

## 研究报告

## 通辽地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药性检测及一株多重耐药菌全基因组测序分析

王永强<sup>1</sup>, 李偲<sup>1</sup>, 耿超<sup>1</sup>, 马海滨<sup>3</sup>, 阿嘎日<sup>4</sup>, 窦亚平<sup>4</sup>, 王婷婷<sup>5</sup>, 王梓<sup>\*1</sup>, 刘锴<sup>\*1,2</sup>

1 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古 通辽 028000

2 内蒙古自治区肉牛疾病防控工程技术研究中心, 内蒙古 通辽 028000

3 内蒙古奥科斯牧业有限公司, 内蒙古 乌拉盖 026300

4 通辽市科尔沁区农畜产品质量安全中心, 内蒙古 通辽 028000

5 通辽市科尔沁区动物疫病预防控制中心, 内蒙古 通辽 028000

王永强, 李偲, 耿超, 马海滨, 阿嘎日, 窦亚平, 王婷婷, 王梓, 刘锴. 通辽地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药性检测及一株多重耐药菌全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 4964-4977

Wang Yongqiang, Li Cai, Geng Chao, Ma Haibin, Agari, Dou Yaping, Wang Tingting, Wang Zi, Liu Kai. Drug resistance of *Escherichia coli* strains causing calf diarrhea in Tongliao and whole-genome sequencing of a multi-drug resistant strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 4964-4977

**摘要:**【背景】大肠杆菌(*Escherichia coli*)是引起犊牛腹泻的最主要病原菌, 其耐药性菌株的不断出现引起广泛关注。【目的】了解内蒙古自治区通辽市犊牛腹泻大肠杆菌耐药性及耐药基因流行情况。【方法】从通辽市多个旗县采集犊牛腹泻样品 40 份, 经细菌分离纯化及 16S rRNA 基因测序, 最终鉴定出 20 株大肠杆菌。采用药敏试验和 PCR 方法对分离菌进行耐药性及耐药基因检测分析, 并对其中 1 株多重耐药菌株进行全基因组测序。【结果】20 株分离菌均具有多重耐药性, 对链霉素、环丙沙星、恩诺沙星和复方新诺明的耐药率达 80%以上。所检耐药基因中, *aphA1*、*strB*、*TEM-1* 和 *qnrS* 检出率达 100%。通过对代表性菌株 TL-13 全基因组测序发现, 其基因组大小为 4 897 185 bp, GC 含量为 50.68%, 同时携带 2 个质粒, 大小分别为 108 288 bp (pTL13-1)和 64 018 bp (pTL13-2)。质粒中共携带 18 个可移动耐药基因。【结论】通辽地区犊牛腹泻大肠杆菌多重耐药性

基金项目: 内蒙古自治区肉牛疾病防控工程技术研究中心开放性课题(MDK2019024, MDK2019025); 内蒙古自治区自然科学基金(2021LHMS03005, 2021BS03015); 内蒙古科技支撑东北振兴研发项目(2022YFDZ0013); 内蒙古民族大学博士启动基金(BS593)

**Supported by:** Inner Mongolia Engineering Technology Research Center of Prevention and Control the Beef Cattle Disease subject (MDK2019024, MDK2019025); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2021LHMS03005, 2021BS03015); Inner Mongolia Science and Technology Supports Northeast Revitalization Research and Development Project (2022YFDZ0013); Inner Mongolia Minzu University Doctoral Start-up Fund (BS593)

\*Corresponding authors: E-mail: WANG Zi: wangzixiaoxu@163.com; LIU Kai: liukai721026@163.com

Received: 2022-09-19; Accepted: 2022-10-18; Published online: 2022-10-28

普遍存在, 4种常见耐药基因普遍流行。

**关键词:** 犊牛腹泻; 大肠杆菌; 耐药性; 耐药基因; 全基因组测序

## Drug resistance of *Escherichia coli* strains causing calf diarrhea in Tongliao and whole-genome sequencing of a multi-drug resistant strain

WANG Yongqiang<sup>1</sup>, LI Cai<sup>1</sup>, GENG Chao<sup>1</sup>, MA Haibin<sup>3</sup>, Agari<sup>4</sup>, DOU Yaping<sup>4</sup>,  
WANG Tingting<sup>5</sup>, WANG Zi<sup>\*1</sup>, LIU Kai<sup>\*1,2</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

2 Inner Mongolia Engineering Technology Research Center for Prevention and Control of Beef Cattle Diseases, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

3 Inner Mongolia Aokes Animal Husbandry Corporation, Wulagai 026300, Inner Mongolia, China

4 Horqin District Quality Safety Center of Agricultural and Livestock Products, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

5 Animal Disease Prevention and Control Center of Horqin District, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

**Abstract:** [Background] *Escherichia coli* is the main pathogen causing diarrhea and the emerging of the drug-resistant strains has aroused wide concern. [Objective] To understand the prevalence of drug resistance and drug resistance genes of *E. coli* causing calf diarrhea in Tongliao city, Inner Mongolia Autonomous Region. [Methods] Forty samples of calves suffering from diarrhea were collected from multiple banners and counties of Tongliao, from which 20 strains of *E. coli* were isolated and identified via 16S rRNA gene sequencing. Drug sensitivity test and PCR were conducted to study the drug resistance and drug resistance genes of the isolated strains. The whole genome of a multi-drug resistant strain was sequenced. [Results] All the 20 isolates had multi-drug resistance and showed the drug resistance rate above 80% to streptomycin, ciprofloxacin, enrofloxacin, and compound sulfamethoxazole. The detection rates of *aphA1*, *strB*, *TEM-1*, and *qnrS* were 100%. The strain TL-13 had the genome size of 4 897 185 bp and the GC content of 50.68%, and it carried two plasmids with the sizes of 108 288 bp (pTL13-1) and 64 018 bp (pTL13-2), respectively. The plasmids carried 18 mobile drug resistance genes. [Conclusion] The *E. coli* strains causing calf diarrhea in Tongliao generally have multi-drug resistance, and the four common resistance genes were prevalent.

