



大熊猫源细菌耐药性研究进展

燕霞^{1,2#}, 苏小艳^{2#}, 侯蓉², 刘颂蕊^{2*}, 邓俊良^{1*}

1 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

2 成都大熊猫繁育研究基地 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 四川 成都 610081

燕霞, 苏小艳, 侯蓉, 刘颂蕊, 邓俊良. 大熊猫源细菌耐药性研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 977-992.

YAN Xia, SU Xiaoyan, HOU Rong, LIU Songrui, DENG Junliang. Research progress in the antibiotic resistance of giant panda-derived bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 977-992.

摘要: 耐药菌和耐药基因已成为一种新型环境污染物, 引发世界公共卫生问题。细菌耐药性尤其是多重耐药菌在人医临床、畜禽养殖以及环境传播等多个方面得到越来越多的关注, 而关于大熊猫等野生动物的耐药性研究相对较少。大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是世界公认的珍稀野生动物, 其种群数量易受到各种疾病的威胁, 尤其是肠道细菌性疾病。随着抗菌药物在疾病预防和控制中的普遍使用, 由此带来的耐药性危害日益明显。本文总结了关于大熊猫源细菌耐药的国内外研究报道, 对其耐药表型、耐药基因型、耐药机制及水平传播机制等方面内容进行了综述, 旨在为大熊猫源细菌耐药性的研究和防控提供依据, 为临床科学用药提供理论参考, 从而助力大熊猫迁地保护。

关键词: 大熊猫; 耐药菌; 耐药表型; 耐药基因; 耐药机制; 水平传播机制

资助项目: 四川省自然科学基金(2022NSFSC0020); 成都大熊猫繁育研究基地自立课题(2020CPB-B24); 四川省科技厅项目(2020YJ0489)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2022NSFSC0020), the Independent Project of Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding (2020CPB-B24), and the Project of the Science and Technology Department of Sichuan Province (2020YJ0489).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: LIU Songrui, srui_liu@163.com; DENG Junliang, dengjl213@126.com

Received: 2022-07-27; Accepted: 2022-10-08; Published online: 2022-10-14

Research progress in the antibiotic resistance of giant panda-derived bacteria

YAN Xia^{1,2#}, SU Xiaoyan^{2#}, HOU Rong², LIU Songrui^{2*}, DENG Junliang^{1*}

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology for Endangered Wildlife, Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu 610081, Sichuan, China

Abstract: Antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes have become new environmental pollutants causing public health problems in the world. The antibiotic-resistant bacteria, especially multidrug-resistant bacteria, has received increasing attention in clinical medicine, animal breeding, and environmental transmission. However, there are few studies about the antibiotic resistance of bacteria in wild animals such as giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) is recognized as a rare wild animal in the world and its population is vulnerable to a variety of diseases, especially intestinal bacterial diseases. With the increasing use of antimicrobials in disease prevention and control, the harm of antibiotic resistance is becoming more and more apparent. By reviewing the research reports on the antibiotic resistance of giant panda-derived bacteria, we introduced the phenotypes, genotypes, and mechanisms of antibiotic resistance as well as the horizontal transmission mechanisms of the bacteria. This review aims to provide a basis for the prevention and control of antibiotic resistance and the reasonable application of antibiotics in clinical practice, so as to facilitate the *ex situ* conservation of giant panda.

Keywords: giant panda; antibiotic-resistant bacteria; antibiotic resistance phenotype; antibiotic resistance gene; antibiotic resistance mechanism; horizontal transmission mechanism

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是隶属于食肉目、熊科、大熊猫亚科、大熊猫属的唯一哺乳动物,是生物多样性保护的旗舰物种,被誉为世界的“活化石”,具有重要的科学价值、社会价值和观赏价值。第4次大熊猫普查结果显示,全国野生大熊猫为1 864只^[1],截至2019年全球圈养大熊猫种群数量达600只^[2]。随着大熊猫圈养种群的壮大以及大熊猫疾病研究的深入,细菌性疾病对大熊猫健康的危害也显露出来,尤其是肠道细菌性疾病在大熊猫圈养种群中的发病率明显高于其他系统疾病^[3]。如肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)可引起大熊猫腹泻、粪便带黏液或血液等症状的肠炎、败

血症和泌尿生殖系统感染^[4];空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、 β -溶血性链球菌(β -hemolytic *Streptococcus*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、A型魏氏梭菌(*Clostridium welchii* type A)均可导致大熊猫腹泻、肠炎等肠道疾病^[5-6]。

大熊猫等野生动物的保护得到了越来越多的关注,尤其是圈养大熊猫在人工合理饲喂和定期驱虫等助益下,近10年来鲜有关于病原菌引起圈养大熊猫发病的报道,有研究提出,动物细菌性疾病的减少可归功于抗生素的大量使用,但是这也提高了某些肠道细菌广泛耐药的

风险^[7]。同时, 耐药菌携带的耐药基因可通过质粒、整合子/基因盒、转座子等可移动元件在细菌间水平传播, 导致或加重细菌的多重耐药性^[7], 增加临床治疗难度。多重耐药菌和耐药基因已成为一种新型环境污染物, 引发世界公共卫生问题。但是目前细菌耐药性研究多关注于人医临床、畜禽养殖、农田施肥等方面^[8-10], 而关于大熊猫的耐药性研究报道相对较少, 尤其是国外地区大熊猫源细菌耐药性的相关研究更是鲜有报道。本文对大熊猫源细菌的耐药表型、耐药基因、耐药机制及水平传播机制进行综述, 旨在为大熊猫临床用药和耐药性防控提供参考依据, 亦为后期科研人员深入研究大熊猫耐药提供一定的理论基础, 进而助力大熊猫迁地保护。

1 大熊猫源细菌耐药表型的研究

细菌的耐药表型指的是细菌对某些抗生素的临床耐药特征, 细菌体外耐药表型主要通过药敏试验来分析, 采用的技术方法主要有纸片扩散(kirby-bauer, K-B)法和琼脂稀释法, 前者结果根据美国临床与实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)制定的标准进行判读; 后者结果以抗菌药物的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)进行判读。大熊猫源细菌的药敏试验研究主要通过纸片扩散法开展^[11-16]。目前大熊猫源细菌的耐药性研究主要为圈养大熊猫, 分别来自中国大熊猫研究与保护中心(卧龙和雅安碧峰峡基地)、成都大熊猫繁育研究基地; 较少来自千佛山、栗子坪等地的野生大熊猫^[17]。样品采集来源多为大熊猫的粪便^[11-16], 极少为雌性大熊猫的阴道分泌物^[18]、生病大熊猫的尿液^[19]及病死大熊猫的组织^[20]。研究的细菌主要为大肠埃希菌(*Escherichia coli*, 简称大肠杆菌), 少部分肠球菌^[21](*Enterococcus*)、克雷伯氏菌^[11](*Klebsiella*)、

沙门氏菌(*Salmonella*)及铜绿假单胞菌等^[13]。

对来自中国大熊猫研究与保护中心大熊猫粪便源大肠杆菌耐药性的相关文献进行概括总结发现(表 1), 从 2006–2018 年大熊猫源大肠杆菌主要对氨基糖苷类、四环素类和 β -内酰胺类抗生素耐药, 尤其是对氨基糖苷类和四环素类的耐药性维持较高水平并有上升趋势^[11-16]; 2008 年大熊猫源大肠杆菌对磺胺类抗生素复方新诺明和磺胺异恶唑的耐药率均为 0^[12], 但是在 2012 年和 2014 年对复方新诺明和磺胺异恶唑均表现出一定的耐药性^[14-15]; 同时, 2018 年的大熊猫源大肠杆菌对氯霉素类抗生素氯霉素和氟苯尼考表现出较高耐药性, 耐药率分别为 31.0%和 26.0%^[16], 氯霉素已经被禁止用于动物, 但是大熊猫有别于传统食用动物, 氯霉素可用于治疗大熊猫小肠结肠炎耶尔森氏菌引起的感染等胃肠道疾病^[22], 以及大熊猫角膜翳等眼科疾病^[23], 故可导致细菌对氯霉素类抗生素的耐药性。尽管每次研究的分离菌株数量有所差异, 但是通过以上研究仍可以发现, 中国大熊猫研究与保护中心的大熊猫种群对氨基糖苷类和四环素类等抗生素已经表现出耐药性。

