

# 基于 PCR 技术检测鸡粪样中的 耐药元件



李佳丹扬, 陶芬, 姜玉莎, 胡海峰, 吴培福\*

西南林业大学生命科学学院, 云南昆明 650224

**摘要:** 目的: 通过 PCR 技术从鸡粪样中检测各种耐药元件, 以期 PCR 技术在肠道菌群耐药性普查的应用上奠定基础。方法: 从采集的鸡粪样中提取菌群基因组 DNA, 采用常规 PCR 技术扩增不同的耐药元件。结果: 本研究从鸡粪样中检测到了不同类的耐药基因 *tetA*、*tetB*、*bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>CTX-M1</sub>*、*qnrA*、*aadA1*、*dfrA1* 和 *sul1*, 且在饲养的不同阶段, 不同的耐药基因的检出率存在时间点差异性, 其中, *tetB* 随着饲养时间的延长具有逐步增高的趋势, 而 *bla<sub>TEM</sub>* 和 *aadA1* 随饲养时间延长有下降的趋势。此外, 本研究还检测到了整合酶基因 *intI1* 和 *intI2*。在质粒复制子类型中, 本研究检测出了 IncB/O、IncFIC、IncFIA、IncFIB、IncI1、IncN 和 IncFrep, 不同样品携带质粒复制子类型的数量范围为 1-6 种, 且质粒复制子的检出率也存在时间点差异性, 但未表现出明显的规律性。在质粒间的关联性方面, 检出的质粒间存在不同程度的关联性。结论: 采用 PCR 技术可检测到肠道菌群中的不同耐药元件。

**关键词:** PCR 技术; 鸡; 粪样; 检测; 耐药元件

DOI: [10.57237/j.jaf.2023.01.002](https://doi.org/10.57237/j.jaf.2023.01.002)

## Detection of Drug Resistant Elements from Broiler Feces Based on PCR Technology

Jiadan yang Li, Fen Tao, Yusha Jiang, Haifeng Hu, Peifu Wu\*

College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

**Abstract:** Objective: The aim of this study is to detect various drug resistance elements from chicken feces by PCR technology, so as to lay a foundation for the application of PCR technology in the survey of drug resistance of intestinal microbiota. Methods: Genomic DNA was extracted from chicken feces, and different drug resistance elements were amplified by conventional PCR. Results: In this study, different classes of the drug-resistant genes *tetA*, *tetB*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M1</sub>*, *qnrA*, *aadA1*, *dfrA1* and *sul1* were observed from collected chicken feces, and the detection rates of different drug-resistant genes varied based on time point at which the genes were amplified. Wherein, *tetB* progressively increased with the prolongation of feeding time, while *bla<sub>TEM</sub>* and *aadA1* decreased with the prolongation of feeding time. In addition, integrase genes *intI1* and *intI2* were also detected in this study. Among the types of plasmid replicons, IncB/O, IncFIC, IncFIA, IncFIB, IncI1, IncN and IncFrep were detected in this study, and the number of replicon types

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2022J0505).

\*通信作者: 吴培福, [jed-wu2008@126.com](mailto:jed-wu2008@126.com)

收稿日期: 2022-11-30; 接受日期: 2023-01-13; 在线出版日期: 2023-02-03

<http://www.agrforestry.com>

carried by different samples ranged from 1 to 6, and the detection rate of plasmid replicons also had a time point difference, while, obvious regularity was not observed. In terms of the correlations between plasmids, the detected plasmids presented varying degrees of correlations. Conclusion: PCR technology could detect different drug resistance elements in intestinal microbiota.

