

· 调查报告与分析 ·

## 零售猪肉中环丙沙星及头孢噻肟双耐药大肠杆菌特征分析\*

林兰, 徐潇, 任秀, 崔生辉

**摘要:**目的 对市场采集的零售猪肉样品进行环丙沙星与头孢噻肟双耐药大肠杆菌检测和耐药机制分析。方法 从陕西汉中( $n=81$ )和北京( $n=37$ )采集新鲜零售猪肉样品,对环丙沙星与头孢噻肟双耐药大肠杆菌进行分离、药敏和耐药机制分析。结果 22.0% (26/118)的零售猪肉样品检出环丙沙星与头孢噻肟双耐药大肠杆菌,以系统发生 A 群为主(12 株),优势耐药谱型为 AMP-CAZ-CTX-CIP-CHL-GEN-SXT-TET( $n=14$ )和 AMP-CAZ-CTX-CIP-CHL-SXT-TET( $n=7$ ),所有菌株的拓扑异构酶喹诺酮耐药决定区中均有点突变,从 12 个菌株中检出质粒介导喹诺酮耐药机制;从 24 株产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠杆菌中共检出 4 个  $bla_{CTX-M}$  型,其中  $bla_{CTX-M-55}$ ( $n=22$ )为优势型。结论 社区零售猪肉是环丙沙星与头孢噻肟双耐药大肠杆菌的重要储存库,其中  $bla_{CTX-M-55}$  为三代头孢耐药的主要机制。

**关键词:** 大肠杆菌;环丙沙星;头孢噻肟;耐药;猪肉

中图分类号:R 378.2 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2014)10-1363-02 DOI:10.11847/zggws2014-30-10-43

Prevalence and characterization of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *Escherichia coli* isolates in retail pork

LIN Lan, XU Xiao, REN Xiu, et al (Department of Chemical Drug Calibration, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To investigate the prevalence and characteristics of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *Escherichia coli* (*E. coli*) isolates in retail pork samples. **Methods** Retail pork samples were collected from 12 supermarkets and 7 farmer's markets in Beijing ( $n=37$ ) and Hanzhong ( $n=81$ ); cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *E. coli* isolates were recovered and subjected to antimicrobial susceptibility testing and resistant mechanism analysis. **Results** Cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *E. coli* isolates were recovered in 22.0% (26/118) of retail pork samples. *E. coli* isolates of phylogenetic group A were dominant (12 isolates). The dominant resistant profiles were ampicillin (AMP)-ceftazidime (CAZ)-cefotaxime (CTX)-ciprofloxacin (CIP)-chloramphenicol (CHL)-gentamicin (GEN)-trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)-tetracycline (TET) ( $n=14$ ) and AMP-CAZ-CTX-CIP-CHL-SXT-TET ( $n=7$ ). Point mutations in quinolone resistance determination regions of topoisomerases were identified in all the isolates. Plasmid mediated quinolone resistant determinants were identified in 12 isolates. Four subtypes of  $bla_{CTX-M}$  were identified in 24 extended spectrum  $\beta$ -lactamases producing *E. coli* isolates and  $bla_{CTX-M-55}$  ( $n=22$ ) was dominant. **Conclusion** This study highlights that retail pork could serve as an important reservoir of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *E. coli*. The dominant  $\beta$ -lactam resistant mechanism is  $bla_{CTX-M-55}$  ( $n=22$ ).

**Key words:** *Escherichia coli*; cefotaxime; ciprofloxacin; drug resistance; pork

由于中国生猪养殖业抗生素的滥用,养猪场和零售猪肉已成为产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)和喹诺酮耐药大肠杆菌的重要储存库。研究显示,环丙沙星-头孢噻肟双耐药大肠杆菌已在病人中广泛出现<sup>[1-2]</sup>,本研究对北京和汉中地区零售猪肉中头孢噻肟-环丙沙星双耐药大肠杆菌的分布、耐药谱与遗传特征进行分析。现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 材料 于 2011 年 4—12 月从北京和陕西汉中地区的 12 个超市和 7 个农贸市场采集零售猪肉样品,共计采集 118 份,其中汉中 81 份,北京 37 份。

