



## 泰安漆河中产 ESBLs 大肠杆菌耐药性及耐药基因的传递规律

衣首静, 刘青霄, 蒋智宇, 孙淑红\*

山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271000

**摘要:**【目的】调查城市河流泰安市漆河(贯穿城区)中产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)大肠杆菌的分布及其多重耐药性与耐药基因携带情况, 探究其耐药基因传递规律。【方法】采用 Kirby-Bauer 法测定耐药表型, 用 PCR 和基因序列测定法进行耐药基因、整合子检测和多位点序列分型, 并进行细菌接合试验。【结果】从 272 份水样中分离 88 株产 ESBLs 大肠杆菌, 分离率 32.4%, 多重耐药率为 59.1%。耐药基因检测出 *bla*<sub>TEM</sub>、*qnrS*、*AacC2*、*aac(6')-Ib-cr*、*oqxA*、*OXA*、*AacC4*, 携带率分别为 94.3%、33.0%、29.5%、12.5%、11.4%、6.8%、5.6%, 59.0% 菌株携带多种耐药基因。MLST 分型检测出 47 种 ST 型, ST38 为主要分型占 13.6%, 发现 ST131 两株。I 类整合子检出率 26.1%, 其中, *dfxA17-aadA5* 阳性率为 13.6%。接合率为 83.0% (73/88), 72.6% 的接合子发生耐药谱变窄, 供体菌所携带的七种耐药基因均发生了水平传递。【结论】城市河流中细菌多重耐药现象严重且耐药性可水平传递, 存在城市公共卫生安全隐患。

**关键词:** 城市河流, 产 ESBLs 大肠杆菌, 多重耐药, I 类整合子, 接合试验, 水平传递

近年来, 随着抗生素在人医和兽医中的广泛应用, 多重耐药菌及耐药基因急剧增长, 已经对公共卫生安全产生威胁<sup>[1-2]</sup>。水环境中耐药菌种类、数量、多重耐药率不断增加等问题日益受到国内外学者的关注。产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)菌在水环境中的出现应引起高度重视。ESBLs 主要由肠杆菌科产生, 由质粒介导, 目前已成为介导革兰阴性杆菌对新型广谱  $\beta$ -

内酰胺类抗生素耐药的主要原因。大肠杆菌是重要的条件致病菌广泛存在于自然界中, 包括各种各样的水环境如海水、污水、饮用水等。因其庞大的数量, 为细菌耐药基因的产生、复制、水平转移提供了适宜的环境<sup>[3]</sup>。国内水体中也存在产 ESBLs 大肠杆菌, 其所携带的某些耐药基因可能会通过水平转移的方式转移到人类的致病菌中, 使人类细菌性疾病的治疗更加困难。这些水环境中产 ESBLs 菌株

基金项目: 国家十三五重点研发计划(2016YFD0500510、2016YFD0501608); 泰山学者计划(201511023); 山东省“双一流”计划(SYL2017YSTD11)

\*通信作者。E-mail: sunshuhong@sdau.edu.cn

收稿日期: 2019-01-12; 修回日期: 2019-04-26; 网络出版日期: 2019-05-24

的耐药基因可以在不同种属细菌甚至是致病菌和条件致病菌之间传播<sup>[4]</sup>。人群一旦通过与水体接触被水中产 ESBLs 菌株感染, 比如开放性伤口感染, 将导致预防和治疗上的极大困难。

城市河流——泰安市漆河贯穿城市中心区域, 河流上游发源于泰山自然风景区, 中、下游居民生活区、商场密集, 下游又与医院相邻, 其水质情况与人们生活息息相关, 虽然河流中未见生活垃圾或工厂污染且有专业人员清理维护, 但如果河流中存在大量多重耐药菌及耐药基因, 即使清理也无法将其清除。有研究表明, 污水流至污水处理厂, 经过工序处理, 出水口仍能检测到大量的产 ESBLs 大肠杆菌并呈现多重耐药和携带一定种类的耐药基因<sup>[5]</sup>。尽管有学者从海水、污水、河口检测出大量抗生素及耐药菌<sup>[6-7]</sup>, 但对城市河流的研究报道比较少。本实验拟通过对流经泰安市中心的漆河进行采样, 分离产 ESBLs 大肠杆菌, 并对其进行耐药表型、耐药基因、I 类整合子检测、多位点序列分型以及细菌接合等测定城市河流漆河中产 ESBLs 大肠杆菌的流行情况及探究其耐药基因的转移规律。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 于 2018 年 4 月沿漆河河岸间隔均匀距离, 用一次性无菌水样采集袋采集水下 0.5 m 水样, 采样根据《中华人民共和国国家环境保护标准》(HJ 494-2009)进行<sup>[8]</sup>。共采集 272 份水样(每份水样 50 mL), 置于 50 mL 灭菌离心管中, 密闭保存于 4 °C 环境并于 24 h 内进行后续实验。

**1.1.2 培养基:** 伊红美蓝琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司), Mueller-Hinton 琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司), LB 固

体培养基、LB 液体培养基(OXOID, England)。

**1.1.3 试剂及试剂盒:** ESBLs 测定盒(杭州滨和微生物试剂有限公司), 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司), DNA 纯化回收试剂盒(上海生工生物有限公司); Easy Taq DNA 聚合酶、10×PCR buffer, Dntp (北京全式金公司); 50×TAE 电泳缓冲液(北京索莱宝科技有限公司), 琼脂糖凝胶(agarose), 核酸染料 DuRed (北京泛博生物试剂公司), DNA 电泳 Marker (TaKaRa 公司); 头孢噻肟(CTX)、叠氮钠(北京索莱宝科技有限公司); 氨苄西林(AMP)、氨基糖苷类(AMG)、卡那霉素(KAN)、头孢噻吩(KF)、头孢吡肟(FEP)、链霉素(STR)、亚胺培南(IPM)、庆大霉素(CN)、四环素(TE)、奈啶酸(NA)、阿莫西林(AML)、多粘菌素 B (PB)、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)(杭州滨和微生物试剂有限公司)。