对来自成都大熊猫繁育研究基地大熊猫粪便源大肠杆菌耐药性的相关文献进行概括总结发现(表 2), 大肠杆菌主要对 β -内酰胺类和四环素类抗生素耐药, 对氨曲南的耐药率从 2014 年的 6.3%增加到 2020 年的 86.9%, 增幅较大; 对链霉素、诺氟沙星和复方新诺明的耐药率有所下降^[24-26]。

同时, 我们前期对来自成都大熊猫繁育研究基地 2018 年和 2019 年大熊猫粪便源肺炎克雷伯菌的耐药表型也进行了分析, 发现分离菌株对多西环素耐药率最高(15.2%), 对其他抗生素的耐药率较低(均低于 10.0%); 与 2018 年相比, 2019 年分离的肺炎克雷伯菌对头孢噻肟、

表 1 中国大熊猫保护中心大熊猫粪便源大肠杆菌对常见抗生素的耐药率(%)
Table 1 Antibiotics resistance rate of *Escherichia coli* isolated from feces of giant panda in China Giant Panda Protection Center (%)

Time	Tetracyclines				Aminoglycosides			Sulfonamides		Chloramphenicols		References
	β -lactams	Vancomycin	Tetracycline	Neomycin sulfate	Kanamycin	Streptomycin	Gentamicin	Compound sulfamethoxazole	azole	Chloram-phenicol	Florfenicol	
2006				8.5	10.2	32.2	8.47					[11]
2008	63.2	10.5	57.9	36.8	39.5	52.6	2.6	0	0			[12]
2009			13.6		6.9	15.3	10.2					[13]
2012		26.7	55.6		1.1		2.2	11.1	18.9			[14]
2014	12.5		35.2		0	1.14	1.1	6.82	12.5			[15]
2018	62.0		65.0		75.0	93.0	47.0			31.0	26.0	[16]

表 2 成都大熊猫繁育研究基地大熊猫粪便源大肠杆菌对常见抗生素的耐药率(%)

Table 2 Antibiotics resistance rate of *Escherichia coli* isolated from feces of giant panda in Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding (%)

Time	β -lactams				Aminoglycosides		Quinolones		Tetracyclines		Sulfonamides		References
	Ampicillin	Cefazolin	Aztreonam	Cefotaxime	Streptomycin	Norfloxacin	Tetracycline	Doxycycline	Compound sulfamethoxazole	Compound sulfamethoxazole	Compound sulfamethoxazole	Compound sulfamethoxazole	
2014	67.7	51.0	6.3	10.4	13.5	19.8	69.8	27.1		42.7			[24]
2015	58.0	68.0	6.0	8.0	14.0	8.0	36.0			30.0			[25]
2020	69.1	8.3	86.9	9.5	9.5	7.1	48.8	61.9		17.9			[26]

亚胺培南和阿奇霉素的耐药性显著增高($P<0.05$), 对头孢西丁耐药率显著降低($P<0.05$); 对四环素类及磺胺类抗生素耐药率升高, 但无显著性差异($P>0.05$)^[27]。进一步对大熊猫粪便源多重耐药肺炎克雷伯菌的耐药表型分析发现, 这些菌株主要对阿莫西林、强力霉素、氯霉素和复方甲氧苄啶耐药, 耐药率分别为 100.0%、86.7%、60.0%和 60.0%^[28]。大肠杆菌和肺炎克雷伯菌同属于肠杆菌科的革兰氏阴性杆菌, 通过以上研究可以看出, 成都大熊猫繁育研究基地大熊猫种群主要对 β -内酰胺类和四环素类等抗生素耐药。

两个环境的大熊猫圈养种群对抗生素耐药的种类有所不同, 可能与以下因素有关: (1) 不同场所的兽医临床抗菌药物使用习惯不同; (2) 不同大熊猫圈养种群平时所患细菌性疾病的种类不同; (3) 外源耐药基因的输入有所不同。2018 年, Chen 等^[17]对野生大熊猫粪便源大肠杆菌的耐药性进行了研究, 发现对链霉素的耐药性最高(61.0%), 其次是阿米卡星(30.0%)。总之, 不管在大熊猫圈养种群还是野外种群都出现了抗生素耐药性, 警示我们平时更加需要合理地临床用药, 做好抗生素耐药性的监测工作。

2 大熊猫源细菌耐药基因的研究

耐药基因是一段核苷酸序列(DNA 片段), 可以在细菌的分裂和增殖过程中得到复制, 从而使细菌表达出耐药性状, 对抗生素表现出耐药性。大熊猫耐药基因的研究主要对大熊猫源大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、沙门氏菌、肠杆菌、葡萄球菌属、链球菌、铜绿假单胞菌、肠球菌和唾液乳杆菌等细菌开展, 其中对大熊猫源大肠杆菌和肺炎克雷伯菌耐药基因的研究相较其他细菌更加深入, 并且这 2 种细菌携带的耐药

基因种类也更多; 大熊猫源细菌携带的耐药基因可归属为 β -内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类、磺胺类、喹诺酮类、氯霉素类、多粘菌素类、MLSb 和万古霉素类 etc 等, 分别介导相应抗生素大类的表型耐药^[11,13,16-17,19-20,24-25,27-41](表 3)。综上发现, 大熊猫源细菌耐药基因的研究采用普通 PCR、高通量荧光定量 PCR 法(high-throughput real-time quantitative PCR, HT-qPCR)、宏基因组测序和全基因组测序等技术。

2.1 基于 PCR 技术对大熊猫源细菌耐药基因的研究

PCR 是一种能够在生物体外快速扩增特定 DNA 片段的分子生物学技术, 通过设计已知序列的耐药基因引物可以直接检测细菌或环境样品中的耐药基因^[42-43]。携带耐药基因是导致细菌对抗生素耐受的主要原因, 耐药基因赋予了细菌对几乎所有主要抗生素类别的抗性。张安云等^[11]早在 2006 年利用 GenBank 上提供的氨基糖苷类抗生素的各个耐药基因序列设计引物, 在大熊猫粪便源革兰氏阴性肠杆菌分离菌株中检测到氨基糖苷类抗生素耐药基因 *aphA3*、*aadA*、*aacC2* 和 *aacC4*, 比较其耐药表型与基因型的符合率为 76.3%; Zhang 等^[13]在 30 只大熊猫粪便源大肠杆菌、葡萄球菌和铜绿假单胞菌等多种分离菌株中发现多重耐药菌株(耐药表型), 通过四重 PCR 技术亦检测到菌株携带 *aph(3')-IIa*、*cmlA*、*ant(3'')-Ia*、*tetC* 和 *sulI* 等多种耐药基因(基因型); 高彤彤^[24]在大熊猫粪便源大肠杆菌中检测到产超广谱 β -内酰胺酶菌株(耐药表型), 通过设计 β -内酰胺类耐药基因, 检测到菌株携带 *TEM* 和 *CTX-M* 等耐药基因(基因型), 表明在大熊猫圈养种群中, 产超广谱 β -内酰胺酶的流行基因型可能是 *TEM* 和 *CTX-M*。理论上分离菌株的耐药表型和基因型是一一对

表 3 大熊猫源不同细菌耐药基因和可移动元件携带情况

Table 3 Antibiotic resistance genes and mobile genetic elements carried by different bacteria isolated from giant pandas

