

研究报告

广州南沙湿地公园候鸟源肠杆菌科耐药性及产超广谱β-内酰胺酶基因监测调查

林贤广¹, 李铁钢^{*2}, 夏云^{*1}, 刘艳慧³

1 广东药科大学公共卫生学院, 广东 广州 510310

2 广州市胸科医院, 广东 广州 510095

3 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510400

林贤广, 李铁钢, 夏云, 刘艳慧. 广州南沙湿地公园候鸟源肠杆菌科耐药性及产超广谱β-内酰胺酶基因监测调查[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 679-689

Lin Xianguang, Li Tiegang, Xia Yun, Liu Yanhui. Surveillance of drug resistance and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Enterobacteriaceae* from migratory birds in Nansha Wetland Park, Guangzhou[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 679-689

摘要:【背景】耐药基因可通过水平转移在环境、动物和人体间发生转移, 而远距离传播则主要通过候鸟的迁徙。耐药基因可通过水平转移和候鸟迁徙跨地区传播至禽畜和人类, 引起公共卫生问题。【目的】分离广州南沙湿地公园候鸟粪便中肠杆菌科细菌, 并鉴定菌种类别, 研究其对常见抗生素的耐药性及携带的主要超广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)耐药基因, 评估广州南沙湿地公园候鸟储存、携带耐药菌和耐药基因的风险。【方法】2019年1月-12月, 采集广州南沙湿地公园候鸟粪便样本393份, 并进行细菌分离、培养和鉴定。使用药敏检测板对细菌进行耐药性检测。PCR扩增待测细菌的 bla_{CTX-M} 、 bla_{TEM} 和 bla_{SHV} 耐药基因, 测序并进行BLAST比对。【结果】检出肠杆菌科细菌59株(检出率为15.01%), 主要优势菌为成团泛菌(36株, 占肠杆菌科细菌61.02%)。肠杆菌科细菌的耐药率达89.83%, 对头孢唑啉、磺胺异噁唑和氨苄西林耐药率分别为81.36%、52.54%和44.07%, 多重耐药率达55.93%。另外检出7株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌。测序结果显示, 所有粪便样本中检出23株细菌携带 bla_{TEM-1} 耐药基因(5.85%)。【结论】广州南沙湿地公园候鸟粪便中肠杆菌科细菌种类复杂, 多重耐药率较高, 而且有储存耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的风险, 具有重要的公共卫生意义。

关键词: 候鸟; 肠杆菌科; 耐药性; 耐药基因; TEM-1

基金项目: 广州市科技计划项目(201804010093)

Supported by: Guangzhou Science and Technology Planning Project (201804010093)

*Corresponding authors: E-mail: LI Tiegang: tiegang1977@126.com; XIA Yun: xy@gdpu.edu.cn

Received: 2021-05-19; Accepted: 2021-07-31; Published online: 2021-10-21

Surveillance of drug resistance and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Enterobacteriaceae* from migratory birds in Nansha Wetland Park, Guangzhou

LIN Xianguang¹, LI Tiegang^{*2}, XIA Yun^{*1}, LIU Yanhui³

1 School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, Guangdong, China

2 Guangzhou Municipal Hospital of Chest Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong, China

3 Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510400, Guangdong, China

Abstract: [Background] Resistance genes can be transferred among environment, animal, and human, and transferred for a long distance by migratory birds, thus posing a great threat to public health. **[Objective]** We isolated and identified the main *Enterobacteriaceae* bacteria from the feces of migratory birds in Nansha Wetland Park, Guangzhou, and explored the resistance to common antibiotics and the main resistance extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes. On this basis, we assessed the risk of migratory birds in Guangzhou carrying and transferring resistance bacteria and genes. **[Methods]** From January to December 2019, 393 fecal samples were collected, and the bacteria were isolated, cultured, and identified. Through drug susceptibility test, the resistance of the bacteria was detected. PCR was performed to amplify the resistance genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV}, followed by sequencing and BLAST alignment. **[Results]** A total of 59 *Enterobacteriaceae* strains (isolation rate 15.01%) were detected from the 393 fecal samples, among which *Pantoea agglomerans* (36 strains, 61.02%) was most abundant. Of the 59 strains, 89.83% were resistant to the tested antibiotics, and the resistance rates to cefazolin (81.36%), sulfisoxazole (52.54%), and ampicillin (44.07%) were particularly high. Moreover, 55.93% of the strains were resistant to multiple antibiotics. In addition, 7 strains were resistant to carbapenems. The sequencing result showed that 23 strains carried the resistance gene *bla*_{TEM-1} (5.85%). **[Conclusion]** *Enterobacteriaceae* bacteria in the feces of migratory birds in Nansha Wetland Park, Guangzhou are intricacy, and the rates of drug resistance and multi-drug resistance are high. The result suggests the risk of the migratory birds carrying carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteria, which has important public health significance.

