

鸡源大肠杆菌 β -内酰胺类药敏及 *bla*_{CTX-M} 基因携带状况的探讨*

张利锋¹, 齐 静², 罗成旺¹, 刘玉庆², 陈 霞¹, 袁 敏¹, 禹蕙兰¹, 卢金星¹, 李 娟^{1△} (1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所/传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206; 2. 山东省农科院畜牧兽医研究所, 济南 250100)

【摘要】 目的 分析肉鸡养殖、屠宰和销售不同环节来源大肠杆菌对 β -内酰胺类药物的敏感性及其 CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 的携带状况, 探讨大肠杆菌在肉鸡养殖、屠宰和销售环节上可能存在的耐药性传播。**方法** 对从山东大型肉鸡养殖场、屠宰场分离的 373 株大肠杆菌进行药物敏感性检测、*bla*_{CTX-M} 基因核酸检测及序列分析。**结果** 菌株对头孢他啶、头孢噻肟和哌拉西林存在高水平的耐药, 耐药率依次是 89.3%、92.8% 和 91.7%, 但对哌拉西林/他唑巴坦仍保持敏感。菌株 *bla*_{CTX-M} 基因的携带率高, 达 54.7% (204/373), 来自养殖和销售等不同环节的菌株携带的 *bla*_{CTX-M} 基因集中在 4 个亚型, 分别是 *bla*_{CTX-M-55}、*bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{CTX-M-14} 和 *bla*_{CTX-M-27}。**结论** 鸡源大肠杆菌对青霉素及头孢菌素类药物有较高的耐药率, 对酶抑制剂复方制剂仍保持较高的敏感率。携带 *bla*_{CTX-M} 基因的菌株来自养殖和销售等不同的环节, 主要集中在 4 个亚型, 提示肉鸡食品链不同环节可能存在大肠杆菌耐药性的传播。

【关键词】 大肠杆菌; 细菌耐药; *bla*_{CTX} 基因; 耐药性传播

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)09-1153-03

Discussion of antimicrobial resistances and β -lactamases CTX subtypes of *Escherichia coli* strains isolated from chickens* ZHANG Li-feng¹, QI Jing², LUO Cheng-wang¹, LIU Yu-qing², CHEN Xia¹, YUAN Min¹, YU Hui-lan¹, LU Jin-xing¹, LI Juan^{1△} (1. State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control/National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2. Animal Husbandry and Veterinary Institute of Academy of Agricultural Sciences of Shandong Province, Shandong 250100, China)

【Abstract】 Objective To analyse the antimicrobial resistances profiles and β -lactamases CTX subtypes of the *Escherichia coli* strains isolated from different poultry production process of breeding, slaughtering and retails and explore the transmission of drug resistance of *Escherichia coli* in chicken breeding, slaughter and sale. **Methods** Antimicrobial resistant profiles and *bla*_{CTX-M} gene were tested in three hundred and seventy-three *Escherichia coli* that from poultry production process. Genotypes of CTX-M type ESBLs were identified by PCR and DNA sequencing. **Results** Three hundred and seventy-three strains were highly resistant to ceftazidime, cefotaxime and piperacillin, which resistance rate attached to 89.3%, 92.8% and 91.7% respectively. While they were still susceptible to piperacillin/tazobactam. The rate of the strains carrying the *bla*_{CTX-M} gene was up to 54.7% (204/373), focused on four subtypes *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CTX-M-27}. **Conclusion** *E. coli* strains isolated from poultry production were high resistant to cephalosporins and penicillin, while still sensitive to β -lactamase inhibitor compound. The strains carrying *bla*_{CTX-M} gene were mainly isolated from the breeding and retail process, focused on four subtypes, inferring that the possible *bla*_{CTX-M} gene transfer during the poultry food production.

