



市售畜禽肉产 CTX-M 酶大肠杆菌的流行病学调查

马振报^{1,2}, 潘晔君^{1,2}, 许钦怡^{1,2}, 黄炜铭^{1,2}, 林思茹^{1,2}, 郭慧中^{1,2}, 曾东平^{1,2},
熊文广^{1,2}, 曾振灵^{1,2*}

¹华南农业大学, 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642

²国家兽医微生物耐药性风险评估实验室, 广东 广州 510642

摘要: 【目的】调查市售畜禽肉类中大肠杆菌的耐药状况和 bla_{CTX-M} 基因的流行病学特征。【方法】采集广州市不同区域零售市场和超市畜禽肉类样品进行大肠杆菌的分离, 通过基因 $phoA$ 扩增和测序进行大肠杆菌鉴定, 采用琼脂扩散法和微量肉汤稀释法测定药物敏感性, 通过PCR扩增检测 bla_{CTX-M} 基因, 对 bla_{CTX-M} 阳性大肠杆菌进行全基因组测序。【结果】从323份市售畜禽肉样品中分离获得大肠杆菌241株; 药物敏感性结果表明大肠杆菌对氨苄西林(63.07%)、多西环素(47.72%)和复方新诺明(43.15%)耐药率较高; bla_{CTX-M} 基因检出率为3.32% ($n=8$), 其中4株携带 $bla_{CTX-M-14}$, 3株携带 $bla_{CTX-M-65}$, 1株携带 $bla_{CTX-M-55}$; 8株产CTX-M大肠杆菌可分为4种不同的ST型, 且携带多种耐药基因和毒力基因。【结论】市售畜禽肉中大肠杆菌污染严重。产CTX-M酶大肠杆菌均为多重耐药菌株, 且 bla_{CTX-M} 基因主要以水平传播方式在大肠杆菌中传播, 需要加强监测。

关键词: CTX-M 酶, 大肠杆菌, 流行病学, 畜禽肉

产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)能够水解青霉素和第三代头孢菌素的 β -内酰胺环, 从而介导大肠杆菌等革兰氏阴性菌对 β -内酰胺类抗生素耐药。自 bla_{CTX-M} 基因在德国首次发现以来, CTX-M 酶已成为 ESBLs 中流行最广的酶, 且 CTX-M 已呈现全球性流行传播, 对临床治疗造成不容忽视的影响^[1-3]。CTX-M 亚型种类丰富, 迄今为止,

NCBI 数据库中已多达 214 种 CTX-M 亚型 (www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/)。根据氨基酸序列差异可将 CTX-M 分为 5 个群, 即 CTX-1G、CTX-2G、CTX-8G、CTX-9G 和 CTX-25G, 其中 CTX-1G 和 CTX-9G 是当前世界最流行的 CTX-M 群, 其中 CTX-M-14 和 CTX-M-15 亚型已成为当前全球最主要的基因型^[3-4]。

基金项目: 十三五国家重点研发计划(2018YFD0500300); 华南农业大学大学生创新训练项目(201910564457)

*通信作者。E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

收稿日期: 2020-03-25; 修回日期: 2020-06-13; 网络出版日期: 2020-07-16

动物源食品作为食物链中重要的组成部分,增加了人与动物的接触机会,加大了ESBLs通过食物链传播至人的风险。相对于人源和动物源CTX-M的研究,我国有关动物性食品源产CTX-M大肠杆菌的报道目前还比较少。Ye等^[5]对广州市零售生肉、蔬菜等食品源肠杆菌中ESBLs基因调查结果表明,肠杆菌 bla_{CTX-M} 基因(68.1%)已成为仅次于 bla_{TEM} 基因(81.9%)的ESBLs基因。Xie等^[6]对深圳市零售肉类中产CTX-M大肠杆菌研究表明,55株耐头孢噻肟大肠杆菌中37株检测到 bla_{CTX-M} 基因,其中 $bla_{CTX-M-55}$ 基因为主要可转移的基因型。但目前有关市售畜禽肉源大肠杆菌中的 bla_{CTX-M} 基因的流行病学研究还比较少。因此,本文针对广州市市售肉类中大肠杆菌的耐药状况和 bla_{CTX-M} 基因在大肠杆菌中的流行与分布特征进行研究,为肉类食品耐药性风险评估和科学防控提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 2018年9月至2019年5月,对广州市天河区、海珠区和越秀区等5个农贸市

