

广州某生猪养殖场大肠杆菌流行性及抗生素的耐药性

黄琴¹, 石磊², 狄慧玲^{1,2}, 闫鹤¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

摘要: 本研究采集广州某规模化养殖场腹泻仔猪、健康仔猪及环境样本共 147 份, 据国标 GB 4789.6-2016 分离鉴定大肠杆菌, 用 K-B 法分析分离株对 12 种抗生素的敏感性, 并用 PCR 检测其对应的耐药基因。结果共检出大肠杆菌 115 株; 分离菌株依次对复方新诺明、左氧氟沙星、加替沙星、环丙沙星呈高水平耐药, 耐药率 > 30%; 对庆大霉素、头孢他啶、氨基糖苷类也呈现一定水平耐药 (20%~30%); 对多粘菌素 B、替加环素、亚胺培南耐药水平较低 (< 15%), 对美罗培南敏感; 46.09% 菌株呈现多重耐药 (≥ 3 种抗生素), 且腹泻仔猪源菌株多重耐药率显著高于健康仔猪源及环境源菌 ($p < 0.05$)。分离株耐药基因携带严重, 其中 *ant(3'')-Ia*、*aac(3)-Ib*、*sul1*、*aac(3)-IIb*、*bla_{TEM}*、*bla_{CTX}*、*tetM* 基因检出率 > 50%, 因此, 这可能是本研究菌株的主要耐药机制。研究结果表明该养殖场大肠杆菌污染严重, 耐药水平高, 有关部门需加强养殖中腹泻仔猪防治用药的监管与指导。

关键词: 腹泻仔猪; 大肠杆菌; 抗生素耐药

文章编号: 1673-9078(2018)08-200-206

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.029

Prevalence and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* from A Pig Farm in Guangzhou

HUANG Qin¹, SHI Lei², DI Hui-ling^{1,2}, YAN He¹

(1. Food Science and Engineering School, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Research Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: This research investigated 147 samples collected from diarrhea pigs, healthy pigs and environment of a large-scale farm in Guangzhou. *Escherichia coli* strains were isolated and identified according to GB 4789.6-2016, and their susceptibility to 12 antibiotics and corresponding resistance genes were analyzed using the K-B disc diffusion method and polymerase chain reaction (PCR), respectively. Results revealed a total of 115 strains of *E. coli*. Drug resistance to sulfamethoxazole, levofloxacin, gatifloxacin and ciprofloxacin was high (over 30%), to gentamicin, ceftazidime and Aztreonam was moderate (20%~30%), and to polymyxin B, tigecycline and imipenem was relatively low (< 15%), with sensitivity to meropenem also detected. Multi-drug resistance (resistance to strains ≥ 3) was observed in 46.09% strains, with the strains from the diarrhea pigs being more resistant than those of the healthy pigs and environmental samples ($p < 0.05$, χ^2 -test). The isolated strains carried high levels of genes encoding resistance to drugs, among which the detection rates of *ant(3'')-Ia*, *aac(3)-Ib*, *sul1*, *aac(3)-IIb*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}*, *tetM* genes over 50%, thus suggesting the major resistance mechanism for the strains isolated in this study. The results of present study indicated the serious contamination with *E. coli* strains in this farm and their high antibiotic resistance. Relevant departments should provide supervision and guidance on the use of appropriate antibiotics for the effective prevention and treatment of diarrhea pigs.

Key words: diarrhea pig; *Escherichia coli*; antimicrobial resistance

收稿日期: 2017-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31571934); 广东省科技计划项目 (2014A020214001、2016A020219001); 中央高校基本科研业务费 (D2170320); 中央高校建设世界一流大学 (学科) 和特色发展引导专项资金 (K5174960); 中国博士后科学基金项目 (2016M590785)

作者简介: 黄琴 (1992-), 女, 在读研究生, 研究方向: 食源性病原菌快速检测与诊断研究

通讯作者: 狄慧玲 (1983-), 女, 在站博士后, 博士, 研究方向: 食源性病原菌快速检测及其分子生物学特性研究; 闫鹤 (1972-), 女, 副研究员, 研究方向: 食品微生物