Keywords: migratory birds; *Enterobacteriaceae*; drug resistance; drug resistance genes; TEM-1

随着人类对抗生素的滥用, 细菌耐药性成为日益严重且备受关注的问题, 尤其是产超广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)细菌。大多数产 ESBL 的细菌对其他抗生素也表现出耐药性^[1]。研究表明, 产 ESBL 肠杆菌科细菌在全球范围内广泛流行^[2-3], 在亚太地区的流行率非常高^[4]。ESBL 可分为 CTX-M、TEM、SHV 等分型, 在中国主要流行的是 TEM-1 型^[5]。

细菌群落之间的耐药基因转移主要通过基因水平转移(horizontal gene transfer, HGT), 而基因广泛传播的重要贡献者则是与人类密切接触的候鸟^[6], 这种传播方式可能导致耐药基因的全球化。候鸟可在受污染的水生环境(如医疗、畜牧业、工业废水、生活污水等)附近活动时获得耐药菌和耐药基因, 并通过迁徙传播到不同地区^[6]。因此候鸟可以作为耐药菌/耐药基因的储存库和传播媒介, 同时也是监测野外

抗生素耐药性分布的良好样本^[7]。监测候鸟携带的耐药菌及 ESBL 耐药基因, 对评估候鸟存储/传播耐药菌和 ESBL 基因的风险具有重要意义。南沙湿地公园是广州市最大的湿地公园, 处于候鸟迁徙路线上, 每年前来越冬的候鸟达 10 万多只。本研究对 2019 年采集的广州南沙湿地公园内候鸟粪便中肠杆菌科细菌进行了分离鉴定、药敏试验及 ESBL 耐药基因检测, 以监测耐药菌/耐药基因在广州南沙湿地公园候鸟中的分布情况。

1 材料与方法

1.1 样品收集

2019 年 1 月-12 月, 在广州南沙湿地公园一期和二期中预设 8 个采样点, 在树叶、树干上刮取新鲜黏稠或大块固体的鸟类粪便, 确保无泥土或河水污染。样本置于装有 10 mL 生理盐水试管中, 2-4 h 内将试管移至 0-4 °C 冰箱保存。共采集了 393 份鸟类粪便样本。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

氧化酶试纸, 广东环凯微生物科技有限公司; 革兰氏阴性需氧菌药敏检测板, 上海星佰生物技术有限公司。

梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统, Bio Mérieux 公司; 脉冲凝胶电泳仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

麦康凯琼脂(MacConkey agar, MAC)平板、血琼脂平板、营养肉汤(不含糖)(用于致泄性大肠埃希菌的前增菌培养), 北京陆桥技术股份有限公司; 药敏接种培养液, 上海星佰生物技术有限公司。

1.3 肠杆菌科细菌分离、培养及鉴定

1.3.1 肠杆菌科细菌分离、培养

无菌操作取 1 mL 样品至 10 mL 营养肉汤(不含糖)内, 37 °C 培养箱内静置培养 18 h。随

后使用无菌接种环将菌液接种至 MAC 平板上, 37 °C 培养箱内静置培养 18-24 h, 观察菌落特征, 菌液保留备用。

1.3.2 氧化酶试验

用氧化酶试纸蘸取待测菌落, 2 min 后试纸无颜色变化或呈淡黄色者(氧化酶试验阴性)为肠杆菌科细菌。

1.3.3 肠杆菌科细菌鉴定

从 MAC 平板上挑取氧化酶试验阴性的菌落至装有 3 mL 无菌稀释液的鉴定专用试管中, 浊度调为 5.0-6.2, 将鉴定专用试管装入梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统中自动鉴定。

1.4 药敏试验

已鉴定为肠杆菌科的细菌进一步接种至血平板上, 37 °C 培养箱内培养 18-24 h, 以备药敏检测。

采用革兰氏阴性需氧菌药敏检测板 A3 板对已鉴定为肠杆菌科的细菌进行 14 种常用抗菌药物的敏感性检测, 包括氨苄西林(ampicillin, AMP)、氨苄西林/舒巴坦(ampicillin-sulbactam, AMS)、四环素(tetracycline, TET)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、复方新诺明(paediatric compound sulfamethoxazole tablets, SXT)、头孢唑啉(cefazolin, CFZ)、头孢噻肟(cefotaxime, CTX)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、头孢西丁(cefepime, CFX)、庆大霉素(gentamicin, GEN)、亚胺培南(imipenem, IMI)、萘啶酸(nalidixic acid, NAL)、磺胺异噁唑(sulfamethoxazole, Sul)和环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)。质控菌株为大肠埃希氏菌 ATCC 25922, 由上海星佰生物技术有限公司提供。

1.4.1 菌液制备与加样

从装有 12 mL 药敏接种培养液的玻璃试管

中吸取 100 μL 培养液, 加入药敏检测板阴性对照孔中。用无菌接种环从 1.4 的血平板上刮取少量菌落至 2–3 mL 灭菌生理盐水中, 混匀菌液, 用 0.5 麦氏比浊管进行比浊(菌液浓度约为 1.5×10^8 CFU/mL)。取 60 μL 上述菌液加至 12 mL 药敏接种培养液中, 在旋涡混匀器上以 1 200 r/min 条件下振荡混匀 10 s, 吸取上述菌液与药敏接种培养液的混合液加入 96 孔微量药敏板条中, 每孔 100 μL , 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养 18–20 h。