**Keywords:** calf diarrhea; *Escherichia coli*; drug resistance; drug resistance gene; whole-genome sequencing

犊牛腹泻是影响肉牛养殖效益的最重要因素之一, 具有较高发病率及死亡率, 而且容易产生预后不良, 造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。在引起犊牛腹泻的病因中, 大肠杆菌原发或继发感

染是引起犊牛腹泻主要因素之一<sup>[2]</sup>。目前, 治疗大肠杆菌腹泻仍大量依赖抗菌药物, 造成近年来大肠杆菌多重耐药株产生的频率增强, 对公共卫生造成严重威胁。因此, 不定期开展对

动物源大肠杆菌耐药性及耐药基因的流行性调查具有重要意义。王丽娟等<sup>[3]</sup>曾对 75 株牛源大肠杆菌进行了氟喹诺酮类抗生素耐药性检测,其中 60%的菌株对至少 2 种氟喹诺酮类药物耐药。高海慧等<sup>[4]</sup>对 75 株牛源大肠杆菌进行耐药性检测,结果显示,分离菌株对阿莫西林、哌拉西林、氨苄西林、头孢唑啉、氟苯尼考、恩诺沙星和四环素的耐药率均>90%。细菌耐药情况会因不同地区用药习惯等因素产生差异,但牛源大肠杆菌的耐药性问题已日趋严重<sup>[5]</sup>。

大肠杆菌中携带的耐药基因常通过水平移动元件在不同菌株中传递,如耐药质粒、整合子、插入序列和转座子等。因此,通过对耐药菌进行全基因组测序,可以全面了解耐药基因的分布情况。在本研究中,为了解内蒙古通辽地区犊牛腹泻大肠杆菌的耐药情况,采集通辽地区犊牛腹泻样本进行大肠杆菌分离鉴定;对 20 株分离菌进行常用抗菌药物的耐药性及耐药基因检测,并对其中 1 株耐药谱范围广的代表性菌株进行全基因组测序分析,以期获得完整的基因组信息并确定耐药基因的分布情况,为通辽地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药性及耐药基因流行情况研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本

犊牛腹泻样本于 2021 年 3-10 月采自内蒙古自治区通辽市下属多个旗县,包括扎鲁特旗 7 份、科尔沁左翼后旗 13 份、库伦旗 10 份、科尔沁左翼中旗 10 份。大肠杆菌 ATCC 25922 质控株由吉林农业大学动物医学院药理毒理实验室惠赠。

### 1.2 主要试剂和仪器

大肠杆菌显色培养基,青岛海博生物技术有限责任公司;16S rRNA 基因和 12 种耐药基

因引物,吉林省库美生物科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 相关试剂和 DL2000 DNA Marker,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;药敏片,杭州滨河微生物试剂有限公司;革兰氏染色液,珠海贝索生物技术有限公司。PCR 仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;电泳仪,北京六一仪器有限公司;冷冻高速离心机,艾本德股份公司;凝胶成像系统,北京原平皓生物技术有限公司;恒温振荡培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

### 1.3 细菌分离鉴定

无菌采集腹泻犊牛粪便样本或病死犊牛肠道样本作为细菌分离材料,接种于普通 LB 固体培养基,37 °C 培养 10-12 h,挑取单菌落于大肠杆菌显色培养基平板划线,37 °C 培养过夜,挑取显色单个菌落进行后续试验。按细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取菌株全基因组 DNA。参照文献[6]合成 16S rRNA 基因通用引物,使用 Primer 5.0 软件设计菌毛黏附素基因 *K88*、*K99* 和 *F41* 的 PCR 引物(表 1)。PCR 反应体系(50 μL): 10×*Taq* Buffer 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 2 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 6 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测并进行测序。

### 1.4 药物敏感性检测

采用 K-B 法对 15 种抗生素进行药物敏感性检测。以 ATCC 25922 为质控株,参照美国临床实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)和国家耐抗菌素监测系统(National Antimicrobial Resistance Monitoring System, NARMS)推荐标准进行试验操作和结果判断<sup>[7]</sup>,结果分为敏感、中度敏感及耐药。

表 1 引物及序列

Table 1 Primer sequences

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增长度 Amplification length (bp)
16S rRNA	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R: GGTTACCTTGTTACGACTT	1 369
<i>K88</i>	F: TGAATGACCTGACCAATGGTGGAAACC R: GCGTTACTCTTTGAATCTGTCCGAG	484
<i>K99</i>	F: GCGACTACCAATGCTTCTGCGAATAC R: GAACCAGACCAGTCAATACGAGCA	230
<i>F41</i>	F: TTAGCAGCGAAGATGAGTGATGGG R: GTACTACCTGCAGAAACACCAGATCC	515
<i>aadA5</i>	F: CTTCAAGTTCGGTGAGTGGC R: AGGTCGTCGTCCTCGCTAC	398
<i>aphA1</i>	F: AAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAG R: GGCAATCAGGTGCGACAATCT	642
<i>strB</i>	F: GCGTTGCTCCTCTTCTCCAT R: ACCTTTTCCAGCCTCGTTTG	723
<i>floR</i>	F: CTGAACACGACGCCCGCTAT R: GGACCGCTCCGCAAACAA	751
<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210
<i>tetR</i>	F: AACAAACCCGTAAACTCGC R: GGTGCCTATCTAACATCTCAAT	116
<i>blaSHV</i>	F: GGGTTATTCTTATTTGTGCGC R: TTAGCGTTGCCAGTGCTC	567
<i>TEM-1</i>	F: TTTTCGTGTCGCCCTTAT R: GCTCGTCGTTTGGTATGG	512
<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA R: TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417
<i>qnrB</i>	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469
<i>qnrC</i>	F: ATTTCTCACAGGCAAACCT R: CTGGAATAACAATCACCC	666
<i>qnrD</i>	F: TTTTCGCTAACTAACTCGC R: GAAAGGATAAACAGGCAAAT	984

### 1.5 耐药基因检测

使用 Primer 5.0 软件设计本次实验所需耐药基因引物, 利用 PCR 扩增及 DNA 测序对分离菌株进行 12 种耐药基因检测(表 1)。以 1.3 中提取的细菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系及反应条件参照 1.3 方法。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并将阳性

样本进行测序。

### 1.6 全基因组测序

测序流程按照 Oxford Nanopore Technologies (ONT)公司提供的标准操作流程执行, 主要步骤包括提取高质量细菌基因组 DNA, 进行纯度、浓度及完整性质检; BluePippin 全自动核酸回收系统回收大片段 DNA; 文库构建(SQK-LSK109

连接试剂盒); 上机测序<sup>[8-9]</sup>。使用 Canu V1.5 软件对过滤后 subreads 进行组装, 通过 Racon V3.4.3 软件利用三代 subreads 对组装结果进行矫正, 采用 Pilon V1.22 软件利用二代数据进一步进行纠错, 得到准确度更高的基因组后进行后续分析。

### 1.7 测序信息分析

通过软件 Prodigal V2.6.3<sup>[10]</sup>进行基因预测; 使用软件 IslandPath-DIMOB V0.2<sup>[11]</sup>预测细菌基因组中基因岛; 通过将基因序列与非冗余蛋白序列(Non-Redundant Protein Sequence, NR)数据库、基因本体论(Gene Ontology, GO)数据库、京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)功能数据库和抗生素抗性数据库进行比对得到注释信息<sup>[12-13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离菌株形态观察

分离菌株在大肠杆菌显色培养基上呈蓝绿色、中等大小的光滑型菌落(图 1), 镜检见两端钝圆、散在或成对存在的革兰氏阴性无芽孢杆菌(图 2)。

### 2.2 16S rRNA 基因序列鉴定结果

分离菌 16S rRNA 基因序列的 PCR 产物经

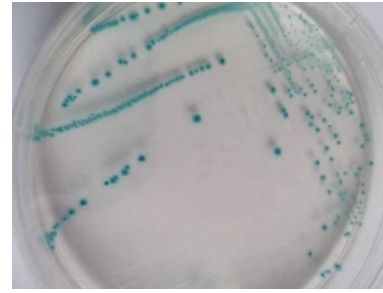


图 1 大肠杆菌显色培养基培养结果  
Figure 1 Culture results of *Escherichia coli* chromogenic medium.