场和1个生鲜超市共采集323份动物肌肉样品,包括165份猪肉、96份鸡肉、57份牛肉和5份羊肉,仅在海珠区的一个摊位采集到羊肉样品,具体采样信息见表1。

1.1.2 常用药品: 氨苄西林、阿莫西林、头孢噻肟、头孢噻肟、美罗培南、新霉素、安普霉素、黏菌素、环丙沙星、甲氧苄啶、磺胺甲噁唑购自大连美伦生物技术有限公司;头孢他啶、氟苯尼考、庆大霉素、阿米卡星、恩诺沙星、多西环素及替加环素购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 培养基: 伊红美蓝琼脂培养基(Eosin-methylene Blue Medium), LB肉汤(luria-bertani broth)和LB琼脂培养基(luria-bertani agar)均购于山东海博生物有限公司;麦康凯琼脂培养基、水解酪蛋白琼脂培养基(mueller-hinton agar)、水解酪蛋白肉汤(MH broth)均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.4 常用试剂: TaKaRa rTaq、dNTPs Mixture及2000 DL marker均购自宝生物工程(大连)有限公司;乙二胺四乙酸、Tris碱、氯化钠、氢氧化钠、冰醋酸、丙三醇和无水乙醇等购自广州化学试剂厂。细菌全基因组提取试剂盒购于广州碧尧德生物科技有限公司。

表 1. 广州市零售市场采样信息表

Table 1. Information of samples collected from retail meat in Guangzhou

Date	Location	Type	Pork	Beef	Chicken	Mutton	Total
2018.09.28	Tianhe district	Retail market	30	13	17	0	60
2018.10.19	Haizhu district	Retail market	25	10	13	5	53
2018.11.14	Yuexiu district	Retail market	20	14	16	0	50
2019.04.21	Liwan district	Retail market	30	0	30	0	60
2019.05.01	Baiyun district	Retail market	30	10	10	0	50
2019.05.01	Huangpu district	Supermarket	30	10	10	0	50
Total	—	—	165	57	96	5	323

1.2 采样及细菌分离

根据采样地点的具体情况进行采样, 零售市场和生鲜超市每个摊位采集 3–5 份畜禽肉, 分别放入无菌密封袋中, 样品采集后将其置于低温盒中运送至实验室。采用无菌操作的方法取 2 g 肉接种到 10 mL 无菌 EP 管中, 加入 5 mL 灭菌 LB 肉汤, 置于 37 °C 恒温摇床培养 14 h, 将培养后菌液划线接麦康凯琼脂平板, 培养 12–14 h 后挑取红色单菌落, 划线接种于伊红美蓝琼脂平板, 培养 14–16 h 后, 挑取纯化后的单菌落接种于 LB 琼脂平板上以便进行菌种鉴定、菌株保存及模板提取等后续实验。大肠杆菌工程菌 J53 和标准菌 ATCC 25922 由本实验室保存。

1.3 大肠杆菌 *bla*_{CTX-M} 基因的检测

1.3.1 细菌 DNA 模板制备: 加热煮沸法提取 DNA, 将大肠杆菌在 LB 平板上培养 12 h, 取少量细菌加入含 0.5 mL 1×TE 的 1.5 mL EP 管中混匀并置于恒温金属浴中 103 °C 加热 10 min, 随后冰浴 5 min, 12000 r/min 离心 3 min, 取上清为模