【Key words】 *Escherichia coli*; drug resistance; antimicrobial resistance gene *bla*_{CTX-M}; gene horizontal transfer

细菌耐药是目前人类面临的重大公共卫生问题, 其中菌株产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 是近年来关注和研究的焦点^[1]。随着新一代 β -内酰胺类抗菌药物如第 3、4 代头孢菌素类药物在人类及动物上的大量使用, 细菌产生的能够水解这类抗菌药物的 ESBLs 逐步被发现。CTX-M 型 ESBLs 在革兰阴性菌中携带率不断攀升^[2], 新的型别也不断被发现。根据 Lahey Clinic (<http://www.lahey.org/Studies/>) 网站的报道, 截止

2013 年, 报道的 *bla*_{CTX-M} 基因型已有 148 种。目前, 国内关于动物来源菌株携带 CTX-M 屡有报道, 但从养殖、屠宰、销售等动物性食品生产链的角度来研究 CTX-M 型 ESBLs 在不同环节菌株中携带情况及系统研究 CTX 亚型分布的报道较少。本文对从山东采样分离的 373 株大肠杆菌进行药物敏感性检测及 *bla*_{CTX-M} 基因亚型分析, 探讨携带不同 *bla*_{CTX-M} 亚型基因的大肠杆菌在食品生产链的不同环节上的分布规律及可能的传播

* 基金项目: 国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (2013ZX10004217)。

作者简介: 张利锋, 女, 公卫执业医师, 硕士, 主要从事动物源革兰阴性杆菌耐药基因研究。△ 通讯作者, E-mail: lijuan@icdc.cn。

途径。

1 材料与方法

1.1 材料 373 株大肠杆菌分离自山东某大型养殖有限公司,采集自种鸡场、商品鸡场、鸡屠宰场等环节的鸡肛拭子,饲养员鼻拭子、屠宰过程中洗涤用水及分割肉等样本。菌株置 25%甘油肉汤中-80℃待检。

1.2 仪器与试剂 头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、哌拉西林(PIP)、PIP/他唑巴坦(TZP)均购自北京天坛生物制品股份有限公司;MH 培养基为英国 Oxoid 产品;细菌多点接种仪购自日本 SAKUMA 公司。细菌基因组提取试剂盒(Wizard® Genomic DNA Purification Kit)为美国 Promega 公司产品;Ex-Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、dNTPs 及 DL2000 DNA Marker 为大连 TaKaRa 公司产品。PCR 仪(Senso Quest Lab-cycler)购自德国 Senso 公司;凝胶成像系统(Gel Doc™ XR+)

购自美国 Bio-Rad 公司。PCR 引物合成、产物纯化及测序由北京天一辉远生物技术有限公司完成。

1.3 实验方法 采用琼脂稀释法对 373 株大肠杆菌进行 3 类 4 种抗菌药物抗性检测,包括青霉素类:PIP;β-内酰胺酶+β-内酰胺酶抑制剂组合:PIP+TZP;头孢菌素类:CTX、CAZ。药敏结果的判读参照美国临床和实验室标准协会(CLSI,2015)的推荐标准。

1.4 CTX-M 基因型检测 *bla*_{CTX-M} 基因通用引物 PCR 扩增 *bla*_{CTX-M} 基因。扩增阳性的菌株,再选用 5 对特异性引物分别扩增 5 组 *bla*_{CTX-M} (PCR 引物序列及扩增条件见表 1)。PCR 扩增产物纯化后测序,将测序结果拼接后,在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)以及 Lahey Clinic (<http://www.lahey.org/Studies/>)数据库中进行检索比对,确定基因型别。

表 1 检测 CTX-M 型基因的 PCR 引物

目的型别	引物序列 (5'-3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)	参考文献
<i>bla</i> _{CTX-M}	F:TTTGCATGTGTCAGTACCAGTAA R:CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	51	522	[3]
<i>bla</i> _{CTX-M-G2}	F:TTAATGATGACTCAGAGCATTC R:GATACCTCGCTCCATTATTG	58	901	[4]
<i>bla</i> _{CTX-M-G9}	F:TATTGGGAGTTTGAGATGGT R:TCCTTCAACTCAGCAAAAGT	50	932	[4]
<i>bla</i> _{CTX-M-G1}	F:CGTCACGCTGTTGTTAGGAA R:ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT	55	780	[5]
<i>bla</i> _{CTX-M-G8}	F:CAGGAGTTTGAGATGATGAG R:GAGCGCTCCACATTTTTTAG	55	910	[5]
<i>bla</i> _{CTX-M-G25}	F:AGGATGATGAGAAAAAGCGT R:TACAAATAGTAAAGTGGAGCG	55	923	[5]

2 结果

2.1 大肠杆菌药敏结果 见表 2。

表 2 大肠杆菌对 4 种被测抗菌药物的药敏结果

抗菌药物	MIC 众数 (μg/mL)	MIC _{max} (μg/mL)	MIC _{min} (μg/mL)	耐药 [n(%)]
CTX	≥64	≥64	≤0.125	346(92.8)
CAZ	≥256	≥256	≤1	332(89.3)
PIP	=256	≥1 024	≤8	342(91.7)
TZP	≤2/4	≥128/4	≤2/4	24(6.4)