**Keywords:** PCR Technology; Broiler; Fece Samples; Detection; Drug Resistant Elements

## 1 引言

细菌耐药性已成为威胁人和动物健康的重大问题,且不断出现的耐药性可使人类进入后抗生素时代[1]。细菌耐药性使临床可选择药物减少,感染治疗效果下降,导致人和动物治疗的成本费用增加,因耐药性所致的人和动物的死亡率增加[2]。可见,研究细菌耐药性产生和进化的机制对药物开发和临床用药具有非常重要的意义。

细菌可通过改变药物靶标、产生灭活酶、改变细胞膜通透性、细胞膜增厚及利用外排泵排出药物等途径对临床用药产生耐受性[2]。基于这些耐药机制,以往研究对临床分离株的耐药表型和耐药机制进行了大量研究,发现随着抗生素的长期使用或不当使用,细菌耐药谱和耐药率有增宽或增高的趋势。抗生素等应激因素可使细菌产生突变获得耐药,或可使细菌通过水平基因转移而获得耐药性。数项研究表明,人类活动可造成耐药菌或耐药基因的传播,使未接触过抗生素的人和动物获得耐药性,抗生素耐药基因普遍存在于各种环境中,并可经水平基因转移发生传播[3, 4]。

以往的微生物耐药性研究主要依赖于常规的细菌分离培养、耐药基因的 PCR 扩增与克隆测序、荧光定量、核酸杂交、基因芯片等技术[5]。随着研究技术的不断提高,宏基因组测序技术不断应用于耐药性研究,研究者可基于分离株或肠道菌群的基因组角度分析耐药基因型、耐药基因的遗传背景和进化、耐药基因的水平转移特征等,结合耐药表型与耐药基因型间的关联性,给临床用药提供了指导性参考。宏基因组测序避免了 PCR 检测出现假阴性及无法检测新或不典型耐药机制的不足,然而,在耐药基因型流行病学筛查时,需要对大量的分离株或肠道样品进行检测,宏基因组测序分析可使检测费用明显增加,故本研究基于 PCR 技术从鸡粪样中直接扩增检测不同的耐药基因、整合酶和质粒复制酶,以期 PCR 技术在肠道耐药性检测

上的应用奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 粪样采集

研究所用粪样源自西南林业大学生命科学学院动物生产基地笼养的黄羽肉鸡。肉鸡所用日粮均购自饲料公司。肉鸡从 1 周龄饲养至 6 周龄,从 2 周龄开始每周周末采集 20 只鸡的粪样,共计采集 100 份粪样。将采集的粪样装入无菌 50mL 离心管,并剔除暴露于空气或与粪盘接触的表面部分,以减少其它菌的污染。

### 2.2 样品预处理和菌群基因组 DNA 提取

参照前期发表的孔雀粪样宏基因组 DNA 的提取方法来预处理样品,并提取菌群基因组 DNA。简而言之,先采用差速离心法、PBS 缓冲液和丙酮溶液漂洗法预处理粪样,以去除粪样中的大部分干扰杂质,而后采用溶菌酶和蛋白酶消化法提取基因组 DNA。

### 2.3 耐药元件的 PCR 扩增

本研究扩增的耐药基因包括:四环素类耐药基因 *tetA* 和 *tetB*;  $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>OXA-48</sub>*、*bla<sub>CTX-M1</sub>*、*bla<sub>CTX-M2</sub>*、*bla<sub>CTX-M9</sub>* 和 *bla<sub>CTX-M8/25</sub>*;喹诺酮类耐药基因 *qnrA*;氨基糖苷类耐药基因 *aadA1* 和 *aac(3')-IV*;磺胺类耐药基因 *dfrA1* 和 *sul1*。此外,本研究还对整合酶基因 *int11*、*int12* 和 *int13* 及质粒复制子 *IncB/O*、*IncFIC*、*IncP*、*IncFIIA*、*IncFIA*、*IncFIB*、*IncI1*、*IncFrep*、*IncN* 和 *IncL/M* 进行了扩增。本研究所用的引物见表 1。

