

荧光 PCR 法检测原料乳中大肠埃希氏菌喹诺酮类的耐药基因

赵琳娜, 刘娜, 王学硕, 崔生辉*, 路勇*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 建立大肠埃希氏菌喹诺酮类耐药基因的 *TaqMan* 荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测方法, 为原料乳中耐药大肠埃希氏菌的监测提供技术方案。**方法** 利用 Chelex 100 法快速获取细菌基因组 DNA, 对大肠埃希氏菌 *aac(6′)-Ib-cr* 和 *qepA* 基因的序列进行分析, 利用 Primer Express 3.0 软件设计特异性引物和探针, 建立单重和双重 *TaqMan* 荧光 PCR 方法。通过耐药基因阳性菌株和原料乳中分离的大肠埃希氏菌菌株, 对方法的特异性和灵敏度进行评估。**结果** 建立的 *aac(6′)-Ib-cr* 和 *qepA* 基因的单重和双重荧光 PCR 反应均有特异性曲线扩增, 方法灵敏度为 10^4 CFU/mL。北京地区 52 份原料乳中共分离出 32 株大肠埃希氏菌, 利用建立的双重荧光 PCR 方法检测 *aac(6′)-Ib-cr* 和 *qepA* 基因为阴性, 和环丙沙星肉汤稀释法药敏结果一致。**结论** 本方法针对 *aac(6′)-Ib-cr* 和 *qepA* 基因建立的 *TaqMan* 荧光 PCR 检测方法特异性强、灵敏度高, 可用于原料乳中大肠埃希氏菌常见喹诺酮类耐药基因的快速检测。

关键词: 大肠埃希氏菌; 喹诺酮类抗菌药; 耐药基因; 双重荧光 PCR

Determination of quinolones-resistance genes in raw milk-derived *Escherichia coli* real-time fluorescence PCR

ZHAO Lin-Na, LIU Na, WANG Xue-Shuo, CUI Sheng-Hui*, LU Yong*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish *TaqMan* real-time fluorescence PCR method for the detection of quinolones-resistance genes in raw milk-derived *Escherichia coli*, and to provide monitoring alternatives to monitor drug-resistant *Escherichia coli* in raw milk. **Methods** Chelex 100 method was used to extract bacterial genomic DNA. Based on the analysis of *aac(6′)-Ib-cr* and *qepA* gene sequences of *E.coli*, the specific primers and probes were designed by software Premier Express 3.0, and the single *TaqMan* real-time fluorescence PCR and duplex *TaqMan* real-time fluorescence PCR methods were established. The specificity and sensitivity of the method were evaluated by the drug-resistant gene-positive strains and the *Escherichia coli* strains isolated from raw milk. **Results** The *aac(6′)-Ib-cr* and *qepA* gene were amplified by single/duplex fluorescence PCR reactions, the sensitivity of the

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2018YFC1604303)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604303)

*通信作者: 崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: cuishenghui@aliyun.com

路勇, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: luyong0560@126.com

*Corresponding author: CUI Sheng-Hui, Ph.D, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: cuishenghui@aliyun.com

LU Yong, Ph.D, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: luyong0560@126.com

method was 10^4 CFU/mL. The duplex fluorescent PCR results of *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* gene in the 32 strains of *Escherichia coli* isolated from 52 raw milk samples in Beijing were negative, which was consistent with the results of ciprofloxacin broth dilution method. **Conclusion** The established Taqman fluorescence PCR detection method is highly specific and sensitive, and it can be used for rapid detection of quinolones-resistance genes of *Escherichia coli* in raw milk.

KEY WORDS: *Escherichia coli*; quinolones; drug resistance genes; duplex fluorescence PCR

0 引言

随着经济发展和人民生活水平的逐渐提高,消费者对乳及乳制品的质量安全更加重视。目前奶牛乳房炎是奶牛普遍发生的疾病^[1],金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、链球菌和克雷伯氏菌是引起乳房炎的主要病原微生物^[2-3],大肠埃希氏菌是引起乳房炎的第二大病原菌,仅次于金黄色葡萄球菌^[4-5]。奶牛乳房炎的预防和治疗离不开抗生素的使用,但随着抗生素的滥用,近几年奶牛乳房炎中致病菌株耐药性的不断增强,引起了国内外大量学者的关注^[6-8]。