### 1.2 大肠杆菌分离鉴定

用无菌注射器吸取采集的河水样品, 经  $\Phi=0.45 \mu\text{m}$  无菌水系滤膜加压过滤, 取过滤后滤膜置于 5 mL LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养 12 h, 菌液接种于含头孢噻肟(64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的伊红美蓝培养基, 37 °C 培养 18–24 h, 挑取带有金属光泽的可疑菌落进行 16S rRNA PCR 大肠杆菌菌种鉴定。

### 1.3 产 ESBLs 大肠杆菌确证实验

采用双纸片协同法, 将菌液浊度调为 0.5 麦氏比浊标准并均匀涂布于 M-H 琼脂平板, 将 ESBLs 测定盒中的头孢噻肟(CTX, 30  $\mu\text{g}$ )、头孢噻肟/克拉维酸(CTX/CLA, 30  $\mu\text{g}/10 \mu\text{g}$ )、头孢他啶(CAZ, 30  $\mu\text{g}$ )、头孢他啶/克拉维酸(CAZ/CAL, 30  $\mu\text{g}/10 \mu\text{g}$ )两组纸片贴在 M-H 琼脂平板表面, 35 °C 过夜培养。测量各纸片抑菌圈直径, 计算每组抑菌圈直径差值, 若两组纸片中, 有任何一组加克拉维酸

比不加克拉维酸抑菌圈直径大于或等于 5 mm, 即为阳性, 说明该株大肠杆菌产 ESBLs 酶。质控菌株为大肠埃希氏菌 ATCC25922。将筛选出的产 ESBLs 大肠杆菌, 经 3 次纯化, 用无菌甘油按照甘油: 菌液为 3: 7 的比例, 将菌液保存于无菌 1.5 mL 离心管, 保存于 -20 °C, 备用。

#### 1.4 耐药表型试验

采用美国临床实验室标准化委员会(CLSI)推荐的纸片扩散法, 操作规范参照 CLSI2017 标准。按照世界卫生组织(WHO)推荐的 Kirby-Bauer 法, 选取本地人和动物临床上常用的 14 种抗生素纸片, 氨苄西林(AMP, 10 µg)、氨基曲南(AZT, 30 µg)、卡那霉素(KAN, 30 µg)、头孢噻吩(KF, 30 µg)、头孢吡肟(FEP, 30 µg)、链霉素(STR, 10 µg)、亚胺培南(IPM, 10 µg)、庆大霉素(CN, 10 µg)、四环素(TE, 30 µg)、奈啶酸(NA, 30 µg)、阿莫西林(AML, 20 µg)、多粘菌素 B (PB, 300 µg)、头孢他啶(CAZ, 30 µg)、头孢噻肟(CTX, 30 µg)进行耐药表型测定。将菌液浊度调整为 0.5 麦氏比浊标准, 均匀涂布于 M-H 琼脂平板, 将药敏纸片贴于平板上, 正置 15 min, 倒置 37 °C 培养 16–18 h, 测量抑菌圈直径, 判定结果。如细菌对三类或三类以上抗生素耐受, 则判定为多重耐药菌。

#### 1.5 耐药基因检测

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 参照 GenBank 中耐药基因的序列及文献[9–12], 合成 16 对引物, 分别扩增 β-内酰胺类耐药基因(*bla*<sub>TEM</sub>、*OXA*、*bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>PSE</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>), 喹诺酮类耐药基因(*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*oqxA*、*aac(6′)-Ib-cr*), 氨基糖苷类耐药基因(*AacC1*、*AacC2*、*AacC3*、*AacC4*)。PCR 条件: 95 °C 4 min; 94 °C 30 s, 50–60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 32 个循环;

72 °C 10 min; 4 °C 保存。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 将显示阳性 PCR 扩增产物送至上海生工生物有限公司进行序列比对。

#### 1.6 多位点序列分型

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 根据 MLST 官网提供的大肠杆菌 7 对管家基因序列合成引物, 分别扩增 *adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA*、*recA* 基因。PCR 条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 54–60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像仪观察结果, 将呈现阳性结果的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测得序列经 MLST 官网([http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele\\_search](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_search))进行序列比对, 获得序列分型即 ST 型<sup>[13]</sup>。以 *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai (NCBI Reference Sequence: NC\_002695.2)为参考菌株<sup>[14]</sup>, 利用 BioNumerics software version 6.5 软件根据所有的 STs 生成最小生成树。

#### 1.7 I 类整合子检测

按照参考文献[15]以 *CLASS I* 为引物(*CLASS I-F*: 5′-TCATGGCTTGTTATGACTGT-3′ *CLASS I-R*: 5′-GTAGGGCTTATTATGCACGC-3′), PCR 程序: 94 °C 10 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。目的条带 1300 bp, PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收纯化, 将纯化产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

#### 1.8 接合试验

根据膜过滤接合法<sup>[16]</sup>进行接合试验。供体菌为产 ESBLs 大肠杆菌分离株(对头孢噻肟耐受, 对叠氮钠敏感), 受体菌为大肠杆菌 J53 (对叠氮钠

