

魏斌, 欧红萍, 严光文, 等. 腹泻犬源大肠埃希菌耐药性以及整合子-基因盒检测研究[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(3): 6-12.

腹泻犬源大肠埃希菌耐药性以及整合子-基因盒检测研究

魏 斌¹, 欧红萍², 严光文³, 田一男¹, 但佳明¹, 涂 蕊¹, 肖启程¹,
朱子琦¹, 唐 丽¹, 杨亭玉¹, 彭广能¹, 钟志军¹

(1 四川农业大学 动物医学院/动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130;
2 成都农业科技职业学院, 四川 成都 611130; 3 西昌学院 动物科学学院, 四川 西昌 615000)

摘要:【目的】了解腹泻犬源大肠埃希菌 *Escherichia coli* 的耐药性以及整合子携带情况。【方法】采用 K-B 纸片扩散法对 30 株分离自腹泻犬的大肠埃希菌进行 19 种抗菌药物的敏感性试验; PCR 检测菌株中是否携带 I、II、III 型整合酶基因, 对携带有整合酶基因的阳性菌株进一步检测 *sulI*、*qacEΔ1* 基因以及可变区基因盒携带情况。【结果】30 株分离株对 19 种抗菌药物表现出不同程度的耐药性, 共产生 18 种耐药谱, 对阿莫西林、氨苄西林、四环素和多西环素的耐药性较高, 耐药率分别为 90.00%、83.33%、66.67% 和 63.33%; 对其余药物耐药性较低, 耐药率低于 14.00%; 11 株分离株含有 I 型整合酶基因且均携带 *sulI* 和 *qacEΔ1* 基因, 未检出 II 型和 III 型整合酶基因; I 型整合子阳性菌株中, 有 2 株扩增出 1 879 bp 的耐药基因盒: *dfrA12+orfF+aadA2*。【结论】本次检测的腹泻犬源大肠埃希菌对抗菌药物呈不同水平的耐药性; 基因盒介导的耐药性与菌株的耐药表型存在部分相关性, 大肠埃希菌的耐药性与 I 型整合子存在一定关系。

关键词: 犬; 大肠埃希菌; 耐药性; K-B 纸片法; 整合子-基因盒
中图分类号: S855.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)03-0006-07

Antimicrobial resistance and integron-gene cassette detection of *Escherichia coli* isolates from diarrhea dogs

WEI Bin¹, OU Hongping², YAN Guangwen³, TIAN Yi'nan¹, DAN Jiaming¹, TU Rui¹, XIAO Qicheng¹,
ZHU Ziqi¹, TANG Li¹, YANG Tingyu¹, PENG Guangneng¹, ZHONG Zhijun¹

(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University/Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, China; 2 Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China;
3 College of Animal Science and Technology, Xichang College, Xi chang 615000, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from diarrhea dogs and the distribution of integron-gene cassettes in *E. coli*. 【Method】The Kirby-Bauer disc diffusion method was used to test the susceptibility of 30 strains of *E.coli* against 19 antimicrobial agents. PCR was used to detect the integrase genes(class I, II, III) in *E.coli* isolates. We further detected if *E.coli* isolates carrying integrase genes also carried the *sulI*, *qacEΔ1* genes and gene cassettes in variable regions. 【Result】Thirty isolates showed different levels of resistance to 19 antimicrobial agents with 18 kinds of resistant spectrum. *E.coli* isolates had

收稿日期: 2017-09-27 优先出版日期: 2018-04-16
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180416.1032.020.html>
作者简介: 魏 斌 (1992—), 女, 硕士研究生, E-mail: 865360412@qq.com; 通信作者: 钟志军 (1980—), 男, 副教授, 博士, E-mail: zhongzhijun488@126.com
基金项目: 国家自然科学基金 (31000548); 国家重点研发计划 (2016YFD0501009); 成都大熊猫繁育研究基金 (CPF2015-4); 四川农业大学本科生科研兴趣培养项目 (ky2016076)

high resistance to amoxicillin, ampicillin, tetracycline and doxycycline with drug resistance rates of 90.00%, 83.33%, 66.67% and 63.33%, respectively, while had low resistance to the other antimicrobials with drug resistance rates below 14.00%. Eleven out of 30 isolates were found to carry class I integrase, *sulI* and *qacEΔ1* genes, and class II or class III integrase gene was not detected. Among the isolates carrying class I integrase gene, the *dfrA12+orfF+aadA2* gene cassette of 1 879 bp length was successfully amplified from two isolates.