Giant panda-derived bacteria	Antibiotic resistant genes and classification	Role of antibiotic resistance genes	Mobile genetic elements	Integron and gene cassettes	References
<i>Escherichia coli</i>	β -lactams (ampC, CTX, CTX-M, CTX-M-28, CTX-M-55, OXA, SHV, TEM, TEM-1, TEM-34), tetracyclines (tetA, tetB, tetC, tetE, tetM, tetR), aminoglycosides (aac(6')-Ib, aac(3)-IIa, aacC2, aacC4, aadA, ant(3')-Ia, aphA3, aph(3')IIa, StrB), sulfonamides (sul1, sul2, sul3), quinolones (qnrB), chloramphenicols (cmIA, cat1, floR), methylase (rmtA, rmtB)	Encoding resistance to β -lactams, tetracyclines, aminoglycosides, sulfonamides, quinolones and chloramphenicols	Conjugate plasmid (tbrC), transposon (tnpA/Tn21, merA), insert sequence (IISCR3/14, IS1133, ISEcp1, IS26, ISaba1, IS903), integrators (class I, class II)	intI1 (dfrA12-orfF-aadA2, dfrA12- aadA2, dfrA17- aadA5, dfrA27- aadA2, dfrA1- aadA1, aacA4-aadA1-catB2, aadA1, aadA2, aadA5, dfrA1, dfrA7), intI2 (dfrA1-sat2-aadA1)	[11,13], [16-17], [19-20], [24-25], [29-34]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	β -lactams (ampC-02, ampC-04, ampC-06, ampC-07, ampC-09, ampC/blaDHA, CMY2-01, CMY2-02, CTX-M-01, CTX-M-02, CTX-M-03, CTX-M-04, CTX-M-05, CTX-M-06, GES, IMP-01, KPC, KPC2-13, MOX/CMY, NDM, NDM-1, OCH, OXA10-01, OXA10-02, OXA/OXA30, OXY, PER, SHV, SHV-01, SHV-02, TEM, VEB, VIM), tetracyclines (tetA, tetA-01, tetA-02, tetB-01, tetB-02, tetC-01, tetC-02, tetD, tetE, tetG-01, tetG-02, tetJ, tetM-01, tetPB-01), aminoglycosides (aac(6')-Ib, aac(6')-Iy, aac(6')-Ib(aka aacA4)-01, aac(6')-Ib(aka aacA4)-02, aac(6')-Ib(aka aacA4)-03, aac(6')II, aac, aacC, aacC2, aac(6')II, aadA1, aadA2-01, aadA2-02, aph, aph6ia, aph(2')-Id-01, aphA1(aka kanR), aphA3-01, aphA3-02, ant(3')-I), sulfonamides (sul1, sul2, sul3), quinolones (qnrA), Polymyxin (mcr1, mcr2), MLSB (erm, ermA, ermB, msrA-01), vancomycins (vanA, vanB-01, vanC1, vanC2/vanC3, vanHB, vanHD, vanSB, vanTC-02)	Encoding resistance to β -lactams, tetracyclines, aminoglycosides, sulfonamides, quinolones, polymyxin, MLSB and vancomycins	Conjugate plasmid (tbrC), Transposon (tnpU, tnpA/Tn21, dfrA12-orfF), merA, tnp513), Insert Sequence (ISCR1, ISCR3/14, ISEcp1, IS26, ISkpn7, ISaba1, IS903, IS613, IS3), Integrators (Class I, Class II, Class III)	intI1(dfrA12-orfF-aadA2, dfrA12-orfF)	[27-28], [34-38]
<i>Salmonella</i>	Aminoglycosides (aph(3')-IIa, ant(3')-Ia), tetracyclines (tetC, tetM)	Encoding resistance to aminoglycoside and tetracycline	—	—	[13]

(待续)

(续表 3)

Giant panda-derived bacteria	Antibiotic resistant genes and classification	Role of antibiotic resistance genes	Mobile genetic elements	Integron and gene cassettes	References
<i>Enterobacteriaceae</i>	β -lactams (CTX, TEM, SHV), tetracyclines (tetA), aminoglycosides (ant(3')-Ia), sulfonamides (sul1)	Encoding resistance to β -lactams, tetracyclines, aminoglycosides	—	—	[34]
<i>Staphylococcus</i>	β -lactams (bla Z, mec A), tetracyclines (tet M, tet K), aminoglycosides (aac A-aph D, aph(3')-IIa, ant(3')-Ia), sulfonamides (sul1), chloramphenicols (floR), MLSB (ermA, ermB, ermC), vancomycins (Van A, Van B)	Encoding resistance to β -lactams, tetracyclines, aminoglycosides, sulfonamides, chloramphenicols, MLSB and vancomycins	—	—	[13,39]
<i>Streptococcus faecalis</i>	Chloramphenicols (cmlA)	Encoding resistance to chloramphenicols	—	—	[13]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tetracyclines (tetC), aminoglycosides (aph(3')-Ia), sulfonamides (sul1, sul3), chloramphenicols (cmlA, cat1, floR)	Encoding resistance to aminoglycosides, sulfonamides and chloramphenicols	—	—	[13]
<i>Enterococcus</i>	Tetracyclines (tetL, tetM), aminoglycosides (aac(6')-Ie-aph(2')-Ia), macrolides (ermE)	Encoding resistance to tetracyclines, aminoglycosides, and macrolides	—	—	[34,40]
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Tetracyclines (tetM)	Encoding resistance to tetracyclines	—	—	[41]

— represents no relevant references or reports.

应的,但是也存在耐药基因不表达或数量太多无法一一研究的情况,因此,存在耐药表型和基因型符合率不高的问题。通过 PCR 技术可以有针对性地检测菌株的耐药基因,通过结合菌株耐药表型,能更好地分析菌株的临床抗生素耐药情况以及耐药机制。但是普通 PCR 技术存在检测通量小,工作量大,且需要测序进一步分析检测结果等缺点^[44],而 HT-qPCR 具有通量高、灵敏、快速等优点,可以对菌株携带的耐药基因进行大量、快速的量化检测,了解掌握耐药基因的全面概况^[45]。我们采用 HT-qPCR 技术检测成都大熊猫繁育研究基地 2018–2019 年分离的 178 株大熊猫源肺炎克雷伯菌的 227 种耐药基因,共检测出 106 种耐药基因,其中多

重耐药基因和 β -内酰胺类耐药基因含量最高,分别为 33.2%和 26.6%^[27];同时我们进一步运用 HT-qPCR 技术检测成都大熊猫繁育研究基地 2020 年分离的 30 株大熊猫源多重耐药肺炎克雷伯菌的 82 种耐药基因,共检测出 50 种不同类型、共包括 671 个耐药基因,丰度排名前十位的耐药基因为: *vanTC-02*、*aacC*、*CTX-M-04*、*SHV-01*、*SHV-02*、*ampC-04*、*OXY*、*tetD*、*TEM* 和 *tetA-02*,介导了一系列抗生素的耐药性,如 β -内酰胺类、氨基糖苷类、万古霉素类、四环素类和磺胺类抗生素的耐药性,其中大部分耐药基因归属于 β -内酰胺类抗生素^[28]。这也与成都大熊猫繁育研究基地大熊猫种群主要对 β -内酰胺类抗生素耐药的表型研究相符合^[24-26]。虽然采用 PCR 技

术开展大熊猫耐药基因研究具有检测目标明确、能与耐药表型对应分析的优点,但是,无论是普通 PCR 还是 HT-qPCR 都须以细菌培养为基础,并且还局限于对已知序列的耐药基因进行检测,不能发现新的耐药基因。