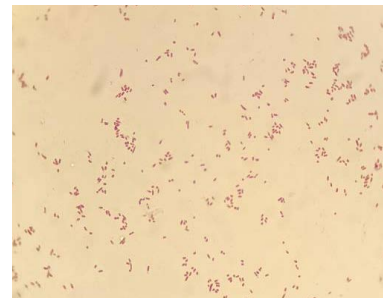


图 2 革兰氏染色镜检结果  
Figure 2 Gram stain microscopy results.

1%琼脂糖凝胶电泳后, 获得单一条带(图 3)。PCR 产物测序结果经 NCBI 比对, 与已登录的大肠杆菌序列一致性均在 98%以上, 证实 20 株分离菌均为大肠杆菌。

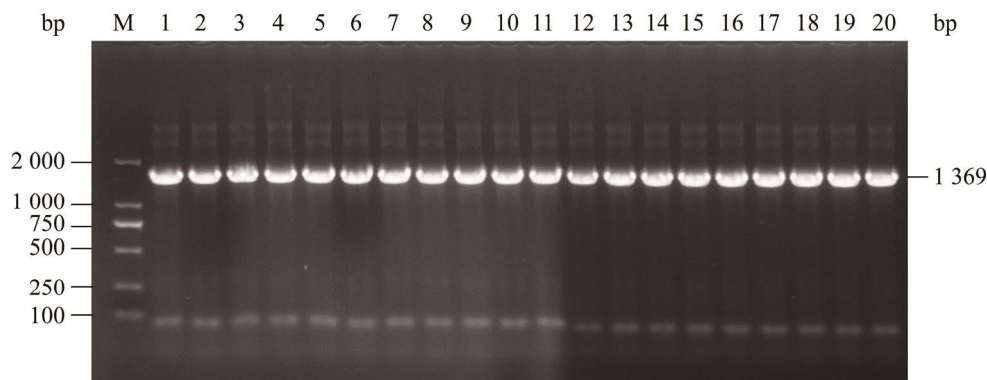


图 3 分离菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

Figure 3 PCR amplification results of 16S rRNA gene of the isolated strain. M: DL2000 DNA Marker; 1-20: Strain number.

### 2.3 黏附素检测结果

对 20 株大肠杆菌菌毛黏附素基因进行 PCR 检测, 结果显示 20 株大肠杆菌中有 15 株检出黏附素基因 *K99*, 检出率为 75%, 其他 2 种黏附素基因均未检出。表明 20 株分离菌中有 15 株为产肠毒素性大肠杆菌。检测结果如图 4 所示。

### 2.4 耐药性检测结果

分离的 20 株犊牛腹泻大肠杆菌普遍存在多重耐药性(表 2)。其中, 4 号菌株耐药性最为严重, 只对阿莫西林克拉维酸钾敏感, 对多西环素中度敏感, 对其余 13 种抗生素均呈耐药。全部受试菌株对链霉素、环丙沙星、恩诺沙星和复方新诺明耐药率较高, 均在 80%以上; 对阿莫西林克拉维酸钾的耐药率仅为 15%; 此外, 分离菌除对丁胺卡那和妥布霉素耐药率分别为 30%及 35%外, 其他抗生素耐药率均在 50%以上。

### 2.5 耐药基因检测结果

利用 PCR 技术对 20 株大肠杆菌进行耐药基因检测, 结果如表 3 所示。其中, 氨基糖苷类耐药基因 *aphA1*、*strB* 和  $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *TEM-1*、喹诺酮类耐药基因 *qnrS* 的检出率均

为 100%。喹诺酮类耐药基因 *qnrB*、*qnrC* 和 *qnrD* 均未检测到, 其他耐药基因检出率不等, 除 *tetR* 基因外, 检出率均在 50%以上。

### 2.6 全基因组测序结果

将 4 号菌株命名为 TL-13 并进行全基因组测序。获得 TL-13 菌株全基因组大小为 4 897 185 bp, GC 含量为 50.68%。包括 1 个完整的菌体染色体序列和 2 个完整的质粒序列。其中染色体大小为 4 724 879 bp, 质粒 pTL13-1 大小为 108 288 bp, 质粒 pTL13-2 大小为 64 018 bp, 共编码 4 585 个基因, 测序结果上传至 NCBI 数据库, 登录号为 CP103295–CP103297。质粒 pTL13-1 包含 IncFIB 和 IncFIC 这 2 个复制子, 质粒 pTL13-2 包含 IncFII 和 IncN 这 2 个复制子。

### 2.7 基因组序列分析结果

#### 2.7.1 基因岛预测结果

基因岛的存在常会赋予菌体特殊的表型, 如对抗生素的抗性、更强的致病性和多样的代谢适应性, 有助于菌体适应环境。在测序菌株的全部基因序列中, 共预测到 22 个基因岛, 其中 19 个位于染色体上、3 个位于质粒 pTL13-1 上, 如表 4 所示。

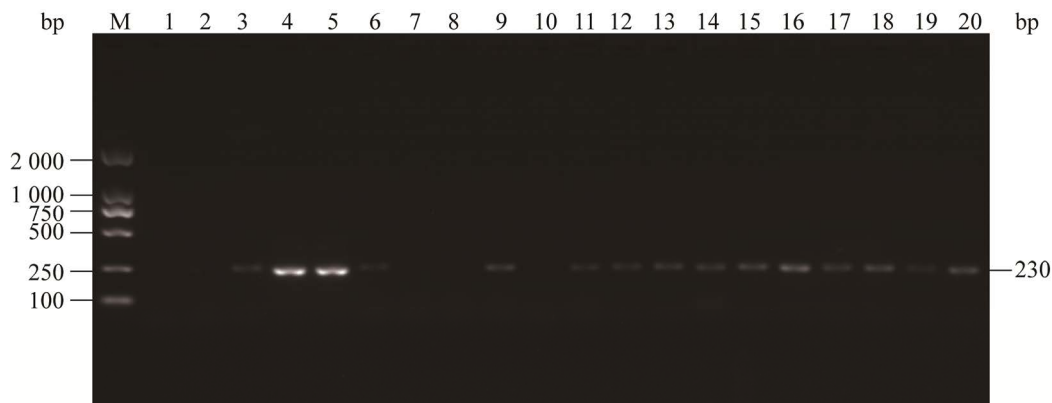


图 4 大肠杆菌黏附素基因 *K99* PCR 扩增结果

Figure 4 PCR amplification results of *Escherichia coli* adhesin gene *K99*. M: DL2000 DNA Marker; 1–20: Strain number.