板, 于–20 °C 保存备用。

1.3.2 引物的合成: 根据相关文献, 合适的大肠杆菌鉴定引物 *phoA*、*bla*_{CTX-M-1G} 和 *bla*_{CTX-M-9G}, 引物序列见表 2, 引物合成由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.3.3 PCR 扩增: PCR 反应 25 μL 体系: 10× rTaq buffer 2.5 μL, dNTPs mixture 2.0 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, rTaq 酶 0.125 μL, 模板 1 μL, 加超纯水至 25 μL。PCR 反应程序见表 3, 取 5 μL 的 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳用凝胶成像系统拍照分析, 对具有阳性条带的 PCR 产物进行测序, 并将测序结果提呈 NCBI 进行序列比对确认。

1.4 药物敏感性测定

大肠杆菌药物敏感性测定按照美国临床和实验室标准化委员会 (CLSI) 标准推荐的方法进行。受试药物中除黏菌素采样微量肉汤稀释法测定最小抑菌浓度, 其余药物均采样琼脂扩散法测定。最小抑菌浓度值按 CLSI-2018 和 CLSI-VET01 所规定的耐药 (resistant, R) 折点值范围判断结果。

表 2. *phoA* 和 *bla*_{CTX-M} 基因引物序列

Table 2. Primer sequence of *phoA* and *bla*_{CTX-M} gene

Primer	Primer sequence (5'→3')	Target length/bp	References
<i>bla</i> _{CTX-M-1G}	F:CTTCCAGAATAAGGAATCCC R:CGTCTAAGGCGATAAACAAA	946	[7]
<i>bla</i> _{CTX-M-9G}	F:ATGATGACTCAGAGCATTCG R:TGATGCCGTATTGGGAGTTTTG	902	[7]
<i>phoA</i>	F:CGATTCTGGAAATGGCAAAG R:CGTGATCAGCGGTGACTATGAC	720	[8]

F: forward primer; R: reverse primer.

表 3. PCR 扩增程序

Table 3. Amplification procedure of PCR

Primer	Amplification procedure
<i>bla</i> _{CTX-M-1G}	94 °C×5 min+(94 °C×45 s+52 °C×45 s+72 °C×45 s)×30+72 °C×10 min
<i>bla</i> _{CTX-M-9G}	94 °C×5 min+(94 °C×45 s+60 °C×45 s+72 °C×45 s)×30+72 °C×10 min
<i>phoA</i>	94 °C×5 min+(94 °C×45 s+58 °C×45 s+72 °C×45 s)×30+72 °C×10 min

1.5 全基因组测序及分析

按照全基因组提取试剂盒说明书进行提取, 将菌液收集至 EP 管, 加入 P1 溶液 300 μL , 混匀后加入 300 μL P2 溶液, 上下颠倒 5–10 次, 加入 300 μL P3 溶液 300 μL , 上下颠倒 5–10 次后室温反应 5 min, 加入 300 μL 无水乙醇, 涡旋混匀, 取上清液过吸附柱, 10000 $\times g$ 离心 2 min, 弃去离心液, 洗涤液 700 μL 洗 2 次, 10000 $\times g$ 离心 2 min, 弃去洗涤液, 10000 $\times g$ 离心 2 min 后加入 100 μL 灭菌超纯水, 转移至新的 1.5 mL EP 管中, 做好标签, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。将样品送至北京诺禾致源生物有限公司进行二代测序。将组装好的全基因组数据放入 CGE 数据库(<https://cge.cbs.dtu.dk/>)进行多位点序列分型(MLST)、耐药基因和毒力基因分析。

1.6 接合转移实验

接合转移实验采用肉汤接合法进行, 将携带 *bla*_{CTX-M} 阳性基因的大肠杆菌作供体菌, 工程菌 *E. coli* J53 作受体菌, 分别接种在 2 mL LB 肉汤试管中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 4 h 至生长对数期, 然后将供体菌与受体菌进行 1:1 混合, 37 $^\circ\text{C}$ 静置培养 12 h, 收集菌液涂布于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 叠氮钠+2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟双药板, 16–20 h 后挑取单菌落在双药板验证接合子, 并 PCR 确证 *bla*_{CTX-M} 基因。