【Conclusion】 *E.coli* isolates from diarrhea dogs show different levels of resistance to antimicrobial agents. Antimicrobial resistance that mediated by gene cassettes is partially related to the resistant phenotype of *E.coli*. Class I integron shows a certain relationship with the antimicrobial resistance of *E.coli*.

Key words: dog; *Escherichia coli*; resistance; Kirby-Bauer disc diffusion method; integron-gene cassette

大肠埃希菌属于革兰阴性菌, 是人和动物体内的正常寄生菌, 属于条件性致病菌。致病性大肠埃希菌可引起以初生幼犬为主的急性肠道疾病, 临床症状主要表现为腹泻、败血症等; 大肠埃希菌还能引起成年犬、猫的肾盂肾炎和尿道炎等^[1]。随着人们生活质量的提高, 饲养宠物的数量日益增多, 抗菌药物的不合理使用也日益严重^[2]。已有人类感染犬源多重耐药细菌的报道^[3]。对犬源大肠埃希菌的耐药性进行长期监测, 有助于防止宠物源大肠埃希菌耐药性的扩散, 同时也可作为临床中的宠物用药提供依据^[4]。

细菌耐药性被认为是人类和动物健康的重要威胁, 耐药基因能够通过可移动遗传元件(质粒、转座子等)在同种或不同种病原菌之间转移^[5-7], 其中整合子-基因盒系统在外源耐药基因的捕获、表达及细菌进化过程中具有重要作用, 引起了科学家的广泛关注^[7]。根据整合酶基因碱基序列的不同, 整合子至少分为 8 类, 与耐药性有关的主要是 I 类、II 类和 III 类整合子。资料表明, 临床中耐药菌株主要以 I 类整合子占比最高^[8]。整合子主要通过特异性位点重组的方式捕获外源基因盒并使其表达, 整合子可存在于质粒中或自身作为转座子的一部分参与转移进而传播耐药基因^[9-10]。目前, 3 类整合子中发现与耐药性相关的基因盒多达 80 余种, 这些基因盒编码的产物导致了细菌对临床中常用的药物产生了广泛的耐药性^[11]。同一个整合子可变区携带的耐药基因盒数量不等, 使宿主菌对药物产生了多重耐药性。携带有整合子的细菌比未携带整合子的细菌更趋向于表现出多重耐药性^[12]。

本研究检测分离的 30 株腹泻犬源大肠埃希菌的耐药性及 I、II、III 类整合子携带情况, 分析分离株中整合子的携带情况及细菌的耐药表型, 探究大肠埃希菌多重耐药株中整合子的分布情况, 为宠物临床用药及犬源大肠埃希菌耐药性监测提供依据。

<http://xuebao.scau.edu.cn>

1 材料与方法

1.1 材料

大肠埃希菌菌株为动物疫病与人类健康四川省重点实验室 2016 年于成都地区腹泻犬中分离保存的菌株; 大肠埃希菌质控菌株(ATCC25922) 购于中国兽医药品监察所。

2×Taq PCR MasterMix、DL2000 DNA Marker、大肠埃希菌 DH5α、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自天根生物试剂有限公司; pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。