表 2 大肠杆菌药物敏感性检测结果  
Table 2 Results of drug sensitivity testing in *Escherichia coli*

抗生素	菌株编号 Strain No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
丁胺卡那 Mikacin	S (21±0.22)	S (19±0.14)	S (22±0.38)	R (9±0.73)	S (19±0.51)	S (20±0.10)	S (21±0.19)	R (7±0.78)	S (18±0.50)	R (5±0.30)
链霉素 Streptomycin	R (6±0.79)	R (5±0.68)	R (9±0.23)	R (6±0.78)	R (8±0.17)	I (13±0.46)	R (10±0.11)	R (8±0.45)	R (7±0.60)	S (16±0.48)
妥布霉素 Tobramycin	S (16±0.34)	S (17±0.48)	R (8±0.56)	R (9±0.65)	I (13.4±0.21)	I (13.6±0.31)	S (17±0.26)	R (10±0.13)	R (7±0.43)	S (19±0.25)
庆大霉素 Gentamicin	I (13.6±0.11)	S (17±0.52)	R (11±0.80)	R (6±0.71)	S (20±0.50)	I (13.4±0.31)	S (18±0.62)	R (4±0.78)	R (9±0.42)	S (16±0.31)
环丙沙星 Ciprofloxacin	R (11±0.46)	R (9±0.45)	R (13±0.40)	R (11±0.53)	R (10±0.53)	R (7±0.76)	I (18±0.34)	R (9±0.65)	R (4±0.74)	S (24±0.21)
卡那霉素 Kanamycin	R (11±0.42)	S (21±0.33)	R (9±0.40)	R (5±0.78)	S (19±0.73)	I (16±0.23)	I (15±0.42)	R (10±0.51)	R (8±0.92)	I (16±0.71)
多西环素 Doxycycline	R (7±0.23)	R (10±0.25)	R (8±0.26)	I (13±0.71)	R (9±0.77)	S (17±0.45)	R (8±0.83)	S (18±0.50)	S (20±0.32)	I (13±0.20)
复方新诺明	S (18±0.50)	I (13±0.40)	R (8±0.22)	R (7±0.83)	R (4±0.72)	R (8±0.30)	S (22±0.62)	R (7±0.44)	R (9±0.23)	R (7±0.85)
Paediatric compound sulfamethoxazole tablets										
恩诺沙星 Enrofloxacin	R (14±0.65)	R (9±0.45)	R (12±0.47)	R (12±0.86)	R (10±0.80)	S (24±0.21)	R (9±0.93)	S (26±0.64)	R (13±0.55)	I (20±0.32)
头孢噻肟 Cefotaxime	R (20±0.32)	R (19±0.45)	R (17±0.30)	R (20±0.44)	I (22.4±0.21)	R (16±0.73)	S (29±0.64)	S (30±0.10)	R (19±0.72)	I (22.5±0.11)
头孢拉定 Cefradine	R (11±0.47)	R (9±0.78)	R (12±0.60)	R (10±0.34)	I (16±0.13)	I (17±0.22)	S (22±0.11)	S (20±0.41)	R (12±0.81)	R (9±0.48)
氟苯尼考 Florfenicol	R (12±0.34)	R (9±0.30)	R (10±0.38)	R (11±0.66)	R (12±0.80)	S (22±0.54)	R (7±0.67)	S (21±0.11)	I (17±0.75)	I (16±0.75)
阿莫西林克拉维酸钾 Amoxicillin and clavulanate potassium	S (22±0.44)	S (19±0.46)	R (9±0.67)	S (24±0.30)	S (20±0.87)	S (23±0.44)	S (22±0.70)	I (15±0.45)	S (23±0.98)	S (19±0.23)
头孢哌酮	I (38±0.97)	R (14±0.71)	R (12±0.74)	R (13±0.53)	I (37±0.51)	I (42±0.41)	I (33±0.16)	R (11±0.96)	I (21±0.11)	I (32.00)
Cefoperazone sodium										
头孢呋辛 Cefuroxime	S (20±0.54)	R (12±0.24)	R (10±0.78)	R (13±0.40)	S (21±0.67)	S (19±0.33)	S (23±0.71)	S (20±0.70)	I (16±0.22)	S (21±0.95)

(待续)



(续表 2)

菌株编号 Strain No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
抗生素										
Antibiotic										
丁胺卡那 Mikacin	S (22±0.37)	S (21±0.78)	R (10±0.89)	S (23±0.21)	R (10±0.37)	S (19±0.56)	R (6±0.37)	S (18±0.27)	S (20±0.33)	R (11±0.37)
链霉素 Streptomycin	R (5±0.68)	R (9±0.32)	R (4±0.56)	R (8±0.98)	R (7±0.77)	R (2±0.86)	R (6±0.73)	R (5±0.89)	S (19±0.22)	R (10±0.11)
妥布霉素 Tobramycin	R (4±0.87)	S (16±0.73)	I (13.2±0.11)	R (6±0.53)	I (13.4±0.19)	R (10±0.26)	S (18±0.35)	S (21±0.33)	R (3±0.89)	S (18±0.75)
庆大霉素 Gentamicin	R (7±0.74)	R (2±0.97)	I (13.6±0.13)	R (8±0.48)	R (10±0.23)	R (6±0.86)	S (18±0.22)	R (4±0.63)	R (5±0.64)	S (19±0.71)
环丙沙星 Ciprofloxacin	R (8±0.95)	R (13±0.27)	R (7±0.80)	R (6±0.84)	R (11±0.49)	R (4±0.46)	R (10±0.83)	R (12±0.12)	S (25±0.76)	R (9±0.97)
卡那霉素 Kanamycin	R (12±0.50)	R (6±0.74)	R (7±0.40)	R (4±0.93)	R (8±0.90)	R (9±0.75)	S (24±0.30)	R (7±0.56)	R (9±0.43)	S (21±0.56)
多西环素 Doxycycline	S (16±0.87)	R (5±0.23)	R (7±0.55)	R (9±0.34)	R (10±0.83)	S (21±0.15)	R (7±0.23)	S (16±0.57)	R (3±0.86)	R (9±0.89)
复方新诺明	R (8±0.29)	R (5±0.73)	R (6±0.83)	R (6±0.90)	R (7±0.43)	S (21±0.42)	R (3±0.80)	R (8±0.13)	R (6±0.53)	R (9±0.22)
Paediatric compound										
sulfamethoxazole tablets										
恩诺沙星 Enrofloxacin	R (12±0.48)	R (11±0.60)	R (8±0.97)	R (12±0.70)	R (14±0.22)	R (9±0.87)	R (11±0.35)	I (19±0.43)	R (12±0.45)	R (9±0.62)
头孢噻肟 Cefotaxime	I (22.3±0.16)	R (18±0.45)	R (19±0.80)	R (20±0.49)	I (22.5±0.30)	R (21±0.21)	S (28±0.78)	I (22.5±0.21)	R (17±0.75)	R (19±0.60)
头孢拉定 Cefradine	I (17±0.33)	R (11±0.46)	R (10±0.87)	R (7±0.92)	I (16±0.19)	R (9±0.33)	S (24±0.20)	R (11±0.60)	S (21±0.63)	R (12±0.31)
氟苯尼考 Florfenicol	I (17±0.25)	I (16±0.22)	R (11±0.44)	R (10±0.27)	R (8±0.60)	S (23±0.51)	R (11±0.24)	R (12±0.74)	R (10±0.61)	S (22±0.76)
阿莫西林克拉维酸钾	S (21±0.72)	S (20±0.41)	I (16±0.25)	I (15±0.21)	S (24±0.82)	R (11±0.47)	I (16±0.75)	S (21±0.34)	S (22±0.67)	R (10±0.52)
Amoxicillin and										
clavulanate potassium										
头孢哌酮	R (14±0.70)	R (13±0.64)	R (12±0.49)	R (14±0.28)	R (10±0.60)	S (66±0.42)	R (11±0.67)	I (43±0.89)	R (14±0.12)	I (33±0.28)
Cefoperazone sodium										
头孢呋辛 Cefuroxime	R (9±0.82)	R (11±0.27)	R (12±0.67)	R (10±0.38)	R (11±0.29)	I (16±0.53)	S (22±0.14)	S (21±0.79)	R (13±0.14)	R (8±0.58)

