

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

张金宝¹, 马春芳², 余 婷¹, 李晓娜¹, 魏小平³, 王桂琴^{1*}

(1. 宁夏大学农学院, 银川 750021; 2. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 3. 吴忠市红寺堡区农牧和科技技术局, 吴忠 751999)

摘要: 为了解宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌耐药性及毒力基因、耐药基因的分布情况, 采用 K-B 法测定从奶牛乳房炎病例分离的 197 株大肠杆菌对 16 种抗菌药物的敏感性, 并采用 PCR 技术对大肠杆菌毒力基因及耐药基因进行检测。结果显示, 大肠杆菌对氨苄西林的耐药率最高, 达到 54.69%, 对多西环素、四环素和链霉素的耐药率在 39% 左右, 而对头孢唑啉、头孢噻肟、多黏菌素、氟苯尼考和喹诺酮类药物则比较敏感, 敏感率都在 60% 以上。基因检测结果显示, 除 *sta*、*stx2e* 这 2 种毒力基因未被检测到, *astA*、*escV*、*eaeA*、*sepA*、*hlyA* 5 种毒力基因的检出率分别是 20.30%、14.72%、8.12%、2.03%、1.02%。四环素类的 2 种耐药基因均被检测到, 其中 *tetC* 的阳性率为 24.87%。氟喹诺酮类的 *GyrA*、*GyrB*、*ParC* 三种耐药突变的检出率分别高达 97.46%、98.98%、98.48%。宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌携带 *astA*、*eaeA*、*sepA*、*escV*、*hlyA* 等毒力基因和介导四环素类、氟喹诺酮类耐药的基因, 对 16 种抗菌药物具有不同程度的耐药性, 且存在多重耐药菌株。

关键词: 大肠杆菌; 毒力基因; 耐药基因; 耐药性

中图分类号: S852.612

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)01-0177-06

Detection of Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Analysis of *Escherichia coli* Isolated from Dairy Cow Mastitis in Ningxia

ZHANG Jin-bao¹, MA Chun-fang², YU Ting¹, LI Xiao-na¹, WEI Xiao-ping³, WANG Gui-qin^{1*}

(1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. College of pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

3. Technology Bureau of Hongsiyu Agricultural and Animal Husbandry, Wuzhong 751999, China)

Abstract: The objectives of this study were to investigate resistance, virulence genes and resistance genes of *Escherichia coli* isolated from dairy cow mastitis in Ningxia. The antimicrobial resistance of 197 *Escherichia coli* from dairy cow mastitis cases to 16 drugs was determined by the methods of K-B and the virulence genes and resistance genes were detected by PCR. The results showed that the resistance rate of ampicillin was the highest and it achieved 54.69%. Furthermore, the resistance rates of doxycycline, tetracycline and streptomycin were about 39%. It was more sensitive to cephalosporins, cefotaxime, polymyxin, florfenicol, quinolones, and the sensitive rates were above 60%. The results of genes detection showed that the detection rates of virulence genes *astA*, *escV*, *eaeA*, *sepA*, *hlyA* were 20.30%, 14.72%, 8.12%, 2.03% and 1.02% respectively. The virulence genes *sta* and *stx2e* were not detected. Tetracycline resistant genes were detected and the detection rate of *tetC* was 24.87%. The detection rate of fluoroquinolone resistance genes *GyrA*, *GyrB* and *ParC* were 97.46%, 98.98% and 98.48%, respectively. Our study demonstrates *Esche-*

收稿日期: 2015-06-08

基金项目: 国家自然科学基金(31160519)

作者简介: 张金宝(1990-), 男, 回族, 宁夏西吉人, 硕士生, 主要从事兽医毒理学与毒理学研究, E-mail: hxzhjb@163.com

* 通信作者: 王桂琴(1970-), 女, 河北清苑人, 教授, 博士, 主要从事兽医毒理学与毒理学研究, E-mail: nxwgq@126.com

richia coli isolates from dairy cow mastitis in Ningxia carrying virulence genes *astA*, *eeA*, *sepA*, *escV*, *hlyA* and the genes mediate resistance to tetracyclines, fluoroquinolones, and those isolates have varying degrees of resistance 16 kinds of antibacterial drugs, and some isolates are multi-resistant strains.