喹诺酮类药物是治疗由大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)引起各种感染的常用药物之一,主要有诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、安妥沙星、德拉沙星、奈诺沙星和非那沙星等^[7],其中环丙沙星、诺氟沙星等是人兽共用抗菌药物。由于其具有广谱抗菌作用、生物利用度高,尤其对需氧革兰阴性杆菌的抗菌活性高、起效快、低毒,使得其不仅在国内畜牧养殖业中被广泛使用,而且也成为治疗多种细菌感染疾病的常用药物^[9],但其所引起的严重耐药问题越来越突出,有研究^[10]显示,我国50%~70%的大肠埃希氏菌已对其产生耐药性,且该耐药基因可在人和动物肠道中水平转移至其他细菌^[11],这给疾病的预防和治疗带来新的挑战。

细菌对喹诺酮类药物存在多种耐药机制,主要包括染色体基因突变引起的喹诺酮类耐药和可移动质粒编码介导的喹诺酮类耐药(plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR)^[12]。目前发现4类PMQR蛋白,包括重复五肽家族成员编码喹诺酮类耐药基因Qnr(quinolone resistance)蛋白、氨基糖苷乙酰转移酶[Aac(6')-Ib-cr]以及2个外排泵蛋白QepA和OqxAB,PMQR蛋白虽然能通过不同作用机制介导低水平喹诺酮类耐药,但增加了细菌中喹诺酮类耐药决定区DNA解旋酶和拓扑异构酶IV(topoisomerase, IV)的突变几率,使由染色体介导的喹诺酮类药物高水平耐药几率显著增加^[13]。PMQR的出现将会加快喹诺酮类耐药基因在细菌间的传播,故快速准确地对耐药微生物进行检测不仅对于指导奶牛养殖业抗生素正确使用具有重要意义,对于食品安全保障也意义重大。

微生物耐药性的常规检测方法主要包括肉汤稀释法、琼脂稀释法、纸片扩散法和全自动微生物检测法。随着分子生物学的发展,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术为耐药基因的检测提供了有力的技术手段。目前对于喹诺酮类耐药基因的检测多是采用普通PCR,基于TaqMan实时荧光PCR对耐药基因进行检测的报道较少。本研究尝试建立单重和双重TaqMan实时荧光PCR方法对大肠埃希氏菌中的*aac(6')-Ib-cr*和*qepA*基因进行快速检测,并且对来自北京地区奶牛场52份原料乳中分离的32株大肠埃希氏菌进行药物敏感性实验和耐药基因筛查,了解原料乳中大肠埃希氏菌的耐药情况,以期为指导饲养环节合理使用抗生素提供依据,为乳制品安全保障的第一道防线提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1389 生物安全柜、205050GC 恒温培养箱、FORMA INCUBATED BENCHTOP 恒温摇床、LEGEND Micro21R 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PL2002 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); Bio-Rad C1000 Thermal cycler 实时荧光 PCR 仪(美国伯乐公司); Thermo mixer comfort 恒温振荡加热仪(德国艾本德公司); Bruker Autoflex II 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司)。

改良 EC 肉汤(modified EC broth, mEC)(批号: 24794)、伊红美蓝琼脂培养基(eosin-methylene blue agar, EMB)(批号: 236950)、大豆酪蛋白琼脂培养基(tryptic soy agar, TSA)(批号: 236950)(美国 BD 公司); Chelex-100(货号: 1422832)(美国伯乐公司); TaKaRa Ex Taq 250U、dNTP mixture 2.5 mmol/L[宝生物工程(大连)有限公司]; 2×super Real Premix (probe)(天根生化科技有限公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

实验菌株为5株*qepA*阳性大肠埃希氏菌,菌株编号为FC6713、FC6714、FC6716、FC6719和FC6972; 8株*aac(6')-Ib-cr*阳性大肠埃希氏菌,菌株编号为FC6644、FC6645、FC6646、FC6648、FC6654、FC6660、FC6666和FC6682; 2株*aac(6')-Ib-cr*和*qepA*同时阳性大肠埃希氏菌,菌株编号为FC6654和FC6687; 实验用标准菌株大肠

