

研究报告

山东省动物源性产志贺毒素大肠埃希菌血清型和耐药特征分析

王琴¹, 德吉玉珍², 杨茜³, 孙文魁⁴, 张元晴⁵, 侯配斌⁴, 熊衍文³, 胡彬⁴

(1. 甘肃省张掖市甘州区疾病预防控制中心, 甘肃 张掖 734000; 2. 西藏自治区疾病预防控制中心, 西藏 拉萨 850000; 3. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206; 4. 山东省疾病预防控制中心, 山东 济南 250014; 5. 山东省精神卫生中心, 山东 济南 250014)

摘要:目的 了解山东省动物源性产志贺毒素大肠埃希菌(STEC)的分子特征和耐药特征,为 STEC 感染风险评估及监测提供依据。方法 对山东省 2017—2018 年分离鉴定的 140 株牛和羊来源 STEC 菌株,采用微量肉汤稀释法测定其对 15 类 27 种抗生素的最小抑菌浓度,采用双纸片协同试验进行超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)检测;对所有菌株进行全基因组测序,并基于全基因组序列进行 O:H 血清型、志贺毒素亚型和耐药相关基因分析,构建最大似然法的 Core Gene SNP 系统进化树。结果 140 株 STEC 组成 45 种不同 O:H 血清型,其中 O157:H7 占 12.86% (18/140);共检出 2 种 *stx1* 亚型和 8 种 *stx2* 亚型,以 *stx1c+stx2b* 亚型为主,其次是 *stx2k* 新亚型。16 株菌(11.43%)对至少 1 种抗生素耐药,4 株(2.86%)为多重耐药。牛和羊来源的 STEC 对四环素耐药率最高(8.57%, 12/140),其次是复方新诺明(6.43%, 9/140),3 株为产 ESBLs 菌株;所有菌株对美罗培南和阿米卡星均敏感;共检出 10 类 25 种耐药相关基因,包括 β -内酰胺酶类耐药基因 *bla_{EC}*、*bla_{CTX}*、*bla_{TEM}* 和 *bla_{OXA}*,并首次从 STEC 中检出磷霉素耐药基因 *fosA7*。140 株 STEC 形成了 38 个簇,每个簇包含了相同的血清型,血清型为 O113:H4 型的菌株为优势簇。结论 山东省牛和羊携带的 STEC 菌株以非 O157 为主,具有高度多样性,存在 *fosA7* 新耐药基因型及携带多种耐药基因的多重耐药菌株,应加强牛羊粪便管理和病原菌监测。

关键词:产志贺毒素大肠埃希菌;耐药表型;耐药基因;超广谱 β -内酰胺酶;全基因组测序

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2025)03-0216-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.03.002

Characterization and drug resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* derived from animals in Shandong ProvinceWANG Qin¹, DEJI Yuzhen², YANG Xi³, SUN Wenkui⁴, ZHANG Yuanqing⁵, HOU Peibin⁴,
XIONG Yanwen³, HU Bin⁴

(1. Disease Prevention and Control Center of Ganzhou District, Zhangye City, Gansu Zhangye 734000, China; 2. Xizang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Xizang Lhasa 850000, China; 3. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 4. Shandong Provincial Center for Disease Prevention and Control, Shangdong Ji'nan, 250014, China; 5. Shandong Mental Health Center, Shangdong Ji'nan, 250014, China)

Abstract: Objective To understand the characteristics and antibiotic resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) derived from animals in Shandong Province, providing a basis for the risk assessment and surveillance of STEC infection. **Methods** A total of 140 STEC strains were isolated from cattle and sheep from 2017 to 2018 in Shandong Province. These strains were tested for the minimal inhibitory concentrations of 27 types of antibiotics in 15 categories using the microbroth dilution method. The detection of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) was

收稿日期:2024-12-18

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2022MH318);山东省医药卫生科技项目(202312051013)

作者简介:王琴 女 主管检验师 研究方向为病原微生物检验 E-mail:810054356@qq.com

德吉玉珍 女 主管检验师 研究方向为微生物检验 E-mail:dejiyuzhen@163.com

王琴和德吉玉珍为并列第一作者

通信作者:胡彬 女 主任技师 研究方向为食源性致病菌分子流行病学和耐药性 Email:wubz9670@126.com

conducted by using the double-disk synergy test. The O:H serotyping, Shiga toxin subtyping and antibiotic resistance gene were analysis based on whole genome sequences. The core gene SNP phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method. **Results** The 140 STEC strains constituted 45 O:H serotypes, with O157:H7 accounting for 12.86% (18/140). Two *stx1* subtypes and eight *stx2* subtypes were detected, and *stx1c+stx2b* was the most common subtype, followed by the novel *stx2k*. Sixteen strains (11.43%) were resistant to at least one antibiotic, and 4 strains (2.86%) were multi-drug resistant. The highest resistance rate to tetracycline was observed in the cattle- and sheep-derived STEC strains (8.57%, 12/140), followed by trimethoprim-sulfamethoxazole (6.43%, 9/140), with 3 strains were ESBLs-producing strains. All strains were sensitive to meropenem and amikacin. A total of 10 categories of 25 antibiotic resistance genes were detected, including the β -lactamase resistance genes *bla_{EC}*, *bla_{CTX}*, *bla_{TEM}* and *bla_{OXA}*, and fosfomycin resistance gene *fosA7* was identified for the first time in STEC. 140 STEC strains formed 38 clusters, each containing the same serotype, with the O113:H4 serotype strain being the dominant cluster. **Conclusion** STEC strains carried by cattle and sheep in Shandong Province are predominantly non-O157 serogroups and exhibit high diversity. The novel *fosA7*-resistant gene and multidrug-resistant isolates were identified. It is essential to strengthen the management of cattle and sheep feces and enhance monitoring of pathogenic bacteria.