Key words: *Escherichia coli*; virulence genes; resistance genes; antimicrobial resistance

1885年,澳大利亚医学家 Escherich 首次发现了大肠埃希菌,又称大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)。最初一直当作是正常肠道菌群的组成部分,认为是非致病菌。直到20世纪中叶,部分学者才逐渐认识到一些特殊血清型的大肠埃希菌对人和动物有致病性,特别对婴儿和幼畜,常引起严重腹泻、猪水肿病、败血症、新生儿脑膜炎及肾炎等^[1],还可引起畜禽生长发育迟缓,生产能力低下,甚至造成死亡,给养殖业带来了严重的经济损失。致病性大肠埃希菌是引起许多疾病的罪魁祸首,并可以通过食物、水源等方式传播,从而引发疫情^[2-4]。

为了解宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌的耐药情况,本试验根据 CLSI^[6](美国临床实验室标准委员会)方法对宁夏地区奶牛乳房炎病例分离鉴定出的197株牛源大肠杆菌进行了药物敏感性测定。同时采用PCR技术对其毒力基因以及耐药基因进行检测,初步分析两者之间的相关性,以期得到宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌耐药性的规律,并指导临床合理用药。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 质控菌株大肠杆菌 ATCC25922 购自中国药品生物制品检定所;试验用大肠杆菌分离自宁夏地区部分奶牛场采集的奶牛乳房炎乳样。

1.1.2 主要试剂及抗菌药物药敏纸片 科玛嘉大肠杆菌显色培养基购自 CHRO Magar 公司;Gel-red 染料购自 Biotium 公司;DNA marker 购自上海生工公司;2×Taq MasterMix 酶购自北京康为世纪生物科技有限公司;BHI 肉汤、LB 肉汤、麦康凯琼脂等购自北京奥星博生物技术有限公司;氨苄西林($10 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、头孢唑啉($30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、庆大霉素($10 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、环丙沙星($5 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、多西环素($30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、卡那霉素($30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、氧氟沙星($5 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、链霉素($10 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、头孢噻肟($30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、四环素($30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、阿米卡星(30

$\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、氟苯尼考($30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、诺佛沙星($10 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、恩诺沙星($5 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、复方新诺明($30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)、多黏菌素($300 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$)购自 Oxoid Limited。

1.1.3 主要仪器设备 立式压力蒸汽灭菌锅,购自上海申安医疗器械厂;恒温培养箱 THZA,购自上海一恒科技有限公司;SW-CJ 苏净安泰洁净工作台,购自苏净集团苏州安泰空气技术公司;电子天平,购自北京塞多利斯仪器有限公司;PCR 反应仪和凝胶成像仪,购自 Biotium-rad 公司;DYY-6C 型电泳仪,购自北京六一仪器厂。

1.2 大肠杆菌的分离鉴定

1.2.1 样品采集 对奶牛进行乳房炎检测,采集隐性和临床型乳房炎奶样,按常规挤奶消毒后,每个乳头挤去前2~3把乳后,无菌取奶样5 mL左右,贴好标签,4 h内送实验室进行处理。

1.2.2 分离纯化和初步鉴定 将采集的乳样用灭菌的棉签涂于麦康凯培养基上,置于37℃培养16~24 h,挑取单个典型菌落涂片,革兰染色进行镜检,观察细菌形态及染色特性,进行初步鉴定。再将镜检后的疑似大肠杆菌的菌落划线接种于新鲜制备的科玛嘉大肠杆菌显色培养基平板上,37℃培养16~24 h后,观察其菌落形态特征,挑取蓝色的单个菌落于BHI肉汤中,置于培养箱中37℃培养16~24 h,保存备用。