表 1 本研究中所用的基因扩增引物

Table 1 The primers used for gene amplification in this study

耐药元件种类	基因	序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/℃
整盒子	<i>int1</i>	F: GCAAACGCAAGCATTTCATTA	565	52
		R: ACGGATATGCGACAAAAAGG		
	<i>int12</i>	F: CTGGATTTTCGATCACGGCACG	403	52
		R: ACATGCGTGTAATCATCGTCG		
	<i>int13</i>	F: GAACCTTGACCGAACGCAG	717	52
		R: AGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAG		
四环素类	<i>tetA</i>	F: GGTTCACCTCGAACGACGTCA	577	54
		R: CTGTCCGACAAGTTGCATGA		
	<i>tetB</i>	F: CCTCAGCTTCTCAACGCGTG	634	54
		R: GCACCTTGCTGATGACTCTT		
β-内酰胺类	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	786	55
		R: GTTGCCAGTGCTCGATCAGC		
	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F: CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	846	55
		R: CCAATGCTTAATCAGTGAGGC		
	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	55
		R: CATCAAGTTCAACCCAACCG		
	<i>bla<sub>CTX-M1</sub></i>	F: CGTCACGCTGTTGTTAGGAA	781	55
		R: ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT		
	<i>bla<sub>CTX-M2</sub></i>	F: CTCAGAGCATTCGCCGCTCA	843	55
		R: CCGCCGACGCCAGAATATCC		
	<i>bla<sub>CTX-M9</sub></i>	F: GCGCATGGTGACAAAGAGAGTGCAA	876	55
		R: GTTACAGCCCTTCGGCGATGATTC		
	<i>bla<sub>CTX-M8/25</sub></i>	F: CCAGGCGAACGATGTTCAACA	730	55
		R: CGGCTCCGACTGGGTGAAGTA		
喹诺酮类	<i>qnrA</i>	F: GGGTATGGATATTATTGATAAAG	670	45
		R: CTAATCCGGCAGCACTATTTA		
氨基糖苷类	<i>aadA1</i>	F: TATCCAGCTAAGCGCGAACT	447	54
		R: ATTTGCCGACTACCTTGGTC		
	<i>aac(3')-IV</i>	F: CTTCAGGATGGCAAGTTGGT	447	54
		R: CATCTCGTTCTCCGCTCAT		
磺胺类	<i>dhfrA1</i>	F: GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC	367	55
		R: GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC		
	<i>sul1</i>	F: TTCGGCATTCTGAATCTCAC	822	51
		R: ATGATCTAACCCTCGGTCTC		
质粒复制子	IncB/O	F: GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	159	60
		R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		
	IncFIC	F: GTGAAGTGGCAGATGAGGAAGG	262	60
		R: TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT		
	IncP	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	60
		R: TCACGCGCCAGGCGCAGCC		
	IncFIIA	F: CTGTCGTAAGCTGATGGC	270	60
		R: CTCTGCCACAACTTCAGC		
	IncFIA	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	60
		R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
	IncFIB	F: GGAGTTCTGACACAGATTTTCTG	702	60
		R: CTCCCGTCGTTTCAGGGCATT		
	IncII	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	60
		R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
	IncFrep	F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	60
		R: GAAGATCAGTCACACCATCC		
	IncN	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559	60
		R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
	IncL/M	F: GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG	785	60
		R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		

扩增体系为 25 $\mu$ L, 含上下游引物各 1 $\mu$ L、2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 $\mu$ L、DNA 模板 1 $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 9.5 $\mu$ L。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 总解链 5min, 而后进行 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C 45s, 相应退火温度 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min) 的 PCR 扩增, 最后 72 $^{\circ}$ C 总延伸 6min。配置 1% 的琼脂糖凝胶, 电泳检测 PCR 产物。PCR 产物送上海捷瑞生物工程有限公司测序, 以验证扩增产物的特异性。