2 结果和分析

2.1 大肠杆菌分离及 *bla*_{CTX-M} 基因检测

本实验共从广州市 6 个不同区采集的 323 份畜禽肉样中分离鉴定大肠杆菌 241 株(分离率为

75.23%), 其中猪肉样分离 120 株(分离率为 72.73%), 鸡肉样分离 70 株(分离率为 72.92%), 牛肉样分离 47 株(分离率为 82.46%)和羊肉样 4 株(分离率为 80.00%)。PCR 检测结果表明, 8 株大肠杆菌中检测到 *bla*_{CTX-M}, 检出率为 3.32%, 其中 4 株为 *bla*_{CTX-M-14}, 3 株为 *bla*_{CTX-M-65}, 1 株为 *bla*_{CTX-M-55}。

2.2 药物敏感性测定

药物敏感性结果表明, 241 株大肠杆菌对 17 种受试药物表现出的耐药状况差异较大。其中氨苄西林耐药率最高, 达到 63.07%, 其次是多西环素和复方新诺明的耐药率分别为 47.72% 和 43.15%, 其他药物的耐药率处于较低水平。值得注意的是, 8 株(3.32%)大肠杆菌具有头孢噻肟耐药表型, 而美罗培南、阿米卡星和替加环素未出现耐药株(图 1)。

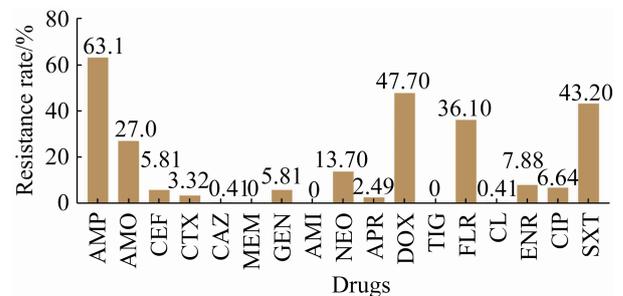


图 1. 241 株市售畜禽肉源大肠杆菌药物敏感性结果
Figure 1. Drug susceptibility test of 241 *E. coli* from retail livestock and chicken meat. AMP: ampicillin; AMO: amoxicillin; CEF: ceftiofur; CTX: cefotaxime; CAZ: ceftazidime; MEM: meropenem; GEN: gentamycin; AMI: amikacin; NEO: neomycin; APR: apramycin; DOX: doxycycline; TIG: tigecycline; FLR: florfenicol; CL: colistin; ENR: enrofloxacin; CIP: ciprofloxacin; SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim.

2.3 *bla*_{CTX-M} 阳性大肠杆菌特征

针对 *bla*_{CTX-M} 阳性大肠杆菌特征研究(表 4)表明, 8 株 *bla*_{CTX-M} 阳性大肠杆菌中 7 株来自鸡肉样品, 1 株来自猪肉样品, 且仅在海珠区和荔湾区市场样品中分离得到。MLST 分型结果表明, 7 株大肠杆菌获得 ST 分型, 其中 4 株为 ST1737 型, 2 株为 ST1838 型, 1 株为 ST616 型; 1 株为新 ST 型, 与 ST101 亲缘关系最近, 仅在 *fumC* 基因上有一个碱基的差异。值得注意的是, ST1737 仅出现在海珠区市场不同摊位的鸡肉中, ST1838 也出现在荔湾区市场不同摊位的鸡肉样品中。8 株 *bla*_{CTX-M} 阳性大肠杆菌为多重耐药菌株, 均对氨苄西林、阿莫西林、头孢噻吩、头孢噻肟和复方新诺明耐药。8 株 *bla*_{CTX-M} 阳性大肠