Key words: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; resistant phenotype; resistant gene; extended spectrum beta-lactamases; whole genome sequencing

产志贺毒素大肠埃希菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)是一类重要的人兽共患病原菌,可引起人感染性腹泻、出血性肠炎(Hemorrhagic colitis, HC),甚至是病死率较高的溶血性尿毒综合征(Hemolytic uremic syndrome, HUS)等疾病^[1]。牛、羊等反刍动物是 STEC 的主要宿主,通过污染食品(肉类、蔬菜)和水源等引起人类感染^[2-3]。目前发现能引起人类疾病的 STEC 血清型超过 200 种,能够引起食源性疾病暴发的以 O157:H7 血清型最为常见^[4],但近年来报道了越来越多的非 O157 血清型 STEC 引起的食源性疾病暴发事件,严重威胁人类健康^[5]。志贺毒素(Shiga toxin, Stx)是 STEC 最重要的毒力因子,根据抗原不同,Stx 可分为 Stx1 和 Stx2 两种型别,Stx1 又可分为 Stx1a、Stx1c-Stx1e 3 种亚型,而 Stx2 可分为 Stx2a-Stx2o 十余种亚型。菌株携带的 Stx 型别/亚型与 STEC 流行情况、所致疾病的严重程度及宿主来源有关^[6]。Stx2k 亚型是 2020 年命名和报道的新亚型,仅见于我国人、动物和食品来源 STEC 菌株^[7]。

抗生素耐药性(Antimicrobial resistance, AMR)是全球面临的重要公共卫生挑战^[8]。大肠埃希菌耐药是临床呼吸道感染、泌尿道感染、新生儿脑膜炎、菌血症等肠道外感染疾病治疗面临的重要问题,常导致住院时间延长、医疗费用增加和死亡率上升,因此各国都加强了临床大肠埃希菌耐药监测^[9-10]。目前,关于具有重要公共卫生学意义的肠道致病性 STEC 菌株的耐药性数据却极少,且主要集中在欧美发达国家^[11-14]。我国虽有人、动物和食品等不同来源 STEC 菌株的耐药性报道,但尚缺乏系统性监测数据,特别是 STEC 感染患者临床治疗数据。牛、

羊作为 STEC 的宿主,是动物源性食品和环境中的抗生素耐药基因传播的重要来源及媒介^[15];抗生素在我国养殖行业广泛应用,了解山东省动物源性(特别是牛、羊来源)STEC 菌株对常见抗生素耐药情况,以及耐药基因流行特征对于评估其对人类健康的威胁开展针对性防控具有重要的公共卫生意义。本研究参考了美国、欧盟等常见药物敏感试验指标,选定 15 类 27 种临床相关且具有流行病学意义的抗生素,对山东省 140 株动物源 STEC 菌株进行菌型特征、耐药表型及耐药基因型初步分析,为评估 STEC 感染风险、指导抗生素使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株信息

2017—2018 年山东省肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 监测点采集的动物粪便 1 238 份,其中牛粪 486 份,羊粪 752 份。采用科马嘉 ECC 和科马嘉 STEC 两种选择性培养基进行菌株分离培养,使用 *stx1/stx2* 基因特异性引物对可疑菌落进行 PCR 检测(*stx1F* 5'-AAA TCG CCA TTC GTT GAC TAC TTC T-3'、*stx1R* 5'-TGC CAT TCT GGC AAC TCG CGA TGC A-3'、*stx2F* 5'-CAG TCG TCA CTC ACT GGT TTC ATC A-3'、*stx2R* 5'-GGA TAT TCT CCC CAC TCT GAC ACC-3')^[16]。最终 *stx* 阳性的细菌采用飞行时间质谱对菌株进行种属鉴定。

1.2 主要试剂和仪器

抗生素最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)测试板(上海星佰科技发展有限公司)、Mueller-Hinton 琼脂(美国 Oxoid 公司)、头孢他啶(30 μ g)、头孢他啶-克拉维甲酸(30 μ g/10 μ g)、头孢

噻吩 30 μg 、头孢噻吩-克拉维甲酸(30 μg /10 μg)药敏纸片(美国 BD 公司)、细菌 DNA 提取试剂盒(硕世生物科技有限公司)、NEBNext[®]Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina(New England Biolabs 公司,美国)试剂盒、恒温培养箱(德国 Binder 公司)、毛细管电泳仪(德国 Qiagen 公司)。

1.3 抗菌药物敏感性检测

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的抗菌药物敏感性试验执行标准 M100-S32,利用微量肉汤稀释法对 15 类、27 种抗生素进行药物敏感性检测,包括:氨苄西林(Ampicillin, AMP, 2-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氨苄西林/舒巴坦(Ampicillin-Sulbactam, AMS, 2/1-64/32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、四环素(Tetracycline, TET, 1-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氯霉素(Chloramphenicol, CHL, 2-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、头孢唑啉(Cefazolin, CFZ, 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、复方新诺明(Sulfamethoxazole, SXT, 0.25/4.75-8/152 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP, 0.03-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、头孢他啶(Ceftazidime, CAZ, 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、亚胺培南(Imipenem, IMI, 0.25-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、萘啶酸(Nalidixic acid, NAL, 4-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、头孢西丁(Cefoxitin, CFX, 2-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、头孢噻肟(Cefotaxime, CTX, 0.25-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、庆大霉素(Gentamicin, GEN, 1-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阿奇霉素(Azithromycin, AZM, 4-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、磺胺异噁唑(Sulfamethoxazole, SUL, 0.12/4-4/4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阿莫西林-克拉维酸(Amoxicillin and clavulanate potassium, AMC, 2/1-64/32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、多黏菌素(Polymyxin, CT, 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、多黏菌素 B(Polymyxin B, PB, 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、米诺环素(Minocycline, MIN, 1-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阿米卡星(Amikacin, AMI, 4-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氨曲南(Aztreonam, AZM, 1-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、头孢吡肟(Cefepime, FEP, 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、美罗培南(Mepirodipine, MEM, 0.125-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、左氧氟沙星(Levofloxacin, LEV, 0.25-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、多西环素(Doxycycline, DOX, 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、卡那霉素(Kanamycin, KAN, 8-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和链霉素(Streptomycin, STR, 4-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922。根据菌株的 MIC,参照 CLSI 2020 版的标准判断敏感(susceptible, S)、中介(Intermediate, I)或耐药(Resistance, R)^[17]。多重耐药(Multidrug resistance, MDR)定义为对 3 类或以上抗菌药物出现耐药。