2.2 基于测序技术对大熊猫源细菌耐药基因的研究

全基因组测序是对未知基因组序列的物种进行个体的基因组测序,细菌则包括染色体和所有质粒的遗传信息和框架。通过全基因组测序能掌握细菌的所有耐药基因信息,包括碱基组成、亚型种类和数量、所在位置及基因环境。2019 年邓雯文等^[19]在泌尿生殖道感染出现潜血的大熊猫尿液中分离出一株致病性大肠杆菌(*Escherichia coli* CCHTP),对该菌株进行全基因组测序,发现其携带了包括 14 大类、共 161 个抗生素耐药基因,涉及介导糖肽类抗生素(万古霉素)耐药的 *vanTG/TC/RI* 等 10 个耐药基因、介导多肽类抗生素多肽类(多粘菌素)抗生素耐药的 *mcr-3*、*PmrF/E/C* 等 9 个耐药基因和介导四环素类抗生素(四环素)耐药的 *tetT/B(60)/A(48)/34* 等耐药基因。运用全基因组测序分别对大熊猫源大肠埃希菌 CCHTP、大肠埃希菌 ECGP15、鲍曼不动杆菌 AB53、肺炎克雷伯菌 KPGP110 和铜绿假单胞菌 PA212 的基因组进行分析,发现以上 5 株菌携带了大量的耐药基因,主要介导了糖肽类、多肽类和四环素类抗生素耐药^[46]。运用全基因组测序研究细菌耐药性可以在分析耐药基因的基础上进一步对其耐药机制和水平传播机制进行探讨,但也存在需要在菌株纯培养基础上进行的缺点。

宏基因组测序则是不需要细菌培养,通过直接提取环境样品的 DNA 并进行高通量测序、序列组装和基因注释之后,与耐药基因数据库比对,达到对样品中所有微生物宏基因组的信

息进行集合,从而定性定量分析的目的。运用宏基因组测序不仅可以掌握大熊猫群体整体的耐药基因携带情况,还可以探讨年龄、生活环境等因素对大熊猫源菌群携带耐药基因的影响。李才武等^[46]比较不同年龄大熊猫肠道细菌耐药基因携带情况,结果表明耐药基因在大熊猫粪便样本中高度富集,涉及了喹诺酮类和 β -内酰胺类等抗生素耐药基因;对丰度前 30 的耐药基因比较发现,幼年、成年和老年大熊猫各有优势耐药基因,但总体上表现为幼年大熊猫高于成年和老年。2021 年 Mustafa 等^[47]对中国大熊猫保护研究中心的大熊猫肠道耐药基因进行研究,发现大熊猫肠道菌群中广泛分布抗生素耐药基因,大熊猫的肠道是新型耐药基因和抗生素生物合成的储存库,并且在幼年大熊猫肠道中耐药基因的丰度显著高于成年和老年大熊猫。Hu 等^[48]运用宏基因组分析了大熊猫野生种群(秦岭、邛崃山和小香岭)和圈养种群(雅安和成都)中抗生素耐药基因的地理分布,发现圈养对大熊猫耐药基因的组成有影响,与其他野生和圈养种群研究相比,秦岭种群肠道菌群携带的耐药基因表现出极大的差异,主要表现在梭菌和万古霉素耐药基因的差异。综上可知,不同生境下不同年龄大熊猫的耐药性有所区别。

3 大熊猫源细菌耐药机制和水平传播机制的研究

细菌主要通过表达药物灭活酶或钝化酶使抗生素失活、外膜通透性的改变使抗生素无法渗透入细菌内、主动外排系统主动泵出抗菌药物和改变抗生素作用的靶点等生化机制对抗生素产生耐药。目前关于大熊猫源细菌的耐药机制的研究报道较少。李才武等^[46]通过宏基因组测序发现耐药基因在大熊猫粪便样本中高度富集,其中

检出率最高的耐药基因主要为外排泵系统, 尤其是耐药结节细胞分化(resistance-nodulation-cell division, RND)家族抗生素外排泵, 揭示其可能为大熊猫肠道细菌耐药的主要机制。我们前期对 178 株大熊猫源肺炎克雷伯菌携带的耐药基因进行分析, 发现外排泵(42.0%)、抗生素失活(41.8%)和改变作用靶位(16.2%)为其主要的耐药机制^[27]。2017 年刘晓强等^[49]报道大熊猫源大肠埃希菌对新型动物专用氟喹诺酮类药物普多沙星的耐药机制主要由靶基因的点突变和外排泵基因的过量表达所导致。2022 年 Wang 等^[34]对一株耐 16 种抗生素的大熊猫粪便源肺炎克雷伯菌携带的耐药基因进行预测, 发现其大部分耐药基因是外排泵基因。综上可知, 目前大熊猫源细菌的耐药机制主要是主动外排。

耐药菌和耐药基因之所以成为一种新型的环境污染物, 是因为耐药菌携带的耐药基因可借助质粒、转座子(如 insertion sequence, IS 序列)、整合子/基因盒系统、噬菌体以及抗性岛等可移动元件在不同细菌间以及环境中进行水平转移, 从而使敏感菌获得耐药性^[50]。2012 年余丛等^[51]在大熊猫粪便源大肠杆菌的抗性质粒序列中预测到转座酶基因。2015 年闫国栋等^[25]对来自成都大熊猫繁育研究基地的 50 株大熊猫粪便源大肠杆菌携带的整合子-基因盒情况开展了研究, 发现有 15 株(30.0%)携带 I 类整合子, 并且其中 6 株含有基因盒, 主要介导氨基糖苷类和磺胺-甲氧苄啶耐药, 未发现 II 类和 III 类整合子。2018 年 Zou 等^[16]对来自中国大熊猫研究与保护中心 89 株大熊猫粪便源大肠杆菌携带的整合子-基因盒情况开展了研究, 发现 47.0% 的菌株携带 I 类整合子, 8.0% 菌株携带 II 类整合子, 部分含有耐药基因盒, 未发现 III 类整合子。2020 年 Zhu 等^[26]对来自成都大熊猫繁育研究基地的 84 株大熊猫粪便源大肠杆菌携带的转座

子、插入序列和整合子-基因盒情况等可移动元件开展了研究, 共检测到 11 种可移动元件, 其中转座子遗传标记 *merA* (54/84, 64.3%) 的检出率最高, 同时分别有 32.0% 和 4.0% 的分离株携带 I 类和 II 类整合子, 部分含有耐药基因盒, 未发现 III 类整合子。我们前期对 30 株大熊猫粪便源多重耐药肺炎克雷伯菌研究发现这些菌株携带了 13 种可移动元件, 其中插入序列遗传标记 IS26 (96.7%, 29/30) 的检出率最高, I 类整合子的检出率为 96.7%, 且含有耐药基因盒, 未检测到 II 类和 III 类整合子^[28]。Wang 等^[34]对一株大熊猫粪便源肺炎克雷伯菌进行全基因组测序, 发现其携带的耐药基因 *blaTEM-1* 与 *blaCTX-M-3* 相邻, 其耐药性区域的两侧是各种 IS 序列, 并且菌株含有 I 类整合子基因盒。2016 年万莉^[29]通过 R 质粒结合转移试验发现大熊猫粪便源大肠杆菌的 R 质粒上的抗四环素和产 β -内酰胺酶的耐药基因可以转移至大肠杆菌 J53, 进行耐药基因的水平传播。综上所述, 大熊猫源细菌中已经存在大量多样的可移动元件, 包括接合性质粒、转座子、插入序列和整合子-基因盒(表 3), 存在水平转移的威胁。其中整合酶的类型主要为 I 型整合子, 较少为 II 型和 III 型, 基因盒的研究主要对 I 型和 II 型整合子开展, 组成主要有 *dfrA12-orfF-aadA2* 和 *dfrA1-sat2-aadA1* (表 3)。造成这种结果的原因可能是大熊猫源细菌的耐药性研究主要集中在革兰氏阴性菌, 而在革兰氏阴性菌中, I 类整合子比 II 类或 III 类更普遍; 且在动物和临床样本中 III 类整合子很少见^[52-54]。