猪肉是我国最主要的肉类消费品和蛋白质摄取来源,生猪养殖业不仅仅满足肉类消费需要,而且在国内外经济中占有重要地位。其中仔猪腹泻是危害养猪业的一种重要疾病,特别是刚出生的仔猪,近一半(49%)的仔猪死亡由腹泻引起^[1]。尽管导致仔猪腹泻的原因非常复杂,但大肠杆菌是其主要病原菌已经明确。大肠杆菌作为肠道菌群中最主要的一种细菌,除腹泻外还能够引发败血症、肺部、尿道或腹腔感染^[2],严重威胁畜牧养殖业发展。伴随着抗生素在疾病防治和饲料添加中的广泛使用乃至滥用,大肠杆菌分离菌株的抗生素耐药率不断攀升,且呈现耐药谱广、多重耐药、耐药传播加速等趋势。同时,抗生素的大量使用致使猪养殖场环境中的细菌生成耐药基因的贮存库,不仅持续危害生猪养殖,而且还可通过感染生猪、污染猪肉进一步通过食物链传播到人类,造成严重的食品安全和公共卫生问题^[3]。

目前,许多研究者对所在地区的猪源大肠杆菌进行临床常用抗生素的耐药情况监测,发现不同地域的猪源大肠杆菌耐药情况有不同程度的差异^[4-6]。由于不同地域抗生素的使用方式不同,大肠杆菌的耐药性存在差异。

广州地区生猪养殖场大肠杆菌的耐药情况鲜有报道,耐药情况不明。但磺胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类、四环素等抗生素具有杀菌谱广和快速杀菌等优点,广泛用于畜牧业的养殖。因此,本研究采集广州某规模化生猪养殖场中腹泻仔猪和健康仔猪及猪圈环境样本,对其进行大肠杆菌的分离鉴定,并对分离菌株进行 β -内酰胺类、喹诺酮类和氨基糖苷类等抗生素敏感性及其对应的耐药基因型进行检测,分析研究广州地区猪源大肠杆菌的流行特征及抗生素耐药规律,寻找仔猪腹泻可能的病因,以期指导仔猪腹泻病的防治用药,同时为进一步防治食源性疾病的爆发提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 样本来源

2017年3~5月从广州地区某规模化生猪养殖场中采集样本147份,其中腹泻仔猪样品97份(粪便拭子48份,咽拭子18份,鼻拭子3份,组织样品28份),健康仔猪样品28份(粪便拭子6份,组织样品22份),猪圈环境样品22份。

1.2 培养基和主要试剂

药敏纸片,杭州微生物试剂有限公司;rTaq DNA

聚合酶(5 U/ μ L)、琼脂糖,日本 TaKaRa 公司;引物,生工生物工程(上海)股份有限公司合成;肠道增菌肉汤、麦康凯琼脂平板(MAC)、三糖铁琼脂(TSI)、蛋白胨水、靛基质试剂、尿素琼脂、氰化钾(KCN)培养基、MH肉汤、LB肉汤,广州环凯微生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株分离纯化

采集的样品依据国标 GB 4789.6-2016 增菌,将增菌液划线接种 MAC 琼脂平板上,37℃培养 16~18 h,挑取砖红色至桃红色典型菌落在 MAC 平板上二次划线纯化。

1.3.2 生化鉴定

将疑似大肠杆菌分离株分别接种 TSI 斜面、蛋白胨水、尿素琼脂和 KCN 肉汤,于 37℃培养 16~18 h。对分离菌株进行生化试验,记录结果。

1.3.3 *uidA* 基因鉴定

将生化鉴定结果为阳性的分离菌株,采用煮沸法提取细菌 DNA,从 37℃过夜培养的营养琼脂平皿中,挑取单菌落 2~4 个,加入 200 μ L 无菌双蒸水,100℃煮沸 10 min,快速冷却,13000 r/min 离心 10 min,取上清液即为模板 DNA,-20℃保存。以大肠杆菌 ATCC25922 作为阳性对照株,金黄色葡萄球菌 ATCC25923 作为阴性对照株,无菌双蒸水作为空白对照,以大肠杆菌特异性 *uidA* 基因做 PCR 验证,引物序列见表 1。