耐受, 对头孢噻肟及大多数药物敏感); 前期证明全部供体菌对叠氮钠敏感, 全部受体菌对头孢噻肟敏感。将 10  $\mu\text{L}$  供体菌加入 5 mL 含有头孢噻肟 (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 液体培养基中, 将 10  $\mu\text{L}$  受体菌加入 5 mL 含有叠氮钠 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min, 培养 6–8 h。当其浊度达到 0.5 麦氏比浊标准时, 分别取 500  $\mu\text{L}$  供体菌和 500  $\mu\text{L}$  受体菌加至 4 mL LB 液体培养基中, 混合液用无菌水系滤器 ( $\Phi=0.45 \mu\text{m}$ ) 过滤, 滤膜置于 LB 固体培养基, 光滑面与培养基接触, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 6 h。用 1 mL LB 液体培养基重悬菌体成菌悬液, 吸取 50  $\mu\text{L}$  涂布于含有叠氮钠 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和头孢噻肟 (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 固体培养基上; 同时取等量供、受体菌相同处理, 作为对照。利用 ERIC-PCR 技术鉴定接合子, 电泳图像经 Gel-Pro Analyzer 软件分析, 鉴定接合子。

## 2 结果和分析

### 2.1 大肠杆菌分离鉴定结果

经初步分离鉴定, 采集的 272 份河水样品中,

共初步分离到 101 株大肠杆菌。

### 2.2 产 ESBLs 表型确证结果

表型确证结果显示, 101 株大肠杆菌中, 共有 88 株为产 ESBLs 大肠杆菌 (结果判读根据 CLSI2017 标准)。272 份水样中共分离出 88 株产 ESBLs 大肠杆菌, 阳性率为 32.4%。

### 2.3 产 ESBLs 大肠杆菌耐药表型的测定结果

88 株产 ESBLs 大肠杆菌, 耐药表型测定结果见图 1。对氨苄西林、阿莫西林、头孢噻吩的耐药率均为 100% (88/88); 对头孢噻肟、萘啶酸、氨基糖苷类、头孢他啶、头孢吡肟、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、四环素耐药率分别为 77.2% (68/88)、76.1% (67/88)、44.3% (39/88)、21.6% (19/88)、17.0% (15/88)、38.6% (34/88)、34.0% (30/88)、35.2% (31/88)、67.0% (59/88)。对碳青霉烯类药物亚胺培南耐药率为 1.1% (1/88), 是检测所有药物中耐药率最低的抗生素。值得注意的是, 有 2.3% (2/88) 的菌株对多粘菌素-B 耐药, 多粘菌素被视为人类抗生素最后一道防线; 多重耐药菌所占比例为 59.1% (52/88)。

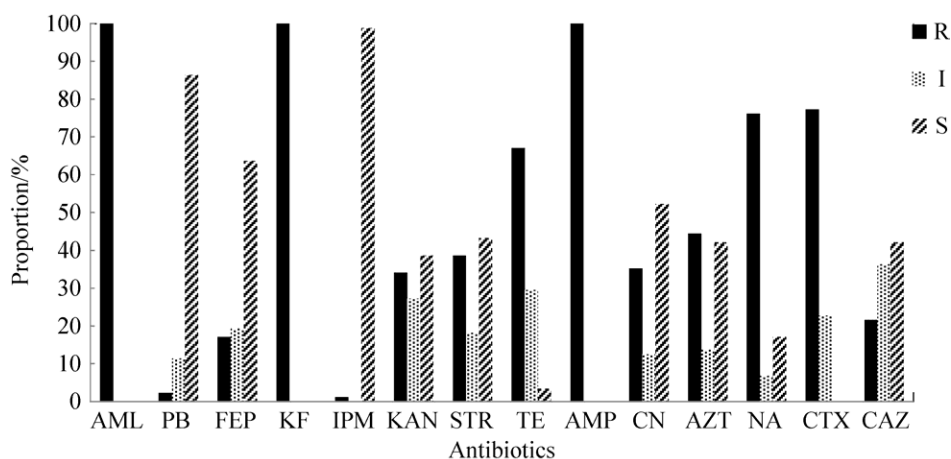


图 1. 88 株产 ESBLs 大肠杆菌对 14 种抗生素的多重耐药情况 (S 表示敏感, I 表示中介, R 表示耐药)

Figure 1. Multiple antibiotic resistance of 88 ESBLs-producing *Escherichia coli* strains to 14 antibiotics (S for sensitive, I for intermediary, R for resistant).

## 2.4 产 ESBLs 大肠杆菌耐药基因测定结果

耐药基因检测结果显示, *bla*<sub>TEM</sub>、*OXA*、*AacC2*、*aac(6')-Ib-cr*、*AacC4*、*qnrS*、*oqxA* 耐药基因携带率分别为 94.3% (83/88)、6.8% (6/88)、29.5% (26/88)、12.5% (11/88)、5.6% (5/88)、33.0% (29/88)、11.4% (10/88); 其他 9 种耐药基因(*bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>PSE</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>、*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*AacC1*、*AacC3*) 均未检测到阳性。59.0% (52/88) 的菌株携带两种或两种以上的耐药基因。

## 2.5 产 ESBLs 大肠杆菌多位点序列分型结果

多位点序列分型结果表明, 88 株产 ESBLs 大肠杆菌共分为 47 种 ST 型, 最小生成树见图 2。其中, 圆圈面积代表菌株数量, 每个圆圈代表一种 ST 型。所选取参考菌株分型为 ST11。ST38 为主要分型占 13.6% (12/88); ST457、ST354、ST1722

各占 4.5% (4/88); ST162、ST617、ST744 各占 3.4% (3/88); ST48、ST69、ST58、ST115、ST131、ST410、ST453、ST602、ST1589、ST1706、ST2003、ST2088、ST2170、ST3331、ST156 各占 2.2% (2/88); ST23、ST34、ST10、ST46、ST75、ST88、ST155、ST167、ST189、ST297、ST224、ST361、ST533、ST609、ST746、ST1125、ST1163、ST1196、ST1290、ST1485、ST1421、ST3014、ST3346、ST3580、ST4204 各占 1.1% (1/88)。