杆菌携带的耐药基因丰富多样, 包括介导人医临床和兽医重要的抗菌药耐药基因, 如 β -内酰胺类耐药基因(*bla*_{TEM}、*bla*_{OXA})、磷霉素耐药基因 *fosA3*、利福平耐药基因 *arr-3* 和氟苯尼考耐药基因 *floR*。不同 ST 型大肠杆菌耐药基因和毒力基因携带的数量和种类差异较大, 其中 ST1838 携带的耐药基因数目最多, 有 15 种耐药基因, 其中氨基糖苷类耐药基因 7 个(*aadA1*、*aadA2b*、*aac(3)-IV*、*aph(3'')-Ib*、*aph(3')-Ia*、*aph(4)-Ia* 和 *aph(6)-Id*)。ST1737 携带的耐药基因数目最少, 有 7 种耐药基因。值得注意的是, ST1838 携带有更多的毒力基因, 包括编码大肠杆菌补体基因 *iss*、编码铁载体受体蛋白基因 *iroN*、编码温度敏感血凝素基因 *tsh* 和 ABC 转运体蛋白基因 *mchBCF* 等毒力基因, 且

表 4. *bla*_{CTX-M} 阳性大肠杆菌特征

Table 4. Characterization of *bla*_{CTX-M}-positive *E. coli*

Strains	Source	Location	ST type	Antibiotic phenotype	Resistance genes	Virulence genes
F18101	Chicken	Haizhu district	1737	AMP/AMO/CEF/CTX/DOX/SXT	<i>aadA5 bla</i> _{CTX-M-14} <i> fosA3 mdf(A) tet(A) dfrA17 sul2</i>	<i>lpfA</i>
F18105	Chicken	Haizhu district	1737	AMP/AMO/CEF/CTX/DOX/SXT	<i>aadA5 bla</i> _{CTX-M-14} <i> fosA3 mdf(A) tet(A) dfrA17 sul2</i>	<i>lpfA</i>
F18106	Chicken	Haizhu district	1737	AMP/AMO/CEF/CTX/DOX/SXT	<i>aadA5 bla</i> _{CTX-M-14} <i> fosA3 mdf(A) tet(A) dfrA17 sul2</i>	<i>lpfA</i>
F18107	Chicken	Haizhu district	1737	AMP/AMO/CEF/CTX/DOX/SXT	<i>aadA5 bla</i> _{CTX-M-14} <i> fosA3 mdf(A) tet(A) dfrA17 sul2</i>	<i>lpfA</i>
F19015	Pork	Liwan district	NEW	AMP/AMO/CEF/CTX/DOX/FLR/SXT	<i>aadA1 aadA2 bla</i> _{CTX-M-55} <i> cmlA1 floR mdf(A) tet(B) tet(M) sul2 dfrA12</i>	–
F19042	Chicken	Liwan district	1838	AMP/AMO/CEF/CTX/GEN/NEO/APR/DOX/FLR/SXT	<i>aadA1 aadA2b aac(3)-IV aph(3'')-Ib aph(3')-Ia aph(4)-Ia aph(6)-Id bla</i> _{OXA-10} <i> bla</i> _{CTX-M-65} <i> cmlA1 floR qnrS1 mdf(A) tet(A) sul3</i>	<i>gad iroN iss mchB mchC mchF mcmA tsh</i>
F19046	Chicken	Liwan district	1838	AMP/AMO/CEF/CTX/GEN/NEO/APR/DOX/FLR/SXT	<i>aadA1 aadA2b aac(3)-IV aph(3'')-Ib aph(3')-Ia aph(4)-Ia aph(6)-Id bla</i> _{OXA-10} <i> bla</i> _{CTX-M-65} <i> cmlA1 floR qnrS1 mdf(A) tet(A) sul3</i>	<i>gad iroN iss mchB mchC mchF mcmA tsh</i>
F19050	Chicken	Liwan district	616	AMP/AMO/CEF/CTX/DOX/FLR/SXT	<i>aadA1 aac(6')-Ib-cr bla</i> _{TEM-1B} <i> bla</i> _{OXA-1} <i> bla</i> _{CTX-M-65} <i> qnrS2 arr-3 catB3 floR mdf(A) mph(A) tet(A) sul1 dfrA1</i>	<i>lpfA</i>