1.3.4 抗菌药物药敏试验

采用美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的 K-B 纸片法,依次对所有大肠杆菌分离菌株进行 12 种 6 大类抗菌药物的敏感性测定,其中, β -内酰胺类药敏纸片 5 种:头孢他啶(30 μ g)、头孢唑肟(30 μ g)、氨曲南(30 μ g)、亚胺培南(10 μ g)、美罗培南(10 μ g);喹诺酮类药敏纸片 3 种:环丙沙星(5 μ g)、加替沙星(5 μ g)、左氧氟沙星(5 μ g);氨基糖苷类、四环素类、磺胺类及多肽类药敏纸片各 1 种,分别为:庆大霉素(10 μ g)、替加环素(15 μ g)、复方新诺明(1.25/23.75 μ g)、多粘菌素 B(10 μ g)。结果判读参照 CLSI 2012 年版的标准^[7],以大肠杆菌 ATCC25922 作标准质控菌株。

1.3.5 耐药基因检测

对所有的耐药菌株进行 PCR 扩增,检测其相应的耐药基因。检测的耐药基因包括:磺胺类:*sul1*;喹诺酮类:*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*aac(6)-Ib*; β -内酰胺类:*bla_{CTX}*、*bla_{SHV}*、*bla_{TEM}*;四环素类:*tetK*、*tetM*;氨基

糖苷类：*aph(3')-IIa*、*aac(3')-Ib*、*ant(3'')-Ia*、*aac(3')-IIb*。根据报道^[1,8-12]设计相关引物，引物序列及扩增条件见表 1。

1.3.6 数据处理

采用 spss 22.0 软件进行统计学处理，计数资料用 χ^2 检验， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 检测的引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

基因	引物	引物序列 (5'-3')	片段大小/bp	退火温度/°C
<i>uidA</i>	uidA-F	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTTCG	1487	55
	uidA-R	AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTC		
<i>sulI</i>	sulI-F	TTCGGCATTCTGAATCTCAC	822	53
	sulI-R	ATGATCTAACCCCTCGGTCTC		
<i>qnrA</i>	qnrA-F	TTCAGCAAGAGGATTTCTCA	628	55
	qnrA-R	GGCAGCACTATTACTCCCAA		
<i>qnrB</i>	qnrB-F	CCTGAGCGGCACTGAATTTAT	409	60
	qnrB-R	GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA		
<i>qnrS</i>	qnrS-F	ACATAAAGACTTAAAGTGATC	619	55
	qnrS-R	CAATTAGTCAGGATAAAC		
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	55
	aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>bla_{CTX}</i>	CTX-F	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	593	48
	CTX-R	TGGGTRAARTARGTSACCAGA		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F	ATGCGTTATATTCGCTGTG	753	57
	SHV-R	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA		
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCGT	861	48
	TEM-R	TTACCAATGCTTAATCAGTGA		
<i>tetK</i>	tetK-F	GTAGCGACAATAGGTAATAGT	360	55
	tetK-R	GTAGTGACAATAAACCTCCTA		
<i>tetM</i>	tetM-F	AGTGGAGCGATTACAGAA	158	55
	tetM-R	CATATGTCCTGGCGTGTCTA		
<i>aph(3')-IIa</i>	aph(3')-II a-F	TGACTGGGCACAACAGACAA	677	58
	aph(3')-II a-R	CGGCGATAATACCGTAAAGCAC		
<i>aac(3')-Ib</i>	aac(3')-I b-F	ATGACCTTGCGATGCTCTATGA	486	59
	aac(3')-I b-R	CGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>ant(3'')-Ia</i>	ant(3'')-I a-F	ATCTGGCTATCTTGCTGACA	284	57
	ant(3'')-I a-R	TATGACGGGCTGATACTGG		
<i>aac(3)-IIb</i>	aac(3)-II b-F	ACCCTACGAGGAGACTCTGAATG	384	59
	aac(3)-II b-R	CCAAGCATCGGCATCTCATA		
<i>mcr-1</i>	mcr-1	CGGTCAGTCCGTTTGTTT	309	52
	mcr-1	CTTGGTCCGTCTGTAGGG		
<i>mcr-2</i>	mcr-2	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	577	55
	mcr-2	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG		