注:最低抑菌水平(MIC)。

2.2 *bla*_{CTX-M} 基因型检测结果及相应耐药表型 见表 3。

表 3 *bla*_{CTX-M} 基因型检测结果及相应耐药表型

耐药基因类型	菌株 (n)	MIC ₁₀ (CAZ)	MIC ₁₀ (CTX)	MIC ₁₀ (PIP)	MIC ₉₀ (TZP)
CTX-M-55	95	16	16	16	≤32/4
CTX-M-65	62	16	16	128	≤16/4
CTX-M-14	55	16	16	64	≤16/4
CTX-M-27	12	256	16	256	≤16/4

注:MIC 的单位均为 μg/mL。

因,耐药基因携带率为 54.7%。其中有 2 株菌株同时携带 *bla*_{CTX-M-55} 和 *bla*_{CTX-M-27},有 8 株菌株同时携带 *bla*_{CTX-M-55} 和 *bla*_{CTX-M-14},有 6 株菌株同时携带 *bla*_{CTX-M-55} 和 *bla*_{CTX-M-65},有 1 株菌株同时携带 *bla*_{CTX-M-65} 和 *bla*_{CTX-M-14}。

2.3 养殖、屠宰、销售各环节耐药菌携带的耐药基因类型汇总 养殖环节中,大肠杆菌携带的耐药基因类型有 *bla*_{CTX-M-55}、*bla*_{CTX-M-27}、*bla*_{CTX-M-65} 和 *bla*_{CTX-M-14} 4 种类型,屠宰环节中未检测到携带 *bla*_{CTX-M} 耐药基因的大肠杆菌,销售环节中大肠杆菌携带的耐药基因类型有 *bla*_{CTX-M-55}、*bla*_{CTX-M-27} 和 *bla*_{CTX-M-65} 3 种类型。见表 4。

表 4 食物链各环节携带的 CTX-M 基因型别汇总

食物链各环节名称	样本来源	耐药基因型别
养殖	种鸡肛拭子	CTX-M-27、65、55
	商品鸡肛拭子	CTX-M-27、65、55、14
	患病商品鸡肛拭子	CTX-M-27、65、55、14
	患病商品鸡肝脏	CTX-M-65、55
屠宰	无	
销售	商品鸡表皮	CTX-M-55、14
	商品鸡胸部	CTX-M-65
	商品鸡肝脏	CTX-M-65、14

373 株大肠杆菌中共有 204 株菌株携带 *bla*_{CTX-M} 型耐药基

3 讨 论

随着临床和兽医抗菌药物的大量、广泛使用,细菌耐药尤其是由 ESBLs 介导的耐药已成为突出的问题,CTX-M 型是传播最广泛的。目前,国际上对于动物源产 CTX-M 型 ESBLs 的大肠杆菌报道的基因型有 *bla*_{CTX-M-1} 型、*bla*_{CTX-M-2} 型、*bla*_{CTX-M-3} 型、*bla*_{CTX-M-14} 型和 *bla*_{CTX-M-15} 型^[6-9],我国动物源产 CTX-M 型酶的大肠杆菌报道的基因型以 *bla*_{CTX-M-G1} 组中的 *bla*_{CTX-M-55} 和 *bla*_{CTX-M-G9} 组中的 *bla*_{CTX-M-65} 和 *bla*_{CTX-M-14} 为主^[2,10-11]。菌株产 CTX-M 型 ESBLs 及基因型的差异,可能与地理因素、养殖业中抗菌药物的使用等多种因素有关。本文在分析中发现,产 CTX-M 型 ESBLs 的大肠杆菌基因型以 *bla*_{CTX-M-G1} 组中的 *bla*_{CTX-M-55} 和 *bla*_{CTX-M-G9} 组中的 *bla*_{CTX-M-65} 及 *bla*_{CTX-M-14} 为主,同时发现了较少报道的 *bla*_{CTX-M-G9} 组中的 *bla*_{CTX-M-27}。