1.4.2 药敏结果分析与判定

使用微生物鉴定/药敏分析系统读取结果及分析报告, 以肉眼判读为辅助判读, 若孔的颜色变为粉色、淡粉色、红色、紫红色则为阳性, 若为蓝色、蓝紫色、深紫色则为阴性, 根据美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的相应标准获得相应敏感(S)、中介敏感(I)和耐药(R)的结果, 具体抗菌药物判定折点见表 1。

1.5 ESBL 耐药基因检测

吸取 1.3.1 中制备的菌液 1 mL 至 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入 50 μL 无菌双蒸水, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后 12 000 r/min 离心 1 min, 以上清液作为 DNA 模板, 置于 -80°C 冰箱保存备用。

根据文献[8-9]设计合成 CTX-M、TEM 和 SHV 相关引物, 由广州昊天生物科技有限公司合成, 引物详情见表 2。对肠杆菌科细菌 ESBL 耐药基因进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(总体积 25 μL): $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$ 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL , 模板 2.0 μL , ddH₂O 补充至 25 μL 。PCR 反应条件: *bla*_{CTX-M}: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。*bla*_{TEM}: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,

表 1 肠杆菌科细菌的种类分布

Table 1 Species distribution of *Enterobacteriaceae*

抗菌药物 Antimicrobials	敏感 Susceptible	中介敏感 Intermediate	耐药 Resistant
氨苄西林 AMP	≤ 8	16	≥ 32
氨苄西林/舒巴坦 AMS	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
四环素 TET	≤ 4	8	≥ 16
氯霉素 CHL	≤ 8	16	≥ 32
复方新诺明 SXT	$\leq 2/38$	–	$\geq 4/76$
头孢唑啉 CFZ	≤ 2	4	≥ 8
头孢噻肟 CTX	≤ 1	2	≥ 4
头孢他啶 CAZ	≤ 4	8	≥ 16
头孢西丁 CFX	≤ 8	16	≥ 32
庆大霉素 GEN	≤ 4	8	≥ 16
亚胺培南 IMI	≤ 1	2	≥ 4
萘啶酸 NAL	≤ 16	–	≥ 32
磺胺异噁唑 Sul	≤ 256	–	≥ 512
环丙沙星 CIP	≤ 1	2	≥ 4

注: –: 药敏检测板中抗菌药物的浓度设置未包括菌株的中介敏感浓度

Note: –: The intermediate susceptibility concentration of strains to antibiotics was not included in the concentration setting of antimicrobials in the drug susceptibility test board.

表 2 肠杆菌科细菌耐药基因引物

Table 2 Primers of drug resistance genes in *Enterobacteriaceae*

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>bla</i> _{CTX-M}	F: TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R: CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	544
<i>bla</i> _{TEM}	F: GTATCCGCTCATGAGACAATA R: AGAAGTGGTCCTGCAACTTT	716
<i>bla</i> _{SHV}	F: GCCTTTATCGGCCTTCACTCAAG R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCGATCA	885

72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。*bla*_{SHV}: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物采用 1%琼脂凝胶电泳检测。结果为阳性的产物送至广州昊天生物科技有限公司测序,

测序结果进行 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)分析。

2 结果与分析

2.1 肠杆菌科细菌的分离与鉴定

对 393 份候鸟粪便分离鉴定后, 获得 59 株肠杆菌科细菌, 检出率为 15.01% (59/393), 共 12 种细菌种类, 见表 3。其中成团泛菌为主要优势菌群, 检出 36 株, 占总肠杆菌科细菌的 61.02%, 占 393 份粪便样品的 9.16%; 检大肠埃希氏菌 4 株, 肺炎克雷伯菌 3 株, 阴沟肠杆菌复合菌 4 株, 各占总肠杆菌科细菌的 6.78%、5.08%和 6.78%; 其余细菌检出 1-3 株, 未检出其他常见肠杆菌科细菌, 如变形杆菌、沙门氏菌等。

2.2 药敏试验结果

应用药敏检测板进行药敏试验, 结果显示 53 株肠杆菌科细菌为耐药菌, 耐药率为 89.83% (53/59), 耐药性肠杆菌科细菌占总粪便样品细

菌分离总数的 13.49%。肠杆菌科细菌中, 对头孢唑啉(81.36%)、磺胺异噁唑(52.54%)和氨苄西林(44.07%)耐药率最高; 检出 7 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE), 分别为成团泛菌 3 株, 肺炎克雷伯菌 1 株, 美洲爱文氏菌 1 株, 阴沟肠杆菌复合菌 2 株, 见表 4。