1.2.3 PCR 鉴定大肠杆菌 根据文献和 Gen-Bank 已发表的序列,确定16S rDNA 引物^[5]。16S-F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16S-R: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3',引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。PCR 反应条件:预变性94℃5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸90 s,32个循环;72℃延伸5 min。配制凝胶进行电泳并进行DNA凝胶回收,将回收产物送至上海英潍捷基贸易有限公司进行测序。

1.3 药敏试验

严格按照美国临床实验室标准委员会(CLSI)2012年推荐的抗微生物药物敏感性试验执行标

准^[6]进行药敏试验。

1.4 毒力基因和耐药基因的检测

根据文献[7-13]和 GenBank 上已公布的序列,

确定 7 种毒力基因和 5 种耐药基因的引物序列,见表 1。

表 1 毒力基因和耐药基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of virulence genes and resistance genes

毒力基因和耐药基因 Virulence genes and resistance genes	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	扩增长度/bp The length of the amplification
<i>astA</i>	F:CCATCAACACAGTATATCCGA;R:GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111
<i>stx2e</i>	F:TTTCTTCGGTATCCTATTCCC;R:GATGCATCTCTGGTCATTGTA	484
<i>sepA</i>	F:TAAAACCCGCCGCTGAGTA;R:TGCCGGTGAACAGGAGGTTT	611
<i>eaeA</i>	F:ATTACTGAGATTAAGGCTGAT;R:ATTTATTTGCAGCCCCCAT	682
<i>sta</i>	F:CAACTGAATCACTTGACTCTT;R:TTAATAACATCCAGCACAGG	158
<i>escV</i>	F:ATTCTGGCTCTCTTCTTTAATGGCTG ;R:CGTCCCTTTTACAACTTCATCGC	544
<i>GyrA</i>	F:GGTGACGTAATCGGTAAATA;R:ACCATGGTGCAATGCCACCA	810
<i>GyrB</i>	F:GGACAAAGAAGGCTACAGCA;R:CGTCGCGTTGTACTCAGATA	879
<i>ParC</i>	F:CTGGGTAAATACCATCCGCAC;R:CGGTTTCATCTTCATTACGAA	987

PCR 反应体系为 25 μL :上游(F)、下游(R)引物各 0.5 μL ; $2 \times \text{Taq}$ MasterMix 酶 12.5 μL ; ddH₂O 11 μL ;细菌 DNA 模板 0.5 μL 。PCR 产物进行电泳,将电泳凝胶回收后送至上海英潍捷基贸易有限公司测序。

2 结果

2.1 大肠杆菌初步鉴定

将采集的乳房炎奶样经过麦康凯培养基初步培养,再经科玛嘉大肠杆菌显色培养基筛选,可见边缘整齐,湿润光滑的蓝色菌落,初步分离鉴定出疑似大肠杆菌 204 株。

2.2 大肠杆菌 PCR 鉴定

采用 PCR 技术对 204 株疑似大肠杆菌进行 16S rDNA 检测,电泳产物回收后进行测序,将全部测序结果进行比对后,确定大肠杆菌 197 株。

2.3 药敏试验

197 株大肠杆菌对临床常用的 16 种抗菌药物的耐药情况见表 2,分离菌株对 16 种抗菌药物具有不同程度的耐药性。其中对氨苄西林耐药率最高,达到 54.69%,其次,对多西环素(39.59%)、四环素(39.09%)和链霉素(38.58%)的耐药率也较高,而

对头孢类、多黏菌素、氟苯尼考和喹诺酮类药物则比较敏感,敏感率都在 60%以上。

2.4 大肠杆菌临床分离株多重耐药情况

本次试验分离的 197 株奶牛乳房炎大肠杆菌多重耐药情况见图 1,对所有抗菌药物都敏感的菌株有 30 株,仅对一种药物耐药的有 51 株。多重耐药中 7 耐、5 耐和 11 耐的菌株较多,所有菌株最多对 15 种抗菌药物耐药。