AMP: ampicillin; AMO: amoxicillin; CEF: ceftiofur; CTX: cefotaxime; GEN: gentamycin; NEO: neomycin; APR: apramycin; DOX: doxycycline; FLR: florfenicol; SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim.

iss、*iroN* 和 *tsh* 位于同一个 ColV 质粒相似片段上。而 ST1737 和 ST616 仅携带编码长极菌毛蛋白的 *lpfA* 基因(表 4)。接合转移试验结果表明, 8 株大肠杆菌 *bla*_{CTX-M} 基因均可成功转移至工程菌 *E.coli* J53。

3 讨论

大肠杆菌、克雷伯菌等肠杆菌作为自然界最广泛存在机会致病菌, 大肠杆菌被作为研究 CTX-M 成功的模型^[3]。市售肉常被大肠杆菌、沙门氏菌等病原菌污染, 其污染的来源可能来自于以下几个方面: (1) 畜禽在屠宰前已被病原菌感染; (2) 在屠宰、储存、运输和销售过程与污染物接触造成的污染; (3) 暴露在空气中的肉由于空气中微生物沉降粘附于肉类表面。本文中由于无法确定农贸市场畜禽肉具体来源及运输和销售等过程是否有污染, 因此无法追踪到耐药基因的源头。本文市售畜禽肉中大肠杆菌的分离率为 75.73%, 表明市售畜禽肉中大肠杆菌的污染已经比较严重, 需要引起人们的注意。同时该实验结果与前人对市售肉大肠杆菌的分离率结果相似^[9-11]。大肠杆菌药物敏感性结果表明对氨苄西林、氟苯尼考、多西环素和复方新诺明耐药率超过 40%, 对阿米卡星、安普霉素、黏菌素等药物的耐药率较低, 这与阿米卡星禁用于食品动物、黏菌素禁用于抗菌促生长添加剂有关。该结果与周雪艳等^[9]分离的大肠杆菌耐药性水平相似, 但低于先前广州市市售肉分离的大肠杆菌耐药性水平^[12-13]。

CTX-M-1 和 CTX-M-9 群是目前国内最主要的流行 CTX-M 酶, 因此本研究主要检查这两种 CTX-M 基因群, 本文共检测到 8 株阳性菌株, 检