埃希氏菌 ATCC25922、沙门氏菌 ATCC14028、金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 以上菌株均由本实验室前期研究收集和保存。

52 份原料乳采集自北京地区 44 个奶牛场。

1.2 实验方法

1.2.1 原料乳中大肠埃希氏菌分离

参考 GB 4789.36—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验》和 GB 4789.38—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》, 无菌操作取 25 g 原料乳加入到含有 225 mL mEC 肉汤的均质袋中, 连续均质 1 min, 36 °C 培养 24 h。取增菌后的 mEC 肉汤, 划线接种于 EMB 平板, 36 °C 培养 24 h, 观察平板上有黑色中心有光泽或无光泽的典型菌落, 将典型菌落接种于 TSA 平板上, 36 °C 培养 24 h, 取培养物利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 进行鉴定。

1.2.2 Chelex 100 法提取基因组 DNA

收集菌体于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 200 μ L 5% Chelex 100 溶液, 涡旋振荡混合均匀, 沸水浴加热 10 min, 冷却至室温后 12000 r/min 离心 10 min, 上清液即为 DNA 模板, 于 -20 °C 保存备用。

1.2.3 引物探针设计

通过文献查阅^[14-16], 在 GenBank 获取大肠埃希氏菌 *qepA* (MK291500.1) 和 *aac(6')-Ib-cr* (LC556213.1) 基因片段, 利用 DNAMAN 软件进行序列比对, 利用 Primer Express 3.0 软件进行上、下游引物和探针序列设计, 具体序列见表 1。引物序列由上海英潍捷基公司合成。

1.2.4 PCR 反应条件

单重 PCR 反应体系中, 上、下游引物浓度各为 250 nmol/L, 探针浓度为 150 nmol/L, dNTP 浓度为 0.2 mmol/L, *Taq* 酶为 2 IU, 模板 1 μ L, 用 ddH₂O 补足总体积为 20 μ L。扩增条件: 95 °C, 10 min; 95 °C, 10 s, 60 °C,

30 s, 40 个循环; 在 60 °C 时分别检测 VIC 和 CY5 2 个通道的荧光值, Ct < 35 为阳性, VIC 通道为 *qepA* 片段, CY5 通道为 *aac(6')-Ib-cr* 片段。在单重 PCR 反应体系建立后, 将 2 对引物和探针加入同一反应体系中, 扩增条件在 60 °C 时同时检测 VIC 和 CY5 2 个通道的荧光值, Ct < 35 为阳性。

1.2.5 PCR 反应敏感性检测

将阳性菌株菌悬液用生理盐水进行 10¹~10⁸ 倍梯度稀释离心去上清, 菌体利用 Chelex 100 法提取细菌基因组 DNA, 进行荧光 PCR 扩增, 同时选择 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 稀释液, 利用螺旋涂布仪 E50 模式涂布于 TSA 平板, 36 °C 培养 24 h, 进行计数。根据菌落计数结果和 PCR 结果, 确定最低检出浓度。

1.2.6 PCR 反应特异性实验

利用所建立的方法检测除耐药大肠埃希氏菌之外的敏感大肠埃希氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌, 以验证实验的特异性。

1.2.7 抗生素最低抑菌浓度

参考临床实验室标准化委员会 (Committee for Standardization of Clinical Laboratories, CLSI) 2019 版, 使用肉汤稀释法测定大肠埃希氏菌对环丙沙星的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值, 并参照 CLSI 判断 MIC 结果是否为耐药或敏感。

1.2.8 原料乳中分离大肠埃希氏菌的检测

用双重 *TaqMan* 实时荧光 PCR 方法对原料乳分离大肠埃希氏菌进行耐药基因检测, 调查原料乳中分离大肠埃希氏菌对喹诺酮类药物的耐药情况。

2 结果与分析

2.1 原料乳中大肠埃希氏菌分离结果

对 52 份原料乳进行大肠埃希氏菌分离, 32 个样本分离到典型菌落, 经 MALDI-TOF MS 鉴定为大肠埃希氏菌, 结果见表 2。大肠埃希氏菌的分离率为 61.5%。

