

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.07.01

猪源大肠杆菌 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 耐药基因多重 PCR 检测方法的建立

李孟¹, 李金磊², 申水莹¹, 杨鹏霞¹, 彭丽², 李慧素², 吴志明^{2*}

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008)

[收稿日期] 2019-04-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 07-0001-07 [中图分类号] S852.6

[摘要] 为了建立猪源大肠杆菌对氟苯尼考、 β -内酰胺类与粘杆菌素耐药基因的多重 PCR 检测方法, 本研究以氟苯尼考耐药基因 *floR*、 β -内酰胺耐药基因 *CTX-M*、粘杆菌素耐药基因 *mcr-1* 作为目的基因, 设计 3 对特异性引物, 通过对多重 PCR 反应体系及条件的优化, 成功建立了多重 PCR 检测方法。该方法的灵敏度为 1.46×10^5 CFU/mL, 具有高度特异性、敏感性和可重复性。本方法的建立为大肠杆菌中常见耐药基因的快速检测及分子流行病学调查提供了新的手段。

[关键词] 大肠杆菌; 耐药基因; *floR*; *CTX-M*; *mcr-1*; 多重 PCR

Development of Multiplex PCR for Detection of *floR*, *CTX-M*, *mcr-1* in Pig-derived *Escherichia coli*

LI Meng¹, LI Jin-lei², SHEN Shui-ying¹, YANG Peng-xia¹, PENG Li², LI Hui-su², WU Zhi-ming^{2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou 450008, China)

Corresponding author: WU Zhi-ming, E-mail: wuzhiming6@sina.com

Abstract: To develop a multiplex PCR for florfenicol, β -Lactamase and colistin resistance genes in pig-derived *Escherichia coli*, We chose florfenicol resistance gene *floR*, β -Lactamase resistance gene *CTX-M*, colistin resistance gene *mcr-1* as the target gene in this study; three pairs of specific primers were designed according to the correlative *floR*, *CTX-M*, *mcr-1* gene sequences from the GenBank. By optimizing the multiplex PCR reaction system and conditions, the multiplex PCR detection method was successfully established. The sensitivity of this method is 1.46×10^5 CFU/mL, and this method has high specificity, sensitivity and reproducibility; the development of this method provides a new means for rapid detection and molecular epidemiological investigation of common resistance genes in *Escherichia coli*.

Key words: *Escherichia coli*; resistance gene; *floR* gene; *CTX-M* gene; *mcr-1* gene; multiplex PCR

作者简介: 李孟, 硕士研究生, 从事细菌耐药性研究。

通讯作者: 吴志明。E-mail: wuzhiming6@sina.com

猪大肠杆菌病在我国许多地区的猪场都有发生,是严重危害仔猪安全的重要传染病之一^[1]。近些年来,猪源大肠杆菌对氟苯尼考的耐药性问题日益严重,有报道指出氟苯尼考的耐药率有增加的趋势^[2];其耐药机制的研究主要集中在 *floR* 基因上^[3],而且 *floR* 基因在革兰氏阴性菌之间广泛传播。产超广谱 β 内酰胺酶 (ESBLs) 是细菌对 β 内酰胺类抗生素产生耐药的主要机制^[4],近年来,CTX-M 型 ESBLs 已经取代传统的 TEM 型和 SHV 型成为全球流行最广的 ESBLs^[5]。我国学者刘艺云等^[6]首次报道了大肠杆菌对粘杆菌素的耐药基因 *mcr-1*,引起了国内外研究人员的高度关注,报道称 *mcr-1* 基因已经在我国畜禽源大肠杆菌中广泛存在,并且有沿食物链传递,从而危害食品安全和人类健康的风险。

氟苯尼考、头孢噻唑、粘杆菌素作为养猪场临床常用的抗菌药物,其耐药性问题不容忽视。目前,国内外报道的大肠杆菌耐药基因检测方法主要以大肠杆菌对同一类药物的不同耐药基因的多重 PCR 为主,尚无针对大肠杆菌对不同药物的耐药基因建立的多重 PCR 检测方法。

本研究结合临床常用抗菌药的使用情况,建立大肠杆菌 *floR*、CTX-M、*mcr-1* 耐药基因多重 PCR 的检测方法,能为大肠杆菌耐药基因的快速检测提供新的检测技术,为耐药基因的分子流行病学调查提供技术手段,为猪源大肠杆菌耐药性的风险评估和临床用药提供科学依据,从而为保障食品安全、公共卫生安全和生态环境安全提供技术支撑。