## 2.6 I 类整合子检测结果

88 株产 ESBLs 大肠杆菌 I 类整合子携带率为 26.1% (23/88), 共包含 7 种, 分别为 *dfrA17-aadA5*、*dhfrA12-aadA2*、*dfr17-aadA5*、*dhfr12-aadA2*、*aadA5*、*dfrA27-aadA16*、*dfrA12-aadA2*。 *dfrA17-aadA5* 携带率为 13.6% (12/88), *dhfrA12-aadA2*、*dfr17-aadA5*

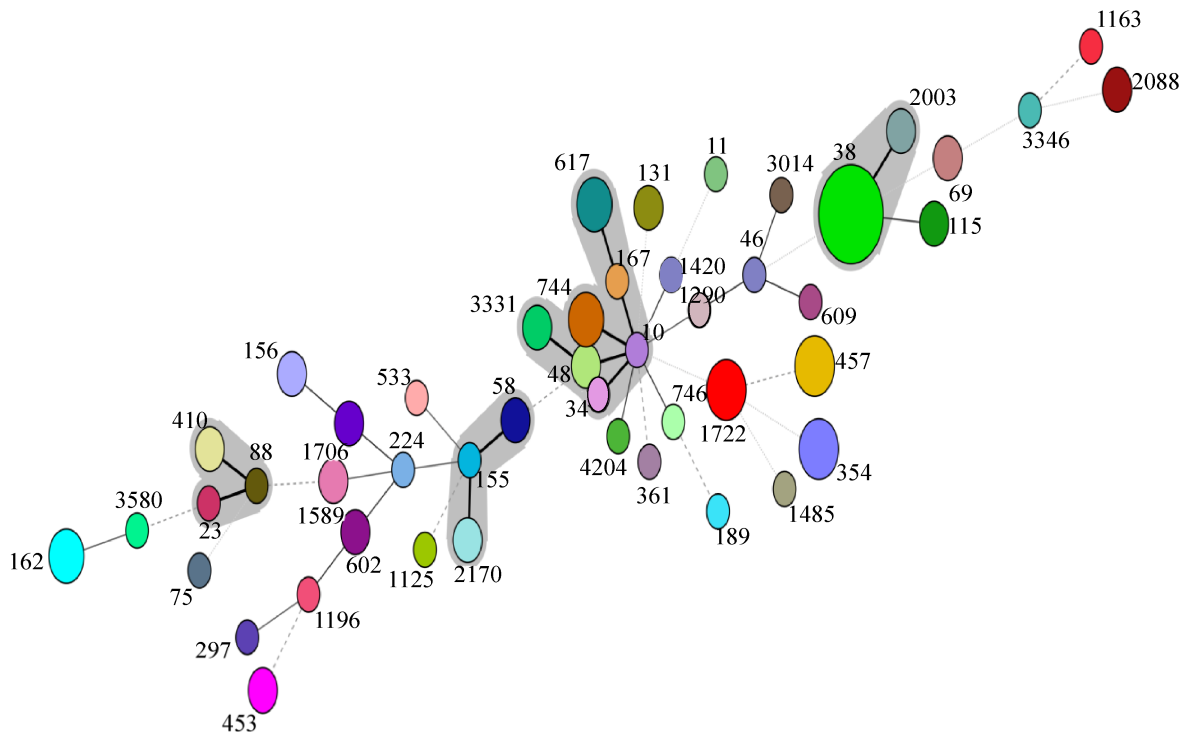


图 2. 产 ESBLs 大肠杆菌分离株最小生成树

Figure 2. The minimum spanning tree of ESBLs-producing *Escherichia coli*.

携带率为 3.4% (3/88), *dfrA12-aadA2* 携带率为 2.2% (2/88), *dhfr12-aadA2*、*aadA5*、*dfrA27-aadA16* 携带率为 1.1% (1/88)。

## 2.7 接合试验与耐药性、耐药基因转移情况测定结果

接合试验中, 共接合成功 73 株产 ESBLs 大肠杆菌即接合子, 接合率高达 83.0% (73/88)。接合子对 14 种药物耐药表型检测结果见表 1, 72.6% (53/73) 的接合子耐药谱变窄, 4.1% (3/73) 的接合子耐药谱变宽, 11.0% (8/73) 的接合子耐药谱未改变, 12.3% (9/73) 的接合子丢失一种或多种耐药表型并

获得一种或多种耐药表型。在耐药谱变窄的接合子中有 17.8% (13/73) 的接合子表现为完全不耐药即与受体菌 J53 耐药谱一致, 接合子多重耐药率为 27.4% (20/73)。耐药基因的转移结果见表 2, *bla<sub>TEM</sub>*、*OXA*、*qnrS*、*oqxA*、*AacC2*、*AacC4*、*aac(6')-Ib-cr* 耐药基因转移率分别为 84.9% (62/73)、100% (5/5)、45.8% (11/24)、62.5% (5/8)、61.9% (13/21)、33.3% (1/3)、62.5% (5/8)。其他 9 种耐药基因(*bla<sub>CTX-M</sub>*、*bla<sub>PSE</sub>*、*bla<sub>SHV</sub>*、*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*AacC1*、*AacC3*)供体菌与接合子均未检测到阳性。