注: R: 耐药; I: 中等敏感; S: 敏感, 括号内为抑菌圈直径(mm)

Note: R: Resistance; I: Moderate; S: Sensitivity. The data in parentheses are diameter of inhibition zone (mm).



表3 大肠杆菌耐药基因检测阳性率

Table 3 The determination of drug-resistant genes in *Escherichia coli*

耐药基因 Drug resistance gene	耐药基因种类 Types of drug resistance genes	检出率 The detection rate (%)
<i>floR</i>	氯霉素类 Chloroamphenicols	55 (11/20)
<i>blaSHV</i>	β-内酰胺类 Beta-lactams	80 (16/20)
<i>TEM-1</i>	Beta-lactams	100 (20/20)
<i>tetA</i>	四环素类 Tetracyclines	60 (12/20)
<i>tetR</i>	Tetracyclines	45 (9/20)
<i>aadA5</i>	氨基糖苷类 Aminoglycosides	55 (11/20)
<i>aphA1</i>	Aminoglycosides	100 (20/20)
<i>strB</i>		100 (20/20)
<i>qnrS</i>	喹诺酮类 Quinolones	100 (20/20)
<i>qnrB</i>	Quinolones	0 (0/20)
<i>qnrC</i>		0 (0/20)
<i>qnrD</i>		0 (0/20)

### 2.7.2 NR 数据库注释分析

通过与 NR 数据库的比对, 可以查看本物种基因组序列与相近物种的相似情况及同源序列的功能信息。本研究中共有 4 568 条序列注释到 NR 数据库, 注释结果如图 5 所示, 共有 1 989 条序列与肠杆菌科基因组具有同源性, 占总 NR 注释的 43.54%, 其次是大肠杆菌(1 276, 27.93%)和变形菌门(981, 21.48%)。

### 2.7.3 GO 数据库注释

对基因组序列进行 GO 注释后, 结果如图 6 所示, 共有 3 963 条序列获得了 GO 注释, 涉及到了三大分支的 41 个二级功能条目。细胞组分注释条目约占总功能条目的 33.99%, 主要包括细胞及细胞膜组分。分子功能注释约占总注释条目的 25.53%, 主要包括催化活性、结合功能和转运活性。生物学过程注释条目约占总功能注释的 40.48%, 主要与代谢过程、细胞过程和单有机体过程有关。

### 2.7.4 KEGG 功能统计分析结果

KEGG 注释表明, 共有 3 208 条序列得到注

表4 基因岛预测结果

Table 4 Gene island prediction results

基因岛 Genomic_island	位置 Location	基因位点 Position
Genomic_island_1	染色体 Chromosome	20 522–58 730
Genomic_island_2	染色体 Chromosome	943 173–949 462
Genomic_island_3	染色体 Chromosome	950 350–960 298
Genomic_island_4	染色体 Chromosome	967 628–976 181
Genomic_island_5	染色体 Chromosome	1 225 186–1 231 304
Genomic_island_6	染色体 Chromosome	1 352 617–1 360 222
Genomic_island_7	染色体 Chromosome	1 435 851–1 443 492
Genomic_island_8	染色体 Chromosome	1 598 463–1 606 978
Genomic_island_9	染色体 Chromosome	1 844 681–1 854 778
Genomic_island_10	染色体 Chromosome	2 278 652–2 291 383
Genomic_island_11	染色体 Chromosome	2 388 094–2 401 258
Genomic_island_12	染色体 Chromosome	2 577 489–2 590 216
Genomic_island_13	染色体 Chromosome	2 708 837–2 718 926
Genomic_island_14	染色体 Chromosome	3 010 175–3 025 705
Genomic_island_15	染色体 Chromosome	3 165 526–3 198 838
Genomic_island_16	染色体 Chromosome	3 862 106–3 881 888
Genomic_island_17	染色体 Chromosome	4 083 440–4 110 957
Genomic_island_18	染色体 Chromosome	4 539 988–4 548 976
Genomic_island_19	染色体 Chromosome	4 584 358–4 596 058
Genomic_island_20	pTL13-1	33 489–46 613
Genomic_island_21	pTL13-1	58 661–68 118
Genomic_island_22	pTL13-1	70 829–80 670

NR homologous species distribution

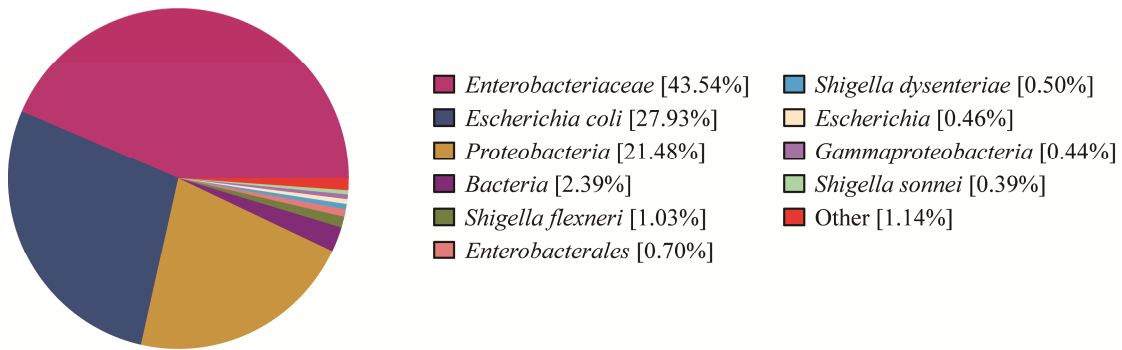


图 5 菌株 TL-13 NR 数据库的注释结果统计

Figure 5 NR database annotation result statistical chart of strain TL-13.