表 1 基因检测用引物和探针序列表
Table 1 Information of primers and probes for gene detection

| 基因 | 引物和探针序列(5'~3') | 片段长度/bp |
|----------------------|------------------------------------------|---------|
| <i>qepA</i> | F: CCGAGGCGAATGCGAATAA | 91 |
| | R: TCTCTGGATCCTGGACATCTAC | |
| | P: VIC-TGCCCATGGTGATCAGGAAGCC-BHQ | |
| <i>aac(6')-Ib-cr</i> | F: CCGACACTTGCTGACGTACAG | 98 |
| | R: ACCCAATCGGCTCTCCATTC | |
| | P: CY5-AGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACCTC-BHQ | |

表2 分离菌株飞行时间质谱鉴定结果

Table 2 Identification of isolated strains by MALDI-TOF

| 菌株号 | 鉴定结果 | 鉴定分值 | 菌株号 | 鉴定结果 | 鉴定分值 |
|-----|-------------------------|-------|-----|-------------------------|-------|
| 1 | <i>Escherichia coli</i> | 2.426 | 17 | <i>Escherichia coli</i> | 2.543 |
| 2 | <i>Escherichia coli</i> | 2.443 | 18 | <i>Escherichia coli</i> | 2.431 |
| 3 | <i>Escherichia coli</i> | 2.136 | 19 | <i>Escherichia coli</i> | 2.535 |
| 4 | <i>Escherichia coli</i> | 2.426 | 20 | <i>Escherichia coli</i> | 2.136 |
| 5 | <i>Escherichia coli</i> | 2.398 | 21 | <i>Escherichia coli</i> | 2.569 |
| 6 | <i>Escherichia coli</i> | 2.483 | 22 | <i>Escherichia coli</i> | 2.548 |
| 7 | <i>Escherichia coli</i> | 2.314 | 23 | <i>Escherichia coli</i> | 2.566 |
| 8 | <i>Escherichia coli</i> | 2.488 | 24 | <i>Escherichia coli</i> | 2.597 |
| 9 | <i>Escherichia coli</i> | 2.353 | 25 | <i>Escherichia coli</i> | 2.438 |
| 10 | <i>Escherichia coli</i> | 2.390 | 26 | <i>Escherichia coli</i> | 2.441 |
| 11 | <i>Escherichia coli</i> | 2.326 | 27 | <i>Escherichia coli</i> | 2.326 |
| 12 | <i>Escherichia coli</i> | 2.546 | 28 | <i>Escherichia coli</i> | 2.398 |
| 13 | <i>Escherichia coli</i> | 2.482 | 29 | <i>Escherichia coli</i> | 2.443 |
| 14 | <i>Escherichia coli</i> | 2.518 | 30 | <i>Escherichia coli</i> | 2.576 |
| 15 | <i>Escherichia coli</i> | 2.542 | 31 | <i>Escherichia coli</i> | 2.322 |
| 16 | <i>Escherichia coli</i> | 2.342 | 32 | <i>Escherichia coli</i> | 2.446 |

注: 鉴定分值 ≥ 2.000 为鉴定到种水平可信; 分值在1.700~1.999之间为鉴定到属水平可信; 分值 < 1.700 鉴定结果不可信。

2.2 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因荧光 PCR 结果

2.2.1 单重荧光 PCR 结果

利用 Chelex 100 法对喹诺酮类耐药菌株进行基因组 DNA 提取, 并分别进行 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因的单重荧光 PCR 扩增, 扩增结果如图 1 和图 2 所示, 耐药菌株均获得了特异性扩增曲线, 且 $Ct < 30$, 空白对照无扩增曲线, 说明 Chelex 100 法提取的 DNA 适用于 TaqMan 荧光 PCR 反应实验。

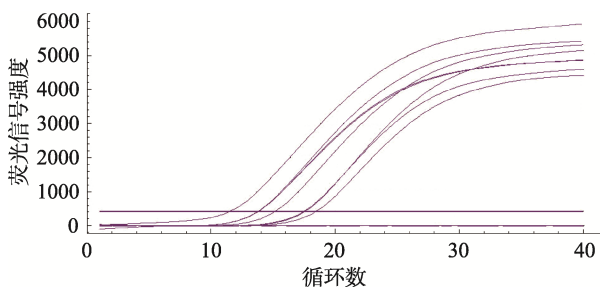


图1 8株 *aac(6')-Ib-cr* 阳性大肠埃希氏菌 *aac(6')-Ib-cr* 基因 TaqMan 实时荧光 PCR 结果

Fig.1 TaqMan real-time PCR results of *aac(6')-Ib-cr* gene in 8 strains of *Escherichia coli* with positive *aac(6')-Ib-cr* gene