4 大熊猫源细菌与其他物种来源细菌的耐药性比较

整体上大熊猫的耐药性与其他物种一样——不同年龄组的耐药性有所不同。通过宏基因组测序对幼年、成年和老年大熊猫粪便样本中耐

药基因的亚型和丰度分析发现,幼年大熊猫携带的耐药基因亚型的丰度是高于成年和老年大熊猫的^[46-47];肖延光等^[55]对分离自不同年龄段猪源链球菌的耐药性进行了比较发现,5周龄仔猪源分离菌株已经具有较高较全面的耐药性,但对头孢吡肟、氟苯尼考等抗生素的耐药性低于20周龄猪;岑敏等^[56]对不同年龄段儿童肺炎克雷伯菌的耐药性分析发现,0-3岁年龄段儿童分离的肺炎克雷伯菌对常见抗菌药物的耐药率大于3-7岁年龄段儿童。以上研究可以看出,不同年龄个体的耐药性以及对其一特种抗生素的耐药性有所不同,临床用药须考虑年龄因素。同时,幼龄动物免疫力较弱,更易受到细菌性疾病的威胁,造成抗生素使用频率增大。大熊猫产仔难,幼仔存活率不高,日常护理更需科学和精心,以增强其免疫力,抵抗细菌性疾病的危害,降低抗生素耐药性。

目前大熊猫源大肠杆菌的耐药性研究较多,将其与其他物种源大肠杆菌的耐药性进行对比发现,大熊猫源大肠杆菌的耐药性相较于其他野生动物更高、相较于食品动物源更低。大熊猫源大肠杆菌对氨苄西林的耐药率为58.0%-69.1%、四环素耐药率为13.6%-69.8%、阿莫西林耐药率为12.5%-26.7%、氨曲南2020年耐药率已达86.9%(表1和表2);丹顶鹤源大肠杆菌菌株对氨苄西林的耐药率为57.5%,但对氨曲南、阿莫西林敏感^[57];野生禽类(野鸽,野鸭,麻雀和无斑点燕八哥)源大肠杆菌菌株对四环素、氨苄西林的耐药率分别为21.3%和19.5%^[58];王娟等^[59]对分离自山东、内蒙古、山西、重庆4个省(市/自治区)的猪源、鸡源大肠杆菌的耐药性检测发现,对四环素耐药率高达92.5%,耐药率高于70.0%的有5种药物;林居纯等^[60]对四川地区不同养殖场和屠宰场中健康鸡、猪、鸭肛拭子及肠道内容物分离的大肠杆菌的耐药

性检测发现,对氨苄西林、四环素等抗生素的耐药率均在80.0%以上。推测出现以上差异的原因一方面是大熊猫作为野生动物的一种,食性单一,平时抗生素使用严格,故比食品动物源大肠杆菌的耐药性低;另一方面大熊猫相较于其他野生动物与人的关系更为紧密,有更多机会接触抗生素,故大熊猫源大肠杆菌的耐药性高于其他野生动物。

近年来,我们课题组对大熊猫源肺炎克雷伯菌的耐药性开展了研究发现,大熊猫源肺炎克雷伯菌对 β -内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类、喹诺酮类和磺胺类等常见37种抗生素的耐药率低于10.0%^[27];郭蕊等^[61]对貂源肺炎克雷伯菌的耐药性进行检测,发现对阿莫西林、氨苄西林、庆大霉素、新霉素、氟苯尼考、强力霉素、磺胺二甲氧嘧啶7种药物的耐药率为59.5%-100.0%;解秀梅等^[62]对西宁地区宠物犬源肺炎克雷伯菌的耐药性进行研究,发现对阿莫西林、氨苄西林、庆大霉素、新霉素、氟苯尼考、强力霉素、大观霉素、磺胺二甲氧嘧啶8种药物耐药率均在61.0%以上;尧荣凤等^[63]对人源肺炎克雷伯菌的耐药性分析发现,分离株对亚胺培南和美罗培南的耐药率从2013年的5.1%和6.2%上升至2019年的28.6%和29.2%,并且产碳青霉烯酶菌株对多数抗菌药物的耐药率大于80.0%。以上研究可以看出,大熊猫源肺炎克雷伯菌的抗生素耐药性整体上是比较低的,表明大熊猫平时临床用药比较合理。但是多重耐药肺炎克雷伯菌^[28]、产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌^[36,38]和产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌^[37]菌株已在大熊猫种群中出现,警示我们须进一步加强大熊猫耐药性的监测,做到合理用药;并加强大熊猫耐药菌的来源与传播机制相关研究,以防止大熊猫源细菌耐药性的扩散和加重。

5 小结与展望

综上所述, 大熊猫种群中已经出现了耐药菌, 并且部分菌株还表现出多重耐药性, 耐药机制主要为主动外排。比较大熊猫圈养种群和野生种群耐药性发现, 大熊猫的生存环境和方式等对其影响相对较小^[21], 但对某些大类抗生素的耐药性存在差异, 大熊猫圈养种群对四环素类和大环内酯类的耐药性高于野生种群^[48]。同时, 耐药菌携带的耐药基因可通过质粒、整合子/基因盒等可移动元件进行水平传播从而加快细菌耐药性的传播。但目前大熊猫源耐药菌的研究主要集中在粪便源、革兰氏阴性菌(多为大肠杆菌), 而关于大熊猫源革兰氏阳性菌耐药性、耐药菌的主要来源与传播途径及耐药菌的危害尚不清楚, 因此, 在未来的研究中可从以下几点进一步探究: (1) 大熊猫源革兰氏阳性菌耐药性的调查研究; (2) 健康大熊猫粪便源细菌多为条件致病菌, 可从大熊猫病料分离致病菌, 开展其耐药性的调查研究; (3) 大熊猫源耐药菌的致病性, 以及耐药性与毒力强弱的关联性; (4) 对大熊猫-环境-人(饲养员)链中细菌耐药性和可移动元件等开展调查, 以掌握大熊猫细菌耐药性的来源与传播机制; (5) 研发新药或者新型抗菌剂(如噬菌体、抗菌肽), 以减少抗生素的使用频率; (6) 通过基因敲除、质粒消除等分子手段研究大熊猫源细菌的耐药机制, 以控制大熊猫源耐药性细菌的持续产生和传播。同时考虑到我们虽然无法根除细菌耐药性, 但可以通过减少对耐药性的选择压力进而减少耐药菌基因的产生与传播。因此, 平时须加强大熊猫耐药性监测, 以促进临床抗生素使用进一步科学化、规范化; 同时合理的大熊猫饲养管理方案, 尤其是对幼年大熊猫的科学护理, 可增强大熊猫对疾病的抵抗力, 从而减少疾病的发