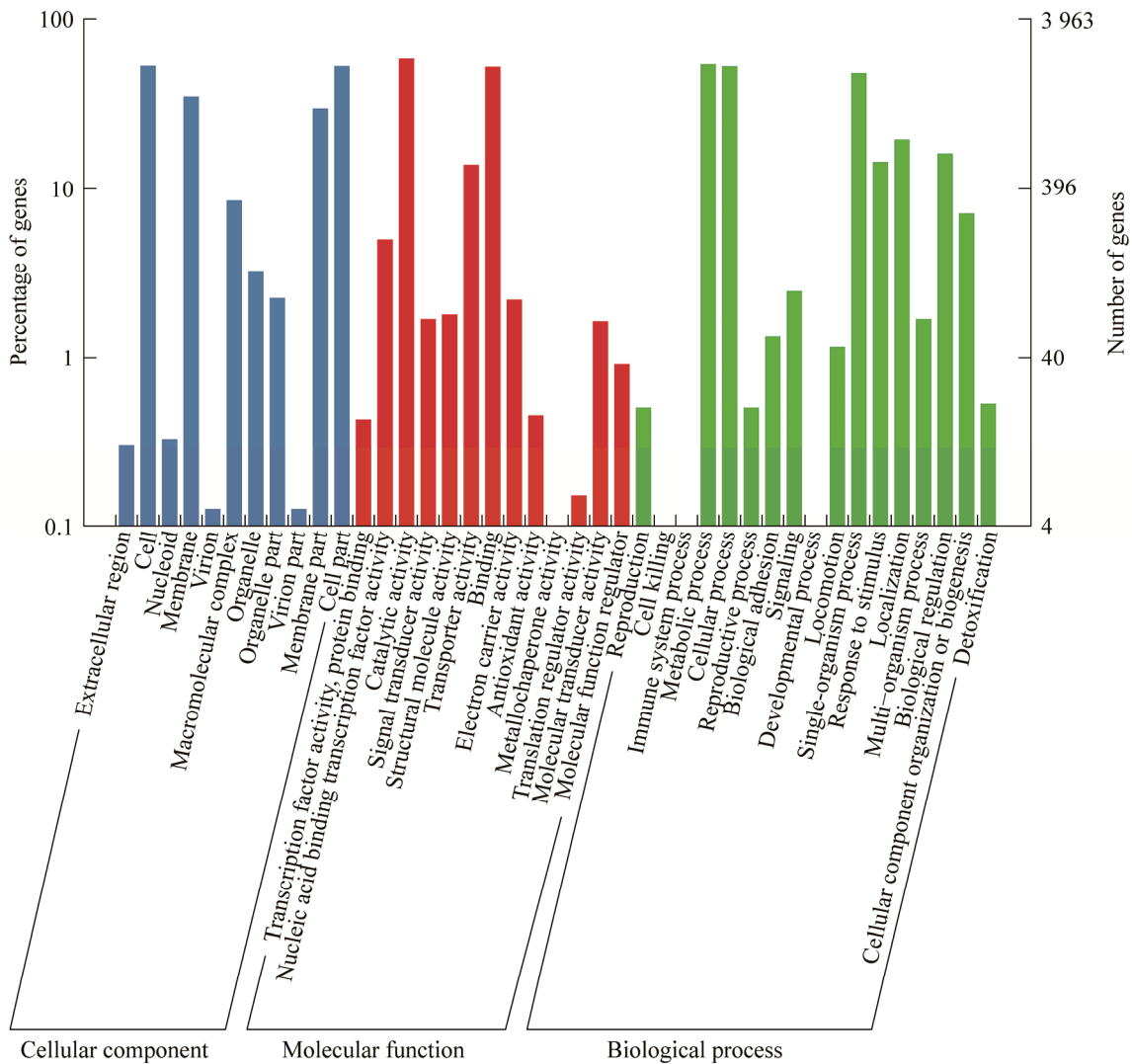


图 6 菌株 TL-13 GO 功能分类图

Figure 6 GO functional classification diagram of strain TL-13.

释, 其中 2 071 条序列参与到了 49 条通路。对这 49 条通路进行归类统计后, 共分为环境信息处理、细胞加工、新陈代谢和遗传信息处理 4 个大类, 如图 7 所示。注释到“新陈代谢”大类的序列数量最多, 共 1 428 条, 共涉及 38 个次级条目。

### 2.7.5 耐药基因预测结果

在测序菌株中, 共预测到 72 个耐药相关基因, 其中染色体存在的耐药基因以外排泵、细菌转运蛋白为主。质粒中共携带有 17 个可移动耐药基因(表 5), 其中 *TEM-1* 为 2 个质粒的共有耐药基因。质粒中耐药基因分布集中, 附近