出率为 3.32%, 其中 4 株 CTX-M-14 为 3 株 CTX-M-65 和 1 株 CTX-M-55。与曾丽^[14]对食品源等不同来源 CTX-M 基因亚型分布结果一致, 但检出率低于姚旭对 2015–2016 年广州市零售肉中 CTX-M 基因的检出率^[12]。同时, 该实验结果与我国动物源大肠杆菌 CTX-M 酶主要流行亚型分布相一致^[15]。这暗示市售畜禽肉大肠杆菌 CTX-M 基因与动物源大肠杆菌有密切关系。进一步研究结果发现, 8 株产 CTX-M 酶大肠杆菌均为多重耐药菌, 其中 7 株从鸡肉样品中分离, 这表明鸡肉中产 CTX-M 酶大肠杆菌更为常见。此外, 8 株菌种存在 4 种不同的 ST 型, 即 ST1737 ($n=4$)、ST1838 ($n=2$)、ST616 ($n=1$) 和新 ST 型($n=1$), 且 4 株 ST1737 来源于海珠区交易市场 2 个不同摊位鸡肉样品分离, 该结果表明水平传播是主要介导 *bla*_{CTX-M} 基因在交易市场的畜禽肉类食品中的传播方式, 但部分农贸市场仍以克隆传播, 但不同摊位之间是否存在相互传播需要进一步研究。前人研究表明 *bla*_{CTX-M} 基因大肠杆菌常与 *fosA3*、*oqxAB* 等介导人医临床重要抗菌药物耐药的基因共存, 给临床治疗带来巨大挑战^[6,13]。本研究中 8 株产 CTX-M 大肠杆菌也携带临床重要耐药基因, 如 ST1737 携带有 *fosA3* 基因, ST616 携带 *arr-3* 基因, ST1838 携带 *bla*_{OXA-10}。不同 ST 型大肠杆菌中的耐药基因和毒力因子种类和数目差异较大, 其中 ST1838 携带的耐药基因和毒力基因数目最多, 对药物的耐药谱更广。携带有 *lpfA* 基因可增加大肠杆菌的粘附能力, 在 ST1838 中 *gad*、*iroN* 和 *iss* 基因共定位在 ColV 质粒片段上, 增加了大肠杆菌的致病力和在宿主体内的生存力, 这可能是大肠杆菌生存环境的选择作用造成的。8 株大肠杆菌均可将 *bla*_{CTX-M} 基因成功转移

至受体工程菌，表明可接合型质粒在 $bla_{\text{CTX-M}}$ 基因的传播和扩散方面起重要作用，该结果与 $bla_{\text{CTX-M}}$ 基因食品动物和动物性食品中的研究结果一致^[6,16]。

4 结论

广州市零售畜禽肉中大肠杆菌污染严重，对氨苄西林耐药率超过 70%，但对大部分药物耐药率仍处在较低水平，且 $bla_{\text{CTX-M}}$ 基因的检出率为 3.32%。值得注意的是，产 CTX-M 酶大肠杆菌均为多重耐药菌株，且 $bla_{\text{CTX-M}}$ 基因均可接合转移，且菌株之间存在水平传播和克隆传播。

参考文献

- [1] Liu BG, Li YC, Wang BY, Bai M, Miao MS, Xu EP. Research progress of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(12): 1–7. (in Chinese)
刘保光, 栗俞程, 汪保英, 白明, 苗明三, 许二平. CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶研究进展. *河南农业科学*, 2019, 48(12): 1–7.
- [2] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(10): 1791–1798.
- [3] Bevan DR, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72(8): 2145–2155.
- [4] Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 110.
- [5] Ye QH, Wu QP, Zhang SH, Zhang JM, Yang GZ, Wang J, Xue L, Chen MT. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from retail food in China. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1709.
- [6] Xie MM, Lin DC, Chen KC, Chan EWC, Yao W, Chen S. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from retail meat that harbor $bla_{\text{CTX-M}}$ and *fosA3* genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(4): 2450–2455.
- [7] Liu JH, Wei SY, Ma JY, Zeng ZL, Lü DH, Yang GX, Chen ZL. Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 β -actamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, 29(5): 576–581.
- [8] Hu QH, Tu J, Han XG, Zhu YY, Ding C, Yu SQ. Development of multiplex PCR assay for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* simultaneously from ducks. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 81(1): 64–69.
- [9] Zhou XY, Liu YZ, Lu JX, Liu JL, Li Z. Identification and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from fresh pork. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2014, 24(14): 2116–2119. (in Chinese)
周雪雁, 刘翊中, 卢建雄, 刘俊林, 李倬. 市售鲜猪肉中大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(14): 2116–2119.
- [10] He XM, Guo LJ, Wu GY, Cheng L, Li B, Luo Y, Zhou LK, Qing LS. Antibiotic and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from pork in Sichuan Province. *Food Science*, 2014, 35(7): 132–137. (in Chinese)
何雪梅, 郭莉娟, 吴国艳, 程琳, 李蓓, 罗燕, 邹立扣, 卿玲杉. 猪肉源大肠杆菌对抗生素及消毒剂的耐药性. *食品科学*, 2014, 35(7): 132–137.
- [11] 于庆华. 不同动物源食品中大肠杆菌分离鉴定与耐药性分析. *饲料研究*, 2019, 42(2): 50–52.
- [12] 姚旭. 市售肉菜产 ESBLs 和碳青霉烯酶肠杆菌的分子流行病学研究. 华南农业大学硕士学位论文, 2016.
- [13] Wang J, Zhi CP, Chen XJ, Guo ZW, Liu WL, Luo J, Huang XY, Zeng L, Huang JW, Xia YB, Yi MY, Huang T, Zeng ZL, Liu JH. Characterization of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, retail meat, and human patients in Guangzhou, China. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1982.
- [14] 曾丽. 不同来源大肠杆菌 ESBLs 基因分子流行病学研究. 华南农业大学硕士学位论文, 2016.
- [15] Zhang DD, Wang HN. Prevalence and variation of CTX-M extended spectrum β -lactamase in animal origin in China. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2018, 45(2): 40–41, 43. (in Chinese)
张冬冬, 王红宁. 我国动物源 CTX-M 型超广谱 β 内酰胺酶的流行及变异. *四川畜牧兽医*, 2018, 45(2): 40–41, 43.
- [16] Liu BT, Li L, Fang LX, Sun J, Liao XP, Yang QE, Huang T, Liu YH. Characterization of plasmids carrying *oqxAB* in *bla* (CTX-M)-negative *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Microbial Drug Resistance*, 2014, 20(6): 641–650.