生, 降低抗生素使用频率。通过上述的举措可进一步指导大熊猫源耐药菌的有效防控。

参考文献

- [1] 耿国彪. 1864 只 我国野生大熊猫保护取得新成效: 全国第四次大熊猫调查结果公布[J]. 绿色中国, 2015(4): 10-12.
GENG GB. 1864 wild pandas protection in China makes new achievements[J]. Green China, 2015(4): 10-12 (in Chinese).
- [2] 吴生才. 大熊猫繁育技术委员会 2019 年年在蓉召开[J]. 绿色天府, 2019(12): 11.
WU SC. The 2019 Annual Meeting of Giant Panda Breeding Technical Committee was held in Chengdu[J]. Green Tianfu, 2019(12): 11 (in Chinese).
- [3] 谭志, 鲍楠, 赖翼, 张和民, 李德生, 刘成君. 野外放归大熊猫和圈养大熊猫肠道正常菌群的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 41(6): 1276-1279.
TAN Z, BAO N, LAI Y, ZHANG HM, LI DS, LIU CJ. The study on the normal intestinal microflora of the giant panda returned to wild and the giant panda in captivity[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2004, 41(6): 1276-1279 (in Chinese).
- [4] 王成东, 兰景超, 罗婵, 杨智, 张再蓉. 大熊猫感染性泌尿生殖道血尿症病原—肺炎克雷伯氏杆菌[J]. 四川动物, 2006, 25(1): 83-85, 202.
WANG CD, LAN JC, LUO L, YANG Z, ZHANG ZR. *Klebsiella pneumoniae*—pathogen of urogenital hematuria of giant panda[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2006, 25(1): 83-85, 202 (in Chinese).
- [5] 孙飞龙, 刘敬贤, 席丹, 王万云, 高更更, 冯宁, 杨水云. 大熊猫肠道疾病致病菌[J]. 经济动物学报, 2002, 6(2): 20-23.
SUN FL, LIU JX, XI D, WANG WY, GAO GG, FENG N, YANG SY. Pathogens of intestinal diseases in giant panda[J]. Journal of Economic Animal, 2002, 6(2): 20-23 (in Chinese).
- [6] 鲍楠, 刘成君, 张和民, 李德生. 大熊猫肠道微生态的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(4): 57-59.
BAO N, LIU CJ, ZHANG HM, LI DS. Research progress on intestinal microecology of giant panda[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2005, 37(4): 57-59 (in Chinese).
- [7] KEENEY KM, YURIST-DOUTSCH S, ARRIETA MC, FINLAY BB. Effects of antibiotics on human

- microbiota and subsequent disease[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2014, 68: 217-235.
- [8] 王娟, 王新华, 徐海. 多重耐药菌在人类、动物和环境的耐药和传播机制[J]. *微生物学报*, 2016, 56(11): 1671-1679.
- WANG J, WANG XH, XU H. Antimicrobial resistance and dissemination of multidrug resistant organisms—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(11): 1671-1679 (in Chinese).
- [9] LI N, CHAI YM, YING GG, JONES KC, DENG WJ. Airborne antibiotic resistance genes in Hong Kong kindergartens[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 260: 114009.
- [10] CHEN QL, AN XL, LI H, SU JQ, MA YB, ZHU YG. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil[J]. *Environment International*, 2016, 92/93: 1-10.
- [11] 张安云, 周万蓉, 吴琦, 王红宁, 柳萍, 黄勇, 杨鑫, 夏青青, 刘立, 曾喻虹. 多重 PCR 对大熊猫和野生动物肠道分离菌氨基糖苷类抗生素耐药基因检测研究: 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会理事会会议暨教学专业委员会暨代表大会, 2006-08-01.
- [12] 曾喻虹, 王红宁, 刘立, 谢波, 杨鑫, 封浪. 大熊猫源大肠杆菌的分离 鉴定和耐药性检测[J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(3): 30-31.
- ZENG YH, WANG HN, LIU L, XIE B, YANG X, FENG L. Isolation, identification and drug resistance detection of *Escherichia coli* from giant panda[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2008, 44(3): 30-31 (in Chinese).
- [13] ZHANG AY, WANG HN, TIAN GB, ZHANG Y, YANG X, XIA QQ, TANG JN, ZOU LK. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in faecal bacteria from 30 giant pandas[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 33(5): 456-460.
- [14] 李蓓, 李旭林, 郭丽娟, 龙梅, 郭放, 何雪梅, 罗燕, 邹立扣. 大熊猫肠道大肠杆菌的分离、鉴定及其耐药性分析[J]. *西南农业学报*, 2012, 25(3): 1109-1113.
- LI B, LI XL, GUO LJ, LONG M, GUO F, HE XM, LUO Y, ZOU LK. Isolation and drug resistance analysis on *Escherichia coli* in intestines from giant pandas[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 25(3): 1109-1113 (in Chinese).
- [15] 李蓓, 郭莉娟, 龙梅, 汤纯香, 周晓平, 罗燕, 邹立扣. 圈养大熊猫肠道微生物分离、鉴定及细菌耐药性研究[J]. *四川动物*, 2014, 33(2): 161-166.
- LI B, GUO LJ, LONG M, TANG CX, ZHOU XP, LUO Y, ZOU LK. Isolation and antimicrobial resistance of bacteria from intestinal tract of giant panda[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2014, 33(2): 161-166 (in Chinese).
- [16] ZOU WC, LI CW, YANG X, WANG YX, CHENG GY, ZENG JX, ZHANG XZ, CHEN YP, CAI R, HUANG QR, FENG L, WANG HN, LI DS, ZHANG GQ, CHEN YX, ZHANG ZZ, ZHANG HM. Frequency of antimicrobial resistance and integron gene cassettes in *Escherichia coli* isolated from giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in China[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 116: 173-179.
- [17] CHEN DY, ZOU WC, XIE SZ, KONG LH, CHEN YP, ZHANG XZ, LI JN, WANG HN, CHENG GY, QIN Y, MU XY, YANG X. Serotype and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from feces of wild giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in Sichuan Province, China[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2018, 54(4): 691-699.
- [18] 马晓平, 杨秋霞, 李长城, 张志和, 侯蓉, 沈富军, 曹三杰, 黄小波, 凌珊珊, 余树民, 左之才, 邓俊良, 沈留红, 伍锐, 文翼平, 任志华, 曹随忠, 王承东, 彭广能, 钟志军, 等. 发情期大熊猫阴道真菌的分离鉴定及酵母菌药敏试验[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(10): 1233-1240.
- MA XP, YANG QX, LI CC, ZHANG ZH, HOU R, SHEN FJ, CAO SJ, HUANG XB, LING SS, YU SM, ZUO ZC, DENG JL, SHEN LH, WU R, WEN YP, REN ZH, CAO SZ, WANG CD, PENG GN, ZHONG ZJ, et al. Isolation and identification of fungi from the vagina of estrus giant panda and drug sensitive tests of the isolated yeasts[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(10): 1233-1240 (in Chinese).
- [19] 邓雯文, 李才武, 赵思越, 李仁贵, 何永果, 吴代福, 杨盛智, 黄炎, 张和民, 邹立扣. 大熊猫源致病大肠杆菌 CCHTP 全基因组测序及耐药和毒力基因分析[J]. *遗传*, 2019, 41(12): 1138-1147.
- DENG WW, LI CW, ZHAO SY, LI RG, HE YG, WU DF, YANG SZ, HUANG Y, ZHANG HM, ZOU LK. Whole genome sequencing reveals the distribution of resistance and virulence genes of pathogenic *Escherichia coli* CCHTP from giant panda[J]. *Hereditas*, 2019, 41(12): 1138-1147 (in Chinese).
- [20] ZHOU W, ZHU LW, JIA M, WANG TC, LIANG B, JI X, SUN Y, LIU J, GUO XJ. Detection of multi-drug-resistant *Escherichia coli* in a giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) with extraintestinal polyinfection[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2018, 54(3): 626-630.