表 1. 供体菌与受体菌耐药表型

Table 1. Antibiotic resistance phenotypes of donor strains and transconjugants

No.	Donor strain	Transconjugant
A1	AML-KF-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-AMP-CTX
A2	AML-FEP-KF-KAN-STR-TE-AMP-CN-AZT-CTX-CAZ	AML-KF-KAN-STR-AMP-CN-CTX-CAZ
A3	AML-KF-TE-AMP-NA	-
A5	AML-KF-STR-TE-AMP-CTX	AML-KF-STR-TE-CTX
A8	AML-KF-KAN-STR-AMP-CN-NA-CTX	AML-KF-AMP-CAZ
A11	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-CN-CTX	AML-KF-TE-AMP-CTX-CAZ
A12	AML-PB-KF-TE-AMP	AML-KF-AMP-AZT-CTX
A14	AML-FEP-KF-KAN-STR-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX	AML-KF-KAN-TE-AMP-CTX
A16	AML-KF-KAN-AMP-CN-NA	AML-KF-KAN-AMP
A18	AML-KF-AMP-CN-NA	AML-KF-AMP-CN-NA
A24	AML-KF-KAN-AMP-CN-NA-CTX	-
A27	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-NA-CTX	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-CTX
A28	AML-FEP-KF-TE-AMP-AZT-CTX-CAZ	AML-FEP-KF-AMP-NA-CTX
A33	AML-KF-AMP-NA-CTX	AML-AMP-AZT-CTX-CAZ
A35	AML-KF-STR-TE-AMP-NA-CTX	AML-KF-STR-TE-AMP-NA-CTX-CAZ
A36	AML-KF-AMP-CTX	AML-KF-AMP
A40	AML-FEP-KF-AMP-AZT	AML-KF-AMP-CTX
A47	AML-KF-KAN-TE-AMP-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-KF-KAN-AMP-CTX
A48	AML-KF-KAN-AMP-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-KF-KAN-AMP-CTX
A49	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-CN-NA
A50	AML-KF-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-KAN-AMP-CAZ
A52	AML-FEP-KF-KAN-TE-AMP-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-FEP-KF-KAN-TE-AMP-AZT-NA-CTX-CAZ
A60	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-NA-CTX	AML-KF-KAN-TE-AMP-NA-CTX
B1	AML-KF-AMP-CTX-CAZ	AML-KF-AMP
B2	AML-KF-STR-TE-AMP-AZT-CTX	AML-KF-STR-AMP-AZT-CTX
B5	AML-KF-AMP-CN-CTX	-

(待续)

(续表 1)

B7	AML-KF-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-KF-AMP-CN-NA
B8	AML-KF-STR-TE-AMP-NA-CTX	AML-KF-STR-TE-AMP-CN-NA-CTX
B9	AML-KF-AMP-CTX	-
B10	AML-PB-KF-AMP-KAN-STR-TE-AMP-CN-NA-CTX	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-NA-CTX
B12	AML-KF-AMP-NA-CTX	-
B14	AML-KF-AMP-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-KF-AMP-CTX
B16	AML-KF-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-FEP-KF-AMP-AZT-CTX
B17	AML-KF-AMP-CN-NA	AML-KF-AMP
B18	AML-KF-KAN-TE-AMP	AML-KF-TE-AMP-CTX
B52	AML-KF-AMP-CN-NA-CTX	-
B70	AML-KF-TE-AMP-CTX	AML-KF-STR-TE-AMP-CTX
B78	AML-KF-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX
B84	AML-FEP-KF-TE-AMP-AZT-CTX-CAZ	AML-KF-AMP-CTX
B85	AML-KF-KAN-TE-AMP	AML-KF-TE-AMP-CTX
B86	AML-FEP-KF-AMP-NA	AML-KF-AMP-CTX
B89	AML-KF-STR-TE-AMP-NA	AML-KF-STR-TE-AMP-NA
C1	AML-FEP-KF-STR-TE-AMP-CN-NA-CTX	AML-KF-STR-TE-AMP-CN-NA-CTX
C3	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-NA-CTX	TE
C4	AML-FEP-KF-KAN-TE-AMP-CN-NA-CTX	AML-KF-KAN-AMP-CN-CTX
C6	AML-KF-STR-TE-AMP-NA-CTX	AML-KF-STR-TE-AMP-CTX
C14	AML-FEP-KF-KAN-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-KAN-AMP-CTX
C16	AML-KF-KAN-TE-AMP-NA-CTX-CAZ	-
C19	AML-KF-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-KF-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX-CAZ
C21	AML-KF-TE-AMP-CN-NA	-
C23	AML-KF-KAN-TE-AMP-AZT-NA	AML-KF-AMP-AZT
C24	AML-KF-AMP-NA	-
C25	AML-FEP-KF-KAN-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-FEP-KF-KAN-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX-CAZ
C26	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-AZT-NA	STR-NA
C27	AML-KF-STR-TE-AMP-CTX	AML-KF-STR-TE-AMP-NA-CAZ
C29	AML-KF-TE-AMP-NA-CTX	-
C30	AML-KF-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-TE-AMP-AZT-CTX
C31	AML-KF-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-STR-TE-AMP-CTX
C32	AML-KF-TE-AMP-NA	AML-KF-AMP
C35	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-CN-NA-CTX	AML-KF-TE-AMP-CN-CTX
C36	AML-KF-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-TE-AMP-CTX
C38	AML-FEP-KF-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-KF-AMP-AZT-CTX-CAZ
C39	AML-KF-AMP-NA-CTX	-
C40	AML-KF-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX	-
C41	AML-KF-STR-AMP-NA-CTX-CAZ	AML-KF-AMP-CTX
C44	AML-KF-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX-CAZ	-
C49	AML-KF-AMP-AZT-CTX-CAZ	AML-KF-AMP-AZT-CTX-CAZ
C53	AML-FEP-KF-KAN-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX	KAN-TE-AZT-CTX
C56	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-CTX	AML-KF-KAN-AMP
C58	AML-FEP-KF-STR-TE-AMP-CN-AZT-NA-CTX-CAZ	AML-KF-TE-AMP-AZT-CTX
C59	AML-KF-AMP-CN-NA-CTX	-
C61	AML-KF-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-AMP-AZT-NA-CTX
C62	AML-KF-KAN-STR-TE-AMP-AZT-NA-CTX	AML-KF-KAN-AMP