1.4 超广谱 β -内酰胺酶确证实验

参照 CLSI 推荐的双纸片扩散实验(CLSI M100-2024):取头孢他啶(30 μg)、头孢他啶-克拉维甲酸(30 μg /10 μg)、头孢噻肟 30 μg 、头孢噻肟-克拉维甲酸(30 μg /10 μg)、两组药敏纸片,将其贴在涂布

有 0.5 麦氏浓度 0.5 mL 菌液的 Mueller-Hinton 琼脂平板上,培养 18 h 后,测量产生的抑菌圈直径结果,与 CLSI 标准给出的耐药判定标准进行比对。头孢他啶和头孢噻肟有任一药物在加入克拉维甲酸后,抑菌圈直径与不加克拉维甲酸的抑菌圈直径相比 ≥ 5 mm 时,判定为产 ESBLs 菌株。大肠埃希菌 ATCC 25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 分别为阴性和阳性质控菌株。

1.5 基因组提取、测序及组装

取单菌落接种于脑心浸液琼脂平板,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养,根据说明书,使用细菌 DNA 核酸提取试剂盒(SDK60108,硕世生物)提取细菌基因组。使用 NEBNext[®]Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina 试剂盒,构建 350 bp 的双端测序文库,使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行测序,获得原始下机数据,通过删除接头及碱基质量较低的 reads 对测得的原始数据进行质控后得到 clean data,使用 FastQC(v0.12.1)对 clean data 进行质检,使用 SPAdes(v4.0.0)进行初步组装。细菌基因组测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.6 基因组数据分析

使用 Abricate(v0.8.10)构建本地大肠埃希菌血清分型、志贺毒素分型数据库。将测序菌株基因组拼接序列与自建库进行比对,使用默认参数(identity $\geq 70\%$ 、coverage $\geq 70\%$),得到菌株的血清型、志贺毒素亚型等分子特征信息^[18]。通过比对耐药基因数据库(Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)(v3.2.4)预测耐药基因。

1.7 基于 cgSNP 构建 STEC 系统进化树

构建基于 140 株 STEC 菌株最大似然法的 Core Gene SNP(cgSNP)系统进化树。首先通过软件 Snippy(v4.3)(<https://github.com/tseemann/snippy>)生成包含不变位点的核心基因组,经 Gubbins(v2.3.4)去重组后,提取 SNP 位点,使用 FastTree(v2.1)构建系统进化树。在线工具 ChiPlot(<https://www.chiplot.online/#Phylogenetic-Tree>)用于系统进化树的可视化及注释。

2 结果

经分离培养鉴定,共得到动物源 STEC 菌株 140 株,包括 2017 年牛来源菌株 21 株,羊来源菌株 84 株;2018 年牛来源菌株 2 株,羊来源菌株 33 株。牛来源菌株分离率为 4.73%(23/486),羊来源菌株分离率为 15.56%(117/752)。

2.1 菌株 O:H 血清型及志贺毒素亚型

基于全基因组序列分析,本研究中 140 株

STEC 菌株可分为 38 种 O 血清群、18 种 H 型, 组成 45 种不同 O:H 血清型, 其中 O113:H4 占比最高, 为 21.43% (30/140), 其次 O157:H7 为 12.86% (18/

140)、O93:H28 为 8.57%(12/140)、O155:H21 为 6.43%(9/140),其余血清型分别含 1~5 株菌。本研究中数量>3 株的 STEC 血清型分布见图 1(A)。

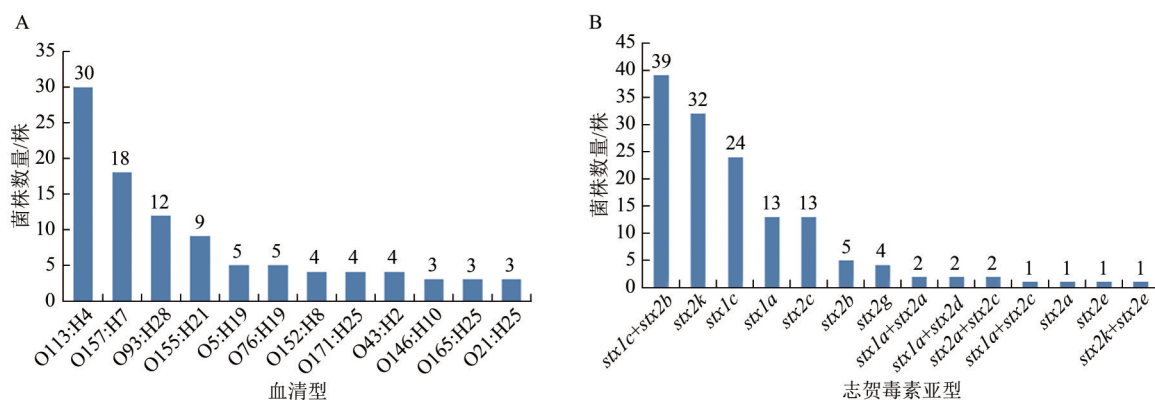


图1 山东省140株动物源STEC菌株血清型及志贺毒素亚型

Figure 1 Serotypes and Shiga toxin subtypes of 140 animal-derived STEC strains in Shandong