## 2.4 实验作图

采用 R 语言包对不同时间点的质粒检出情况及质粒关联性进行作图。

# 3 结果

## 3.1 不同耐药基因的检出率

整体而言, 检测到的耐药基因包括: 四环素类耐药基因 *tetA* 和 *tetB*;  $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>* 和 *bla<sub>CTX-M1</sub>*; 喹诺酮类耐药基因 *qnrA*; 氨基糖苷类耐药基因 *aadA1*; 磺胺类耐药基因 *dfrA1* 和 *sul1* (表 2)。未检测到剩余的其它耐药基因。磺胺类耐药基因 *sul1* 和 *dfrA1* 具有最高的检出率, 其平均检出率分别为 99.72% 和 99.73%; 四环素类耐药基因 *tetA* 也具有很高

的检出率 (平均为 93.68%)。此外,  $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>CTX-M1</sub>* 和氨基糖苷类耐药基因 *aadA1* 具有较高的检出率, 其平均检出率分别为 82.00%、78.84% 和 65.98%。喹诺酮类耐药基因 *qnrA* 具有最低的检出率, 平均检出率为 6.32%。

在饲养的各个节段, 不同的耐药基因存在时间点的差异性。四环素类耐药基因 *tetA* 在第三周和第五周的检出率均为 100%, 在其它周也具有很高的检出率 (均高于 84%); *tetB* 随着饲养时间的延长, 具有逐步增高的趋势, 从第二周的 20.15% 增高至第六周的 48.63%。 $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>SHV</sub>* 在第二、五和六周的检出率均为 100%, 但在第三和四周呈现出稍高的检出率 (分别为 50% 和 60%); 除第二周的检出率稍低 (40.41%) 外, *bla<sub>CTX-M1</sub>* 其它周的检出率都较高, 且在第五和六周的检出率均为 100%; *bla<sub>TEM</sub>* 的检出率随饲养时间延长有下降的趋势, 即从第二周的 100% 下降至第五周的 10.24%。喹诺酮类耐药基因 *qnrA* 在整体上的检出率较低, 甚至在第二和三周末检测到该基因。氨基糖苷类耐药基因 *aadA1* 的检出率随饲养时间延长有下降的趋势, 即从第二和三周的 100% 下降至第六周的 31.60%。除第四周的检出率略低于 100% 外, 磺胺类耐药基因 *dfrA1* 和 *sul1* 在其它周的检出率均为 100%。

表 2 不同耐药基因和整合酶的检出率 (%)

Table 2 Detection rates of various antimicrobial resistance genes and integrases (%)

周次	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M1</sub></i>	<i>qnrA</i>	<i>aadA1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>sul1</i>	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>
二	94.73	20.15	100	100	40.41	0	100	100	100	100	40.32
三	100	21.05	50	73.12	73.34	0	100	100	100	100	50.22
四	84.21	31.42	60	50.01	80.45	5.26	57.89	98.65	98.62	99.65	43.15
五	100	45.02	100	10.24	100	15.79	40.42	100	100	100	48.52
六	89.47	48.63	100	10.26	100	10.54	31.60	100	100	100	43.52
平均	93.68	33.25	82.00	48.73	78.84	6.32	65.98	99.73	99.72	99.93	45.15

注: 表中只列出了整个实验期间检出的耐药基因和整合酶。

## 3.2 不同整合酶的检出率

在整个实验期间, 本研究只检测出了整合酶基因 *intI1* 和 *intI2*, 未检测到 *intI3* (表 2), 其中, *intI1* 的检出率明显高于 *intI2*, 除第四周外, 其它周的检出率均为 100%。在整个时间段, *intI2* 的检出率比较恒定, 其检测范围值为 40.32%-50.22%。

## 3.3 不同质粒复制子的检测情况

在 10 种质粒复制子类型中, 本研究检测出了 7 种质粒复制子型: IncB/O、IncFIC、IncFIA、IncFIB、IncI1、IncN 和 IncFrep (表 3)。平均而言, IncI1 的检出率最高 (为 59.26%), 其次为 IncFIB (为 42.59%), 而 IncFrep 的检出率最低 (为 2.78%)。

表 3 不同质粒复制子的检出率（%）

Table 3 Detection rates of different plasmid replicons (%)