表 2. 供体菌与受体菌携带耐药基因的转移情况

Table 2. The resistant genotype of 74 strains of donors and transconjugants

No.	Donor strain	Transconjugant	No.	Donor strain	Transconjugant
A1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	B84	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A2	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	B85	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>OXA</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>OXA</i>
A3	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	B86	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>
A5	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	B89	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i>
A8	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i>	C1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i>	<i>AacC2</i>
A11	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C3	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i>
A12	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	C4	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A14	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i>	C6	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	–
A16	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	C14	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A18	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	C16	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	–
A24	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	C19	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>OXA</i> - <i>qnrS</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>OXA</i> - <i>AacC2</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>
A27	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C21	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC4</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A28	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	–	C23	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>
A33	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C24	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A35	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C25	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>
A36	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	C26	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A40	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	–	C27	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A47	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C29	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A48	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C30	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>
A49	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i> - <i>AacC2</i>	C31	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A50	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C32	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
A52	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>OXA</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	<i>OXA</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	C35	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i> - <i>AacC4</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i> - <i>AacC4</i>
A60	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C36	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
B1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	C38	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>
B2	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C39	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
B5	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC4</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C40	<i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	–
B7	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	C41	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
B8	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C44	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>OXA</i> - <i>AacC2</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>OXA</i> - <i>AacC2</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i>
B9	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	–	C49	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
B10	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C53	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
B12	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>oqxA</i> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C56	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>
B14	–	–	C58	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
B16	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	C59	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
B17	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i> - <i>AacC2</i>	C61	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>
B18	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>OXA</i>	<i>OXA</i>	C62	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
B52	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>AacC2</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>			
B70	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> - <i>qnrS</i>			
B78	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	–			



### 3 讨论

自 20 世纪 40 年代,  $\beta$ -内酰胺类抗生素就被选择用作治疗各种感染人或动物的疾病, 但由于细菌耐药性的产生, 导致临床上此类抗生素的疗效减弱, 尤其是在肠杆菌科, 这就导致了产 ESBLs 大肠杆菌数量的增长<sup>[17-18]</sup>。本研究从泰安城市河流中分离鉴定产 ESBLs 大肠杆菌, 阳性率 32.4%。

根据其分布位置及耐药基因携带情况发现, 产 ESBLs 大肠杆菌及所携带耐药基因大多分布于城市生活区, 自然保护区明显小于城市生活区, 下游医院附近比中游人群居住社区的分布更为集中。*bla<sub>TEM</sub>* 为河水中产 ESBLs 大肠杆菌主要携带的耐药基因, *OXA*、*AacC2*、*aac(6')-Ib-cr*、*AacC4*、*qnrS* 和 *oqxA* 主要分布于河流中下游, 上游只检测出少量 *bla<sub>TEM</sub>*、*OXA*、*qnrS* 和 *AacC2* 等耐药基因。自然保护区处于河流上游, 且商场与居民区较少; 而河流中段, 河岸有大量商场、居民区, 产 ESBLs 大肠杆菌分离率明显高于上游风景区地段且携带耐药基因种类丰富; 医院靠近河流下游, 菌株分布密度最高且耐药基因检出率更高。由此看出, 产 ESBLs 大肠杆菌分离率及耐药基因携带情况与河岸的建筑物、人员流动以及商业活动有关系。医院附近产 ESBLs 大肠杆菌分离率与耐药基因携带率最高, 可能由于医院临床治疗用药较多或污水处理系统不完善等所致<sup>[19]</sup>。

本研究药敏试验结果显示河水中产 ESBLs 大肠杆菌多重耐药率达 59.1%, 对碳青霉烯类药物耐药性最弱, 说明碳青霉烯类药物对产 ESBLs 大肠杆菌具有良好的抑菌作用。检测耐药基因发现, 所分离的产 ESBLs 大肠杆菌中高达 97.7% (86/88) 菌株携耐药基因, 说明城市河流中存在大量耐药

基因。检测  $\beta$ -内酰胺类耐药基因发现 *bla<sub>TEM</sub>* 检出率最高, 而未检测到 *bla<sub>CTX-M</sub>*, 这与我国目前 ESBLs 菌主要分型为 CTX-M 不同<sup>[20]</sup>。接合试验中, 接合成功率高达 83.0%, 高于李晴等<sup>[5]</sup>从污水厂分离产 ESBLs 大肠杆菌接合率 70%。接合前后 *bla<sub>TEM</sub>*、*OXA*、*qnrS*、*oqxA*、*AacC2*、*AacC4*、*aac(6')-Ib-cr* 耐药基因均发生转移, 说明耐药基因的传递由质粒介导。72.6%的接合子发生了耐药谱变窄, 可能由于有的耐药基因位于可移动质粒之外的遗传片段上或是因为质粒不相容性; 而 4.1%的接合子耐药谱变宽, 12.3%的接合子丢失一种或多种耐药表型并获得一种或多种耐药表型则提示在细菌疾病治疗中要谨慎选择应用抗生素, 避免用药不当引起细菌耐药性增强; 11.0%的接合子耐药谱未发生改变, 则说明有的耐药基因位于可移动质粒上, 通过接合试验使其得以传递。整合子作为一个可移动的基因元件, 能够通过整合酶的作用, 识别、捕获、剪切或整合外源性耐药基因并在自身启动子作用下, 表达外源耐药基因从而获得细菌耐药表型<sup>[21]</sup>, 整合子/基因盒系统在耐药基因携带和细菌耐药性扩散过程中发挥着重要作用, 耐药菌株可通过动物传递给人, 对公共卫生安全造成威胁。本试验检测 I 类整合子发现河水中产 ESBLs 大肠杆菌主要以介导甲氧苄啶和氨基糖苷类耐药的 *dfrA* 和 *aadA* 基因为主, 且基因盒排列 *dfrA17-aadA5* 最为流行。由此说明, 城市河水中细菌耐药性问题不容小觑, 不仅耐药泛滥, 并且可以通过移动质粒进行传递, 而一定比例 I 类整合子的存在又加重了其危害。证明城市河水中存在公共卫生安全隐患。