140 株 STEC 菌株中存在 2 种 *stx1* 亚型和 8 种 *stx2* 亚型, 形成 14 种不同的 *stx1* 和/或 *stx2* 亚型组合。最主要的 *stx* 亚型(组合)是 *stx1c*+*stx2b*(27.86%, 39/140)、*stx2k* (22.86%, 32/140), 其次是 *stx1c* (17.14%, 24/140) 和 *stx1a*、*stx2c* (9.29%, 13/140)、*stx2b* (3.57%, 5/140)、*stx2g* (2.86%, 4/140), *stx1a*+*stx2a* (1.43%, 2/140)、*stx1a*+*stx2d* (1.43%, 2/140) 与 *stx2a*+*stx2c* 分别包含 2 株菌(1.43%), 而 *stx1a*+*stx2c*、*stx2a*、*stx2c* 与 *stx2k*+*stx2e* 只包含 1 株菌(0.71%); 18 株 O157:H7 菌株包含 13 株 *stx2c*, 5 株 *stx1a*。本研究检出的 *stx* 亚型组合分布如图 1(B)所示。

2.2 抗生素耐药表型

140 株 STEC 对 27 种抗生素的药敏结果显示: 16 株菌株 (11.43%) 对至少 1 种抗生素耐药, 对四环素耐药率最高为 8.57% (12/140), 其次是复方新诺明 6.43% (9/140), 头孢唑啉、氨苄西林、氨曲南、阿奇霉素耐药率都为 5.71% (8/140), 氯霉素 5.00% (7/140), 庆大霉素、亚胺培南、萘啶酸、阿莫西林-克拉维酸、链霉素均为 2.86% (4/140), 头孢他啶、磺胺异噁唑、多黏菌素 E、多黏菌素 B、米诺环素、头孢吡肟、卡那霉素耐药率均为 1.43% (2/140), 所有菌株对美罗培南和阿米卡星均敏感 (图 2)。

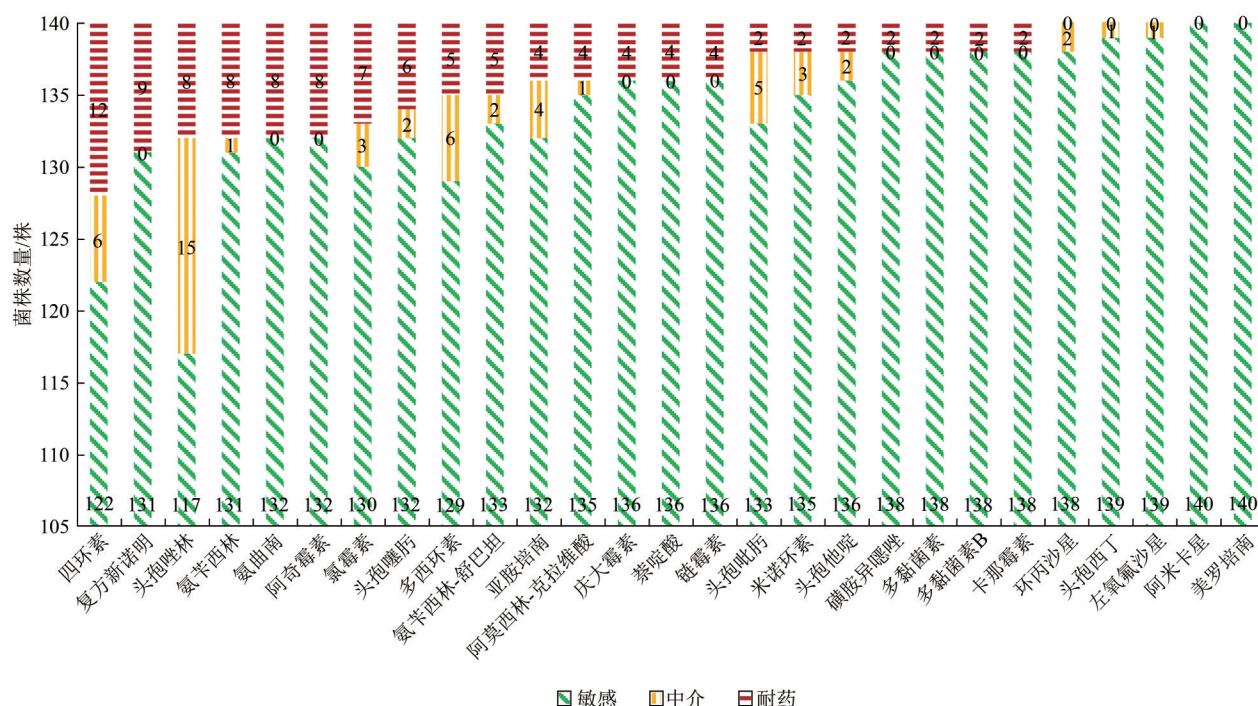


图2 140株STEC的药物敏感性分布

Figure 2 Drug sensitivity distribution of 140 STEC isolates

2.3 耐药基因分析

本研究剔除大肠埃希菌固有的多种外排泵相关家族基因,共鉴定出与 10 类抗生素相关的 25 种耐药基因。包括氯霉素类(*floR*,*cmlA5*)、甲氧苄啶类(*dfrA14*,*dfrA27*)、喹诺酮类(*qnrB17*,*qnrS1*)、磺胺类(*sul1*,*sul2*)、四环素类(*tetA*,*tetB*)、磷霉素类(*fosA7*)、β-内酰胺酶类(*bla_{EC}*,*bla_{CTX-M-65}*,*bla_{OXA-10}*,*bla_{CTX-M-55}*,*bla_{TEM-181}*)、利福平类(*arr-2+arr-3*)、氨基糖苷类[*ant(3'')-IIa+aph(3')-Ia*,*aph(3'')-Ib+aph(6)-Id+aac(3)-IId+aac(6')-Ib-cr*]以及大环内酯类(*mph(A)*),各耐药基因分布见表 1。