试验共选择 19 种抗菌药物药敏纸片, 均购于杭州天和微生物试剂有限公司。抗菌药物包括青霉素类: 阿莫西林(Amoxicillin, AML) 和氨苄西林(Ambicillin, AMP), 每张药敏纸片含药量分别为 20、10 μg; 四环素类: 四环素(Tetracycline, TET) 和多西环素(Doxycycline, DOX), 每张药敏纸片含药量均为 30 μg; 酰胺醇类: 氯霉素(Chloramphenicol, CHL) 和氟苯尼考(Florfenicol, FFC), 每张药敏纸片含药量均为 30 μg; 磺胺类: 复方新诺明(Sulfamethoxazole, SXT), 每张药敏纸片含药量为 23.75/1.75 μg; 氨基糖苷类: 链霉素(Streptomycin, STR)、庆大霉素(Gentamicin, GM)、卡那霉素(Kanamycin, Kan)、新霉素(Neomycin, NEO) 和阿米卡星(Amikacin, AMK), 每张药敏纸片含药量分别为 10、10、30、30 和 30 μg; 喹诺酮类: 环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、诺氟沙星(Norfloxacin, NOR) 和氧氟沙星(Ofloxacin, OFX), 药敏纸片每张纸片含药量分别为 5、10 和 5 μg; 头孢类: 头孢唑啉(Cephazoline, CFZ)、头孢噻肟(Cefotaxime Sodium, CTX) 和头孢曲松(Ceftriaxone, CRO), 每张药敏纸片含药量分别为 20、30 和 30 μg; 单环 β-内酰胺类: 氨曲南(Aztreonam, AZM), 每张药敏纸片含药量为 30 μg。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 根据美国临床和实验室标准协

会 (CLSI) 推荐的纸片琼脂扩散法 (Kirby-Bauer, K-B)^[13]测定分离株对 19 种抗菌药物的抑菌圈直径, 以大肠埃希菌 ATCC25922 的药敏结果为对照, 依据 CLSI 标准进行判定。

1.2.2 DNA 的提取 大肠埃希菌 DNA 采用细菌

基因组 DNA 提取试剂盒进行提取。

1.2.3 整合子-基因盒引物序列 扩增 3 类整合子、I 型整合子可变区 (基因盒) 及 *sull-qacEΔ1* 基因, 引物序列见表 1。引物由上海英俊技术生物有限公司合成。

表 1 整合子-基因盒引物序列
Tab. 1 Primers used for integron-gene cassettes application

基因/基因盒	引物	序列(5'→3')	产物大小/bp
<i>intI1</i>	HS463a ^[14]	CTGGATTTTCGATCACGGCACG	471
	HS464 ^[14]	ACATGCGTGTAATCATCGTCG	
<i>qacEΔ1-sull</i>	qacEΔ1-sul1F ^[15]	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	800
	qacEΔ1-sul1R ^[15]	GCAAGGCGGAAACCCCGCC	
基因盒插入区	HS458 ^[14]	GTTTGATGTTATGGAGCAGCAACG	可变
	HS459 ^[14]	GCAAAAAGGCAGCAATTATGAGCC	
<i>intI2</i>	intI2-F ^[16]	CAAGCATCTCTAGGCGTA	1 056
	intI2-R ^[16]	AGTAGCATCAGTCCATCC	
<i>intI3</i>	intI3-F ^[16]	CATCAAGCTGCTCGATCA	878
	intI3-R ^[16]	ACAACCTCTTGACCGTTC	

1.2.4 I 型、II 型和 III 型整合子 PCR 检测 以大肠埃希菌的基因组 DNA 为模板扩增 *intI1*、*intI2*、*intI3* 基因。PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR MasterMix 12.5 μL, 2 μL 模板 DNA, 上、下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, ddH₂O 8.5 μL。循环条件: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 30 s, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环; 72 ℃ 5 min。10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳初步验证。

所有 I 型整合子阳性菌株均进行 *sull-qacEΔ1* 基因的扩增。PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR MasterMix 12.5 μL, 2 μL 模板 DNA, 上、下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, ddH₂O 8.5 μL。循环条件: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 60 s, 60.5 ℃ 50 s, 72 ℃ 80 s, 共 32 个循环; 72 ℃ 10 min。10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳对产物进行初步验证。

1.2.5 分离株中整合子-基因盒的扩增 整合子可变区的 PCR 扩增采用 25 μL 反应体系: 2×*Taq* PCR MasterMix 12.5 μL, 2 μL 模板 DNA, 上、下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, ddH₂O 8.5 μL。循环条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 2 min, 共 36 个循环; 72 ℃ 5 min。10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶对整合子可变区的 PCR 产物进行电泳初步分析。

将 PCR 扩增出的不同整合子可变区片段经胶回收纯化后, 连接 pMD19-T 载体并转化至大肠埃

希菌 DH5α 感受态细胞中, 由北京六合华大基因科技有限公司进行测序分析。测序结果与 GenBank 中相应序列进行比对 (BLAST), 分析菌株中基因盒的组合形式。