成团泛菌和大肠埃希氏菌对头孢唑啉的耐药率最高, 分别为 80.56%和 100.00%; 肺炎克雷伯菌对氨苄西林和四环素的耐药率最高, 均为 66.67%, 见表 4。

2.3 多重耐药检测结果

在 59 株肠杆菌科细菌中, 有 33 株表现为多重耐药, 多重耐药率达 55.93%, 占总粪便样品细菌分离总数的 8.40%。成团泛菌的多重耐药率为 44.44% (16/36); 大肠埃希氏菌的多重耐药率为 75.00% (3/4); 检出肺炎克雷伯菌的多重耐药菌 1 株, 为前文所述的碳青霉烯类肺炎克雷伯菌, 占总肺炎克雷伯菌的 33.33% (1/3), 见图 1。

表 3 肠杆菌科细菌种类检出分布

Table 3 The prevalence of different genera of *Enterobacteriaceae*

菌属 Genera	菌株数 Number of strains	检出率 Isolation rate (%)
阿氏耶尔森氏菌 <i>Yersinia aldovae</i>	1	0.25
成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>	36	9.16
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	4	1.02
法氏柠檬酸杆菌 <i>Citribacter farmeri</i>	1	0.25
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0.76
美洲爱文氏菌 <i>Ewingella americana</i>	2	0.51
摩氏摩根菌塞氏亚种 <i>Morganella morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	1	0.25
普城沙雷菌 <i>Serratia plymuthica</i>	2	0.51
伤口埃希菌 <i>Escherichia vulneris</i>	1	0.25
乡间布丘菌 <i>Budvicia aquatica</i>	3	0.76
液化沙雷菌 <i>Serratia liquefaciens</i>	1	0.25
阴沟肠杆菌复合菌 <i>Enterobacter cloacae</i> complex	4	1.02
合计 Total	59	15.01

表 4 肠杆菌科细菌药敏试验结果

抗菌药物	阿氏耶尔	成团泛菌	大肠埃	法氏柠檬	肺炎克雷	美洲爱文	摩氏摩根菌	普城沙	伤口埃希菌	乡间布	液化沙雷菌	阴沟肠杆菌	合计
Antimicrobials	森氏菌	<i>Pantoea</i>	希氏菌	酸杆菌	伯菌	氏菌	塞氏亚种	雷菌	<i>Escherichia</i>	丘菌	<i>Serratia</i>	复合菌	Total
	<i>Yersinia</i>	<i>agglomerans</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Morganella</i>	<i>Serratia</i>	<i>vulneris</i>	<i>Budvicia</i>	<i>liquefaciens</i>	<i>Enterobacter</i>	
	<i>aldovae</i>	(n=36)	<i>coli</i> (n=4)	<i>farmeri</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>americana</i>	<i>morganii</i>	<i>phymuthica</i>	(n=1)	<i>aquatica</i>	(n=1)	<i>cloacae</i>	
	(n=1)		(n=1)	(n=3)	(n=3)	(n=2)	(n=1)	(n=2)		(n=3)		complex	
												(n=4)	
氨基西林	0.00	33.33	75.00	0.00	66.67	0.00	100.00	50.00	0.00	100.00	100.00	75.00	44.07
AMP													
氨基西林-舒巴坦	0.00	2.78	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00	50.00	8.47
AMS													
四环素 TET	0.00	5.56	50.00	0.00	66.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	18.64
氯霉素 CHL	0.00	8.33	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	10.17
复方新诺明	100.00	13.89	50.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	33.33	0.00	0.00	18.64
SXT													
头孢唑啉	100.00	80.56	100.00	100.00	33.33	100.00	100.00	50.00	0.00	100.00	100.00	100.00	81.36
CFZ													
头孢噻肟	100.00	22.22	50.00	0.00	0.00	100.00	100.00	0.00	0.00	66.67	100.00	25.00	30.51
CTX													
头孢他啶	100.00	22.22	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	50.00	0.00	33.33	0.00	0.00	23.73
CAZ													
头孢西丁	100.00	36.11	25.00	0.00	0.00	100.00	100.00	0.00	0.00	66.67	0.00	100.00	40.68
CFX													
庆大霉素	0.00	5.56	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.78
GEN													
亚胺培南 IMI	0.00	8.33	0.00	0.00	33.33	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00	11.86
萘啶酸 NAL	100.00	27.78	25.00	0.00	33.33	100.00	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	32.20
磺胺异噁唑	100.00	41.67	50.00	100.00	0.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	50.00	52.54
Sul													
环丙沙星 CIP	100.00	22.22	50.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	33.33	0.00	0.00	23.73