2.4 多重耐药菌株

140 株 STEC 中,有 4 株菌(其中 3 株为产 ESBLs 菌株)分别显示为 4 种不同耐药谱的多重耐药性,

表 1 140 株 STEC 菌株耐药相关基因

Table 1 Antibiotic resistance genes of 140 STEC strains	
抗生素类(菌株数)	耐药相关基因
氯霉素类(5)	<i>cmlA5</i> , <i>floR</i>
甲氧苄胺嘧啶类(5)	<i>dfrA14</i> , <i>dfrA27</i>
喹诺酮类(5)	<i>qnrB17</i> , <i>qnrS1</i>
磺酰胺类(1)	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>
四环素类(5)	<i>tetA</i> , <i>tetB</i>
磷霉素类(2)	<i>fosA7</i>
	<i>bla_{CTX-M-65}</i> + <i>bla_{EC-18}</i> + <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{TEM-181}</i> +
β-内酰胺酶类(5)	<i>bla_{CTX-M-55}</i> + <i>bla_{EC-8}</i> , <i>bla_{CTX-M-55}</i> + <i>bla_{EC-15}</i> + <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{TEM-181}</i> , <i>bla_{CTX-M-55}</i>
利福平类(4)	<i>arr-3+arr-2</i>
氨基糖苷类(5)	<i>ant(3'')-IIa</i> , <i>aph(3'')-Ib+aph(6)-Id+aac(3)-IId+aac(6')-Ib-cr6</i> , <i>ant(3'')-IIa+aph(3')-Ia</i>
大环内酯类(1)	<i>mph(A)</i>

MDR 菌株对 5~15 种抗生素表现为耐药性,携带 6~15 种耐药基因(表 2)。

表 2 山东省 4 株 STEC 菌株多重耐药谱与耐药基因

Table 2 Multi-drug resistance spectrum and drug resistance gene of four STEC strains in Shandong Province	
4 种 STEC 多重耐药谱(菌株数量)	耐药基因
AMP-AMS-CHL-KAN-TET(1 株)	<i>aph(3'')-Ia+bla_{TEM-181}</i> + <i>dfrA14+floR+qnrS1+tetA</i>
AMP-AMS-AZM-CFZ-CHL-CTX-ESBL-STR-TET(1 株)	<i>ant(3'')-IIa+arr-2+bla_{CTX-M-65}</i> + <i>bla_{EC-18}</i> + <i>bla_{OXA-10}</i> + <i>cmlA5+dfrA14+floR+qnrS1</i>
AMP-AMS-AZM-CAZ-CFZ-CHL-CIP-CTX-ESBL-FEP-GEN-KAN-STR-SUL-SXT-TET(1 株)	<i>AAC(6')-Ib-cr6+APH(3'')-Ib+APH(6)-Id+aac(3)-IId+arr-3+bla_{TEM-181}</i> +
AMP-AMS-AZM-CFZ-CHL-CIP-CTX-DOX-ESBL-LEV-KAN-NAL-STR-SXT-TET(1 株)	<i>bla_{CTX-M-55}</i> + <i>bla_{EC-8}</i> + <i>dfrA27+floR+qnrB17+sul1+sul2+tetA</i>
	<i>ant(3'')-IIa+aph(3')-Ia+arr-2+bla_{CTX-M-55}</i> + <i>bla_{EC-15}</i> + <i>bla_{OXA-10}</i> + <i>cmlA5+dfrA14+qnrS1+tetA</i>

4 株多重耐药菌株表型和基因型的相关性见表 2。结果显示,4 株多重耐药菌均携带 β-内酰胺酶类耐药基因,分别为 *bla_{CTX-M-65}*+*bla_{EC-18}*+*bla_{OXA-10}*,*bla_{TEM-181}*+*bla_{CTX-M-55}*+*bla_{EC-8}*,*bla_{CTX-M-55}*+*bla_{EC-15}*+*bla_{OXA-10}*,*bla_{TEM-181}*,这 4 株菌均对氨苄西林和氨苄西林/舒巴坦耐药;4 株多重耐药菌中有 3 株携带四环素类耐药基因 *tetA*,4 株均表现为四环素耐药,且有一株同时对多西环素耐药;4 株多重耐药菌均携带氯霉素类耐药基因,其中 2 株携带 *floR*,一株携带 *floR+cmlA5*,一株携带 *cmlA5*,且均表现为氯霉素耐药;4 株多重耐药菌中 3 株携带喹诺酮类耐药基因 *qnrS1*,其中一株表现为环丙沙星耐药,1 株携带 *qnrB17*,表现为萘啶酸、环丙沙星、左氧氟沙星同时耐药;1 株携带磺酰胺类耐药基因 *sul1+sul2* 的菌株表现为磺胺异噁唑耐药;3 株菌携带氨基糖苷类耐药基因,分别为 *ant(3'')-IIa*,*aph(3'')-Ib+aph(6)-Id+aac(3)-IId+AAC(6')-Ib-cr6*,*ant(3'')-IIa+aph(3')-Ia*,这 3 株菌均表现为链霉素耐药,其中有 1 株同时对庆大霉素耐药;3 株菌携带甲氧苄胺嘧啶类耐药基因,3 株为 *dfrA14*,1 株为 *dfrA27*。

2.5 基于 cgSNP 的 STEC 系统进化树

基于 cgSNP 构建了 140 株动物源 STEC 系统发育树,菌株总体呈现分散分布,相同血清型菌株具有聚类趋势,140 株动物来源的 STEC 形成了 38 个