1.3 数据处理

依据菌株中整合子检测结果, 将分离株分为整合子携带阳性组和阴性组。采用 SPSS 软件中 χ^2 检验对 30 株分离株的耐药率进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 30 株犬源分离株的药敏试验结果

药敏试验结果显示, 30 株大肠埃希菌对 19 种药物表现出不同程度的耐药性 (表 2)。对阿莫西林、氨苄西林、四环素和多西环素的耐药率分别为 90.00%、83.33%、66.67% 和 63.33%, 耐药性很高; 而对头孢唑啉、头孢噻肟、阿米卡星、氨基曲南等敏感性较高, 敏感率大于 80%; 其他药物耐药率为 3.33%~36.67%。从抗生素大类分析, 耐药率高低依次为: 青霉素类 (83.33%~90.00%)>四环素类 (63.33%~66.67%)>酰胺醇类 (33.33%~36.67%)>磺胺类 (30.00%)>氨基糖苷类 (3.33%~23.33%)>喹诺酮类 (3.33%~6.67%)>头孢类、单环 β -内酰胺类 (3.33%)。

2.2 大肠埃希菌的多重耐药及耐药谱

30 株大肠埃希菌中耐受 1 种抗生素的菌株有
<http://xuebao.scau.edu.cn>

表 2 30 株大肠埃希菌对 19 种抗菌药物的药敏结果¹⁾
Tab. 2 Susceptibility results of 30 *Escherichia coli* isolates against 19 antimicrobial agents

抗生素分类	药物	总体耐药性/%			整合子耐药性/%	
		耐药率	中介率	敏感率	整合子携带阴性株	整合子携带阳性株 ²⁾
青霉素类	阿莫西林	90.00	3.33	6.67	100.00	72.73*
	氨苄西林	83.33	16.67	0	84.21	81.82
四环素类	四环素	66.67	3.33	30.00	57.89	81.82
	多西环素	63.33	20.00	30.00	52.63	81.82*
酰胺醇类	氯霉素	36.67	3.33	60.00	15.79	72.73**
	氟苯尼考	33.33	3.33	63.33	21.05	54.55
磺胺类	复方新诺明	30.00	0	70.00	10.53	63.64**
氨基糖苷类	链霉素	23.33	13.33	63.33	10.53	45.45*
	庆大霉素	13.33	0	86.67	5.26	27.27
	卡那霉素	6.67	20.00	73.33	0	18.18*
	新霉素	3.33	16.67	80.00	0	0
喹诺酮类	阿米卡星	3.33	0	96.67	0	9.09
	环丙沙星	6.67	3.33	90.00	0	18.18*
	诺氟沙星	6.67	3.33	90.00	0	18.18*
	氧氟沙星	3.33	3.33	93.33	0	9.09
头孢类	头孢唑啉	3.33	0	96.67	0	9.09
	头孢噻肟	3.33	0	96.67	0	0
	头孢曲松	3.33	3.33	93.33	0	9.09
单环β-内酰胺类	氨曲南	3.33	0	96.67	0	9.09

1) 共有30株分离株, 整合子阴性株和阳性株分别为 11 和 19株; 2)*和**分别表示整合子携带阳性株与整合子携带阴性株的耐药性在 0.05 和 0.01 水平差异显著(χ^2 检验)

3 株, 占 10%; 耐受 2 种抗生素的菌株有 6 株, 占 20%; 耐受 3 种及 3 种以上抗生素的菌株有 21 株, 占 70%。由表 3 可知, 大肠埃希菌对 19 种抗菌药物共产生 18 种耐药谱, 最多的耐药谱抗生素组合是 AML/DOX/AMP/TET、AML/AMP、AML/DOX/CHL/FFC/AMP/TET 和 AML。

2.3 30 株犬源大肠埃希菌中整合子的 PCR 扩增结果

30 株大肠埃希菌中共检出 *intI1* (I 型整合子) 阳性菌 11 株, 菌株编号分别为 2、8、9、11、14、18、21、27、31、34 和 40, 检出率为 37%, 未检出 *intI2* 和 *intI3*。部分大肠埃希菌 *intI1* 基因的扩增结果见图 1。11 株 I 型整合子阳性菌株均进行 *sulI-qacEAI* 基因的扩增, 结果 (图 2) 显示, 11 株整合子阳性菌均携带 *sulI* 和 *qacEAI* 基因, 检出率为 100%。