2.5 毒力基因和耐药基因的检测

在 7 种毒力基因中,有 5 种毒力基因扩增出相应大小的目的片段,分别是 *astA*、*escV*、*eaeA*、*sepA*、*hlyA*,而 *sta*、*stx2e* 没有扩增出相应大小的目的片段;5 种耐药基因 *tetB*、*tetC*、*GyrA*、*GyrB*、*ParC* 全部扩增出相应大小的目的片段。

2.6 197 株大肠杆菌毒力基因及耐药基因的测序比对

对 197 株宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌毒力基因及耐药基因进行了测序比对。结果(表 3)显示,未检测到 *sta* 和 *stx2e* 这 2 种毒力基因,*astA*、*escV*、*eaeA*、*sepA* 4 种毒力基因的检出率分别是 20.30%、14.72%、8.12%、2.03%,而毒力基因 *hlyA* 的检出率最低,为 1.02%。耐药基因中,四环素类的 2 种耐药基因 *tetC*、*tetB* 阳性率分别为 24.87%、7.61%;

表 2 大肠杆菌药敏试验结果

Table 2 The susceptibility test results of *Escherichia coli*

药物名称 Drug names	菌株数 Strains			耐药情况 Drug resistance	
	耐药(R) Resistant	中介(I) Mediation	敏感(S) Sensitive	耐药率/% Resistance	敏感率/% Sensitive rate
氨苄西林	105	24	68	54.69	34.52
头孢唑林	57	20	120	28.93	60.91
庆大霉素	54	11	132	27.41	67.00
环丙沙星	27	3	166	13.71	84.26
多西环素	78	9	110	39.59	55.84
新诺明	69	0	128	35.03	64.97
头孢噻肟	46	13	138	23.35	70.05
卡那霉素	37	5	155	18.78	78.68
四环素	77	4	116	39.09	58.88
氧氟沙星	37	4	156	18.78	79.19
链霉素	76	9	112	38.58	56.85
阿米卡星	17	3	177	8.63	89.85
氟苯尼考	26	14	157	13.20	79.70
诺氟沙星	22	9	166	11.17	84.26
多黏菌素	54	23	120	27.41	60.91
恩诺沙星	36	3	158	18.27	80.20

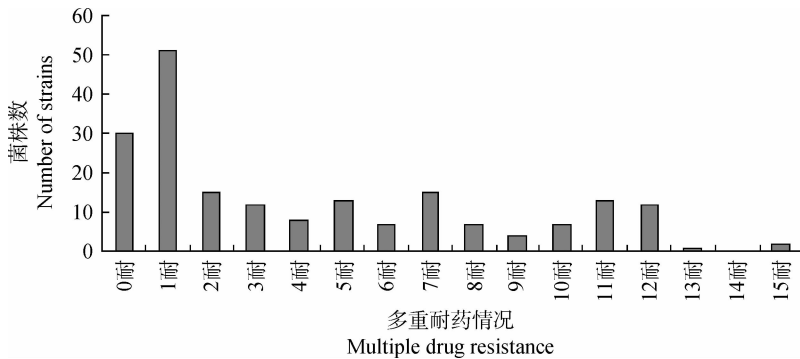


图 1 大肠杆菌多重耐药情况

Fig. 1 Multiple drug resistance of *Escherichia coli*

氟喹诺酮类的三种耐药基因 *GyrA*、*GyrB*、*ParC* 检出率都很高,分别为 97.46%、98.98%、98.48%。

3 讨论

3.1 药敏试验结果显示,宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌普遍对氨苄西林、四环素、链霉素和庆大霉素等药物具有一定的耐药性,而对诺氟沙星、阿米卡星、环丙沙星、氟苯尼考等药物的耐药率较低,且存在多重耐药菌株。所以在临床用药要尽量避免使用氨苄

