初探[J]. 中国兽医杂志, 2021, 57(9): 38-42.
- YANG Y F, MA W J, PENG S L, et al. Preliminary study on multi-drug resistant mechanism of avian *Escherichia coli* isolates [J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2021, 57(9): 38-42.
- [35] 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.
- [36] 崔艳丽, 马策, 崔云昊, 等. 青岛地区鸭源四环素类耐药大肠杆菌流行情况调查及耐药基因分析[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(11): 4681-4692.
- CUI Y L, MA C, CUI Y H, et al. Epidemiological investigation and resistance gene analysis of tetracycline-resistant *Escherichia coli* from ducks in Qingdao[J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2023, 50(11): 4681-4692.
- [37] YANG J, YUN S, PARK W. Blue light sensing BlsA-mediated modulation of meropenem resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* [J]. mSystems, 2023, 8(1): e0089722.
- [38] 陈艺丽. 禽病原性大肠杆菌 E058 株 *iucD*、*flsK* 基因突变株的构建及其致病性评价[D]. 扬州: 扬州大学, 2009: 13-33.
- CHEN Y L. Construction of an *iucD* mutant and a *flsK* mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* and evaluation of their pathogenicity[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2009: 13-33.
- [39] 王亚楠. 鸡、猪和人体肠道菌群耐药基因的多样性和播散规律研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021: 103-105.
- WANG Y N. The diversity and dissemination of antibiotic resistance genes in chicken, pig, and human gut microbiomes [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021: 103-105.
- [40] 马馨, 刘一飞, 王志宇, 等. 鸡源大肠杆菌分离鉴定 ES-*BLs* 与 *AmpC* 酶基因型检测及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(9): 2715-2725.
- MA X, LIU Y F, WANG Z Y, et al. Isolation, identification, detection of ESBLs and *AmpC* enzyme genotypes and drug resistance analysis of *Escherichia coli* from chicken[J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2019, 46(9): 2715-2725.
- [41] PODSCHUN R, ULLMANN U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors [J]. Clinical microbiology reviews, 1998, 11(4): 589-603.
- [42] ROZWANDOWICZ M, BROUWER M M, FISCHER J, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae[J]. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2018, 73(5): 1121-1137.
- [43] ZHONG Y, GUO S Y, SEOW K L G, et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Jurong Lake, Singapore with whole-genome-sequencing [J]. International journal of environmental research and public health, 2021, 18(3): 937.
- [44] JARVIS K G, GRIM C J, FRANCO A A, et al. Molecular characterization of *Cronobacter* lipopolysaccharide O-antigen gene clusters and development of serotype-specific PCR assays[J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(12): 4017-4026.
- [45] KHEDHER M B, BARON S A, RIZIKI T, et al. Massive analysis of 64, 628 bacterial genomes to decipher water reservoir and origin of mobile colistin resistance genes: is there another role for these enzymes? [J]. Scientific reports, 2020, 10(1): 5970. ◆