簇,每个簇包含了相同的血清型,血清型为 O113:H4 型的菌株为优势簇。具体信息见图 3。

3 讨论

反刍动物,尤其是牛和羊,是 STEC 的重要天然宿主。这些经济动物与人类的动物源性食物息息相关,携带 STEC 的动物可能在屠宰过程中造成肉类污染,其排放的粪便也可能污染养殖环境中的水,从而导致人类出现 STEC 的散发感染甚至暴发疫情,是人类健康的潜在威胁^[2]。本研究中牛源 STEC 菌株分离率为 4.73%,高于 2015 年在山东省微山地区开展的牛源 STEC 调查^[19],羊源 STEC 菌株分离率为 15.56%,高于我国新疆地区 2018—2019 年羊肛拭子中 STEC 10.4% 的检出率^[20],表明此地反刍动物牛、羊中 STEC 呈较高流行。

本研究中的 140 株动物源 STEC 菌株涵盖 45 种 O:H 血清型,O113:H4 血清型分离率最高,其次是 O157:H7 血清型。O157:H7 普遍被认为是毒性最强、危害最为严重的 STEC 菌株^[4]。本研究数据表明,O157:H7 动物带菌一直存在,但其他血清型 STEC 尚未纳入我国系统性主动监测范围,非 O157:H7 血清型及新致病型菌株在中国的流行情况可能一直被低估。系统进化分析显示,本研究中血清型为 O113:H4 的菌株为优势簇,菌株均分离自山东兰

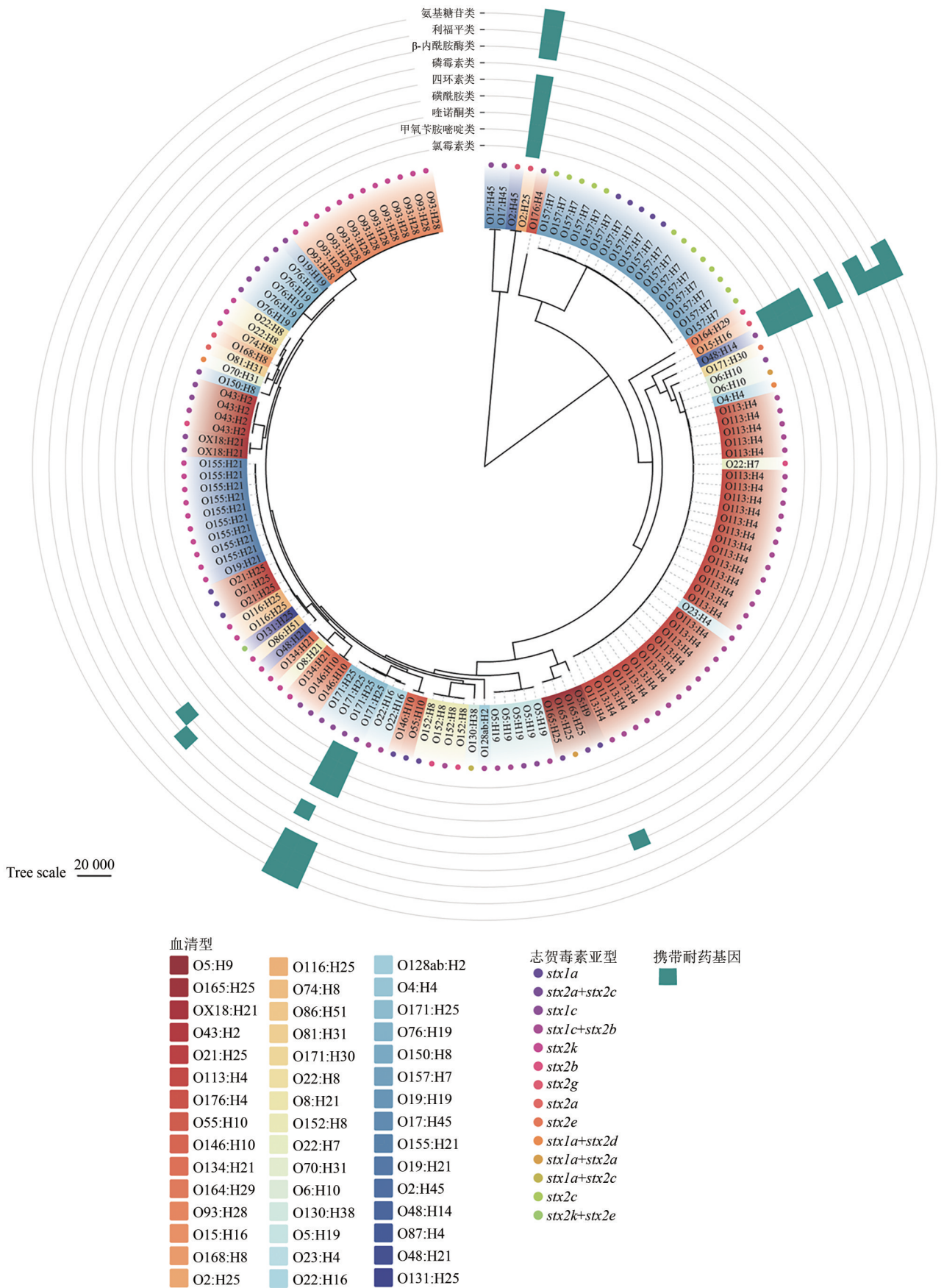


图3 山东省140株牛、羊来源菌株cgSNP系统进化分析

Figure 3 Phylogenetic analysis of cgSNP of 140 strains derived-from cattle and sheep in Shandong Province