周次	IncB/O	IncFIC	IncFIA	IncFIB	IncI1	IncN	IncFrep
二	0	0	0	57.89	52.63	15.79	0
三	89.47	15.79	10.53	89.47	0	84.21	0
四	94.74	0	31.58	94.74	84.21	84.47	15.79
五	0	0	0	0	100	0	0
六	0	0	0	0	100	0	0
平均	32.41	2.78	7.42	42.59	59.26	33.33	2.78

跟上述耐药基因的检出率类似，在不同的饲养阶段，质粒复制子的检出率也存在时间点的差异性。IncB/O 只在第三周和第四周被检出（检出率分别为 89.47%和 94.74%）；IncFIC 只在第三周得到检出（检出率为 15.79%）；IncFIA 只在第三周和第四周被检出（检出率分别为 10.53%和 31.58%）；在第五周和第六周末检测到 IncFIB，但 IncFIB 在第四周有较高的检出率（为 94.74%）；IncI1 在第五周和第六周均有 100%的检出率，但在第二周末检测出；IncN 在第三周和第四周有较高的检出率（分别为 84.21%和 84.47%），但在第五周和第六周末检测到 IncN；只在第四周检测到了 IncFrep，其检出率为 15.79%。

在所有样品中，1 个样本中同时检测出 6 种质粒复制子，占比为 1%；在 6 个粪样中同时检测出 5 种质粒复制子，占比为 6%；在 12 个粪样中，同时检测出 4 种质粒复制子，占比为 12%；在 14 个粪样中，同时检测出 3 种质粒复制子，占比为 14%；在 13 个粪样中，检测出 2 种质粒复制子，占比为 13%；在 43 个粪样中，检测出 1 种质粒复制子，占比为 43%。

在不同的时间段中，不同质粒复制子的检出情况也存在差异（图 1 A）。第二周时，3 个样品中同时检测出了 3 种质粒复制子，5 个样品中检测出了 2 种质粒复制子，5 个样品中检测出了 1 种质粒复制子。第三周时，7 个样品中检测出了 2 种质粒复制子，7 个样品检测出了 3 种质粒复制子，5 个样品中检测出了 4 种质粒复制子。第四周时，1 个样品中检测出了 2 种质粒复制子，4 个样品中检测出了 3 种质粒复制子，7 个样品检测出了 4 种质粒复制子，6 个样品中检测出了 5 种质粒复制子，1 个样品中检测出了 6 种质粒复制子。第五周和第六周时，只有 1 个样品中检测出了 1 种质粒复制子。

质粒间的关联性方面，本研究发现 IncB/O 质粒与 IncN、IncFrep、IncI1、IncFIB、IncFIA 和 IncFIC 六种质粒均有密切关联性；IncFIA 质粒与 IncN、IncI1、IncFIB 和 IncFrep 四种质粒有密切关联性；IncI1 质粒与 IncFIB、IncFrep 和 IncN 三种质粒有密切关联性；IncFrep 质粒只与 IncN 有密切关联性；IncFIB 质粒与 IncI1、IncFrep 和 IncN 三种质粒有密切关联性；IncI1 质粒与 IncN 和 IncFrep 两种质粒有密切关联性(图 1 B)。