1 材料

1.1 菌株 *FloR*、CTX-M、*mcr-1* 基因阳性菌株 (已测序鉴定),大肠杆菌标准菌株 ATCC25922,鼠伤寒沙门氏菌标准菌株、金黄色葡萄球菌标准菌株、单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株、志贺氏菌标准菌株、肠炎沙门氏菌标准菌株、粪肠球菌标准菌株均为河南省兽药饲料监察所实验室购买保存。

1.2 培养基与试剂 LB 肉汤、菌落计数培养基,购自北京陆桥技术股份有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒,购自天根生化(北京)有限公司;PCR 预混

酶(2 × Flash Hot Start MasterMix,货号: CW3007M,批号:20347),细菌基因组 DNA 提取试剂盒(货号: CW0552,批号:00021304),购自北京康为世纪生物科技有限公司;50 × TAE、溴化乙锭,购自索莱宝生物科技有限公司;琼脂糖,购自西班牙 BIONEWE 公司。

1.3 主要仪器设备 PCR 扩增仪,购自美国 Applied Biosystems 公司;凝胶电泳仪,购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶电泳成像系统,购自 Alphainnotech Corporation 公司;电子天平 (BS2002S),购自北京赛多利斯仪器公司;生物安全柜,购自美国 Thermo 公司;离心机,购自德国 Sigma 公司;水浴锅,购自金坛市医疗仪器厂;电冰箱,购自青岛海尔股份有限公司;超低温冰箱,购自美国 Thermo 公司;纯水仪,购自 Milipore 公司;恒温培养箱,购自上海一恒科技有限公司;浊度仪,购自无锡市光明浊度仪厂;立式自动压力蒸汽灭菌锅,购自日本三洋公司。

2 方法

2.1 引物设计 根据 GenBank 提供的 CTX-M、*mcr-1*、*floR* 基因及其亚型基因序列,利用 DNASTar 软件进行同源性分析,确定每个基因同源性高的保守区域作为耐药基因的扩增靶序列,用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,引物交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。引物序列及预期扩增片段长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增片段长度

Tab 1 Primer sequence and amplified fragment length		
靶基因 Gene	引物序列(5' to 3') Primer sequences(5' to 3')	长度/bp Length/bp
CTX-M	上游(F) ATGTG CAGTA CCACT AAAGT	593bp
	下游(R) TGGGT RAAGT ARGTC ACCAG AA	
<i>mcr-1</i>	上游(F) GCTCGGTCAGTCCGTTTGTC	338bp
	下游(R) CTGCGTTTAATAGATCCTTGGTCTCG	
<i>floR</i>	上游(F) CTGAACACGACGCCCGCTATG	752bp
	下游(R) CAGACCCTCCGCAAACAA	

2.2 大肠杆菌模板 DNA 的制备 参照试剂盒说明书提供的步骤,利用细菌基因组 DNA 提取试剂

盒,提取大肠杆菌基因组 DNA, -20 °C 冰箱保存备用。

2.3 单基因 PCR 的扩增及测序 选用耐药基因阳性对照菌株模板 DNA 作为扩增模板,参照常规 PCR 标准添加量,根据引物的 TM 值、GC 含量等参数,初步确定 *floR*、*CTX - M*、*mcr - 1* 单基因 PCR 扩增体系及条件,将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,并将测序结果与 Gen-Bank 上公布的序列进行同源性比较。

2.4 多重 PCR 方法条件优化

2.4.1 引物浓度优化 以阳性菌株为模板,各组分浓度和参数均参照常规多重 PCR 反应的一般原则,在单重 PCR 基础上,为了取得引物最佳组合浓度,在预实验基础上按三因素五水平 $L_{25}(5^3)$ 设计正交实验表,选取扩增效果较好的一组引物浓度组合,初步确立多重 PCR 扩增体系。正交实验方案见表 2。

2.4.2 退火温度优化 在优化引物组合的基础上,进行退火温度优化。将退火温度分别设置为 51 °C、52 °C、53 °C、54 °C、55 °C、56 °C、57 °C、58 °C、59 °C、60 °C 进行 PCR 扩增,扩增产物用 1.5% 浓度的琼脂凝胶进行电泳,用凝胶成像系统对扩增结果进行分析。