本试验对河水中产 ESBLs 大肠杆菌多位点序列分型发现, 河水中产 ESBLs 大肠杆菌 ST 型众

多且分布广泛, ST38 为河水中主要型, 分布于整条河流并未出现集中分布趋势。值得注意的是, 有两株分型为 ST131 型的产 ESBLs 大肠杆菌, 大肠杆菌 ST131 型是世界流行的分型而 ST131 型一般表现较高的毒性和耐药性, 并且能够传递而成为流行株, 既可以在人类之间传播, 也可以在人与动物中传播<sup>[22]</sup>。但世界范围内只有少数 ST131 型大肠杆菌从水中分离检测出, 在国内还未发现从水环境中分离检测出 ST131 的报道。另外, 通过 BioNumerics software version6.5 软件, 规定等位基因相同个数  $\geq 6$  为一个克隆复合群(clone complex), 则 ST10 与 ST744、ST34、ST48、ST167、ST3331、ST617、ST744 为克隆复合群 1 即 CC1; ST155 与 ST58、ST2170 为 CC2; ST2003 与 ST38 为 CC3; ST88、ST23、ST410 为 CC4。其中, CC1 占比 18.2% (16/88), CC2 占比 5.7% (5/88), CC3 占比 15.9% (14/88), CC4 占比 4.5% (4/88)。由此发现, CC1 为河水中产 ESBLs 大肠杆菌主要流行的克隆复合群, 并由图 3 推测, ST10 型为 CC1 的祖代 ST 型; ST155 型为 CC2 的祖代 ST 型; ST88 型为 CC4 的祖代 ST 型<sup>[23]</sup>。

本研究完成了城市河流泰安市漆河中产 ESBLs 大肠杆菌耐药情况及耐药基因转移情况探究, 发现河流中产 ESBLs 大肠杆菌多重耐药现象严重, 对规范和限制抗生素使用及当地细菌感染性疾病的临床治疗具有指导意义, 对维护公共卫生安全具有参考意义。本研究中所分产 ESBLs 大肠杆菌数量庞大, 且耐药性强, 能够成为耐药基因庞大的载体。因此, 产 ESBLs 大肠杆菌有望作为了解某些水环境中细菌多重耐药情况的监测菌。但如果只限于研究、监测少数重要致病菌耐药性的现状, 可能会极大地限制对耐药问题的全

面了解, 对于耐药问题的警示作用非常有限; 另外, 细菌多重耐药状况以及水环境中细菌多重耐药情况与季节性疾病流行等环境因素的相关性有待于进一步探究。

## 参考文献

- [1] Xi CW, Zhang YL, Marrs CF, Ye W, Simon C, Foxman B, Nriagu J. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(17): 5714–5718.
- [2] Shi P, Jia SY, Zhang XX, Zhang T, Cheng SP, Li AM. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Research*, 2013, 47(1): 111–120.
- [3] Zhou Y, Zhang L, Wang ZH, Zhong J, Wang H. Key risk factors of antibiotic resistance ecology and targeted control strategies. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(11): 2040–2050. (in Chinese)  
周旻, 张陆, 王子华, 钟江, 王华. 抗生素耐药性的多重风险因子及针对性管控策略. *微生物学报*, 2018, 58(11): 2040–2050.
- [4] Wang RF, Wang ZS, Dai XM, Zhou ME, Lin YZ. Study of transferred R-plasmid of *Escherichia coli* to *Vibrio cholera* by conjugation. *Acta Microbiologica Sinica*, 1983, 23(2): 168–174. (in Chinese)  
王荣福, 王曾遂, 戴娴敏, 周明娥, 林玉尊. 大肠杆菌 R 质粒接合转移到霍乱弧菌. *微生物学报*, 1983, 23(2): 168–174.
- [5] Li Q, Zhang HN, Liu YQ, Zhai J, Chang WS. Transfer of antimicrobial resistant genes of ESBL-producing *Escherichia coli* recovered from a wastewater treatment plant. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(5): 681–689. (in Chinese)  
李晴, 张红娜, 刘玉庆, 翟静, 常维山. 污水厂产超广谱  $\beta$  内酰胺酶大肠杆菌通过接合水平传递耐药性. *微生物学报*, 2017, 57(5): 681–689.
- [6] Zhu YG, Zhao Y, Li B, Huang CL, Zhang SY, Yu S, Chen YS, Zhang T, Gillings MR, Su JQ. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nature Microbiology*, 2017, 2(4): 16270.
- [7] Araújo S, Silva IAT, Tacão M, Patinha C, Alves A, Henriques I. Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in