2.4 11 株分离株中 I 型整合子-基因盒的 PCR 扩增结果

11 株 *intI1* 阳性菌株进行 I 型整合子可变区的扩增, 发现 9 株菌株含有整合酶但未携带耐药基因

<http://xuebao.scau.edu.cn>

盒, 只有编号为 21 和 40 的 2 株菌株含有耐药基因盒, 其 PCR 产物为 1 879 bp (图 3)。分别对 2 株菌株的耐药基因盒进行克隆, PCR 鉴定后进行测序, 与 GenBank 中相应序列进行比对分析, 结果显示, 此次 PCR 扩增可变区得到的类型均为: *dfrA12+orfF+aadA2* [介导甲氧苄氨嘧啶 (二氢叶酸还原酶)+假定蛋白+链霉素、大观霉素 (氨基糖苷腺苷转移酶)], 检出率为 18.18%。

2.5 整合子-基因盒与分离株耐药性的相关性分析

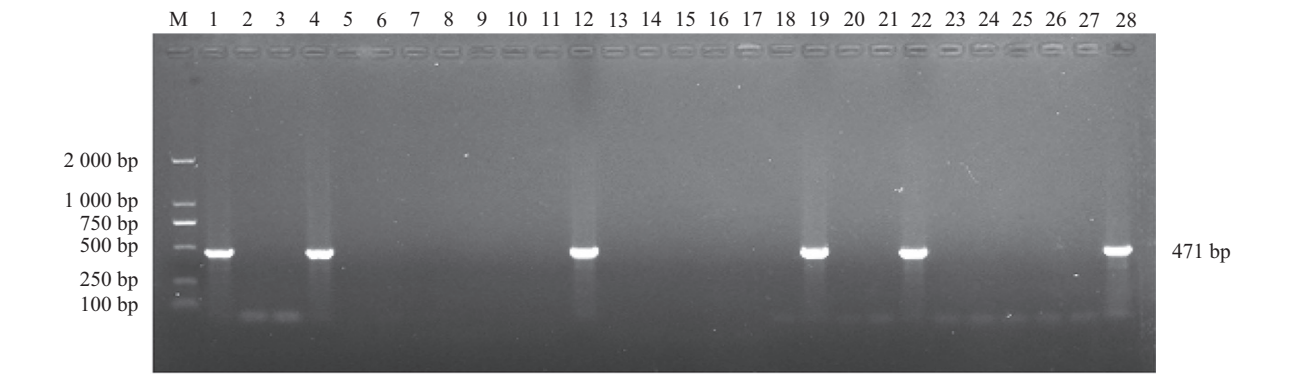
11 株 I 型整合子阳性分离株中, 6 株菌表现为多重耐药 (≥ 3 种抗菌药物), 多重耐药率为 54.55%; 19 株 I 型整合子阴性大肠埃希菌中, 有 14 株菌表现为多重耐药, 多重耐药率为 73.68%。SPSS 统计软件中的 χ^2 检验结果显示, 2 组大肠埃希菌对阿莫西林、多西环素、链霉素、卡那霉素、诺氟沙星、环丙沙星的耐药率为整合子阳性菌株显著高于阴性菌株; 对复方新诺明、氯霉素的耐药率为整合子阳性菌株极显著高于阴性菌株。

从表 3 的犬源大肠埃希菌耐药表型与整合子-

表 3 大肠埃希菌耐药菌株的耐药谱
Tab. 3 Resistance spectrum of *Escherichia coli* resistant strains