2.4.3 循环次数优化 在优化好退火温度的基础上,将循环次数分别设置为 30 次、31 次、32 次、33 次、34 次、35 次进行 PCR 扩增,扩增产物用 1.5% 浓度的琼脂凝胶进行电泳,用凝胶成像系统对扩增结果进行分析。

2.5 多重 PCR 方法的验证

2.5.1 多重 PCR 特异性实验 分别以阳性对照菌株、大肠杆菌标准菌株、鼠伤寒沙门氏菌标准菌株、金黄色葡萄球菌标准菌株、单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株、志贺氏菌标准菌株、肠沙门氏菌标准菌株、粪肠球菌标准菌株,进行多重 PCR 的扩增,观察 PCR 结果特异性。

2.5.2 多重 PCR 敏感性实验 选取 10 株 *FloR*、*CTX - M*、*mcr - 1* 基因阳性的分离菌株(已经检测证实),进行多重 PCR 的扩增,扩增产物用 1.5% 浓

度的琼脂凝胶进行电泳,观察多重 PCR 敏感性。

表 2 引物正交试验方案

Tab 2 Primer orthogonal test protocol

引物组合	Flor(μL) (20 μmol/mL)	ctx - m(μL) (20 μmol /mL)	mcr - 1(μL) (20 μmol/mL)
1	0.1	1.8	0.3
2	0.1	1.9	0.4
3	0.1	2.0	0.5
4	0.1	2.1	0.6
5	0.1	2.2	0.7
6	0.2	1.8	0.4
7	0.2	1.9	0.5
8	0.2	2.0	0.6
9	0.2	2.1	0.7
10	0.2	2.2	0.3
11	0.3	1.8	0.5
12	0.3	1.9	0.6
13	0.3	2.0	0.7
14	0.3	2.1	0.3
15	0.3	2.2	0.4
16	0.4	1.8	0.6
17	0.4	1.9	0.7
18	0.4	2.0	0.3
19	0.4	2.1	0.4
20	0.4	2.2	0.5
21	0.5	1.8	0.7
22	0.5	1.9	0.3
23	0.5	2.0	0.4
24	0.5	2.1	0.5
25	0.5	2.2	0.6

2.5.3 多重 PCR 灵敏度实验 将阳性对照菌株接种于 LB 肉汤,37 °C 过夜培养,调节菌液浓度至 0.5 MCF,然后用无菌生理盐水将菌液递增稀释至 10^{-8} 浓度,分别取 1 mL 稀释菌液制备扩增模板,用多重 PCR 方法进行 PCR 检测。同时,选取 10^{-6} ~ 10^{-8} 稀释液,取 1 mL 涂布于菌落计数培养基。根据平板菌落计数结果和多重 PCR 检测结果,确定多重 PCR 灵敏度。

2.5.4 多重 PCR 重复性实验 用同批 PCR 反应试剂, 分别在不同时间(间隔 7 d)、不同操作条件(包括 PCR 仪、操作人员)下对同一批阳性菌株(已测序鉴定) 检验批内重复性检测。

分别用 3 个不同批次的 PCR 反应试剂, 对同一批次阳性菌株(已测序鉴定) 进行批间重复性检测。

2.5.5 多重 PCR 符合性实验 随机选取 80 株猪源大肠杆菌(已分离鉴定), 同时采用已发表的 *Flor*^[2]、*CTX-M*^[7]、*mcr-1*^[6] 基因 PCR 检测方法 与本文建立的多重 PCR 方法进行耐药基因的检测, 对检测结果进行比较分析, 检验多重 PCR 的符合性。

2.6 对临床大肠杆菌样品的检测 用优化好的多重 PCR 方法对河南部分地区猪源大肠杆菌样品进行检测(为了方便对大量临床样品的检测, 进行了试剂盒提取样品 DNA 模板、煮沸法提取 DNA、菌液 PCR 和菌落 PCR 等提取方法对检测结果影响的对比试验)。