西林、多西环素、四环素、新诺明和链霉素等药物。

3.2 尹召华^[14]研究结果显示,毒力基因 *hlyA* 的阳性分离率是 6.5%。杨少华等^[15]研究显示,从兔场分离到的 171 株大肠杆菌中,*eaeA* 基因的检出率为 72.7%,说明该基因是导致兔腹泻的主要病原。本研究中未检测出 *sta*、*stx2e*,其余几种毒力基因检出率较低,*astA*、*eaeA* 等基因在宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌中检出率相对较高。黄名钱^[16]研究显示,对四环素耐药的 10 株菌株中,*tetB* 基因的阳性检出

表 3 毒力基因及耐药基因检测结果及测序比对结果

Table 3 The detection rate and sequencing positive strain ratio results of virulence gene and resistance gene

基因名称 Genes	检测株 Test strains	检出株 Detection strain	检出率/% Detection rate	参考序列 Reference sequence	相似性/% Homology
<i>astA</i>	197	40	20.30	KJ149568.1	97
<i>escV</i>	197	29	14.72	HQ428080.1	99
<i>eaeA</i>	197	16	8.12	U62657.1	97
<i>sepA</i>	197	4	2.03	Z49933.1	99
<i>hlyA</i>	197	2	1.02	AB0329301.1	95
<i>tetB</i>	197	15	7.61	KJ868772.1	99
<i>tetC</i>	197	49	24.87	KC590087.1	99
<i>GyrA</i>	197	192	97.46	X06744.1	99
<i>GyrB</i>	197	195	98.98	AB083946.1	99
<i>ParC</i>	197	194	98.48	M58408.1	99

率为 20%, *tetC* 基因的阳性检出率为 90%。F. A. Neela 等、刘维红^[17-18] 研究表明,四环素类药物一般较多使用的为四环素,这种药物的作用机制可能与耐药基因 *tetB*、*tetC* 有关。本研究中,四环素类的 2 种耐药基因均被检测到,其中 *tetC* 阳性率为 14.72%;氟喹诺酮类的 *GyrA*、*GyrB*、*ParC* 三种耐药突变均被检测到,而且检出率都很高,达到 97.46%、98.98%、98.48%。由此可以看出,宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌携带 *astA*、*eaeA*、*sepA*、*escV*、*hlyA* 等毒力基因和介导四环素类、氟喹诺酮类耐药的基因。

3.3 作者对扩增的 *GyrA*、*GyrB*、*ParC* 基因的 PCR 产物进行测序,并进行序列比对分析。根据 GenBank 已发表的序列,进行 *GyrA* 基因比对,在比对序列的 813 个碱基中发现,第 10 位多了 1 个碱基 G,第 429、690、723 位均为 G→A,第 555 位 G→C,第 750、768、775 位均为 A→G。*GyrB* 基因测序比对的 857 个碱基中发现,第 460、736、787 位 T→C,第 685、775 位 C→T,第 769 位 A→G。*ParC* 基因测序比对的 909 个碱基中发现,第 903 位多了一个碱基 T。近几年,*GyrA* 基因的第 83、87 位点是热点突变,83 位丝氨酸突变为亮氨酸或色氨酸时,则是大肠杆菌对喹诺酮类药物表现高水平耐药的原因之一。刘晓强^[19] 研究表明大肠杆菌对喹诺酮类药物的耐药水平的高低和其靶基因突变数目有着密切的关系,单一的突变只能导致低水平的耐药,高水平

的耐药需要多个位点的突变。此次试验只涉及到 PCR 产物测序分析其部分片段的基因突变、缺失等,其是否会影响到大肠杆菌对该类药物的耐药水平还有待进一步研究。

4 结 论

宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌携带 *astA*、*eaeA*、*sepA*、*escV*、*hlyA* 等毒力基因和介导四环素类、氟喹诺酮类耐药的基因,对 16 种抗菌药物具有不同程度的耐药性,且存在多重耐药菌株。

参考文献(References):

- [1] 杜冬冬. 一株猪源大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
DU D D. Isolation and identification of a porcine *Escherichia coli* and analysis of drug resistance[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [2] 安徽, 张秀英, 李蕊, 等. 致病性大肠杆菌毒力因子和耐药性研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(8): 106-110.
AN W, ZHANG X Y, LI R, et al. Research progress on virulence factors and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 45(8): 106-110. (in Chinese)
- [3] 张金宝, 李晓娜, 王桂琴. 大肠埃希菌毒力基因的研究进展[J]. 动物医学进展, 2014, 35(8): 70-74.