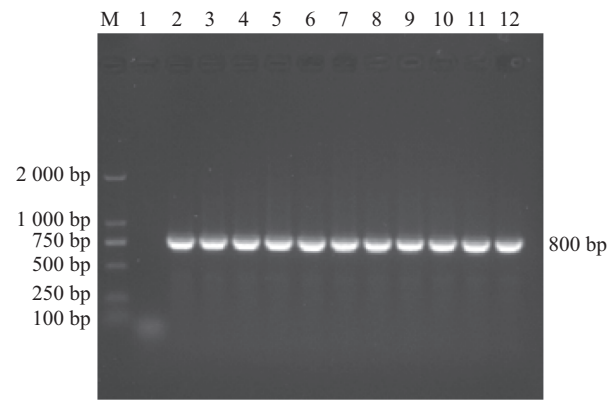
犬源大肠埃希菌 菌株编号	耐药谱 ¹⁾	犬源大肠埃希菌 菌株编号	耐药谱 ¹⁾
4、5、10、29、32、33	AML/DOX/AMP/TET	8	DOX/TET/SXT
1、9、13、25、37	AML/AMP	23	AML/DOX/AMP/SXT
2、11、36	AML/DOX/CHL/FFC/AMP/TET	28	DOX/TET
6、7	AML	14	GM
3	AML/DOX/STR/AMP/TET/SXT	34	AML/DOX/CHL/STR/ AMP/TET/SXT
18	AML/DOX/CHL/STR/AMP/TET/SXT	38	AML/CHL/FFC/AMP/TET
21	AML/AMP/TET/DOX/CHL/FFC/SXT/STR/ GM/KAN/CIP/NOR/AMK/CRO/CEZ/CTX/ AZM/OFX	39	AML/CHL/FFC/STR/AMP/TET
27	AML/DOX/CHL/FFC/AMP/STR/TET/SXT	41	AML/GM/NEO/FFC/AMP
40	AML/AMP/TET/DOX/CHL/FFC/SXT/STR/ GM/KAN/CIP/NOR	31	AML/CHL/FFC/AMP/TET/SXT

1)AML: 阿莫西林; AMP: 氨苄西林; TET: 四环素; DOX: 多西环素; CHL: 氯霉素; FFC: 氟苯尼考; SXT: 复方新诺明; STR: 链霉素; GM: 庆大霉素; KAN: 卡那霉素; CIP: 环丙沙星; NOR: 诺氟沙星; AMK: 阿米卡星; CRO: 头孢曲松; CEZ: 头孢唑啉; CTX: 头孢噻肟; AZM: 氨曲南; OFX: 氧氟沙星

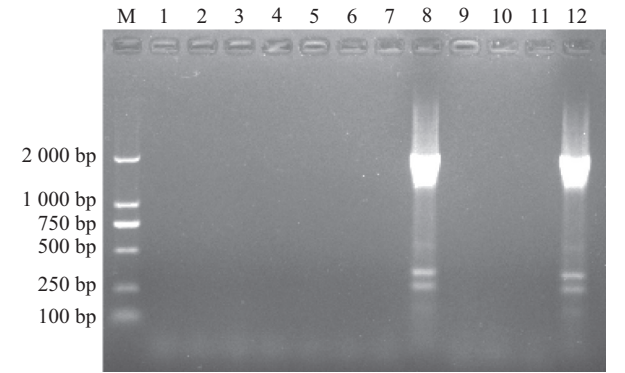


M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 4、12、19、22 和 28 表示部分 *intI1* 阳性株; 3、5、6、7、8、9、10、11、13、14、15、16、17、18、20、21、23、24、25、26 和 27 表示部分 *intI1* 阴性株

图 1 I 类整合子 PCR 产物的电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results for PCR products of *IntI1*



M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2~12: *sulI-qacEA1* 阳性株
图 2 *sulI-qacEA1* 基因 PCR 产物的电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis results for PCR products of *sulI-qacEA1* gene



M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 8、12: 基因盒阳性株; 2、3、4、5、6、7、9、10、11: 基因盒阴性株
图 3 基因盒 PCR 产物电泳图
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis results for PCR products of gene cassettes

基因盒的关系中可以得出:30株分离株中携带基因盒的菌株均为多重耐药菌,编号为21的菌株耐18种药物;编号为40的菌株耐12种药物;PCR扩增结果表明编号为21和40的菌株的基因盒携带情况均为*dfrA12+orfF+aadA2*,且携带I型整合子;基因盒所介导的耐药性与分离株的耐药表型只有部分相关,即菌株不仅对基因盒介导的药物表现出抗性,而且对其他药物也表现出抗性;相反,某些菌株对一些药物表现出耐药性,但其相关的耐药基因盒检测呈阴性。