3 结果与分析

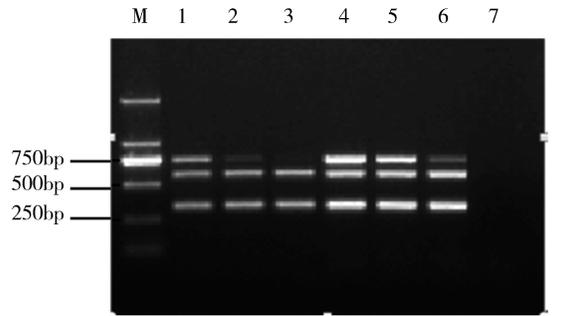
3.1 单基因 PCR 扩增和测序结果 根据 2.3 提供的方法进行单基因 PCR 扩增, 最终在预期目的条带附近都能扩增出单一目的条带。其中退火温度的优化结果为: *floR* 基因最佳退火温度为 57℃, 可变范围为 51℃ - 60℃; *CTX-M* 基因的最佳退火温度为 57℃, 可变范围为 53℃ - 60℃; *mcr-1* 基因的最佳退火温度为 56℃, 可变范围为 53℃ - 59℃; 对 3 个目的基因片段进行测序, 分别进行序列比对分析, 结果证明扩增片段均为目的基因的片段。

3.2 多重 PCR 方法条件优化

3.2.1 引物浓度优化结果 按照 2.4.1 的方法, 将 3 对引物进行组合后进行 PCR 扩增, 结果如图 1。结果显示, 组合 13 的扩增效果最好, 即 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 的添加量分别为 0.3、2、0.7 μL 时, 扩增效果最好。

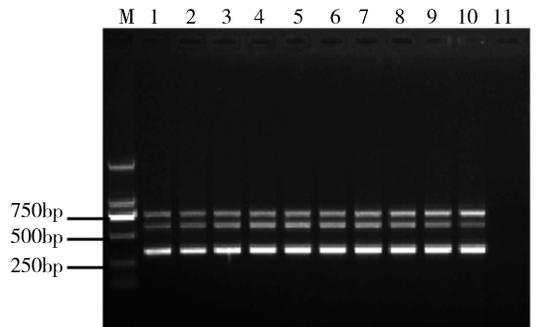
3.2.2 退火温度优化结果 根据 2.4.2 的方法调整退火温度, 用凝胶成像系统对扩增结果进行分析, 见图 2。结果显示, 在 55℃ ~ 58℃ 均能进行高效的扩增, 最终, 选取 57℃ 为最佳退火温度。

3.2.3 循环次数优化结果 根据 2.4.3 的方法,



M: DNA Marker DL2000; 1: 引物组合 3; 2: 引物组合 4; 3: 引物组合 5; 4: 引物组合 12; 5: 引物组合 13; 6: 引物组合 14; 7: 阴性对照

图 1 部分引物组合的 PCR 产物凝胶电泳结果
Fig 1 PCR product electrophoresis results of partial primer combinations



M: DNA Marker DL2000; 1 - 10: 51℃ - 60℃; 11: 阴性对照

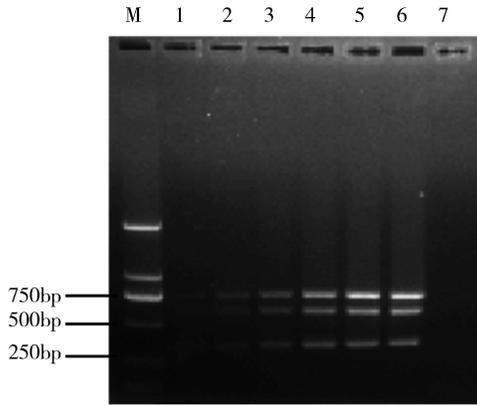
图 2 不同退火温度的 PCR 产物凝胶电泳结果
Fig 2 Results of gel electrophoresis of PCR products at different annealing temperatures

在退火温度优化完毕的基础上, 进行循环次数的优化, 循环次数优化结果, 见图 3。根据结果, 在 33 次、34 次、35 次循环时均有比较好的扩增结果, 结合扩增时间双重条件, 选择 34 次循环为最佳循环次数。

根据全部优化结果最终确定多重 PCR 反应体系, 见表 3。

3.3 多重 PCR 方法验证

3.3.1 多重 PCR 特异性实验结果 按照 2.5.1 所述的方法, 对上述菌株进行 PCR 扩增, 结果见图 4。图中可以看出, 只有阳性菌株扩增出了 3 条特异性目的条带, 其他标准菌株的模板均没有扩增出来。说明本方法具有很高的特异性。