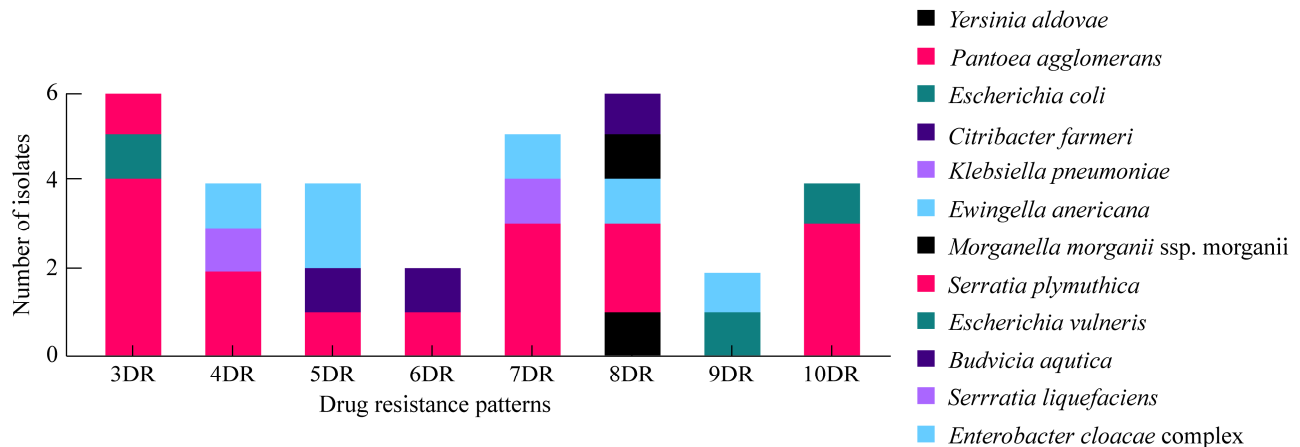


图1 肠杆菌科多重耐药结果 3-10DR: 菌株对3-10种抗菌药物耐药

Figure 1 Results of multi-drug resistance in *Enterobacteriaceae*. 3-10DR: Strains were resistant to 3-10 different antimicrobials.

2.4 耐药基因检测结果

2.4.1 耐药基因扩增结果

对候鸟粪便中59株肠杆菌科细菌进行 bla_{CTX-M} 、 bla_{TEM} 和 bla_{SHV} 基因扩增, 只检出 bla_{TEM} 耐药基因存在目的片段, 见图2。

2.4.2 候鸟粪便中肠杆菌科细菌携带耐药基因情况

PCR 扩增结果显示, 有23株细菌检出 bla_{TEM} , 占总粪便样品细菌分离总数的5.85% (23/393), 占总肠杆菌科细菌的38.98% (23/59), 占耐 β -内酰胺类抗生素肠杆菌科细菌的

46.00% (23/50)。未检出 bla_{CTX-M} 和 bla_{SHV} 耐药基因。23株携带 bla_{TEM} 耐药基因的肠杆菌科细菌中, 成团泛菌11株(47.82%)、大肠埃氏希菌2株(8.69%)、肺炎克雷伯菌1株(4.34%), 其余菌株的扩增结果显示, 所有检出的阿氏耶尔森氏菌、法式柠檬酸杆菌、美洲爱文氏菌和普城沙雷菌均携带 bla_{TEM} 耐药基因。

携带 bla_{TEM} 耐药基因的肠杆菌科细菌对氨苄西林-舒巴坦、四环素、头孢西丁和亚胺培南这4种药物的耐药率高于未携带 bla_{TEM} 耐药基因菌株的对应药物耐药率, 见图3。将基因片段测序, 并与NCBI数据库BLAST比对, 结果显示, 待测序列与已知序列(GenBank 登录号CP055262.1)的相似度达100%, 所有 bla_{TEM} 耐药基因均为TEM-1型。

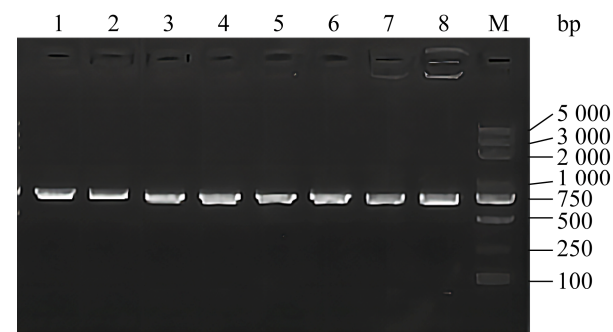


图2 肠杆菌科细菌 bla_{TEM} 基因扩增结果

Figure 2 Gene amplification results of bla_{TEM} in *Enterobacteriaceae*. M: DL5000 DNA Marker.