2.2.2 双重荧光 PCR 结果

对 2 株喹诺酮类耐药菌株进行 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因双重 TaqMan 实时荧光 PCR 扩增, 结果如图 3 所示, 耐药菌株同时获得了 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因特异性扩增曲线, $Ct < 30$, 空白对照无扩增曲线, 说明双重荧光 PCR 反

应体系建立可以实现目标基因的扩增。

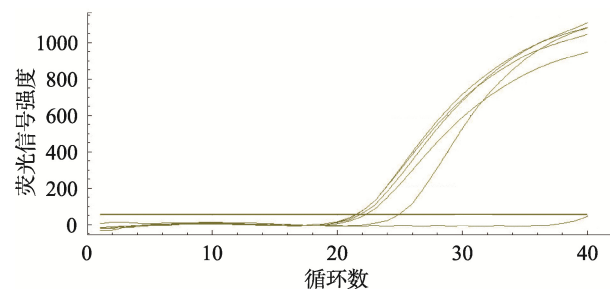


图2 5株 *qepA* 阳性大肠埃希氏菌 *qepA* 基因 TaqMan 实时荧光 PCR 结果

Fig.2 TaqMan real-time PCR results of *qepA* gene in 5 strains of *Escherichia coli* with positive *qepA* gene

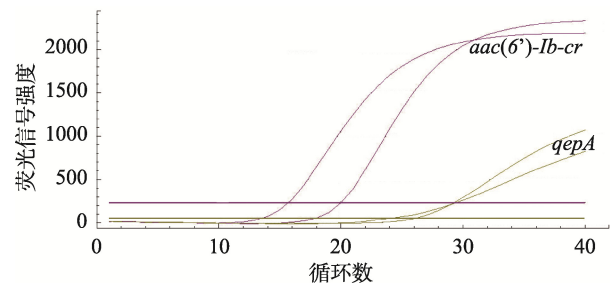
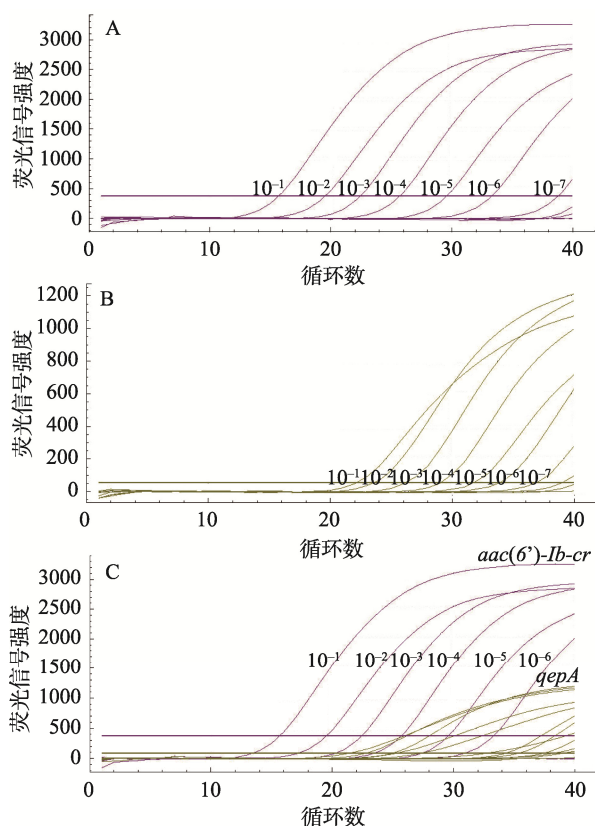


图3 2株 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因阳性大肠埃希氏菌双重 TaqMan 实时荧光 PCR 结果

Fig.3 TaqMan duplex real-time PCR results of *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* gene in 2 strains of *Escherichia coli* with positive *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* gene