3 讨论与结论

30株犬源大肠埃希菌的药敏试验结果表明,分离株对19种抗菌药物表现出不同程度的耐药性,对氨苄西林、阿莫西林、四环素和多西环素表现出很高程度的耐药性,耐药率分别为90.00%、83.33%、66.67%和63.33%,高于其他检测结果^[17-18],对阿米卡星、头孢曲松等其他药物耐药率低于或接近其他检测结果^[17,19-20]。以上结果表明,成都地区的犬源大肠埃希菌耐药性与其他地区存在一定的差异,这可能与菌株来源不同以及各地区的用药习惯、用药方式及用药种类不同等有关。因此,各地区应该根据动物病情以及药敏试验等,综合考虑轮换用药、交叉用药以及联合用药的方式,减少动物抗生素的滥用。

造成多重耐药菌流行的主要原因是整合子-基因盒介导的耐药基因可在同种或不同种病原菌间水平传递^[21]。本试验对30株犬源大肠埃希菌进行3类整合子的检测发现,37%的菌株携带有I型整合子,未检出II型、III型整合子,低于闫国栋^[7]的64.10%和蒋月等^[22]的76.00%,表明成都区域犬源大肠埃希菌中I型整合子广泛流行。有文献表明,I型整合子在食品动物源大肠埃希菌^[23-24]和大熊猫等野生动物源菌株^[25]中广泛分布。本次试验结果也表明,在犬源大肠埃希菌中I型整合子也大量存在,为大肠埃希菌在不同动物间耐药基因的水平传播和交换提供了可能,应加强对动物源大肠埃希菌整合子的监测。11株I型整合子阳性菌株均携带磺胺耐药基因(*sul1*)和季铵盐化合物耐药基因(*qacEΔ1*),检出率为100%,表明11株I型整合子阳性菌株均为典型的I类整合子。

对11株*int1*阳性菌株进行耐药基因盒检测,其中9株菌未检出基因盒。出现这一现象的原因可能是,部分分离株中的整合子可变区携带基因盒的数量过多,片段大,超过了试验中*rTaq*酶的扩增范

<http://xuebao.scau.edu.cn>

畴;本试验的部分分离株是未携带基因盒的空整合子菌株。剩余2株菌株携带基因盒的组合方式均为*dfrA12+orfF+aadA2*,主要介导甲氧苄啶耐药(*dfrA12*)和氨基糖苷类耐药(*aadA2*),这与报道^[26]认为的I型整合子在临床菌株中大多携带*aadA*、*dfrA*基因盒相一致,这从耐药基因水平验证了本试验的分离株的耐药性与氨基糖苷类药物有一定相关性。此外,本试验中基因盒介导的耐药性与分离株的耐药表型只有部分相关,即分离株不仅对基因盒所介导的药物具有耐药性,且对其他类药物也同样产生抗性;反之,某些菌株对部分药物检测出耐药性,但其并未携带耐药相关的基因盒。分析其原因可能是:本试验仅对分离株的整合子-基因盒进行了检测,而耐药表型是多种耐药机制综合表现的结果,如其他耐药基因的参与,细菌细胞膜的通透性发生改变以及外排泵的存在导致药物的外排效应等。本次试验中的分离株是否还有其他可移动遗传元件参与抗生素的耐药调控,需要进一步的研究。

综上所述,本次检测的腹泻犬大肠埃希菌对多种抗菌药物呈现出不同水平的耐药性,对青霉素类药物耐药性最高。I型整合子已普遍存在于犬源大肠埃希菌中,其与大肠埃希菌耐药性密切相关。虽然整合子-基因盒不是导致大肠埃希菌产生耐药性的唯一原因,但其与多重耐药菌株的产生与散播密切相关。今后的研究中,应加强动物源大肠埃希菌整合子-基因盒的检测,为临床中控制大肠埃希菌的多重耐药菌株的形成和传播提供依据。

参考文献:

[1] 张美君,廖晓萍,王秀梅,等. 宠物源大肠杆菌的血清型和毒力基因及耐药性调查[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(8): 601-605.