样品采集后 4 h 内进行双耐药大肠杆菌检测。

1.2 主要试剂与仪器 (1)试剂:氨苄西林(ampicillin, AMP)、氨苄西林-舒巴坦(ampicillin/sulbactam, SAM)、头孢他啶(cefotaxime, CAZ)、头孢噻肟(cefotaxime, CTX)、亚胺培南(imipenem, IMP)、萘啶酸(nalidixic acid, NAL)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、庆大霉素(gentamicin, GEN)、替加环素(tigecycline, TGC)、复方新诺明(trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT)、和四环素(tetracycline, TET)对照品(中国食品药品检定研究院);缓冲蛋白胨水、MH 培养基、EC 肉汤培养基(美国 BD 公司);SSI 肠道细菌琼脂(丹麦血清所);API 20E 生化鉴定条(法国梅里埃公司);

\* 基金项目:科技部国家高技术研究发展计划(2012AA101003)

作者单位:中国食品药品检定研究院 化学药品检定所,北京 100050

作者简介:林兰(1973-),女,北京人,副研究员,博士,主要从事食品和药品检验工作。

数字出版日期:2014-9-1 15:28

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140903.1500.002.html>

Taq DNA 聚合酶及相关试剂(大连 Takara 公司); PCR 扩增用引物由上海英俊公司合成;(2)仪器:恒温培养箱(美国 Thermo 公司;基因扩增仪 C1000 96W、电泳仪 POWERPAC 和凝胶成像系统 Versodoc MP4000(美国伯乐公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 环丙沙星-头孢噻肟双耐药大肠杆菌分离 按猪肉重量加入缓冲蛋白胨水(225 mL/25 g), (36±1)℃ 培养 20~22 h,取 100 μL 缓冲蛋白胨水培养物接种 10 mL EC 增菌肉汤,在(44±1)℃、100 rpm 震荡培养 20~22 h。取一环 EC 培养物接种于添加有 4 μg/mL 环丙沙星和 8 μg/mL 头孢噻肟的 SSI 肠道细菌琼脂平板,(36±1)℃ 培养 22~24 h,从 SSI 每个平板上挑取红色可疑菌落进行确认。

1.3.2 大肠杆菌药敏测定 参照 CLSI 2012 版推荐的肉汤稀释法<sup>[3]</sup>,测定所分离大肠杆菌对 AMP(1~128 μg/mL)、CAZ(0.03~64 μg/mL)、头孢他啶-克拉维酸、CTX(0.015~128 μg/mL)、头孢噻肟-克拉维酸、IMP(0.03~16 μg/mL)、CIP(0.015~512 μg/mL)、CHL(1~128 μg/mL)、GEN(0.125~64 μg/mL)、TGC(0.015~32 μg/mL)、TET(0.25~64 μg/mL)和 SXT(0.06/1.19~16/304 μg/mL)的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MICs)。

1.3.3 PCR 扩增与 DNA 测序 通过多重 PCR 方法检测 *chuA*、*yjaA* 和 *TspE4*。C2 的阳性与否对所分离大肠杆菌的系统发生进行分类<sup>[4]</sup>。用 PCR 方法检测质粒介导喹诺酮耐药机制 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*oxqAB*、*aac*-(6')-*Ib* 和 *qepA*。并对大肠杆菌 *gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE* 喹诺酮耐药决定区进行扩增<sup>[5]</sup>。对产 ESBL 菌株中 *bla*<sub>CTX-M</sub> 进行筛选<sup>[6]</sup>。所有 PCR 产物由大连宝生物公司进行序列测定。

## 2 结果

2.1 样品采集与双耐药大肠杆菌检测 26 份样本检出头孢噻肟-环丙沙星双耐药大肠杆菌,其中北京地区检出 11 份,汉中地区检出 15 份。在 26 株头孢噻肟-环丙沙星双耐药大肠杆菌中,系统发生 A 群和 B1 群为优势群,其中 12 株属于系统发生 A 群,9 株属于 B1 群,4 株属于 D 群,1 株属于 B2 群。