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌的检出情况

经细菌生化鉴定及 *uidA* 基因检测验证，147 份样

本中共分离大肠杆菌 115 株，分离率为 78.23%，其中腹泻仔猪样品分离 83 株，健康仔猪样品分离 25 株，猪圈环境样品分离 7 株，详见表 2。统计分析表明，环境样本的大肠杆菌分离率显著低于腹泻及健康仔猪样品的分离率($p < 0.01$)，但腹泻仔猪和健康仔猪样本中

大肠杆菌的分离率并无显著差异($p>0.05$), 这表明这些大肠杆菌可能为条件致病菌, 腹泻的发生可能与饮食或气候条件相关, 也有可能是自身免疫力低下导致。但总体广州地区猪源大肠杆菌的阳性率低于王基伟^[13]在长春地区养殖场里腹泻仔猪大肠杆菌的分离率(100%), 可能与养殖场地域及养殖方式有关, 也可能与地域流行病情况有关。有研究表明其他食源性致病菌的污染会随着大肠杆菌污染程度的加剧而增多^[14], 大肠杆菌的大量污染会加重仔猪腹泻的严重程度, 增加仔猪的死亡率。因而为防止仔猪腹泻疫情在此地区蔓延, 应当加强大肠杆菌污染的防控措施。

表2 广州地区猪场大肠杆菌分离情况

Table 2 Prevalence of *E.coli* from pig farm in Guangzhou

样本来源	样本数量	阳性菌株	分离率/%
腹泻仔猪	97	83	85.57
健康仔猪	28	25	89.29
猪圈环境	22	7	31.82
总计	147	115	78.23

2.2 大肠杆菌对 12 种抗生素的药敏情况

115 株大肠杆菌对 12 种抗生素的耐药情况见表 3。其中对磺胺类药物复方新诺明的耐药率最高, 腹泻仔猪、健康仔猪样品及环境样品分离株的耐药率都达到或接近 100%; 与国内外关于猪源大肠杆菌对复方新诺明的耐药率(90%~100%)的报道一致^[3,15,16], 这与磺胺类药物使用时间早、使用领域广泛有直接的关系, 同时也表明磺胺类药物已不合作为仔猪腹泻防治用

药。其次, 对三种喹诺酮类药物(左氧氟沙星 53.91%、加替沙星 48.70%、环丙沙星 36.52%)也呈现了较高水平耐药, 且腹泻仔猪样品分离株的耐药率显著高于健康仔猪样品分离株($p<0.01$), 但与环境样品分离株无显著差异($p>0.05$), 这可能与喹诺酮类抗生素的耐药性能够通过质粒介导进行水平传播有关^[17]。对 β -内酰胺类药物头孢他啶(31.30%)、氨基曲南(28.7%)也呈现了较高水平的耐药, 腹泻仔猪样品分离株的耐药率显著高于健康仔猪样品分离株($p<0.01$), 这可能与近年来养殖业中使用 β -内酰胺类药物作为抗菌药物有关, 今后有关部门应提醒养殖户对该类药物谨慎使用以免进一步扩大耐药菌群的加重; 但对头孢唑肟及亚胺培南的耐药水平较低, 仅在腹泻仔猪样品分离菌中检出, 对美罗培南所有菌株均敏感; 此外, 对氨基糖苷类药物庆大霉素及多肽类药物多粘菌素 B 呈现一定水平的耐药, 而对四环素类药物替加环素耐药水平较低, 且仅在腹泻仔猪样品中检出, 这可能与养殖场中较少使用这些药物的因素有关^[18], 可考虑作为今后的用药方向。

碳青霉烯类抗生素是治疗人类细菌感染的第一线药物^[18], 本次测定的猪源大肠杆菌出现了 2 株大肠杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药的菌株, 与国内外报道的耐药率情况相似^[8], 虽然耐药率不高, 但也应引起重视。另外多粘菌素和替加环素是目前治疗碳青霉烯类抗生素耐药菌的最后一道防线^[21], 而本次测定的猪源大肠杆菌对粘菌素和替加环素的耐药率分别为 11.30%、3.48%, 应予以重视。