2.3 实时荧光 PCR 反应敏感性结果

螺旋涂布计数结果显示 *aac(6')-Ib-cr* 阳性、*qepA* 阳性、*aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 同时阳性 3 株大肠埃希氏菌在 10^{-7} 稀释度时, 平板上分别生长有 59、69 和 65 个菌落, 由此可计算出初始菌液浓度均为 1×10^{10} CFU/mL。将其进行 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 系列稀释, 不同稀释度菌液获得的 DNA 作为模板进行荧光 PCR 扩增, 结果如图 4 所示, $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释度可以得到有效的扩增曲线, Ct 值均 < 35 。因此, 单重荧光 PCR 和 双重荧光 PCR 检测灵敏度均可达到 1×10^4 CFU/mL, 即每毫升样品中含有 1×10^4 个细菌时, 可以检测出耐药基因。



注: A: *aac(6')-Ib-cr* 基因实时荧光 PCR 结果; B: *qepA* 基因实时荧光 PCR 结果; C: *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因双重实时荧光 PCR 结果。

图 4 TaqMan 实时荧光 PCR 检测方法灵敏度实验结果

Fig.4 Sensitivity test results of TaqMan real-time fluorescence PCR

2.4 PCR 反应特异性实验结果

aac(6')-Ib-cr 和 *qepA* 基因引物和探针特异性实验结果见图 5, 除耐药基因阳性菌株外, 大肠埃希氏菌 ATCC25922、沙门氏菌 ATCC14028、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 作为阴性对照和空白对照均无荧光信号检出, 说明 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因的引物和探针具有很好的特异性。

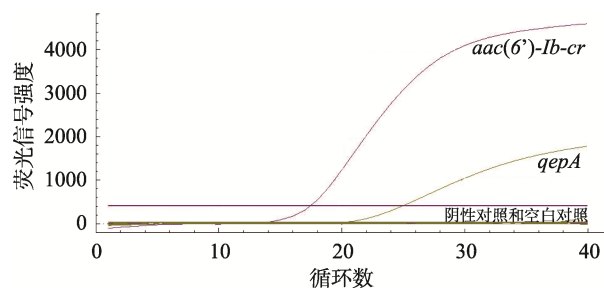


图 5 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因引物和探针特异性实验结果

Fig.5 The results of the primers and probes specificity of *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes

2.5 原料乳分离大肠埃希氏菌耐药检测结果

对采集自北京地区 44 个奶牛场的 52 份原料乳分离出的 32 株大肠埃希氏菌, 利用建立的荧光 PCR 方法对其进行了喹诺酮类耐药基因检测, 均未检出 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qepA* 基因。同时, 采用微量肉汤稀释法对菌株进行了环丙沙星耐药性实验, 实验结果表明, 32 株大肠埃希氏菌对环丙沙星均敏感。

3 结论与讨论

抗生素在动物中的使用对细菌耐药性的产生会有潜在影响^[17]。大肠埃希氏菌耐药菌株可以通过食物链感染人和动物, 潜在风险较大。对于耐药菌株的检测方法主要是分离培养鉴定和药物敏感性实验, 至少需要 3~4 d, 对于原料乳中耐药细菌的及时发现有一定限制。实时荧光 PCR 法因为具有灵敏、快速、少污染和操作简便等优点, 近年来得到广泛的应用^[18]。本研究充分利用实时荧光 PCR 技术的多通道同时检测的特点, 采取单重和双重荧光标记的探针设计方案, 对不同的基因片段同时检测, 以便快速、准确了解原料乳中大肠埃希氏菌喹诺酮类耐药情况。

aac(6')-Ib 是重要的氨基糖苷乙酰基转移酶, 其变异基因 *aac(6')-Ib-cr* 可同时作用于氨基糖苷类和喹诺酮两类结构不同的抗生素, 而且有研究发现 *aac(6')-Ib-cr* 对氨基糖苷类和喹诺酮类抗生素的作用机制是不同的^[19]。另外, β -内酰胺酶基因也能促使 *aac(6')-Ib-cr* 耐药菌产生更广泛的多重耐药性。*qepA* 基因是近 10 年来新发现的一个 PMQR 基因, 其主要喹诺酮类耐药机制包括点突变和药物外排 2 种, 近几年 *qepA* 基因的菌株携带率也呈快速增长趋势^[20-22]。本实验室前期对我国临床分离的大肠埃希氏菌耐药研究中发现单独含有 *qepA* 的菌株对环丙沙星高度耐药^[23]。*aac(6')-Ib-cr* 常与 β -内酰胺酶类耐药基因 *blaCTX-M* 存在于同一质粒, 也有关于 *qepA* 基因与 *blaCTX-M* 存在于同一质粒的报道, 但目前还不清楚 *qepA* 基因与 β -内酰胺酶类耐药基因之间是否存在某种相关性^[24]。携带 *aac(6')-Ib-cr* 和(或)*qepA* 基因