2.2 药敏分析 所有 26 株大肠杆菌表型均为多重耐药,优势耐药谱型为 AMP-CAZ-CTX-CIP-CHL-GEN-SXT-TET ( $n = 14$ ) 和 AMP-CAZ-CTX-CIP-CHL-SXT-TET ( $n = 7$ ),系统发生分群与耐药谱间未见相关关系,所有 26 株大肠杆菌均对 AMP、CTX、CAZ、CIP、TET 耐药,均对 IMP 和 TGC 敏感,对其他抗生素耐药菌株数依次为:SXT 25 株、CHL 22 株和 GEN 18 株。24 株 CAZ 或 CTX 的 MIC 值与加克拉维酸后的 MIC 值差异在 3 倍或以上,确认为产 ESBL 菌株。

2.3 喹诺酮耐药机制分析 16 株菌的喹诺酮耐药决定区存在 3 个点突变,均为 *GyrA* (S83L, D87N)-*ParC* (S80I);9 株菌的喹诺酮耐药决定区存在 4 个点突变:*GyrA* (S83L, D87N)-*ParC* (S80I)-*ParE* (S458A) ( $n = 5$ )、*GyrA* (S83L, D87N)-*ParC* (S80I, E84A) ( $n = 2$ )、*GyrA* (H92Y, Y101H)-*ParC* (S80I, E84G) ( $n = 1$ )、*GyrA* (H92Y, Y101H)-*ParC* (S80I, E84A) ( $n = 1$ )。质粒介导喹诺酮耐药机制在 12 株大肠杆菌中检出:*oxqAB* ( $n = 12$ )、*aac* (6')-*Ib-cr* ( $n = 2$ )、*qnrS1* ( $n = 2$ )。

2.4 β-内酰胺耐药基因的检测 在 24 株产 ESBLs 大肠杆菌中,共检出 4 个 *bla*<sub>CTX-M</sub> 型,包括 *bla*<sub>CTX-M-55</sub> ( $n = 22$ )、*bla*<sub>CTX-M-65</sub> ( $n = 2$ )、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> ( $n = 1$ ) 和 *bla*<sub>CTX-M-64</sub> ( $n = 1$ )。携带 *bla*<sub>CTX-M-55</sub> 的大肠杆菌从汉中 ( $n = 14$ ) 和北京 ( $n = 8$ ) 来源的样品中均有检出。

## 3 讨论

本研究所分离菌株中累积了与临床病人来源菌株相同的氟喹诺酮和三代头孢耐药机制。在近一半菌株中同时累积了染色体和质粒介导喹诺酮耐药机制,且具有较高的环丙沙星 MIC 值( $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ ),这进一步揭示这些菌株经历了较长耐药机制进化历程。由于这些菌株对头孢噻肟和环丙沙星同时耐药,一旦引起社区人群感染后,由于门诊针对性治疗措施十分有限,极可能加重医疗负担或导致高的死亡率。

大肠杆菌对环丙沙星的 MIC 值与其累积的耐药机制复杂程度密切相关。质粒介导的喹诺酮耐药机制可使宿主菌株在较高浓度喹诺酮条件下中存活,并增加耐药突变菌株出现的概率<sup>[14-15]</sup>,鉴于本研究中大量菌株同时具备染色体和质粒介导的喹诺酮耐药机制,应在明确的染色体遗传背景中,针对质粒介导和染色介导喹诺酮耐药机制间关系开展深入研究。

### 参考文献

- [1] 倪朝辉,郑文旭,李凡,等.产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌耐药基因分析[J].中国公共卫生,2008,24(10):1237-1239.
- [2] 李介华,袁春雷,肖伟民,等.大肠埃希菌产超广谱β-内酰胺酶与耐药监测[J].中国公共卫生,2005,21(5):569-571.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing:seventeenth informational supplement M100-S22 [M]. Wayne, Pennsylvania:CLSI,2012.
- [4] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10):4555-4558.
- [5] Everett MJ, Jin YF, Ricci V, et al. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(10):2380-2386.
- [6] Xu L, Ensor V, Gossain S, et al. Rapid and simple detection of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes by multiplex PCR assay[J]. J Med Microbiol, 2005, 54:1183-1187.