表3 大肠杆菌对抗生素的耐药情况

Table 3 Antibiotic susceptibility of *E.coli* strains isolated in this study

药物种类	抗生素	菌株数/%			
		腹泻仔猪样本 (n=83)	健康仔猪样本 (n=25)	猪圈环境样本 (n=7)	总计 (n=115)
磺胺类	复方新诺明	82(98.79)	25(100.00)	7(100.00)	62(99.13)
	左氧氟沙星	53(63.86)	3(12.00)	6(85.71)	62(53.91)
喹诺酮类	加替沙星	48(57.83)	3(12.00)	5(71.43)	56(48.70)
	环丙沙星	36(43.37)	0(0.00)	6(85.71)	42(36.52)
氨基糖苷类	庆大霉素	23(27.71)	1(4.00)	2(28.57)	26(22.61)
	头孢他啶	28(33.73)	3(12.00)	5(71.43)	36(31.30)
β -内酰胺类	氨基曲南	29(34.94)	0(0.00)	4(57.14)	33(28.70)
	头孢唑肟	10(12.05)	0(0.00)	0(0.00)	11(9.57)
	亚胺培南	2(2.41)	0(0.00)	0(0.00)	2(1.74)
	美罗培南	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
四环素类	替加环素	4(4.82)	0(0.00)	0(0.00)	4(3.48)
多肽类	多粘菌素 B	10(12.05)	3(12.00)	0(0.00)	13(11.30)

与国内不同地区腹泻仔猪大肠杆菌耐药情况研究结果比较,发现广州地区腹泻仔猪大肠杆菌耐药率较其他地区具有不同程度的差异,2012年浙江省地区养殖场腹泻仔猪样品分离大肠杆菌对庆大霉素、环丙沙星的耐药率分别为77.4%、82.3%^[22],2014年吉林省地区养殖场腹泻仔猪样品分离大肠杆菌对左氧氟沙星、环丙沙星、庆大霉素的耐药率分别为58.06%、67.74%、67.74%^[21],2016年安徽省地区养殖场腹泻仔猪样品分离大肠杆菌对庆大霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、加替沙星、氨基曲南的耐药率分别为72.1%、58.1%、61.2%、55.8%和20.9%^[23]。本实验从腹泻仔猪样品分离大肠杆菌对庆大霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、加替沙星、氨基曲南的耐药率分别为27.71%、63.86%、43.37%、57.83%和34.94%,产生此种现象原因可能是不同地区养殖模式和预防治疗方式的不同。本实验腹泻仔猪样品分离株耐药情况较健康仔猪样品分离株的耐药情况严重,这可能与养殖场中对于腹泻仔猪的治疗,盲目用药甚至过量用药有关,今后兽医部门应制定相关措施,加强养殖场防治用药的指导工作。

2.3 耐药谱分析

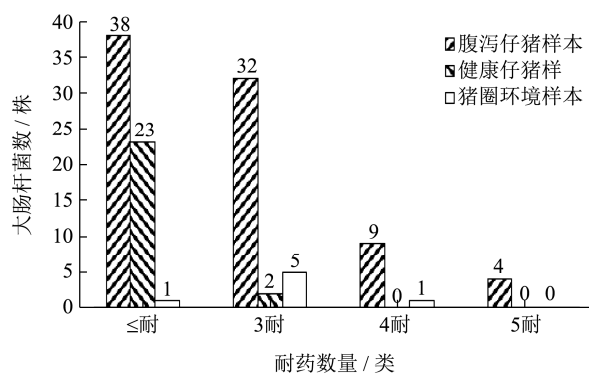


图1 大肠杆菌的多重耐药情况

Fig.1 Multi-Antimicrobial resistance of *E.coli* strains isolated in the study

本研究定义同时对≥3种抗生素耐药的菌株为多重耐药菌株,统计结果见图1。53株为多重耐药菌株,多重耐药率为46.09%,统计分析表明腹泻仔猪样品分离株的多重耐药率显著高于健康仔猪样品及环境样品分离株($p<0.05$)。腹泻仔猪样品菌株的主要耐药组合为磺胺类、 β -内酰胺类、喹诺酮类;来自健康仔猪样本的耐药组合较为分散;来自猪圈环境样本菌株的耐药组合与腹泻仔猪一致,这表明环境有可能受到腹泻仔猪粪便等排泄物的污染,有可能会进一步传染给健康仔猪,造成多重耐药菌在整个养殖场的扩散,加重仔猪腹泻的蔓延,因而需注意加强养殖场环境消毒,并