- [21] 郝中香, 廖红, 刘丹, 赵珊, 郝立新, 颜其贵, 韩国全, 张和民, 李德生, 王承东, 侯蓉, 齐敦武. 不同生境大熊猫源肠球菌耐药性分析[J]. 四川动物, 2015, 34(5): 641-649.
HAO ZX, LIAO H, LIU D, ZHAO S, XI LX, YAN QG, HAN GQ, ZHANG HM, LI DS, WANG CD, HOU R, QI DW. Antimicrobial resistance and characteristics of *Enterococcus* isolates from different habitats of giant Panda[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2015, 34(5): 641-649 (in Chinese).
- [22] 叶志勇, 吕文其, 刘新华, 姜文球, 权洙浣, 金银规, 李昌雨. 大熊猫小肠结肠炎耶尔森氏菌感染及治疗[J]. 中国兽医杂志, 1998, 34(8): 11.
YE ZY, LÜ WQ, LIU XH, JIANG WQ, QUAN ZH, JIN YG, LI CY. Infection and treatment of *Yersinia enterocolitis* in giant panda[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1998, 34(8): 11 (in Chinese).
- [23] 张锐. 中西兽医结合治疗大熊猫角膜翳[J]. 中国兽医杂志, 1994, 30(1): 41-42.
ZHANG R. Treatment of giant panda's pannus by combination of Chinese and western veterinary medicine[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1994, 30(1): 41-42 (in Chinese).
- [24] 高彤彤. 大熊猫粪便及环境中大肠杆菌耐药性和质粒介导 ESBLs 酶耐药基因检测[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2014.
GAO TT. The detection of resistance and plasmid-mediated ESBLs in *Escherichia coli* strains from feces of pandas and living environment[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [25] 闫国栋, 刘颂蕊, 侯蓉, 高彤彤, 王爽, 代鹏飞, 邓林, 林居纯. 大熊猫粪源大肠杆菌耐药性及整合子研究[J]. 四川动物, 2015, 34(4): 489-493.
YAN GD, LIU SR, HOU R, GAO TT, WANG S, DAI PF, DENG L, LIN JC. Antimicrobial resistance and integrons of *Escherichia coli* isolates from giant pandas feces[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2015, 34(4): 489-493 (in Chinese).
- [26] ZHU ZQ, PAN SL, WEI B, LIU HF, ZHOU ZY, HUANG XM, LUO Y, ZHOU L, ZHANG SQ, MA XP, CAO SZ, SHEN LH, WANG Y, FU HL, GENG Y, HE CL, XIE Y, PENG GN, ZHONG ZJ. High prevalence of multi-drug resistances and diversity of mobile genetic elements in *Escherichia coli* isolates from captive giant pandas[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 198: 110681.
- [27] 燕霞, 杨梅, 李林, 张东升, 苏菲, 李运莉, 侯蓉, 岳婵娟, 刘颂蕊, 苏小艳. 大熊猫源肺炎克雷伯菌耐药性和分子分型研究[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 1061-1072.
YAN X, YANG M, LI L, ZHANG DS, SU F, LI YL, HOU R, YUE CJ, LIU SR, SU XY. Drug resistance and molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolated from giant panda[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 1061-1072 (in Chinese).
- [28] YAN X, SU XY, REN ZH, FAN XY, LI YL, YUE CJ, YANG M, DENG HD, DENG YT, XU ZW, ZHANG DS, LI L, HOU R, LIU SR, DENG JL. High prevalence of antimicrobial resistance and integron gene cassettes in multi-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 801292.
- [29] 万莉. 大熊猫源大肠杆菌耐药性检测及质粒介导耐药基因的研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2013.
WAN L. Surveillance of antimicrobial resistance and detection of plasmid-mediated resistance gene among *Escherichia coli* isolates from giant pandas[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [30] 覃振斌, 侯蓉, 林居纯, 高彤彤, 刘颂蕊. 圈养大熊猫粪便源和环境源大肠杆菌质粒介导 β -内酰胺类酶耐药基因的检测[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(3): 69-74.
QIN ZB, HOU R, LIN JC, GAO TT, LIU SR. Detection of plasmid-mediated β -lactams resistance genes in *Escherichia coli* isolates from feces of captive giant panda and their habitats[J]. Journal of China Agricultural University, 2018, 23(3): 69-74 (in Chinese).
- [31] 魏斌. 圈养大熊猫肠道大肠杆菌耐药性分析[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2019.
WEI B. Study on drug resistance of *Escherichia coli* in captive giant pandas[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [32] 闫国栋. 不同源大肠杆菌耐药性及整合子—基因盒研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2015.
YAN GD. Study on drug resistance and integron gene cassette of *Escherichia coli* from different sources[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [33] 龚永平, 陈珍容, 杨智捷, 曹洪志, 杨锐, 杨光友, 孙国忠, 王飞, 颜其贵. 野生大熊猫粪便源携I类整合子的产志贺毒素大肠杆菌的分离鉴定[J]. 中国预

- 防兽医学报, 2017, 39(9): 767-769.
- GONG YP, CHEN ZR, YANG ZJ, CAO HZ, YANG R, YANG GY, SUN GZ, WANG F, YAN QG. Isolation and identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with class I integrons from wild giant panda[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(9): 767-769 (in Chinese).
- [34] WANG X, ZHANG Y, LI CW, LI G, WU DF, LI T, QU YY, DENG WW, HE YG, PENTTINEN P, ZHANG HM, HUANG Y, ZHAO K, ZOU LK. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus* spp. isolated from the feces of giant panda[J]. BMC Microbiology, 2022, 22(1): 102.
- [35] FENG Y, CHEN YY, LIU SR, HOU R, YAN X, GENG Y, ZHONG ZJ, GUO HR, OU-YANG P, ZHANG DS, SU XY. Surveillance study of *Klebsiella pneumoniae* in the giant panda revealed high genetic diversity and antibiotic therapy challenge[J]. Antibiotics: Basel, Switzerland, 2022, 11(4): 473.
- [36] SU XY, YAN X, LI YL, ZHANG DS, LI L, GENG Y, SU F, YUE CJ, HOU R, LIU SR. Identification of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST37, ST290, and ST2640 in captive giant pandas[J]. BMC Veterinary Research, 2022, 18(1): 186.
- [37] 燕霞, 杨梅, 蒋雨林, 李林, 张东升, 李运莉, 侯蓉, 岳婵娟, 嵇晓光, 刘颂蕊, 苏小艳. 大熊猫源产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药性和致病性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(2): 214-218.
- YAN X, YANG M, JIANG YL, LI L, ZHANG DS, LI YL, HOU R, YUE CJ, JI XG, LIU SR, SU XY. Study on antibiotic resistance and pathogenicity of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from giant panda[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022, 44(2): 214-218 (in Chinese).
- [38] 苏小艳, 李运莉, 燕霞, 张东升, 李林, 侯蓉, 岳婵娟, 刘颂蕊. 大熊猫源产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(7): 1276-1281.
- SU XY, LI YL, YAN X, ZHANG DS, LI L, HOU R, YUE CJ, LIU SR. Isolation and identification of extended-spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in captive giant panda[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(7): 1276-1281 (in Chinese).
- [39] 冯帆. 圈养大熊猫口腔源葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2019.
- FENG F. Isolation, identification and drug resistance analysis of oral *Staphylococcus* in captive giant panda[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [40] 俞道进, 陈玉村, 修云芳, 罗小青, 赖宝色, 陈志华, 黄一帆. 熊猫源性高水平耐氨基糖苷类肠球菌耐药表型及基因型研究[A]//大熊猫繁育技术委员会年会[C]. 2010-11-11.
- [41] 王黎明, 张文平, 王洁, 谢军金, 周杰珑. 熊猫源唾液乳杆菌的分离鉴定及部分生物学特性分析[J]. 野生动物学报, 2019, 40(3): 537-546.
- WANG LM, ZHANG WP, WANG J, XIE JJ, ZHOU JL. Isolation, identification, and analysis of some biological characteristics of *Lactobacillus salivarius* from giant panda[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2019, 40(3): 537-546 (in Chinese).
- [42] 应春晓. DNA 片段体外扩增技术: 聚合酶链式反应(PCR)的原理与应用[J]. 西安教育学院学报, 1996(2): 30-32.
- YING CX. Principle and application of DNA fragment amplification technology *in vitro*-polymerase chain reaction (PCR)[J]. Journal of Xian Institute of Education, 1996(2): 30-32 (in Chinese).
- [43] 李玥莹. DNA 体外扩增技术: 聚合酶链式反应(PCR)[J]. 沈阳师范学院学报(自然科学版), 2000, 18(4): 40-44.
- LI YY. DNA amplified technique out body polymerase chain reaction (PCR)[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science), 2000, 18(4): 40-44 (in Chinese).
- [44] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(6): 1-3, 8.
- LIANG ZY, LIU F. Research progress on real-time quantitative PCR technology and its application[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(6): 1-3, 8 (in Chinese).
- [45] SU JQ, WEI B, OU-YANG WY, HUANG FY, ZHAO Y, XU HJ, ZHU YG. Antibiotic resistance and its association with bacterial communities during sewage sludge composting[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(12): 7356-7363.
- [46] 李才武, 邹立扣. 圈养大熊猫肠道细菌耐药性研究[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2020.
- LI CW, ZOU LK. Antibiotic Resistance of Intestinal Bacteria in Captive Giant Pandas[M]. Chengdu: Sichuan Scientific & Technical Publishers, 2020 (in