M: DNA Marker DL2000; 1-6: 30-35 个循环次数; 7: 阴性对照

图 3 不同循环次数的 PCR 产物凝胶电泳结果

Fig 3 Results of gel electrophoresis of PCR products with different cycle times

表 3 多重 PCR 扩增体系

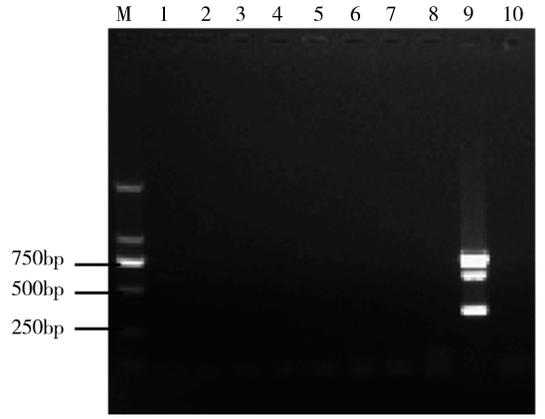
Tab 3 Multiplex PCR amplification system

体系组成 System composition	组分用量 (μL) Component dosage (μL)
模板	2
<i>floR</i>	0.3 × 2
<i>CTX - M</i>	2.0 × 2
<i>mcr - 1</i>	0.7 × 2
ExTaq Mix 酶	25
灭菌双蒸水加至	50

PCR 运行参数为: (95℃, 5min) + {(95℃, 30s) + (57℃, 40s) + (95℃, 30s)} × 34cycles + (72℃, 10min)。

3.3.2 多重 PCR 敏感性实验结果 根据 2.5.2 所述的方法,对实验菌株进行 PCR 扩增,结果见图 5。结果显示,10 株已知 *floR*、*CTX - M*、*mcr - 1* 基因阳性的分离菌株,均能扩增出 3 条特异性条带。说明本方法具有很高的敏感性。

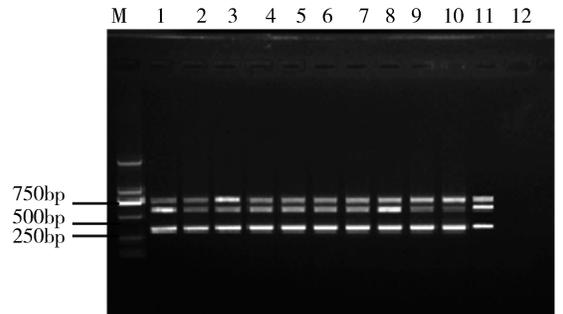
3.3.3 多重 PCR 灵敏度实验结果 按照 2.5.3 所述的方法进行实验,平板菌落计数结果表明,在 10⁻⁶ 稀释度时,平板上长有 146 个菌落,由此可以得出 0.5 MCF 的原菌液浓度为 1.46 × 10⁸ CFU/mL; 多重 PCR 实验结果(见图 6)表明,在 10⁻³ 稀释度时仍能扩增出 3 条特异性条带,此时的菌液浓度为 1.46 × 10⁵ CFU/mL,即平均每毫升 PCR 反应体系中有 1.46 × 10⁵ 个细菌存在时,3 个耐药基因全部能够被检测出来,说明本方法具有很好的灵敏度。



M: DNA Marker DL2000; 1:大肠杆菌 ATCC25922; 2:阪崎杆菌; 3:志贺氏菌; 4:肠炎沙门氏菌; 5:鼠伤寒沙门氏菌; 6:粪肠球菌; 7:单核细胞增生李斯特氏菌; 8:金黄色葡萄球菌; 9:阳性对照; 10:阴性对照

图 4 特异性实验电泳图

Fig 4 Specific experimental electropherogram



M: DNA Marker DL2000; 1-10: 10 个样品; 11: 阳性对照; 12: 阴性对照

图 5 敏感性实验电泳图

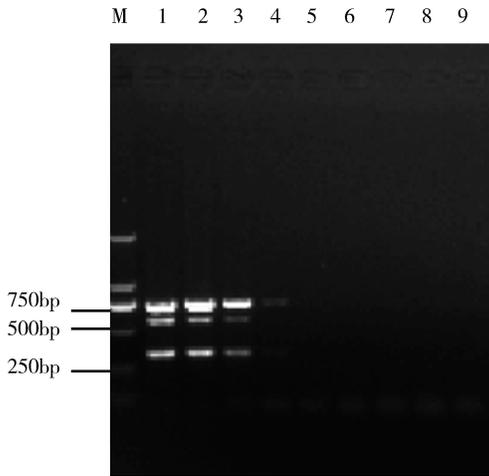
Fig 5 Sensitivity experiment electropherogram