陵县同一乡镇,且 *stx* 亚型(组合)均为 *stx1c+stx2b*, 是近年来越来越引起关注的血清型,有研究表明, 占此乡镇 STEC 分离株的 80.56%。O113:H4 血清型 O113 血清群的分离株与严重疾病有关^[21],但其毒力

潜力和致病机理尚不清楚,今后应重点加强对此血清菌株的研究。

本研究基于基因组测序数据系统分析了动物源 STEC 菌株的 *stx* 亚型,占比最高的亚型为 *stx1c+stx2b*,这一发现与既往文献报道的羊源菌株以携带 *stx1c* 亚型为主的特性不同^[22]。值得注意的是本研究中 22.86% 的菌株携带 *stx2k* 亚型。*stx2k* 是 2020 年发现并命名的新志贺毒素亚型,目前是中国特有的型别,在腹泻患者粪便、动物和食品来源中均有分离,研究发现 *stx2k* 亚型转化原噬菌体在插入位点、基因含量和结构方面都区别于以往发现的志贺毒素亚型^[7],其致病机制尚不清楚,因此,在更大范围系统地开展 *stx2k*-STEC 分子流行病学调查,掌握新型菌株的分子特征,阐明影响菌株毒力和致病性的关键因素,探讨 *stx2k* 新亚型菌株可能出现的机制、在不同宿主中的传播途径及其感染人群的风险,对预防 *stx2k* 新亚型引起大规模人群感染,起到相当重要的作用。

STEC 具有经某些抗生素处理后志贺毒素产量增高从而使感染者患 HUS 风险增高的特征,因此在人感染 STEC 后的治疗方案中,抗生素的使用一直存在争议^[24]。近年来的研究发现,有些类型的抗生素,如阿奇霉素、四环素、氯霉素、磷霉素、庆大霉素、多西环素等,不仅不会引起细菌 SOS 反应反而能抑制细菌 SOS 反应,从而降低志贺毒素的产生,进而防止 HUS 的发生^[23]。特别是在出现腹泻症状后的 2~3 天内给予恰当的抗生素治疗,可以减少 HUS 的发生^[24]。阿奇霉素因曾在 STEC O104:H4 暴发疫情使用,被证明能有效预防及改善 HUS 的预后,此后常被作为 STEC 感染的临床首选抗生素^[25];磷霉素在日本的 STEC 感染治疗实践中被证明是最有效的抗生素^[26];此外,氟喹诺酮类抗生素也可作为 STEC 感染的治疗选择^[27]。

本研究耐药表型实验显示:11.43%(16/140)对至少一种抗生素表现出耐药性,2.86%(4/140)表现为多重耐药;对四环素耐药率最高为 8.57%(12/140),这跟 PAN 等研究结果基本一致^[15]。牛和羊来源的 STEC 分离株中都鉴定出一个新的磷霉素耐药基因 *fosA7*,表明该基因可能具有在不同遗传菌株之间转移的潜力,今后应重点加强对磷霉素类药物的监测。3 株产 ESBLs 分离株,都表现出 MDR(表 2),发现一个 AMR 基因 *bla_{CTX-M-65}+bla_{OXA-10}* 共存,一个 AMR 基因 *bla_{CTX-M-55}+bla_{OXA-10}* 共存,一个 AMR 基因 *bla_{TEM-181}+bla_{CTX-M-55}* 基因共存。中国 β 内酰胺类耐药基因主要为 *bla_{CTX}* 型、*bla_{TEM}* 型、*bla_{OXA}* 型、*bla_{SHV}* 型^[28],同时 *bla_{CTX}* 也是许多国家的主要类型,如日本的 CTX-M-

14 和南美的 CTX-M-2^[29-30]。本研究显示,*bla_{CTX}* 型、*bla_{TEM}* 型、*bla_{OXA}* 型是山东省动物源菌株中产 ESBLs 基因的主要遗传类型,这一结果与中国其他地区的结果相近,如宁夏地区羔羊源大肠埃希菌产 ESBLs 耐药基因主要是 CTX、TEM 及 OXA 与本研究结果基本相符^[31],也跟四川成都分离菌株的研究结果较为接近^[16]。本研究虽检出 2 株耐多黏菌素的表型的菌株,但未检出携带相关多黏菌素 MCR 的基因,这可能与研究的菌株数量少有关。本研究所有 STEC 菌株均对美罗培南和阿米卡星敏感,而部分菌株对四环素和复方新诺明耐药,提示美罗培南可作为临床 STEC 感染的用药。

综上,山东省动物源产志贺毒素大肠埃希菌以非 O157:H7 血清型为主,存在多种志贺毒素亚型并检出 *stx2k* 新亚型菌株,存在 *fosA7* 新耐药基因型及携带多种耐药基因的多重耐药菌株,但均对美罗培南和阿米卡星药物敏感,可作为临床 STEC 感染的用药参考。因此,对这些菌株进行进一步的病原特征和耐药监测,对于 STEC 感染的抗生素治疗具有重要指导意义。

参考文献

- [1] JOSEPH A, COINTE A, MARIANI KURKDJIAN P, et al. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: a narrative review[J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(2): 67.
- [2] 胡夏佩,王惠,孔学维,等.反刍动物产志贺毒素大肠杆菌的分离鉴定和致病潜力分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(8): 2495-2505.
HU X P, WANG H, KONG X W, et al. Isolation, identification, and pathogenic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from ruminants [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(8): 2495-2505.
- [3] RAY R, SINGH P. Prevalence and implications of Shiga toxin-producing *E. coli* in farm and wild ruminants [J]. *Pathogens*, 2022, 11(11): 1332.
- [4] COOMBES B K, WICKHAM M E, MASCARENHAS M, et al. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains [J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2008, 74(7): 2153-2160.
- [5] JOHNSON K E, THORPE C M, et al. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43(12): 1587-1595.
- [6] XUAN W, DANIEL Y, LINDA C, et al. A comprehensive review on Shiga toxin subtypes and their niche-related distribution characteristics in Shiga-toxin-producing *E. coli* and other bacterial hosts [J]. *Microorganisms*, 2024, 12: 687.
- [7] YANG X, BAI X, ZHANG J, et al. *Escherichia coli* strains producing a novel Shiga toxin 2 subtype circulate in China [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2020, 310(1):