3 讨论与结论

肠杆菌科细菌是候鸟肠道中研究最多的能使人致病的菌群, 多种海鸥和水禽是传播肠杆菌科细菌的主要动物^[10-11], 而且传播范围也是全球性的^[12]。

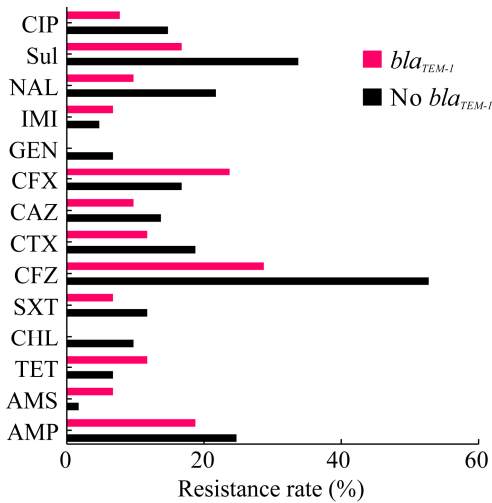


图 3 携带与未携带 *bla*_{TEM-1} 肠杆菌科细菌对多种药物耐药率结果 AMP: 氨苄西林; AMS: 氨苄西林-舒巴坦; TET: 四环素; CHL: 氯霉素; SXT: 复方新诺明; CFZ: 头孢唑啉; CTX: 头孢噻肟; CAZ: 头孢他啶; CFX: 头孢西丁; GEN: 庆大霉素; IMI: 亚胺培南; NAL: 萘啶酸; Sul: 磺胺异噁唑; CIP: 环丙沙星

Figure 3 Results of drug resistance rates of *Enterobacteriaceae* with and without *bla*_{TEM-1}. AMP: Ampicillin; AMS: Ampicillin-sulbactam; TET: Tetracycline; CHL: Chloramphenicol; SXT: Paediatric compound sulfamethoxazole tablets; CFZ: Cefazolin; CTX: Cefotaxime; CAZ: Ceftazidime; CFX: Cefoxitin; GEN: Gentamicin; IMI: Imipenem; NAL: Nalidixic acid; Sul: Sulfamethoxazole; CIP: Ciprofloxacin.

本研究对 393 份广州南沙湿地公园的候鸟粪便中肠杆菌科细菌进行分离, 并鉴定菌种类别。肠杆菌科细菌总检出率为 15.01% (59/393), 低于 Liao 等^[13]在中国西南部鸢鸟肠道中肠杆菌科细菌的检出率(52.40%), 高于安徽省升金湖白头鹤粪便中肠杆菌科细菌的检出率(6.40%)^[14]。本文检出的肠杆菌科细菌包括成团泛菌、大肠埃氏希菌和肺炎克雷伯菌等, 主要优势菌为成团泛菌, 有别于青海湖^[15]、成都^[16]等地区候鸟肠道菌的研究结果, 提示广州南沙

湿地公园候鸟具有独特的肠杆菌科细菌群落组成, 可能与候鸟迁徙路线和生活习性不同有关。成团泛菌广泛存在于自然环境和动物体内, 可致农作物枯萎、腐败^[17]及致人败血症或软组织感染^[18]。Zhao 等^[19]发现假单胞菌属和泛菌属与候鸟感染 H5N1 有一定关联。本研究检出成团泛菌为主要优势菌, 另检出了 8 株假单胞细菌, 提示候鸟有感染 H5N1 的风险。

本研究检出肠杆菌科细菌的耐药率为 89.83% (53/59)。除了 β -内酰胺类抗生素, 检出细菌还对磺胺类、喹诺酮类抗生素表达高耐药性, 提示该公园候鸟携带的产 ESBL 肠杆菌科细菌也可对其他抗生素表达耐药性。本研究肠杆菌科细菌药敏结果与广州临床检出细菌药敏结果(主要对头孢唑啉、复方磺胺和氨苄西林耐药)^[20]较为相似, 与广州市市售畜禽肉源大肠杆菌(主要对氨苄西林、多西环素和复方新诺明耐药)^[21]、广东地区鱼源大肠埃希菌(主要对氟苯尼考耐药)^[22]和 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测(主要对呋喃妥因耐药)^[23]中的药敏结果有所差异, 提示广州地区候鸟粪便中的肠杆菌科细菌耐药情况可能与当地医院中的耐药菌株有关联, 仍需进一步研究。主要优势菌成团泛菌对头孢唑啉和磺胺异噁唑耐药率最高, 与 Kampf^[24]的结果较为相似, 但是与陈卓等^[15]的研究结果相差甚远, 提示不同地区候鸟携带的相同种类菌落其耐药表型也可能不同。Munoz-Price 等^[25]研究表明, 若细菌对碳青霉烯类抗生素耐药, 则提示这种细菌对其他多种抗生素耐药, 可引起严重的临床感染, 而耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)可引起血液感染患者较高的死亡率。本研究检出 7 株 CRE, 检出率高于广东临床检出率^[23,26], 提示南沙湿地公园候鸟有储存 CRE/CRKP 的风险, 需要重点