- Chinese).
- [47] MUSTAFA GR, LI CW, ZHAO SY, JIN L, HE XP, SHABBIR MZ, HE YG, LI T, DENG WW, XU L, XIONG YW, ZHANG GQ, ZHANG HM, HUANG Y, ZOU LK. Metagenomic analysis revealed a wide distribution of antibiotic resistance genes and biosynthesis of antibiotics in the gut of giant pandas[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 15.
- [48] HU T, DAI QL, CHEN H, ZHANG Z, DAI Q, GU XD, YANG XY, YANG ZS, ZHU LF. Geographic pattern of antibiotic resistance genes in the metagenomes of the giant panda[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(1): 186-197.
- [49] 刘晓强, 李芳娥, 杨鹏超, 李引乾, 蒿彩菊. 体外诱导大熊猫大肠埃希菌对普多沙星的耐药性及其机制研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(3): 68-74.
- LIU XQ, LI FE, YANG PC, LI YQ, HAO CJ. *In vitro* pradofloxacin resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2017, 45(3): 68-74 (in Chinese).
- [50] PAL C, BENGTTSSON-PALME J, KRISTIANSSON E, LARSSON DGJ. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes[J]. Microbiome, 2016, 4(1): 54.
- [51] 余丛, 张义正, 侯蓉, 张志和, 严悦, 谭雪梅. 大熊猫肠道菌抗生素抗性菌转座酶的基因克隆和表达[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2012, 49(3): 715-722.
- YU C, ZHANG YZ, HOU R, ZHANG ZH, YAN Y, TAN XM. Cloning and expression of transposase gene of plasmid DNA from antibiotic-resistance bacteria in intestine of giant pandas[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2012, 49(3): 715-722 (in Chinese).
- [52] LAVAKHAMSEH H, MOHAJERI P, ROUHI S, SHAKIB P, RAMAZANZADEH R, RASANI A, MANSOURI M. Multidrug-resistant *Escherichia coli* strains isolated from patients are associated with class 1 and 2 integrons[J]. Chemotherapy, 2016, 61(2): 72-76.
- [53] REHMAN MU, ZHANG H, HUANG SC, IQBAL MK, MEHMOOD K, LUO HQ, LI JK. Characteristics of integrons and associated gene cassettes in antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from free-ranging food animals in China[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(8): 1902-1907.
- [54] ZHANG SQ, YANG H, REHMAN MU, YANG KM, DONG MY, YANG J, WANG MS, JIA RY, CHEN S, LIU MF, ZHU DK, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG L, LIU YY, YU YL, TIAN B, PAN LC, CHEN XY, et al. Class 1 integrons as predominant carriers in *Escherichia coli* isolates from waterfowls in Hainan, China[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 183: 109514.
- [55] 肖延光, 夏新萌, 王宝菊, 郝占忠, 王兆烂. 不同年龄、地区、饲养模式下猪链球菌耐药性比较[J]. 养殖与饲料, 2022, 21(1): 84-86.
- XIAO YG, XIA XM, WANG BJ, HAO ZZ, WANG ZL. Comparison of drug resistance of *Streptococcus suis* in different ages, regions and feeding patterns[J]. Animals Breeding and Feed, 2022, 21(1): 84-86 (in Chinese).
- [56] 岑敏, 何仁忠, 袁科, 左芳. 2015-2018 年黄石市中心医院不同年龄段儿童下呼吸道感染病原菌的分布及耐药性分析[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(2): 549-553.
- CEN M, HE RZ, YUAN K, ZUO F. Analysis on distribution and drug resistance of pathogens in children of different ages with lower respiratory tract infections in Huangshi Central Hospital from 2015 to 2018[J]. Drugs & Clinic, 2019, 34(2): 549-553 (in Chinese).
- [57] 魏正凯, 李玥, 周伟, 薛原, 华育平, 肖向红, 张显光, 马建华. 丹顶鹤源大肠杆菌耐药性的检测与分析[J]. 经济动物学报, 2012, 16(1): 13-15.
- WEI ZK, LI Y, ZHOU W, XUE Y, HUA YP, XIAO XH, ZHANG XG, MA JH. Monitoring and multi-drug resistance analysis of *Escherichia coli* from *Grus japonensis*[J]. Journal of Economic Animal, 2012, 16(1): 13-15 (in Chinese).
- [58] SACRISTÁN C, ESPERÓN F, HERRERA-LEÓN S, IGLESIAS I, NEVES E, NOGAL V, MUÑOZ MJ, TORRE ADL. Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain[J]. Avian Pathology, 2014, 43(2): 172-175.
- [59] 王娟, 黄秀梅, 刘书科, 盖文燕, 赵思俊, 曲志娜, 王玉东, 王君玮. 不同动物源大肠杆菌的耐药性监测分析[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(11): 64-67.
- WANG J, HUANG XM, LIU SK, GAI WY, ZHAO SJ, QU ZN, WANG YD, WANG JW. Surveillance and analysis of drug resistance of *Escherichia coli* from different animals[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 49(11): 64-67 (in Chinese).
- [60] 林居纯, 舒刚, 张辉建, 曹三杰, 文心田. 健康畜禽

- 肠道大肠杆菌耐药性及整合子-基因盒检测[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(1): 56-60.
- LIN JC, SHU G, ZHANG HJ, CAO SJ, WEN XT. Detection of resistance and characterization of integron-cassettes in *Escherichia coli* from intestinal tract of healthy food-animals, enteric strains[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(1): 56-60 (in Chinese).
- [61] 郭蕊, 张召兴, 曹丽辉, 高桂生, 史秋梅. 貂源肺炎克雷伯菌分离鉴定与耐药性检测[J]. 野生动物学报, 2021, 42(4): 1187-1191.
- GUO R, ZHANG ZX, CAO LH, GAO GS, SHI QM. Isolation, identification and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* from mink[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2021, 42(4): 1187-1191 (in Chinese).
- [62] 解秀梅, 童富珍. 西宁地区宠物犬源肺炎克雷伯菌血清型鉴定、致病性及耐药性检测[J]. 动物医学进展, 2021, 42(7): 131-134.
- XIE XM, TONG FZ. Serotype identification, pathogenicity and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from pet dogs in Xining[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2021, 42(7): 131-134 (in Chinese).
- [63] 尧荣凤, 赵冰清, 吴亚洲, 吴迪, 任圣洁, 许国祥. 2013–2019 年某三级综合医院肺炎克雷伯菌分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(12): 1611-1616, 1620.
- YAO RF, ZHAO BQ, WU YZ, WU D, REN SJ, XU GX. Analysis on distribution and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary comprehensive hospital from 2013 to 2019[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2022, 19(12): 1611-1616, 1620 (in Chinese).