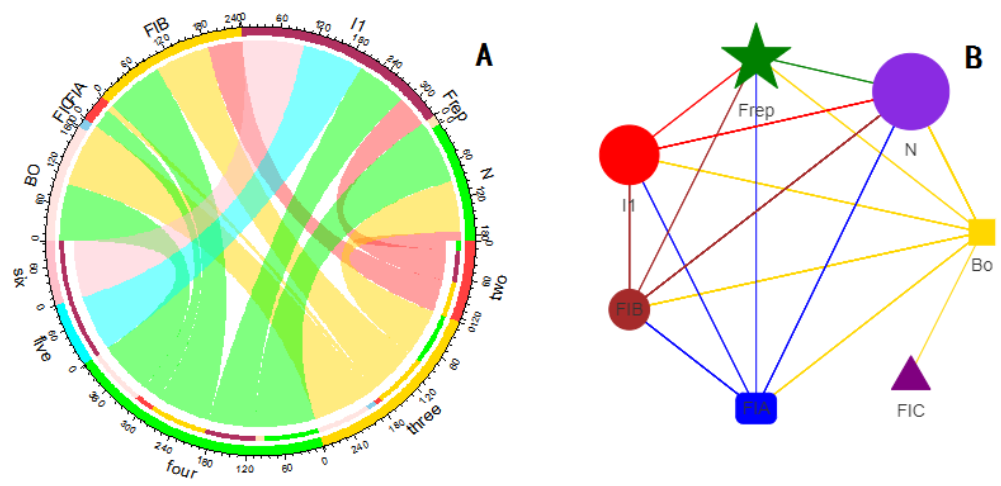


图 1 不同质粒的检出情况及关联性

Figure 1 Detection patterns and overall correlation of different plasmids



## 4 讨论

受人类和家畜抗生素使用影响,耐药性已成为威胁全球健康的大问题。抗生素不当使用导致了对耐药菌的选择,是驱动全球耐药基因流行的主要驱动力。宏基因组学或功能宏基因组学的研究发现不同的生态系统中均存在抗生素耐药基因,即土壤、水体、人和动物肠道甚至极端环境(如永冻土)等中均存在耐药基因。此外,研究还认为特定生态系统中存在的耐药基因可被致病菌摄取,对人和动物健康产生危害性。Chen等[6]对栖息于陆地和水体的低等脊椎动物进行了宏转录组分析,从中发现了与13类抗生素相关的194种耐药基因,其中包含了与临床分离株高度相似的耐药基因。Forsberg等[7]发现了多药耐药性土壤菌,且耐药菌基因盒的核苷酸序列与各种人源致病菌的基因有很高的相似性,从而证实了环境菌和临床致病菌间在近期发生了耐药基因的交换。Bich等[8]基于社区的40个志愿者家庭,测定了人类粪便、动物粪便、人类食物和环境(雨水、水井和灌溉水)样本的耐药性,并分析了测定结果与抗生素使用间的关联性,结果表明在越南农村社区的人和动物粪便中富含耐药基因,且动物和人粪便中的耐药组相似,但与水和食物中的耐药基因分离。以上研究均表明耐药基因几乎存在于所有的环境中,其中,人和动物肠道是耐药基因的重要贮存库,由此可见,对动物粪样中的耐药基因进行筛查可为耐药性的防控、相应政策的制定及临床用药等提供理论参考。

本研究利用PCR技术检测到的耐药基因有:四环素类耐药基因*tetA*和*tetB*;β-内酰胺类耐药基因*bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>*和*bla<sub>CTX-M1</sub>*;喹诺酮类耐药基因*qnrA*;氨基糖苷类耐药基因*aadA1*;磺胺类耐药基因*dfrA1*和*sul1*。尽管本研究只检测到了上述耐药基因,但对于其它耐药基因型而言,可通过增加相应的检测引物进行检测,相信随着检测引物类别的增加可从肠道菌群中扩增出更多的耐药基因型。在四环素类耐药基因方面,本研究中*tetA*的检出率明显高于*tetB*,这与以往的报道基本一致。王晓泉等[9]在46株沙门氏菌中分别检测出*tetA*、*tetB*和*tetG*三种耐药基因,其中*tetA*占49.5%,*tetB*占35.5%。李胜利等[10]对河南省大肠杆菌四环素耐药基因进行检测,检测到了*tetA*、*tetB*和*tetC*耐药基因,检出率分别是100%、12.50%和87.50%。可见,在四环素类耐药基因*tetA*和*tetB*中,*tetA*基因的流行