监测这类细菌在候鸟体内的定殖及传播。

本文肠杆菌科细菌的多重耐药率(55.93%)高于新加坡^[27]和阿拉伯半岛^[28]候鸟携带细菌的多重耐药率, 高于 2019 年中国广东省某医院^[29]及 2016 年中国广东省某三甲医院多重耐药菌检出率^[26], 提示我国广州南沙湿地公园候鸟携带的多重耐药性肠杆菌科细菌占比较高, 可能与候鸟所接触的水体和土壤有关, 今后还需加强对候鸟活动周围环境中多重耐药菌监测。肠杆菌科细菌携带的 ESBL 耐药基因主要是 *bla*_{TEM-1}, 检出率低于牛金利^[30]、黄琴^[31]的研究结果。携带 *bla*_{TEM-1} 肠杆菌科细菌对四环素的耐药率高于未携带 *bla*_{TEM-1} 的耐药率, 提示该园区候鸟携带的含 *bla*_{TEM-1} 肠杆菌科细菌具有更高的公共卫生风险。*bla*_{TEM-1} 是革兰氏阴性菌中普遍存在的质粒编码 β -内酰胺酶, 可有效催化青霉素和早期头孢菌素的水解^[32], 需要重点监测 *bla*_{TEM-1} 在该地区附近候鸟源肠杆菌科细菌的分布, 以及质粒介导的 ESBL 耐药基因的水平转移。

REFERENCES

- [1] Moghaddam MJM, Mirbagheri AA, Salehi Z, Habibzade SM. Prevalence of class 1 integrons and extended spectrum beta lactamases among multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from north of Iran[J]. Iranian Biomedical Journal, 2015, 19(4): 233-239
- [2] Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(6): 1311-1312
- [3] Bonnedahl J, Järhult JD. Antibiotic resistance in wild birds[J]. Upsala Journal of Medical Sciences, 2014, 119(2): 113-116
- [4] Jean SS, Coombs G, Ling T, Balaji V, Rodrigues C, Mikamo H, Kim MJ, Rajasekaram DG, Mendoza M, Tan TY, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART), 2010–2013[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2016, 47(4): 328-334
- [5] 底丽娜, 南海辰, 夏利宁. TEM 型 β -内酰胺酶[J]. 动物医学进展, 2014, 35(7): 107-110
Di LN, Nan HC, Xia LN. TEM-type β -lactamases[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(7): 107-110 (in Chinese)
- [6] Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(4): 251-259
- [7] Radimersky T, Frolkova P, Janoszowska D, Dolejska M, Svec P, Roubalova E, Cikova P, Cizek A, Literak I. Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(5): 1687-1695
- [8] Cai WH, Fu YM, Zhang WL, Chen XB, Zhao JZ, Song WQ, Li YJ, Huang Y, Wu Z, Sun R, et al. Synergistic effects of baicalein with cefotaxime against *Klebsiella pneumoniae* through inhibiting CTX-M-1 gene expression[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 181
- [9] 张青青, 李月华, 黄秀梅, 赵建梅, 王娟, 赵格, 王琳, 刘娜, 高玉斌, 刘俊辉, 等. 吉林和黑龙江两省猪鸡源产 ESBLs 大肠杆菌耐药检测与优势基因型分析[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(10): 42-48, 70
Zhang QQ, Li YH, Huang XM, Zhao JM, Wang J, Zhao G, Wang L, Liu N, Gao YB, Liu JH, et al. Drug resistance testing for ESBLs-producing *E. coli* derived from chicken and swine in Jilin and Heilongjiang and relevant analysis on dominant genotypes[J]. China Animal Health Inspection, 2020, 37(10): 42-48, 70 (in Chinese)
- [10] Reed KD, Meece JK, Henkel JS, Shukla SK. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens[J]. Clinical Medicine & Research, 2003, 1(1): 5-12
- [11] Kobayashi H, Pohjanvirta T, Pelkonen S. Prevalence and characteristics of intimin-and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2002, 64(11): 1071-1073
- [12] Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME. Human infections associated with wild birds[J]. Journal of Infection, 2008, 56(2): 83-98
- [13] Liao F, Gu WP, Li D, Liang JR, Fu XQ, Xu W, Duan R, Wang X, Jing HQ, Dai JJ. Characteristics of microbial