[2] 朱恒乾,廖晓萍,陈朝喜,等. 宠物源大肠杆菌质粒介导喹诺酮类耐药基因流行性检测[J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3447-3454.

[3] JOHNSON J K, PERENCEVICH E N, LINCALIS D P, et al. Dog bite transmission of antibiotic-resistant bacteria to a human[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006, 27(7): 762-763.

[4] 师志海,王文佳,兰亚莉,等. 宠物源性大肠杆菌耐药性调查[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(7): 244-245.

[5] VAN DEN BOGAARD A E, STOBBERINGH E E. Antibiotic usage in animals: Impact on bacterial resistance and public health[J]. Drugs, 1999, 58(4): 589-607.

[6] HAMPTON T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat[J]. JAMA, 2013, 310(16): 1661-1663.

[7] 闫国栋. 不同源大肠杆菌耐药性及整合子-基因盒研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.

[8] LABBATE M, CASE R J, STOKES H W. The

- integron/gene cassette system: An active player in bacterial adaptation[M]//MARIA G, JOHANN P G, LORRAINE D. Horizontal gene transfer: Genomes in flux. New Jersey: Humana Press, 2009: 103-125.
- [9] CAMERON F H, GROOT OBBINK D J, ACKERMAN V P, et al. Nucleotide sequence of the AAD(2") aminoglycoside adenyltransferase determinant *aadB*: Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfr-II* in R388[J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14(21): 8625-8635.
- [10] MAZEL D, DYCHINCO B, WEBB V A, et al. Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel *aad* gene[J]. Antimicrob Agents Ch, 2000, 44(6): 1568-1574.
- [11] MAZEL D. Integrons: Agents of bacterial evolution[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8): 608-620.
- [12] 王海生, 扈瑞平, 高玉敏, 等. 牛源大肠杆菌 I 类整合子分子特征及其与耐药性关系的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9): 63-68.
- [13] WAYNE P A. Clinical and laboratory standards institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- [14] HOLMES A J, HOLLEY M P, MAHON A, et al. Recombination activity of a distinctive integron-gene cassette system associated with *Pseudomonas stutzeri* populations in soil[J]. J Bacteriol, 2003, 185(3): 918-928.
- [15] 魏伟. 猪源产肠毒素大肠杆菌多重 PCR 检测方法的建立及整合子介导的耐药性分析[D]. 南昌: 江西农业大学, 2014.
- [16] XU H, DAVIES J, MIAO V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp.[J]. J Bacteriol, 2007, 189(17): 6276-6283.
- [17] 赵相胜. 犬源大肠杆菌耐药性及分子流行病学初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [18] 何柳, 孙艳, 雷涛, 等. 宠物源大肠杆菌耐药性调查[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(8): 28-30.
- [19] 兰亚莉. 郑州市宠物源大肠杆菌生物被膜表型与耐药谱型分析[J]. 河南农业科学, 2016, 45(1): 135-137.
- [20] RAVI A, AVERSHINA E, LUDVIGSEN J, et al. Integrons in the intestinal microbiota as reservoirs for transmission of antibiotic resistance genes[J]. Pathogens, 2014, 3(2): 238-248.
- [21] 林居纯, 曹三杰, 张辉建, 等. 动物源大肠杆菌整合子携带氨基糖苷类耐药基因盒的研究[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(11): 1587-1590.
- [22] 蒋月, 盛鹏飞. 宠物源大肠杆菌耐药性与整合子关系的研究[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(8): 79-83.
- [23] 邹立扣, 蒲妍君, 杨莉, 等. 四川省猪肉源大肠杆菌和沙门氏菌的分离与耐药性分析[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 202-206.
- [24] 林居纯, 舒刚, 张辉建, 等. 健康畜禽肠道大肠杆菌耐药性及整合子-基因盒检测[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(1): 56-60.
- [25] 闫国栋, 刘颂蕊, 侯蓉, 等. 大熊猫粪源大肠杆菌耐药性及整合子研究[J]. 四川动物, 2015, 34(4): 489-493.
- [26] LEILA S, YOLANDA S, CAEMEN T, et al. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons[J]. Int J Food Microbiol, 2011, 144(3): 497-502.

【责任编辑 霍 欢】