率要高于*tetB*。

对其它耐药基因来说,本研究的检出率也与中国报道基本一致。杨承霖等[11]对收集的444株食品动物源大肠杆菌进行检测,发现产ESBLs菌株携带的耐药基因以*bla<sub>TEM</sub>*和*bla<sub>CTX-M</sub>*为主,其中*bla<sub>CTX-M1</sub>*的检出率为63.3%,*bla<sub>TEM-52</sub>*的检出率为32.1%。钟嘉诚等[12]对广东多地病死禽的分离株进行检测,发现*bla<sub>CTX-M</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>*和*bla<sub>OXA</sub>*基因的检出率分别是43.14%、35.29%和8.82%。郭家媚[13]分析了水貂源致病性大肠杆菌的耐药表型与耐药基因型相关性,发现耐药基因*gyrA*、*gyrB*、*qnrA*和*qnrB*检出率范围为80%-100%。顾晓晓等[14]采用PCR技术检测了羊粪便源分离株的耐药基因,发现大肠杆菌分离株中*aadA1*和*aph(3')-I*耐药基因的检出率分别为98%和89%。杨瑞等[15]从河北省16个鸡场采集肛拭子样品,并检测了150株鸡源沙门菌的耐药基因,发现*catA1*、*sul1*、*bla<sub>OXA</sub>*等的检出率在38.67%-50.00%间。孙宇洁等[16]利用荧光定量PCR分析了浙江省某水产养殖环境中的耐药基因,发现磺胺类抗性基因*sul1*和*sul2*在所检测的抗性基因中占主导地位。

本研究发现不同耐药基因的检出率存在时间点的差异性。出现该现象的原因可能与以下几个方面有关:(1)本研究饲养的黄羽肉鸡开始于1周龄,在鸡的生长发育阶段其肠道菌群也可能处于逐步完善期间,即幼龄鸡的肠道菌群处于不断地动态变化过程中,故因肠道菌群多样性的变化可导致肠道耐药基因型的变化;(2)在小鸡饲养过程中,疫苗免疫会对鸡产生应激现象,而应激可能会导致肠道菌群结构的短期变化,进而导致耐药基因检出率的变化;(3)在实验操作过程中,粪样基因组DNA的提取、PCR扩增体系的变化等因素也可能导致耐药基因检出率的变化。对于导致时间点变异性的具体原因还有待进一步的研究。

整合子是广泛存在于细菌中的一种可移动基因元件,它可以捕获外来基因盒并使其在细菌体内得到表达。整合子在细菌耐药性的传播方面发挥着非常重要的作用。本研究从鸡粪样中成功检测到了整合酶基因*int1*和*int2*,且*int1*的检出率高于*int2*,这与国内外的研究报道基本一致。基于整合子在细菌耐药性转移上的特殊作用和环境中的普遍性,对肠道中的整合子进行检测显得非常必要。闫爽等[17]对东北地区狐源大肠杆菌的耐药性及其整合子-基因盒系统进行了研究,发现I类整合子基因的检出率为62.86%,且33.81%的

I 类整合子基因中携带基因盒。鲁勇等[18]对分离的肠杆菌科细菌进行了研究,发现 60.55% 的分离株携带 I 类整合酶基因。

抗生素的广泛和不当使用,以及耐药基因通过质粒、转座子和整合子的传播是造成多重耐药分离株的重要原因[19],且宽宿主质粒可在广宿主范围内发生水平基因转移。本研究从鸡粪样中检出了 7 种质粒复制子型,其中,占主要的是 IncFIB、IncII 和 IncN。同耐药基因一样,质粒的检出率也存在时间点的差异性,究其原因,可能也与上述因素有关。至于质粒间的关联性方面,本研究主要从肠道菌群的整体上来反映鸡肠道中质粒间的相关性,即鸡肠道中同时携带质粒复制子的类型,这可从整体上推导动物肠道中耐药基因的可转移性。