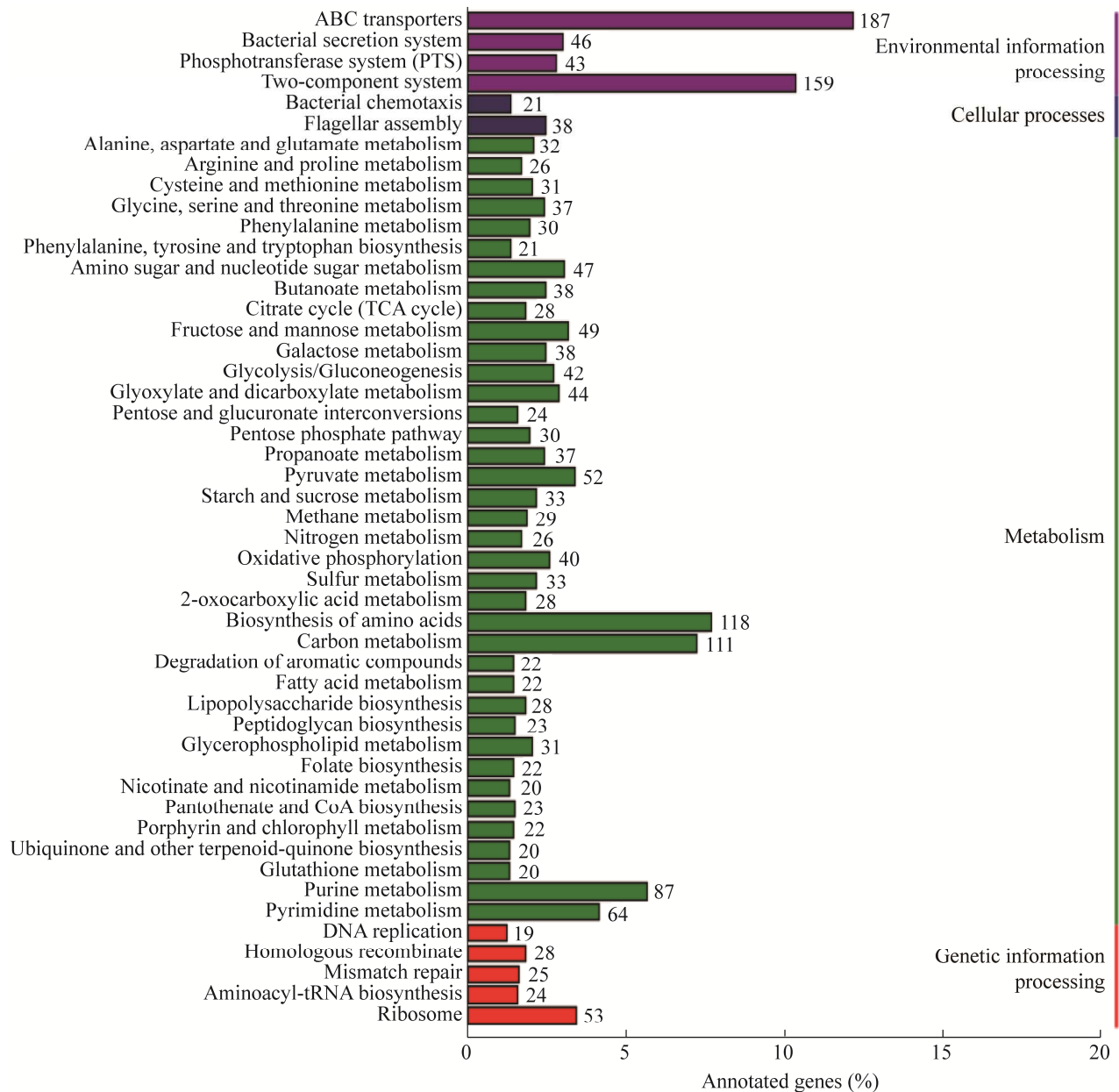


图 7 菌株 TL-13 KEGG 功能统计分类图

Figure 7 KEGG functional statistics classification diagram of strain TL-13.

表 5 质粒携带耐药基因预测结果

Table 5 Prediction results of plasmid carrying drug resistance genes

耐药基因	位置	基因位点	耐药表型
Antimicrobial resistance genes	Location	Position	Antibiotic resistance phenotype
<i>APH(3')-Ia</i>	pTL13-1	28 600–29 415	氨基糖苷类抗生素 Aminoglycoside antibiotic
<i>cmlA6</i>	pTL13-1	23 822–25 081	苯丙醇类抗生素 Phenicol antibiotic
<i>aadA2</i>	pTL13-1	25 343–26 122	氨基糖苷类抗生素 Aminoglycoside antibiotic
<i>qacH</i>	pTL13-1	22 436–22 768	氟喹诺酮类抗生素 Fluoroquinolone antibiotic
<i>aadA</i>	pTL13-1	22 938–23 717	氨基糖苷类抗生素 Aminoglycoside antibiotic
<i>sul3</i>	pTL13-1	20 465–21 256	磺胺类抗生素 Sulfonamide antibiotic
<i>TEM-1</i>	pTL13-1	16 525–17 385	$\beta$ -内酰胺类抗生素 Beta-lactam antibiotic
<i>mef(B)</i>	pTL13-1	18 450–18 704	大环内酯类抗生素 Macrolide antibiotic
<i>dfra12</i>	pTL13-1	26 542–27 039	二氨基嘧啶类抗生素 Diaminopyrimidine antibiotic
<i>TEM-1</i>	pTL13-2	29 571–30 431	$\beta$ -内酰胺类抗生素 Beta-lactam antibiotic
<i>floR</i>	pTL13-2	36 612–37 826	苯丙醇类抗生素 Phenicol antibiotic
<i>tet(C)</i>	pTL13-2	38 426–39 625	四环素类抗生素 Tetracycline antibiotic
<i>rmtB</i>	pTL13-2	30 601–31 356	氨基糖苷类抗生素 Aminoglycoside antibiotic
<i>APH(6)-Id</i>	pTL13-2	40 961–41 704	氨基糖苷类抗生素 Aminoglycoside antibiotic
<i>TEM-206</i>	pTL13-2	11 190–11 927	$\beta$ -内酰胺类抗生素 Beta-lactam antibiotic
<i>FosA3</i>	pTL13-2	9 628–10 044	磷霉素类抗生素 Fosfomycin
<i>vgaC</i>	pTL13-2	51 394–51 624	链霉素抗生素 Streptogramin antibiotic
<i>CTX-M-55</i>	pTL13-2	12 709–13 584	头孢菌素类抗生素 Cephalosporin

存在转座酶等移动元件,证实质粒中携带的耐药基因可通过整合的方式水平传递。

### 3 讨论与结论

现阶段,在肉牛养殖业中预防和及时有效治疗犊牛腹泻仍是世界范围内较为严峻的挑战<sup>[4]</sup>。据报道,在美国 39%犊牛死亡是由腹泻引起<sup>[15]</sup>;韩国的犊牛因腹泻死亡比例达 53.4%<sup>[16]</sup>。犊牛腹泻病因复杂多样,包括非感染性和感染性(非病原性和病原性)因素<sup>[17]</sup>。本试验采集的 40 份样本中,犊牛腹泻大肠杆菌的分离率为 50%,虽在其他样本中也检出有沙门氏菌、志贺氏菌和牛病毒性腹泻病毒等病原微生物,但致犊牛腹泻主要为大肠杆菌感染。

本试验中 20 株犊牛腹泻大肠杆菌药敏试验结果显示,在选取的阿米卡星、卡那霉素和恩诺沙星等 15 种药物中,链霉素、庆大霉素和

环丙沙星等 9 种药物的耐药率在 50%以上。在国内牛源大肠杆菌耐药性研究中,张金宝等<sup>[18]</sup>对宁夏地区牛源大肠杆菌耐药性的调查显示,环丙沙星和恩诺沙星的耐药率分别为 6.12%和 19.70%;庆大霉素和阿米卡星的耐药率分别为 40.91%和 15.15%。赵红霞等<sup>[19]</sup>研究表明,呼和浩特地区致病性奶牛源大肠杆菌对链霉素、氨基西林、土霉素和四环素的耐药率分别为 76.2%、90.5%、100%和 95.2%。结合王丽娟等<sup>[3]</sup>和高海慧等<sup>[4]</sup>研究结果表明,我国不同地区的牛源大肠杆菌耐药性有所差异,但对四环素、庆大霉素和链霉素等临床常用药物均已呈现较高耐药率,因此,在临床用药选择中,应结合所在区域耐药流行情况合理选用抗生素。

耐药基因检测结果表明,20 株分离菌中, $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *TEM-1*、喹诺酮类耐药基因 *qnrS*、氨基糖苷类耐药基因 *aphA1* 和 *strB* 的