- ZHANG J B, LI X N, WANG G Q. Advance in virulence genes of *Escherichia coli* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(8): 70-74. (in Chinese)
- [4] BUGAREL M, MARTIN A, FACH P, et al. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (*EHEC*) and enteropathogenic (*EPEC*) *Escherichia coli* strains; a basis for molecular risk assessment of typical and atypical *EPEC* strains [J]. *BMC Microbiol*, 2011, 11: 142.
- [5] 杨 滴, 王耀兵, 李冬梅, 等. 粪便中大肠埃希菌的分离鉴定[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 1-5.
- YANG D, WANG Y B, LI D M, et al. Isolation and identification of *E. coli* from feces [J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 27(3): 1-5. (in Chinese)
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement [S]. CLSI documents M100-S22. CLSI, 2012.
- [7] ASLANI M M, ALIKHANI M Y, ZAVARI A, et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (*EAEC*) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern [J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(2): 136-139.
- [8] 王 宏. 牛源大肠杆菌耐药性及耐药机制研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- WANG H. Study on antibiotic resistance and resistant mechanism of bovine *E. coli* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [9] 梁宏儒. 黑龙江部分奶牛大肠杆菌耐药性的耐药基因检测分析 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2013.
- LIANG H R. Detection and analysis of resistance and resistance gene of *E. coli* isolated from part of dairy farms in Heilongjiang province [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [10] PIDDOCK L J. Mechanism of quinolone uptake into bacterial cells [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1991, 27(4): 399-403.
- [11] BEARDEN D T, DANZIGER L H. Mechanism of action of and resistance to quinolones [J]. *Pharmacotherapy*, 2001, 21(10): 224-232.
- [12] 杨汉春, 陈 声, 将鸿蒙, 等. 鸡源大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的多重耐药性 [J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(4): 398-404.
- YANG H C, CHEN S, JIANG H M, et al. Multiple fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from chickens [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2003, 34(4): 398-404. (in Chinese)
- [13] HANSEN H, HEISIG P. Topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant salmonellae selected *in vitro* [J]. *Microb Drug Resist*, 2003, 9(1): 25-32.
- [14] 尹召华. 奶牛乳腺炎的病原菌分离鉴定、毒力基因检测与基因治疗研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2009.
- YIN S H. Identification, virulent gene detection and gene therapy of mastitis-causing bacteria in dairy cows [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2009. (in Chinese)
- [15] 杨少华, 柴同杰. 断奶幼兔腹泻致病性大肠杆菌 LEE 毒力岛的分子检测 [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(10): 6-8.
- YANG S H, CHAI T J. Molecular epidemiological investigation of LEE pathogenic island of *E. coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2004, 40(10): 6-8. (in Chinese)
- [16] 黄名钱. 猪源大肠杆菌四环素耐药基因检测及大肠杆菌抑制剂的筛选 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
- HUANG M Q. Detection on tetracycline resistance gene and suppressor screening of *Escherichia coli* in swine [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [17] NEELA F A, NONAKA L, RAHMAN M H, et al. Transfer of the chromosomally encoded tetracycline resistance gene *tet(M)* from marine bacteria to *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* [J]. *World J Microb Biot*, 2009, 25(6): 1095-1101.
- [18] 刘维红. 猪沙门氏菌耐药基因检测方法的建立及其应用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- LIU W H. Establishment of detection methods of resistant genes for swine *Salmonella* and the application [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [19] 刘晓强. 宠物源大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的多药耐药机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- LIU X Q. Mechanism accounting for fluoroquinolone multidrug resistance in *Escherichia coli* isolated from companion animals [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012. (in Chinese)