## 5 结论

本研究利用 PCR 技术从黄羽肉鸡的粪样中检测到了不同类型的耐药元件,如耐药基因 *tetA*、*tetB*、*bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>CTX-M1</sub>*、*qnrA*、*aadA1*、*dfrA1* 和 *sul1*,整合酶基因 *int1* 和 *int2*,质粒复制子 IncB/O、IncFIC、IncFIA、IncFIB、IncII、IncN 和 IncFrep。在饲养的不同阶段,耐药基因和质粒复制子的检出率存在时间点差异性,其中, *tetB* 随着饲养时间的延长具有逐步增高的趋势, *bla<sub>TEM</sub>* 和 *aadA1* 随饲养时间延长有下降的趋势,但质粒复制子未表现出明显的规律性。这些结果充分表明:PCR 技术可用于鸡粪样或肠道内容物中耐药元件的检测,为肠道菌群中耐药元件的流行性研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] 周芷锦,陈洁,沈红霞,等. 动物源细菌耐药性评估在兽用抗菌药使用减量化行动中的应用 [J]. 中国兽药杂志, 2022, 56 (7): 6-11.
- [2] Mart ínez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes [J]. Nat Rev Microbiol. 2015, 13 (2): 116-123.
- [3] Hu Y, Yang X, Li J, et al. The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes [J]. Appl Environ Microbiol. 2016, 82 (22): 6672-6681.
- [4] Swift BMC, Bennett M, Waller K, et al. Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife [J]. Sci Total Environ. 2019, 649: 12-20.
- [5] 陆东东,张伟. 多药耐药基因检测方法介绍 [J]. 陕西医学检验,2000, 15 (3): 8.
- [6] Chen YM, Holmes EC, Chen X, et al. Diverse and abundant resistome in terrestrial and aquatic vertebrates revealed by transcriptional analysis [J]. Scientific Reports, 2020, 10 (1): 18870.
- [7] Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, et al. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens [J]. Science, 2012, 337 (6098): 1107-1111.
- [8] Bich V, Le VT, Thai PD, et al. An exploration of the gut and environmental resistome in a community in northern Vietnam in relation to antibiotic use [J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2019, 8: 194.
- [9] 王晓泉,王彦红,吴双,等. 四环素耐药基因在鸡源沙门菌中的分布和传播 [J]. 中国家禽, 2007, 29 (9): 10-12.
- [10] 李胜利. 河南省鸭源大肠杆菌四环素类及磺胺类耐药基因的分子检测 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 11: 174-176.
- [11] 杨承霖,舒刚,赵小玲,等. 2010-2016 年四川省食品动物源大肠杆菌的耐药性研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48 (9): 8.
- [12] 钟嘉诚,仇桂玲,陈济钊,等. 广东地区禽源致病性大肠杆菌对 5 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素的耐药情况与 ESBLs 基因的携带情况 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, 16: 62-72.
- [13] 郭家媚,葛成,张文斌,等. 水貂源致病性大肠杆菌对喹诺酮类药物耐药表型与耐药基因型检测与分析 [J]. 野生动物学报, 2021, 42 (1): 166-170.
- [14] 顾晓晓,郭琴,陶乔孝慈,等. 羊源大肠杆菌对氨基糖苷类药物耐药表型及耐药基因的检测 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40 (8): 1566-1570.
- [15] 杨瑞,党儒尧,何云凤,等. 2019 年-2020 年河北地区鸡源沙门菌流行病学调查及耐药性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43 (9): 924-929.
- [16] 孙宇洁,孟令轩,朱琳,等. 水产养殖尾水中抗生素抗性基因的去除及磺胺类耐药细菌研究 [J]. 环境科学学报, 2022, 42 (5): 286-295.
- [17] 闫爽,冯涛,王东阳,等. 东北地区狐源大肠杆菌耐药性,整合酶及整合子基因的检测与相关分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44 (4): 439-444.
- [18] 鲁勇,汪一萍,应建飞,等. 临床分离肠杆菌科细菌 I 型整合子和 ISCR1 的检测 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31 (15): 1832-1834.
- [19] 苟秋凤,代富英,曹康,等. 全基因组测序后质粒的组装与鉴定研究进展 [J]. 成都医学院学报, 2022, 17 (4): 525-529.