隔离腹泻仔猪。徐国峰^[6]对黑龙江省不同地区集约化生猪养殖场分离的462株大肠杆菌进行耐药性分析,其主要的耐药组合是磺胺类、 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类,与本次实验主要耐药组合相似,这表明磺胺类、磺胺类、 β -内酰胺类和喹诺酮类药物在我国生猪养殖业中使用广泛,已造成较广范围的细菌耐药。

2.4 耐药基因的PCR检测结果

表4 6类耐药大肠杆菌耐药基因分布率

Table 4 Detection rate of antibiotic resistance genes of 6 kinds of drug-resistance *E.coli* strains isolated in this study

耐药表型		耐药基因型		
抗生素	耐药株数	基因	PCR 阳性株数	阳性率
磺胺类	114	<i>sulI</i>	62	54.39
		<i>qnrA</i>	0	0.00
喹诺酮类	63	<i>qnrB</i>	4	6.35
		<i>qnrS</i>	9	14.29
		<i>aac(6)-Ib-cr</i>	28	44.44
氨基糖苷类	26	<i>aph(3)-IIa</i>	10	38.46
		<i>ant(3)-Ia</i>	19	73.08
		<i>aac(3)-Ib</i>	22	84.62
		<i>aac(3)-IIb</i>	22	84.62
β -内酰胺类	42	<i>bla_{SHV}</i>	0	0.00
		<i>bla_{TEM}</i>	26	73.81
		<i>bla_{CTX}</i>	31	61.90
四环素	4	<i>tetK</i>	0	0.00
		<i>tetM</i>	4	100.00
多肽类	13	<i>mcr-1</i>	0	0.00
		<i>mcr-2</i>	0	0.00

由表4的PCR检测结果可知,除多肽类外,其它5类抗生素耐药基因均有阳性扩增产物检出,检出率最高的为四环素类 *tetM* (100%),其次为氨基糖苷类: *aph(3)-IIa*、*ant(3)-Ia*、*aac(3)-IIb* (73.08%~84.62%); β -内酰胺类: *bla_{CTX}*、*bla_{TEM}* (61.9%~73.81%)及磺胺类 *sulI* (54.38%)。表明这些耐药基因可能是导致相应种类抗生素耐药的主要原因。但有些耐药基因检出率较低,如喹诺酮类: *qnrA*、*qnrB*、*qnrS* (0%~14.29%),表明这三个耐药基因不是本研究分离株的主要耐药机制。产超广谱 β -内酰胺酶 (Extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs)的大肠杆菌近年来引起广泛关注,引起不仅在临床病患体内检出,也广泛在健康人群中分检出^[24],本研究在腹泻仔猪、健康仔猪及环境样本中均检测到,表明该类耐药基因污染广泛,可能

是人类普遍感染的传染源之一。ESBLs 广义上可以分为三大类 TEM、CTX-M、SHV, 本研究只检测到前两类, 这与之前的一些研究相似^[25], 但李进福等^[26]关于河南地区猪呼吸道隐性感染大肠杆菌的研究中也检测到 SHV, 表明大肠杆菌 β -内酰胺类耐药机制可能存在地域差异。另孙慧等^[11]报道的山东禽源大肠杆菌氨基糖苷类耐药基因 *ant(3')-Ia*、*aac(6)-Ib*、*aph(3')-IIa* 的检出率分别为 49.6%、25.0%、22.8%, 低于本实验结果; 而磺胺类耐药基因 *sulI* 的检出率却低于韦庆兰等^[27]报道的大肠杆菌 *sulI* 耐药基因检出率 (73.8%), 喹诺酮类耐药基因 *qnrS* 的检出率低于夏绪进等^[28]对新疆地区猪源大肠杆菌的研究结果 (62.5%), 这些均表明各地大肠杆菌耐药机制大体一致, 但主要的耐药机制可能存在地域差异。