CTX-M 型 ESBLs 对 CTX 的水解活性最强,对酶抑制剂 TZP 较舒巴坦或棒酸更为敏感,介导第 3 代头孢类和青霉素类抗菌药物耐药^[12]。药敏结果显示,大肠杆菌对 CTX、CAZ、PIP 均有较高的耐药率,且最大的 MIC 值分别是界值的 16 倍、16 倍和 8 倍,均呈高水平的耐药。其中对 CTX 的耐药率最高,对 PIP/TZP 敏感。由表 3 可以看出携带耐药基因的菌株对应的高 MIC 值所占的比例更高,携带 *bla*_{CTX-M-27} 的菌株对 CAZ 和 PIP 的 MIC 值高达 256 μg/mL 的比例均为 90%,推断 *bla*_{CTX-M-27} 基因对 CAZ 和 PIP 的耐药水平较高。

研究还发现个别菌株不携带耐药基因,但对 CTX、CAZ 和 PIP 均耐药,说明还有其他的耐药机制介导了这些菌株耐药的产生,有待进一步探讨。

追溯商品鸡食品生产链的不同环节、不同样本携带的耐药基因型别发现,养殖环节中,种鸡携带的 *bla*_{CTX} 基因型别在商品鸡肛拭子中均有,说明从种鸡到商品鸡可能是 *bla*_{CTX} 耐药基因传播的一个环节,且患病鸡肝脏样品分离菌株中携带的耐药基因型别在商品鸡肛拭子分离菌株中均携带,推断养殖环节中致病菌和正常携带菌间可能存在耐药基因的传播。销售环节中不同部位的分割肉:表皮、胸部、肝脏等分离菌株携带的基因型别均是养殖环节中商品鸡来源菌株携带的基因型别,说明从商品鸡到分割肉的加工环节可能存在耐药菌株或耐药基因的传播。而中间的屠宰环节来源样品中未分离到携带 *bla*_{CTX-M} 耐药基因的菌株,屠宰环节是否不存在携带 *bla*_{CTX-M} 耐药基因的菌株或是采集样品的局限抑或是其他的原因还需要进一步研究。部位不同的分割肉来源菌株中 CTX、CAZ 和 PIP 携带的耐药基因型别也不同,推断耐药基因型别的分布可能与器官、组织类型有关。养殖环节中病死鸡肝脏携带的耐药基因型别和销售环节中分割肉中肝脏携带的耐药基因型别不同,推断耐药基因型别的分布可能与鸡的免疫生理状况有关。从养殖、屠宰到销售的环节中都可能存在耐药基因的传播。因此,在加强人和动物感染检测与监测的同时,应进行菌株耐药性监测,采取有效的措施阻遏耐药菌的传播。

参考文献

[1] Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant

β-lactamases [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2013, 1277: 84-90.

[2] 杜向党, 焦显芹, 莫娟, 等. 鸡猪源大肠杆菌 CTX-M 型 ESBLs 的分子检测 [J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 90-93.

[3] Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, et al. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(12): 3724-3732.

[4] Kim J, Lim YM, Jeong YS, et al. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Korea [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(4): 1572-1575.

[5] Wang XR, Chen JC, Kang Y, et al. Prevalence and characterization of plasmid-mediated blaESBL with their genetic environment in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with pneumonia [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(5): 894-900.

[6] Roest HI, Liebana E, Wannet W, et al. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* O157 isolated between 1998 and 2003 in the Netherlands [J]. Tijdschr Diergeneesk, 2007, 132(24): 954-958.

[7] Valat C, Haenni M, Saras E, et al. CTX-M-15 extended-spectrum β-lactamase in a shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate of serotype O111 H8 [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(4): 1308-1309.

[8] Pehlivanlar OS, Aslantas O, Sebnem YE, et al. Prevalence of β-lactamase producing *Escherichia coli* from retail meat in Turkey [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(9): 2023-2029.

[9] Meireles D, Leite ML, Bessa LJ, et al. Molecular characterization of quinolone resistance mechanisms and extended-spectrum β-lactamase production in *Escherichia coli* isolated from dogs [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2015(41): 43-48.

[10] 曲志娜, 张颖, 李玉清, 等. 鸡、猪大肠杆菌 ESBLs 基因型检测及耐药性分析 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(8): 50-54.

[11] 刘雅妮, 商军, 郭士博. 猪源分离大肠埃希菌产 ESBLs 的基因型及耐药性分析 [J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(9): 19-22.

[12] Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassics PT. CTX type β-lactamase: an emerging group of extended-spectrum β-lactamase [J]. Int J Antimicrob Agents, 2000, 14(2): 137.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-24)