的耐药菌株常与养殖业大量使用抗生素有关。本研究选择 *aac(6′)-Ib-cr* 和 *qepA* 2 个基因作为目标基因,设计引物和探针,所建立的 *TaqMan* 实时荧光 PCR 检测方法特异性良好,灵敏度可达到 10^4 CFU/mL,可为检测大肠埃希氏菌对喹诺酮类药物的耐药基因提供新的技术手段。从实验结果中可以看到 *aac(6′)-Ib-cr* 和 *qepA* 2 个基因扩增的 Ct 值存在一定的差异,这可能是由于 *aac(6′)-Ib-cr* 基因和 *qepA* 基因在基因组中拷贝数不同引起的。

大肠埃希氏菌在我国是引起奶牛乳房炎的主要致病菌之一,在乳房炎和原料乳样品中存在大肠埃希氏菌的污染情况,有研究结果显示不同地区对喹诺酮类耐药率不同,这与不同地区的用药情况不同有紧密关系^[4,7,22]。本研究对 44 个牧场 52 份样本原料乳进行了大肠埃希氏菌的分离,利用快速、高通量的 MALDI-TOF MS 对可疑菌株进行鉴定,大肠埃希氏菌分离率为 61.5% (32/52),与利用 *uidA* 基因鉴定大肠埃希氏菌相比,不仅操作方便,而且能够提高检出率,有研究显示有 5% 的大肠埃希氏菌为 *uidA* 阴性,存在不能检出的个例^[25]。本研究药敏结果显示 32 株大肠埃希氏菌对环丙沙星均敏感, *aac(6′)-Ib-cr* 和 *qepA* 基因检测结果均为阴性,说明北京地区周边奶牛场喹诺酮类药物使用还在合理范围内。

综上所述,本研究建立的单重和双重 *TaqMan* 实时荧光 PCR 检测方法为大肠埃希氏菌质粒介导喹诺酮类耐药基因的检测提供了一种快速、简便、准确的方法,适宜于奶牛场奶源分离菌株对喹诺酮类药物耐药性检测,不仅对奶牛乳房炎等疾病用药和防治提供了技术支持和理论指导,而且对原料乳中耐药微生物的控制具有重要的意义,为乳制品的安全生产提供了第一道防线的技术保障。下一步将在本研究基础上继续探索质粒介导的 *qnr* 相关耐药基因的 *TaqMan* 实时荧光 PCR 检测方法。