3 结论

3.1 广州某规模化生猪养殖场中大肠杆菌污染严重, 阳性率高达 78.23%, 养殖环境样品的大肠杆菌阳性率显著低于腹泻仔猪和健康仔猪样品的分离率 ($p < 0.01$); 但腹泻仔猪和健康仔猪样本中大肠杆菌的阳性率并无显著差异 ($p > 0.05$)。所有菌株对磺胺类及喹诺酮类药物呈现了较高水平耐药 (>30%), 不建议再作为仔猪腹泻的防治用药; 对多粘菌素 B、替加环素、亚胺培南耐药水平较低 (<15%), 对美罗培南敏感, 可以作为今后仔猪腹泻的用药方向。46.09%分离株呈现多重耐药 (≥ 3 种抗生素); 且腹泻仔猪样品分离株的多重耐药率显著高于健康仔猪样品及环境样品分离株 ($p < 0.05$)。除多肽类外, 本研究其它 5 类抗生素耐药基因均有阳性扩增产物检出, 且检出率较高, 表明耐药基因元件在本地污染大肠杆菌细菌中普遍存在, 但检出率与其他地域存在差异, 表明主要耐药机制可能存在地域差异。

3.2 我国是养猪大国, 猪肉是人类日常喜爱的消费食品, 因而猪肉食品的安全越来越受到人们的关注。因养猪业中大量使用抗生素, 使得在养殖环境中, 形成细菌耐药基因贮藏库, 耐药性细菌通过生-猪-肉-人的链条将其携带的耐药基因散播给人类, 给人类健康造成威胁。本研究从广州地区某生-猪-肉-人链条的养殖场采集样品, 对大肠杆菌进行分离鉴定及耐药性分析, 为当地生-猪-肉-人链条的养殖场腹泻仔猪临床治疗提供指导意见, 同时为防治食源性疾病的爆发提供数据支持。

参考文献

[1] Yang Q, Huang X, Zhao S, et al. Structure and function of the fecal microbiota in diarrheic neonatal piglets [J]. *Frontiers in*

Microbiology, 2017, 8: 502-514

- [2] Tian G, Zhang Z, Zou L, et al. Detection of clinically important-lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, 61(2): 233-238
- [3] Xu G, An W, Wang H, et al. Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1103-1111
- [4] 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
FENG Shi-wen, LI Jun, PAN Yan, et al. Antimicrobial resistance variation of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pig in Guangxi [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(2): 350-356
- [5] 黄健强, 南文金, 胡鸿惠, 等. 粤北地区仔猪腹泻大肠杆菌分离鉴定及耐药性分析 [J]. *微生物学杂志*, 2017, 37(3): 59-64
HUANG Jian-qiang, NAN Wen-jin, HU Hong-hui, et al. Isolation and identification of *E. coli* from piglets diarrhea and drug resistance analysis in North Guangdong region [J]. *Journal of Microbiology*, 2017, 37(3): 59-64
- [6] 徐国锋. 碳青霉烯不敏感大肠杆菌分子特征及 NDM-1 适应性代价研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015
XU Guo-feng. Study on the molecular characteristic of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* and fitness cost of NDM-1 [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015
- [7] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M31 A2 [S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2012
- [8] Wang Y, Zhang R, Li Z, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(2): 16260-16266
- [9] 钟钦卿. 四川省动物源大肠杆菌质粒介导 ESBLs 和 AmpC 酶耐药基因的检测 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012
ZHONG Qin-qing. The detection of plasmid-mediated ESBLs and Amp C β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from animals in Sichuan province [D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2012
- [10] Jiang H, Lu D, Chen X, et al. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China [J]. *The Veterinary Journal*, 2011, 187(1): 99-103