- household farms. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 257: 192–200.
- [8] 中华人民共和国环境保护部. HJ 494-2009 水质 采样技术指导. 北京: 中国环境科学出版社, 2009.
- [9] Zhao XN, Yang J, Zhang BZ, Sun SH, Chang WS. Characterization of integrons and resistance genes in *Salmonella* isolates from farm animals in Shandong Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1300.
- [10] Ma YB, Li M, Xu XB, Fu Y, Xiong ZY, Zhang LN, Qu XY, Zhang HX, Wei YH, Zhan ZQ, Chen ZQ, Bai J, Liao M, Zhang JM. High-levels of resistance to quinolone and cephalosporin antibiotics in MDR-ACSSuT *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* mainly isolated from patients and foods in Shanghai, China. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 286: 190–196.
- [11] Moawad AA, Hotzel H, Awad O, Tomaso H, Neubauer H, Hafez HM, El-Adawy H. Occurrence of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers. *Gut Pathogens*, 2017, 9(1): 57.
- [12] Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, Shimamoto T. Zoo animals as reservoirs of Gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6686–6690.
- [13] Wirth T, Morelli G, Kusecek B, van Belkum A, van der Schee C, Meyer A, Achtman M. The rise and spread of a new pathogen: seroresistant *Moraxella catarrhalis*. *Genome Research*, 2007, 17(11): 1647–1656.
- [14] Ji XW, Liao YL, Zhu YF, Wang HG, Gu L, Gu J, Dong C, Ding HL, Mao XH, Zhu FC, Zou QM. Multilocus sequence typing and virulence factors analysis of *Escherichia coli* O157 strains in China. *Journal of Microbiology*, 2010, 48(6): 849–855.
- [15] Qu ZN, Li WC, Wang J, Zhao SJ, Huang XM, Zheng ZR. Investigation of the relationship between class I integron and resistance of *E. coli* from swine. *Chinese Journal of Animal Health Inspection*, 2010, 27(12): 51–54. (in Chinese)
- 曲志娜, 李伟臣, 王娟, 赵思俊, 黄秀梅, 郑增忍. 猪源大肠杆菌耐药性与 I 型整合子关系研究. *中国动物检疫*, 2010, 27(12): 51–54.
- [16] Clewell DB, An FY, White BA, Gawron-Burke C. Sex pheromones and plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: a pheromone, cAM373, which is also excreted by *Staphylococcus aureus*. *Basic Life Sciences*, 1985, 30: 489–503.
- [17] Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(4): 251–259.
- [18] Gutkind GO, Di Conza J, Power P, Radice M.  $\beta$ -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19(2): 164–208.
- [19] Rabbani MAG, Howlader ZH, Kabir Y. Detection of multidrug resistant (MDR) bacteria in untreated waste water disposals of hospitals in Dhaka city, Bangladesh. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2017, 10: 120–125.
- [20] 许攀峰. 头孢他啶对家兔产 CTX-M-14 型 ESBLs 细菌性腹膜炎的治疗作用. 浙江大学硕士学位论文, 2005.
- [21] Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 1989, 3(12): 1669–1683.
- [22] Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, Nordstrom L, Billig M, Chattopadhyay S, Stegger M, Andersen PS, Pearson T, Riddell K, Rogers P, Scholes D, Kahl B, Keim P, Sokurenko EV. The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio*, 2013, 4(6): 00377–13.
- [23] Lau SH, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Willshaw G, Cheasty T, Fox AJ, Upton M. Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(3): 1076–1080.

# Antibiotic resistance and antibiotic resistance gene transfer of ESBLs-producing *Escherichia coli* in Naihe, Taian

Shoujing Yi, Qingxiao Liu, Zhiyu Jiang, Shuhong Sun\*

College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong Province, China

**Abstract:** [Objective] To study the distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Naihe, Taian City, as well as its multiple antibiotic resistance and relative antibiotic resistance genes, and further reveal the mechanism of antibiotic resistance gene transmission. [Methods] We used Kirby-Bauer method to determine the antibiotic resistance profiles, PCR for the detection of antibiotic resistance genes and *Class I* integrons, and multilocus sequence typing among ESBLs-producing *Escherichia coli* strains, and conducted the bacterial conjugation test. [Results] We isolated 88 ESBLs-producing *Escherichia coli* strains out of 272 water samples with the detection rate of 32.4% and the multiple antibiotic resistance rate of 59.1%. Resistance genes including *bla*<sub>TEM</sub>, *qnrS*, *AacC2*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *OXA* and *AacC4* were detected with the detection rates of 94.3%, 33.0%, 29.5%, 12.5%, 11.4%, 6.8% and 5.6% respectively. 59% of strains carried multiple drug resistance genes. We observed 47 sequence types (STs) in 88 isolates, and 13.6% of them were ST38; we also detected two ST131 strains. The positive rate of *Class I* integrons was 26.1%, and the predominate gene cassette was *dfrA17-aadA5* with detection rate of 13.6%. The conjugation rate was 83.0% (73/88), 72.6% of the conjugates turned into narrower antibiotic resistance profiles. We observed horizontal transfer in all seven antibiotic resistance genes carried by the donor bacteria. [Conclusion] The bacterial multiple antibiotic resistance existed in urban rivers and the resistance genes were capable to transfer horizontally, which could be potential hazard that threatened public health.

**Keywords:** urban rivers, ESBLs-producing *Escherichia coli*, multiple antibiotic resistance, *Class I* integron, conjugation test, horizontal transmission

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500510, 2016YFD0501608), by the Taishan Scholars Project (201511023) and by the Funds of Shandong "Double Tops" Program (SYL2017YSTD11)

\*Corresponding author. E-mail: sunshuhong@sdau.edu.cn

Received: 12 January 2019; Revised: 26 April 2019; Published online: 24 May 2019