- 151377.
- [8] ANWARUL M A A, MAJUMDER A, RAHMAN S, et al. Antimicrobial stewardship: fighting antimicrobial resistance and protecting global public health[J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 4713-4738.
- [9] TIAN L, ZHANG Z, SUN Z. Antimicrobial resistance trends in bloodstream infections at a large teaching hospital in China: a 20-year surveillance study (1998—2017) [J]. Antimicrobial Resistance Infection Control, 2019, 8: 86.
- [10] GANDRA S, ALVAREZ-URIA G, TURNER P, et al. Antimicrobial resistance surveillance in low- and middle-income countries: progress and challenges in eight South Asian and Southeast Asian countries[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2020, 33(3): e00048-19.
- [11] AMÉZQUITA-LÓPEZ B A, SOTO-BELTRÁN M, LEE B G, et al. Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. Journal Of Microbiology Immunology And Infection, 2018, 51: 425-434.
- [12] DAY M, DOUMITH M, JENKINS C, et al. Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 isolated from human cases of diarrhoeal disease in England, 2015[J]. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72: 145-152.
- [13] MIR R A, KUDVA I T. Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview of prevalence and intervention strategies[J]. Zoonoses Public Health, 2019, 66(1): 1-13.
- [14] GENTLE A, DAY M R, HOPKINS K L, et al. Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serotype O157: H7 in England, 2014—2016 [J]. Journal Of Medical Microbiology, 2020, 69(3): 379-386.
- [15] PAN Y, HU B, BAI X, et al. Antimicrobial resistance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and domestic animals[J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(1): 74.
- [16] BAI X, ZHAO A, LAN R, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in yaks (*Bos grunniens*) from the Qinghai-Tibetan Plateau, China[J]. PLoS One. 2013, 11; 8(6): e65537.
- [17] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. 30th ed. Pennsylvania, 2020: 32-41.
- [18] YANG X, LIU Q, BAI X, et al. High prevalence and persistence of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxin subtype 2k in goat herds[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4): e0157122.
- [19] 邵纯纯, 胡彬, 毕振旺, 等. 山东省微山县动物粪便中产志贺毒素大肠埃希氏菌血清型鉴定及耐药性分析[J]. 中华预防医学杂志, 2017, 51(1): 70-75.
- SHAO C C, HU B, BI Z W, et al. Serotype identification and antibiotic susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the Weishan area in Shandong Province, China[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2017, 51(1): 70-75.
- [20] 佟盼盼, 张萌萌, 陈文霞, 等. 新疆牛、羊和骆驼源产志贺毒素大肠埃希氏菌的系统进化分群、血清群与毒力基因及耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(12): 3660-3668.
- TONG P P, ZHANG M M, CHEN W X, et al. Phylogenetic clustering, serotype, virulence genes and drug resistance analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle, sheep and camel in Xinjiang[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(12): 3660-3668.
- [21] PETER F, SABINE D, DAVID W, et al. Characterization and virulence potential of serogroup O113 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef and cattle in the United States[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(3): 383-391.
- [22] TaGHADOSI R, SHAKIBAIE MR, ALIZADE H, HOSSEINI-NAVE H, ASKARI A, GHANBARPOUR R. Serogroups, subtypes and virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from human, calves and goats in Kerman, Iran. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2018, 11: 60-67.
- [23] BERGER M, AIJAZ I, BERGER P, et al. Transcriptional and translational inhibitors block SOS response and Shiga toxin expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 18777.
- [24] KAKOULLIS L, PAPACHRISTODOULOU E, CHRA P, et al. Shiga toxin-induced haemolytic uraemic syndrome and the role of antibiotics: a global overview[J]. The Journal of Infection, 2019, 79: 75-94.
- [25] NITSCHKE M, SAYK F, HARTEL C, et al. Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104: H4 [J]. The Journal Of The American Medical Association, 2012, 307: 1046-1052.
- [26] TAJIRI H, NISHI J, USHIJIMA K, et al. A role for fosfomycin treatment in children for prevention of haemolytic-uraemic syndrome accompanying Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection [J]. International Journal Of Antimicrobial Agents, 2015, 46: 586-589.
- [27] SHIOMI M, TOGAWA M, FUJITA K, et al. Effect of early oral fluoroquinolones in hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7[J]. Pediatrics International, 1999, 41: 228-232.
- [28] XIONG Y, WANG P, LAN R, et al. A novel *Escherichia coli* O157: H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China[J]. PLoS One, 2012, 7: e36144.
- [29] HAYASHI W, OHSAKI Y, TANIGUCHI Y, et al. High prevalence of bla_{CTX-M-14} among genetically diverse *Escherichia coli* recovered from retail raw chicken meat portions in Japan [J]. International Journal Of Food Microbiology, 2018, 284: 98-104.
- [30] BEVAN E R, JONES A M, HAWKEY P M, et al. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype [J]. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(8): 2145-2155.
- [31] 高海慧, 汪洁, 扈宁霞, 等. 宁夏地区犊牛腹泻型产ESBLs大肠埃希氏菌的筛选及相关基因型分析[J]. 动物医学进展, 2022, 43(7): 19-23.
- GAO H H, WANG J, HU N X, et al. Screening and genotypic analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* in diarrheal calves in Ningxia region[J]. Animal Medical Progress, 2022, 43(7): 19-23.