- [11] 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
SUN Hui, LEI Zhan, ZOU Jin-feng, et al. Mechanism of resistance and detection of resistance genes to aminoglycoside among avian *Escherichia coli* strains from Shandong province [J]. Chinese Journal of Veterinary, 2011, 31(9): 1279-1282
- [12] Wang M, Guo Q, Xu X, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(5): 1892-1897
- [13] 王基伟,孙洋,纪雪,等.长春地区猪源大肠杆菌的分离鉴定和耐药性分析[J].中国兽药杂志,2014,48(11):14-18
WANG Ji-wei, SUN Yang, JI Xue, et al. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Swine in Changchun [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(11): 14-18
- [14] 席美丽.食源性革兰氏阴性肠道病原菌 PFGE 分型和大肠杆菌耐药性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2009
XI Mei-li. Study on PFGE subtyping of gram negative foodborne pathogen and antibiotic resistance of *E.coli* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2009
- [15] Liu B, Liao X, Yue L, et al. Prevalence of β -lactamase and 16S rRNA methylase genes among clinical *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from animals [J]. Microbial Drug Resistance, 2013, 19(3): 237-245
- [16] Wang X, Liao X, Liu S, et al. Serotypes, virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from pigs [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(6): 687-692
- [17] Veldman K, Cavaco L, Mevius D, et al. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(6): 1278-1286
- [18] 隋倩雯,张俊亚,魏源送,等.畜禽养殖过程抗生素使用与耐药病原菌及其抗性基因赋存的研究进展[J].生态毒理学报,2015,10(5):20-34
SUI Qian-wen, ZHANG Jun-ya, WEI Yuan-song, et al. Veterinary antibiotics use, occurrence of antibiotic resistance pathogen and its antibiotic resistance genes in animal production: an overview [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(5): 20-34
- [19] Abraham S, Wong H, Turnidge J, et al. Carbapenemase-producing bacteria in companion animals: a public health concern on the horizon [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(5): 1155-1161
- [20] Woodford N, Wareham D, Guerra B, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(2): 287-291
- [21] Liu Y, Wang Y, Walsh T, 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
- [22] 张静,姜中其,虞惠贞,等.腹泻仔猪病原性大肠埃希菌毒力因子分布与耐药性分析[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2013,39(1):98-104
ZHANG Jing, JIANG Zhong-qi, YU Hui-zhen, et al. Distribution of virulence factors in pathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal piglets and their antibacterial resistance [J]. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci), 2013, 39(1): 98-104
- [23] 陈传荣,韩敏敏,赵乃嘉,等.腹泻仔猪源致病性大肠杆菌生物膜与耐药性及毒力的相关性[J].微生物学通报,2016,43(10):2234-2241
CHEN Chuan-rong, HAN Min-min, ZHAO Nai-jia, et al. Association of biofilm formation with drug-resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from diarrhea piglet [J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2234-2241
- [24] Pitout J, Laupland K. Extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern [J]. Lancet Infectious Diseases, 2008, 8(3): 159-166
- [25] 嵇辛勤,李世静,文明,等.鸭源大肠杆菌 β -内酰胺类耐药基因的检测[J].广东农业科学,2015,42(15):88-91
JI Xin-qin, LI Shi-jing, WEN Ming, et al. Detection of β -lactamases-resistant genes in *Escherichia coli* isolated from ducks [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(15): 88-91
- [26] 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 Jin-fu, DING Hai-feng, LI Xiao-shen, et al. Detection and analysis of *Escherichia coli* resistance gene in recessive infection of pigs in Henan province [J]. Journal of Henan

- Agricultural Sciences, 2017, 46(9): 144-148
- [27] 韦庆兰,张济培,谭华龙,等.广东地区水禽源大肠杆菌耐药性和磺胺类耐药基因检测[J].中国家禽,2015,37(3):54-56
WEI Qing-lan, ZHANG Ji-pei, TAN Hua-long, et al. Detection resistance of sulfa drug resistance genes *E.coli* from waterfowl in Guangdong [J]. China Poultry, 2015, 37(3): 54-56
- [28] 夏绪进,程伟华,夏利宁,等.新疆昌吉地区猪源喹诺酮耐药大肠杆菌 PMQR 因子检测及分析[J].中国农业大学学报,2016,21(4):95-101
XIA Xu-jin, CHENG Wei-hua, XIA Li-ning, et al. Detection and analysis of PMQR determinants in Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates from swine in Xingjiang Changji area [J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(4): 95-101

现代食品科技