Epidemiological investigation of CTX-M-producing *Escherichia coli* from retail livestock and chicken meat

Zhenbao Ma^{1,2}, Yejun Pan^{1,2}, Qinyi Xu^{1,2}, Weiming Huang^{1,2}, Siru Lin^{1,2}, Huizhong Guo^{1,2}, Dongping Zeng^{1,2}, Wenguang Xiong^{1,2}, Zhenling Zeng^{1,2*}

¹ Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

² National Risk Assessment Laboratory for Antimicrobial Resistance of Animal Original Bacteria, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] To investigate antibiotic resistance and epidemiological characteristics of *bla*_{CTX-M} gene of *Escherichia coli* from retail livestock and chicken meat in Guangzhou. **[Methods]** *E. coli* was isolated from retail livestock and chicken meat samples in different regional retail markets and fresh supermarket in Guangzhou. Those isolates were identified by the gene *phoA* and sequencing. Drug susceptibility was determined by agar diffusion and broth microdilution method. The *bla*_{CTX-M} gene was detected using PCR amplification. Whole genome sequencing was performed in all *bla*_{CTX-M}-positive *E. coli*. **[Results]** A total of 241 strains were isolated from 323 meat samples. The drug susceptibility test shows that those strains were highly resistant to ampicillin (63.07%), doxycycline (47.72%) and sulfamethoxazole/trimethoprim (43.15%). The prevalence of *bla*_{CTX-M} gene was 3.32% (*n*=8), which contained 4 *bla*_{CTX-M-14}-positive strains, 3 *bla*_{CTX-M-65}-positive strains and 1 *bla*_{CTX-M-55}-positive strain. Eight CTX-M-producing *E. coli* were divided into four distinct ST types, which carried multiple resistance genes and virulence genes. **[Conclusion]** The contamination of *E. coli* was serious in retail meat. All CTX-M-producing *E. coli* were multi-resistant strains, and the dissemination of *bla*_{CTX} gene was mainly due to horizontal transfer, which needs further surveillance.

Keywords: CTX-M enzyme, *Escherichia coli*, epidemiology, livestock and chicken meat

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key R&D Program of China (2018YFD0500300) and by the Training Program of Innovation for College Student of South China Agricultural University (201910564457)

*Corresponding author. E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

Received: 25 March 2020; Revised: 13 June 2020; Published online: 16 July 2020