检出率均为 100%；而喹诺酮类耐药基因 *qnrB*、*qnrC* 和 *qnrD* 均未检出。由此可见，上述 3 种耐药基因在通辽地区的流行率较低。此外，对 4 号菌株(TL-13)进行全基因组测序，结果获得了完整的染色体序列和 2 个质粒序列。其耐药基因的携带和分布显示，可水平传递的耐药基因主要存在于质粒中，2 个质粒分别携带有 9 个可移动耐药基因，其中 *TEM-1* 为共有基因。另外，在 2 个质粒中均预测有 2 个复制子，证实质粒的适应性较强，可在不同菌株中复制。在耐药基因簇附近序列中，存在转座酶、松弛酶和细菌 IV 型分泌系统基因，证实其具有较强的水平转移潜力。质粒携带的 18 个耐药基因中，包含 9 类抗生素耐药基因，其中氨基糖苷类耐药基因数量最多。在其他相关报道中，*APH(3)*、*aadA*、*TEM*、*sul3*、*dfrA*、*tetC* 和 *CTX-M* 等基因在牛源大肠杆菌中流行率较高，而且在不同国家均有流行，常以基因盒形式存在，以整合子、转座子或插入序列方式存在于染色体或质粒 DNA 中<sup>[20-21]</sup>。然而本实验全基因组测序菌株染色体中未发现可移动元件所携带的耐药基因，18 个可水平转移耐药基因均存在于质粒中。本实验中所分离菌株时间跨度较短，且菌株数量较少，不能完全体现通辽地区犊牛腹泻大肠杆菌的耐药现状。在后续研究中，将继续分离犊牛腹泻大肠杆菌，持续监测耐药性发展及耐药基因携带情况，并选择更多菌株进行全基因组测序。本研究为持续监测犊牛腹泻大肠杆菌耐药性发展、耐药基因携带情况和后续深入研究提供了参考。

## REFERENCES

- [1] Ngeleka M, Godson D, Vanier G, Desmarais G, Wojnarowicz C, Sayi S, Huang YY, Movasseghi R, Fairbrother JM. Frequency of *Escherichia coli* virotypes in calf diarrhea and intestinal morphologic changes associated with these virotypes or other diarrheagenic pathogens[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2019, 31(4): 611-615
- [2] Cho YI, Yoon KJ. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention[J]. Journal of Veterinary Science, 2014, 15(1): 1-17
- [3] 王丽娟, 王宁宁, 王乐, 李芬, 刘晓强, 王妍, 李勤凡. 牛源大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(2): 8-13  
Wang LJ, Wang NN, Wang L, Li F, Liu XQ, Wang Y, Li QF. Resistance of *Escherichia coli* from dairy to fluoroquinolones[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2021, 49(2): 8-13 (in Chinese)
- [4] 高海慧, 黎玉琼, 高小斐, 王培柱, 吴学青, 康晓冬, 梁小军. 犊牛腹泻源大肠杆菌耐药情况及 HPI 相关基因的检测[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(6): 1942-1951  
Gao HH, Li YQ, Gao XF, Wang PZ, Wu XQ, Kang XD, Liang XJ. Drug resistance and detection of HPI related genes in *E. coli* from calves with diarrhea[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(6): 1942-1951 (in Chinese)
- [5] Alawneh JI, Vezina B, Ramay HR, Al-Harbi H, James AS, Soust M, Moore RJ, Olchoway TWJ. Survey and sequence characterization of bovine mastitis-associated *Escherichia coli* in dairy herds[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 582297
- [6] 蔺旭光, 李佳怡, 牛天明, 娜仁图雅, 刘镛. 一株猪肺炎木糖氧化杆菌分离鉴定及系统进化树分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(10): 908-911  
Lin XG, Li JY, Niu TM, Na RTY, Liu K. Identification and phylogenetic analysis for *Achromobacter xylosoxidans* in porcine pneumonia[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2017, 33(10): 908-911 (in Chinese)
- [7] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Clinical Laboratory Standard Institution[CLSI]: Wayne, PA, USA, 2015
- [8] Deamer D, Akesson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(5): 518-524
- [9] Jain M, Olsen HE, Paten B, Akesson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community[J]. Genome Biology, 2016, 17(1): 239

- [10] Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11: 119
- [11] Bertelli C, Brinkman FSL. Improved genomic island predictions with IslandPath-DIMOB[J]. Bioinformatics, 2018, 34(13): 2161-2167
- [12] Jia BF, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo PY, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D566-D573
- [13] Chen LH, Yang J, Yu J, Yao ZJ, Sun LL, Shen Y, Jin Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(suppl\_1): D325-D328
- [14] Klein-Jöbstl D, Iwersen M, Drillich M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(8): 5110-5119
- [15] Kim HS, Whon TW, Sung H, Jeong YS, Jung ES, Shin NR, Hyun DW, Kim PS, Lee JY, Lee CH, et al. Longitudinal evaluation of fecal microbiota transplantation for ameliorating calf diarrhea and improving growth performance[J]. Nature Communications, 2021, 12: 161
- [16] Hur TY, Jung YH, Choe CY, Cho YI, Kang SJ, Lee HJ, Ki KS, Baek KS, Suh GH. The dairy calf mortality: the causes of calf death during ten years at a large dairy farm in Korea[J]. Korean Journal of Veterinary Research, 2013, 53(2): 103-108
- [17] Meganck V, Hoflack G, Opsomer G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2014, 56(1): 75
- [18] 张金宝, 马春芳, 余婷, 李晓娜, 魏小平, 王桂琴. 宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌毒力基因检测和耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(1): 177-182
- Zhang JB, Ma CF, Yu T, Li XN, Wei XP, Wang GQ. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance analysis of *Escherichia coli* isolated from dairy cow mastitis in Ningxia[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2016, 47(1): 177-182 (in Chinese)
- [19] 赵红霞, 李培锋, 吴聪明, 樊宏亮, 沈建忠. 奶牛子宫内膜炎大肠杆菌耐药性及其与整合子关系的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(1): 142-144
- Zhao HX, Li PF, Wu CM, Fan HL, Shen JZ. Research of drug-resistance of *Escherichia coli* isolated from bovine with endometritis and the relationship between antibiotic resistance and integron[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2009, 40(1): 142-144 (in Chinese)
- [20] 梁圆, 张丹丹, 程景, 李博, 靳光, 王栋才, 张元庆. 犊牛源大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(5): 52-57, 63
- Liang Y, Zhang DD, Cheng J, Li B, Jin G, Wang DC, Zhang YQ. Isolation, identification and antimicrobial resistance analysis of *Escherichia coli* from calves[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58(5): 52-57, 63 (in Chinese)
- [21] Leekitcharoenphon P, Johansson MHK, Munk P, Malorny B, Skarżyńska M, Wadepohl K, Moyano G, Hesp A, Veldman KT, Bossers A, et al. Genomic evolution of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 15108