- communities and intestinal pathogenic bacteria for migrated *Larus ridibundus* in southwest China[J]. *Microbiology Open*, 2019, 8(4): e00693
- [14] Zhao GH, Zhou LZ, Dong YQ, Cheng YY, Song YW. The gut microbiome of hooded cranes (*Grus monacha*) wintering at Shengjin Lake, China[J]. *Microbiology Open*, 2017, 6(3): e00447
- [15] 陈卓, 罗静, 张国钢, 何宏轩. 青海湖斑头雁粪便细菌分离鉴定与耐药性分析[J]. *动物学杂志*, 2016, 51(4): 590-598
- Chen Z, Luo J, Zhang GG, He HX. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of fecal bacteria from bar-headed geese *Anser indicus* from Qinghai lake[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2016, 51(4): 590-598 (in Chinese)
- [16] Lin YF, Dong XH, Wu J, Rao DW, Zhang LH, Faraj Y, Yang K. Metadata analysis of *mcr-1*-bearing plasmids inspired by the sequencing evidence for horizontal transfer of antibiotic resistance genes between polluted river and wild birds[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 352
- [17] Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(6): 1989-1992
- [18] 杨君洋, 卢洪洲. 成团泛菌感染及其诊治的研究近况[J]. *上海医药*, 2016, 37(3): 48-50
- Yang JY, Lu HZ. Updates of *Pantoea agglomerans* infection and its diagnosis and treatment[J]. *Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal*, 2016, 37(3): 48-50 (in Chinese)
- [19] Zhao N, Wang SP, Li HY, Liu SL, Li M, Luo J, Su W, He HX. Influence of novel highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infection on migrating whooper swans fecal microbiota[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 46
- [20] 李娟, 邓秋连, 龙燕, 黄钰君, 尚彦彦, 杨丽娜. 肠杆菌科产 ESBLs 细菌的临床耐药研究[J]. *中国当代医药*, 2017, 24(15): 126-128
- Li J, Deng QL, Long Y, Huang YJ, Shang YY, Yang LN. Clinical drug resistance of *Enterobacteriaceae* producing ESBLs bacteria[J]. *China Modern Medicine*, 2017, 24(15): 126-128 (in Chinese)
- [21] 马振报, 潘晔君, 许钦怡, 黄炜铭, 林思茹, 郭慧中, 曾东平, 熊文广, 曾振灵. 市售畜禽肉产 CTX-M 酶大肠杆菌的流行病学调查[J]. *微生物学报*, 2021, 61(2): 398-405
- Ma ZB, Pan YJ, Xu QY, Huang WM, Lin SR, Guo HZ, Zeng DP, Xiong WG, Zeng ZL. Epidemiological investigation of CTX-M-producing *Escherichia coli* from retail livestock and chicken meat[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(2): 398-405 (in Chinese)
- [22] 汤电, 张小华, 付晓平, 王丽华, 郭玉芳, 李健, 纪雪薇, 蒋红霞. 广东地区鱼源大肠埃希菌 ESBLs 和 PMQR 流行分布调查[J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(1): 113-119
- Tang D, Zhang XH, Fu XP, Wang LH, Guo YF, Li J, Ji XW, Jiang HX. Prevalence of ESBLs and PMQR encoding genes in *Escherichia coli* isolated from edible fish in Guangdong[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2012, 33(1): 113-119 (in Chinese)
- [23] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(1): 1-10
- Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang XJ, Zhang CX, Ji P, Xie Y, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance in China: 2018 report[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020, 20(1): 1-10 (in Chinese)
- [24] Kampf G. Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in Gram-negative species[J]. *Antibiotics*, 2018, 7(4): 110
- [25] Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2013, 13(9): 785-796
- [26] 林秀娟, 林红燕, 钟韵. 某三甲医院 2014—2016 年多重耐药菌感染趋势变迁[J]. *广东医学*, 2018, 39(1): 107-110
- Lin XJ, Lin HY, Zhong Y. The trend of multiple drug-resistant organism (MDRO) infection in a 3A Grade Hospital from 2014 to 2016[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2018, 39(1): 107-110 (in Chinese)
- [27] Ong KH, Khor WC, Quek JY, Low ZX, Arivalan S, Humaidi M, Chua C, Seow KLG, Guo SY, Tay MYF, et al. Occurrence and antimicrobial resistance traits of *Escherichia coli* from wild birds and rodents in Singapore[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(15): 5606
- [28] Elsohaby I, Samy A, Elmoslemany A, Alorabi M, Alkafay M, Aldoweriej A, Al-Marri T, Elbehiry A, Fayez M. Migratory wild birds as a potential

- disseminator of antimicrobial-resistant bacteria around Al-asfar lake, eastern Saudi Arabia[J]. *Antibiotics*, 2021, 10(3): 260
- [29] 张毅, 彭玲玲, 黄丽玲. 广东某军队医院2019年多重耐药菌检出现状及耐药性分析[J]. *东南国防医药*, 2021, 23(1): 45-49
- Zhang Y, Peng LL, Huang LL. Analyze the distribution and drug susceptibility of multi-drug-resistant bacteria in patients admitted to a military hospital in Guangdong in 2019[J]. *Military Medical Journal of Southeast China*, 2021, 23(1): 45-49 (in Chinese)
- [30] 牛金利. 湛江地区鸭场环境中耐药基因检测及 *floR* 基因传播方式的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2020
- Niu JL. Study on the detection of drug resistance genes and *floR* gene transmission in the environment of duck farms in Zhanjiang area[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2020 (in Chinese)
- [31] 黄琴. 猪源大肠杆菌耐药表型和基因型研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2018
- Huang Q. Phenotypic and genotypic characterization in *Escherichia coli* isolates from swine[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2018 (in Chinese)
- [32] Stojanoski V, Chow DC, Hu LY, Sankaran B, Gilbert HF, Prasad BVV, Palzkill T. A triple mutant in the Ω -loop of TEM-1 β -lactamase changes the substrate profile via a large conformational change and an altered general base for catalysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(16): 10382-10394