3.3.4 多重 PCR 重复性实验结果 根据 2.5.4 的方法,进行批间和批内重复性实验,结果分别见表 4 和表 5,结果显示,批间和批内重复性结果均一致,说明本方法具有良好的重复性。

表 4 批内重复性试验结果

Tab 4 Repetition test result of within the batch

实验次数	试剂批次	操作时间	阳性结果	阴性结果
1	2018.6.20	2018.8.13	10/10	1/1
2	2018.6.20	2018.8.20	10/10	1/1
3	2018.6.20	2018.8.28	10/10	1/1



M: DNA Marker DL2000; 1: 1.46×10^7 cfu/mL; 2: 1.46×10^6 cfu/mL; 3: 1.46×10^5 cfu/mL; 4: 1.46×10^4 cfu/mL; 5: 1.46×10^3 cfu/mL; 6: 1.46×10^2 cfu/mL; 7: 1.46×10^1 cfu/mL; 8: 1.46×10^0 cfu/mL; 9: 阴性对照

图 6 灵敏度实验电泳图

Fig 6 Sensitivity experimental electropherogram

表 5 批间重复性试验结果

Tab 5 Repetition test result of in batches

实验次数	试剂批次	操作时间	阳性结果	阴性结果
1	2018.6.20	2018.9.10	10/10	1/1
2	2018.7.20	2018.9.10	10/10	1/1
3	2018.8.10	2018.9.10	10/10	1/1

3.3.5 多重 PCR 符合性实验结果 根据 2.5.5 的方法对 80 株分离菌进行 PCR 的扩增, 比较单重 PCR 和本文建立的多重 PCR 结果, 得出如下结果: *floR* 基因有 2 个样品结果不一致 (符合率为 97.5%); *CTX-M* 有 2 个样品的结果不一致 (符合率为 97.5%); *mcr-1* 有 1 个样品的结果不一致 (符合率为 98.8%)。符合率均为 98% 左右。

3.4 对临床大肠杆菌样品的检测 用优化好的多重 PCR 方法对河南部分地区的猪源大肠杆菌进行检测 (经过不同提取方法对检测结果影响的对比发现, 菌液 PCR 和菌落 PCR 均有良好的检测结果, 鉴于菌液 PCR 和菌液 PCR 更方便快捷, 本文在检测临床样品时选取菌液 PCR 的方法), 调查了该地区

100 株猪源大肠杆菌分离株的 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 基因的携带情况, 进一步验证了该方法的实用性。检测结果表明, *floR* 基因检出率为 75.0%, *CTX-M* 检出率为 18.0%, 未检出 *mcr-1* 基因。

4 讨论与结论

目前在耐药基因的检测方面, 主要还是以单重 PCR 检测为主, 单重 PCR 每次只能检测一种耐药基因, 耗时费力, 而目前建立的多重 PCR 方法, 也多以同一类药物耐药基因的检测为主, 如田国宝等^[8]建立的三重 PCR 检测方法, 针对的是大肠杆菌 β -内酰胺酶的耐药基因 *bla_{TEM}*、*bla_{SHV}*、*bla_{CTX-M}*。本研究更好的结合临床药物使用情况, 选取临床常用抗生素的主要耐药基因, 建立了多重 PCR 检测方法, 为临床上筛选大肠杆菌的敏感抗生素提供技术支持。

本研究中对临床样品的检测结果显示, *floR* 基因检出率为 75.0%, 这一结果与包义斐^[9]2017 年的研究结果相吻合, 说明河南地区对氟苯尼考的耐药性严重; 本研究中 *CTX-M* 的检出率为 18.0%, 与杨守深等^[10]在福建地区的 18.0% 的检出率结果一致; 随着农业农村部 2016 年公布的 2428 号公告的实施, 禁止硫酸粘杆菌素作为饲料添加剂用于促进动物生长使用, 本研究中并未检出大肠杆菌对粘杆菌素的耐药基因 *mcr-1*。