参考文献

- [1] YANG F, LIU HL, LI YJ, *et al.* Short communication: N-Acetylcysteine-mediated modulation of antibiotic susceptibility of bovine mastitis pathogens [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 4300–4302.
- [2] CHRISTIAN B, VALERIE VM, JALIL M, *et al.* Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors [J]. *Vet Res*, 2003, 3(4): 521–564.
- [3] 黄学坤. 奶牛乳房炎的危害及其防治[J]. 中兽医学杂志, 2018, (2): 30. HUANG XK. Harm of bovine mastitis and its prevention [J]. *Chin J Tradit Vet Sci*, 2018, (2): 30.
- [4] 朱宁, 赵艳坤, 陈贺, 等. 上海地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国奶牛, 2020, (9): 31–35. ZHU N, ZHAO YK, CHEN H, *et al.* Isolation and identification drug resistance analysis of pathogen of dairy cow mastitis [J]. *China Dairy Cattle*, 2020, (9): 31–35.
- [5] ZHANG Z, LI XP, YANG F, *et al.* Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 6484–6493.
- [6] TODOROVIC D, VELHNER M, GREGO E, *et al.* Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from bovine clinical mastitis and pigs in the Vojvodina province, Serbia [J]. *Microb Drug Resist*, 2018, 24(1): 95–103.
- [7] 杨艳丽, 张星星, 黄新, 等. 牛源大肠杆菌质粒介导喹诺酮类耐药基因的检测分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(8): 2462–2469. YANG YL, ZHANG XX, HUANG X, *et al.* Analysis and detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in bovine *Escherichia coli*. [J]. *Chin J Anim Husbandry Vet Med*, 2019, 46(8): 2462–2469.
- [8] RAHMAN MA, RAHMAN A, ISLAM MA, *et al.* Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from milk, beef and chicken meat in Bangladesh [J]. *Bangl J Vet Med*, 2017, 15(2): 141–146.
- [9] 梁业飞. 喹诺酮类抗菌药物的临床应用研究进展[J]. 中国现代医生, 2015, 53(33): 153–160. LIANG YF. Research progress of clinical application of quinolones [J]. *China Mod Doc*, 2015, 53(33): 153–160.
- [10] NISCHAL PM. First global report on antimicrobial resistance released by the WHO [J]. *Natl Med J India*, 2014, 27(4): 241.
- [11] HWANG D, KIM SM, KIM HJ. Modelling of tetracycline resistance gene transfer by commensal *Escherichia coli* food isolates that survived in gastric fluid conditions [J]. *Int J Antimicrob Ag*, 2017, 49(1): 81–87.
- [12] ALDRED KJ, KERNS RJ, OSHEROFF N. Mechanism of quinolone action and resistance [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(10): 1565–1574.
- [13] YAN L, LIU D, WANG XH, *et al.* Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40610.
- [14] PARK CH, ROBICSEK A, JACOBY GA, *et al.* Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2006, 50(11): 3953–3955.
- [15] KARCZMARCZYK M, ABBOTT Y, WALSH C, *et al.* Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a university veterinary hospital [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(20): 7104–7112.
- [16] GUILLARD T, MORET H, BRASME L, *et al.* Rapid detection of *qnr* and *qepA* plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(2): 253–259.
- [17] 罗娟, 姬华, 王庆玲, 等. 新疆部分地区食源性大肠杆菌耐药性的研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(8): 271–277. LUO J, JI H, WANG QL, *et al.* Drug resistance of *Escherichia coli* isolated from different foods in Xinjiang [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2016, 32(8): 271–277.
- [18] 陈霞, 车洁, 骆鹏杰, 等. 肉鸡养殖场中耐药相关基因散播情况的调查研究[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(3): 931–939. CHEN X, CHE J, LUO PJ, *et al.* Investigation on the spread of

- resistance-related genes in broiler farms [J]. *Chin J Anim Husb Vet Med*, 2020, 47(3): 931-939.
- [19] VETTING MW, PRAK CH, HEGED SS, *et al.* Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase *aac(6)-Ib* and its bifunctional, fluoroquinolone-active *aac(6)-Ib-cr* variant [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(37): 9825-9835.
- [20] REDGRAVE, LIAM S, SUAON, *et al.* Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success [J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(8): 438-445.
- [21] HOOPER D, JACOBY G. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance [J]. *Ann Ny Acad Sci*, 2015, 1354(1): 12-31.
- [22] 张鹏飞, 王婷, 钟楠, 等. 奶源大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(9): 214-221.
- ZHANG PF, WANG T, ZHONG N, *et al.* Isolation and identification of *Escherichia coli* in milk and its drug resistance analysis [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(9): 214-221.
- [23] YANG J, LUO Y, LI J, *et al.* Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2010, 65: 453-459.
- [24] XU GF, AN W, WANG HD, *et al.* Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1103.
- [25] 文岚, 朱彩明, 曹珂珂, 等. 长沙市食品从业人员致泻大肠埃希菌实时

荧光多重 PCR 检测结果分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(16): 2260-2262.

WEN L, ZHU CM, CAO KK, *et al.* Analysis on detection results of diarrheogenic *Escherichia coli* among food practitioners in Changsha city by real time fluorescence multiple PCR [J]. *Int J Lab Med*, 2016, 37(16): 2260-2262.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



赵琳娜, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: jade_zhao@126.com



崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: cuishenghui@aliyun.com



路勇, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: luyong0560@126.com