需要指出的是, 本研究建立的多重 PCR 检测方法是基于我国目前兽医临床用药习惯以及各耐药基因流行特点设计的, 随着抗生素的继续使用, 可以预见我国的动物源大肠杆菌耐药基因也会随之发生改变。因此, 研究人员有必要持续跟踪耐药基因的分子流行病学变化, 以及临床用药习惯的改变, 适时调整 PCR 检测方法的靶基因和各反应体系参数, 使之能更准确有效的服务于临床。

通过对 PCR 条件的优化, 建立了猪源大肠杆菌中对临床常用药物氟苯尼考、头孢噻唑、粘杆菌素的主要耐药基因 *floR*、*CTX-M*、*mcr-1* 的多重 PCR 检测方法, 经验证, 该方法灵敏度为 1.46×10^5 CFU/mL, 并且具有较高的特异性、稳定性。

参考文献:

- [1] 高月林, 解志峰, 刘立新. 黑龙江省东部地区腹泻仔猪大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 养殖技术顾问, 2011(11):113.
Gao Y L, Xie Z F, Liu L X. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Escherichia Coli* in diarrhea piglets in eastern Heilongjiang Province[J]. Farming technology consultant, 2011(11):113.
- [2] 郭树源, 李代军, 张红娜, 等. 猪源耐氟苯尼考大肠杆菌的耐药性及 floR 基因的序列分析: 中国畜牧兽医学动物福利与健康养殖分会成立大会暨首届规模化健康与福利养猪高峰论坛学术论坛, 中国山东泰安, 2015[C].
Guo S Y, Li D J, Zhang H N, et al. Drug resistance of florfenicol-resistant *Escherichia coli* and sequence analysis of floR gene: China Animal Husbandry and Veterinary Society Animal Welfare and Healthy Breeding Branch Inaugural Meeting and the First Large-scale Health and Welfare Pig Summit Academic Forum, Tai'an, Shandong, China, 2015[C].
- [3] He T, Shen J, Schwarz S, et al. Characterization of a genomic island in *Stenotrophomonas maltophilia* that carries a novel floR gene variant[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(4):1031-1036.
- [4] Tian G B, Wang H N, Zhang A Y, et al. Detection of clinically important beta-lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China[J]. J Med Microbiol, 2012, 61(Pt 2):233-238.
- [5] 赵东霞, 黄永茂. CTX-M 型 β 内酰胺酶的研究进展[J]. 西南军医, 2017, 19(02):172-176.
Zhao D X, Huang Y M. Progress in research on CTX-M β -lactamase[J]. Southwestern military doctor, 2017, 19(02):172-176.
- [6] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(2):161-168.
- [7] 田国宝, 王红宁, 张安云, 等. 大肠杆菌 β -内酰胺酶耐药基因 blaTEM, blaSHV, blaCTX-M 三重 PCR 检测方法建立[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(1):3-5.
Tian B G, Wang H N, Zhang A Y, et al. Establishment of triple PCR detection method for *Escherichia coli* β -lactamase resistance gene of blaTEM, blaSHV, blaCTX-M[J]. Chinese Veterinary Journal, 2013, 49(1):3-5.
- [8] 郝秀红, 赵强元, 李艳君, 等. 2012 年临床常见细菌分离及耐药性监测[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(10):1029-1032.
Hong X H, Zhao Q Y, Li Y J, et al. Clinical common bacterial isolation and drug resistance monitoring in 2012[J]. Journal of PLA Medical College, 2013, 34(10):1029-1032.
- [9] 包义斐. 猪源大肠杆菌 floR 耐药基因的检测与分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2017, 38(03):23-24.
Bao Y F. Detection and analysis of resistance genes of *Escherichia coli* floR in pigs[J]. Livestock and Feed Science, 2017, 38(03):23-24.
- [10] 杨守深, 曾雪花, 林敏, 等. 猪源大肠杆菌耐药性及超广谱 β -内酰胺酶流行性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(01):45-50.
Yang S S, Ceng X H, Lin M, et al. Antibiotic resistance of pig-derived *Escherichia coli* and epidemiological analysis of extended-spectrum β -lactamase[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(01):45-50.

(编辑:陈希)