

盐酸多西环素诱导大肠埃希菌及其对替加环素体外交叉耐药性及相关耐药基因分析

黄歆如¹, 郭刘玲¹, 吴俊伟^{1,2*}, 唐鑫², 邓开锋²

1 西南大学 动物医学院, 重庆

2 重庆布尔动物药业有限公司, 重庆

黄歆如, 郭刘玲, 吴俊伟, 唐鑫, 邓开锋. 盐酸多西环素诱导大肠埃希菌及其对替加环素体外交叉耐药性及相关耐药基因分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3524-3539.

HUANG Xinru, GUO Liuling, WU Junwei, TANG Xin, DENG Kaifeng. Induction of cross resistance of *Escherichia coli* to tigecycline by doxycycline hydrochloride and identification of resistance genes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3524-3539.

摘要: 【目的】研究体外诱导的大肠埃希菌耐药突变株对替加环素的交叉耐药机制。【方法】采用防耐药突变浓度(mutant prevention concentrations, MPC)诱导方法, 使用盐酸多西环素对大肠埃希菌 ATCC 25922 进行分步耐药突变诱导, 并对诱导所得耐药突变株进行耐药谱测定; 通过全基因组二代测序分析 ATCC 25922 及最高倍耐药突变株的关键差异耐药基因突变情况, 并根据全基因组测序结果使用 RT-PCR 技术对最高倍耐药突变株的关键差异耐药基因进行转录量测定; 采用 siRNA 技术分别干扰关键差异耐药基因在最高倍耐药突变株中的表达。【结果】经分步耐药突变诱导获得 3 株不同程度对替加环素耐药的大肠埃希菌耐药突变株, 分别为 Y_{3.2-2}、Y₆₄ 和 Y₁₂₈₋₂, 且耐药程度依次为 Y_{3.2-2}<Y₆₄<Y₁₂₈₋₂, 其耐药谱均表现出多重耐药性; 共检出 14 种耐药基因, 均出现不同程度的碱基突变和氨基酸突变; 在高倍耐药突变株 Y₁₂₈₋₂ 中, *acrA*、*acrE*、*acrF*、*acrS*、*plsC*、*rpsJ*、*acrB* 和 *macA* 基因上调, 而 *tolC*、*marA*、*sdiA* 和 *macB* 基因下调; 在 1×MIC 和 1/2×MIC 替加环素浓度下成功干扰 Y₁₂₈₋₂ 的 *rpsJ* 和 *plsC* 耐药基因表达, 菌株恢复对替加环素的敏感性。【结论】体外诱导所得的高倍耐药突变株 Y₁₂₈₋₂ 对替加环素产生耐药性的主要作用机制是, 核糖体结合位点 *rpsJ* 和细菌细胞膜通透性相关耐药基因 *plsC* 过量表达。

关键词: 替加环素; 大肠埃希菌; 耐药机制; 干扰

*Corresponding author. E-mail: wjw999@163.com

Received: 2024-10-25; Accepted: 2025-04-10; Published online: 2025-06-11

Induction of cross resistance of *Escherichia coli* to tigecycline by doxycycline hydrochloride and identification of resistance genes

HUANG Xinru¹, GUO Liuling¹, WU Junwei^{1,2*}, TANG Xin², DENG Kaifeng²

¹ College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing, China

² Chongqing Bull Animal Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing, China

Abstract: [Objective] To investigate the mechanism of the induced cross resistance of drug-resistant mutants of *Escherichia coli* to tigecycline *in vitro*. [Methods] We used doxycycline hydrochloride and the mutation preventive concentration (MPC) method to induce the drug resistance mutation of *Escherichia coli* ATCC 25922, and the drug resistance spectra of the mutants were determined. Genome-wide next-generation sequencing was utilized to analyze the mutations of key differentially expressed resistance genes of ATCC 25922 and the mutant with the highest resistance index. RT-PCR was used to determine the transcription levels of the key differentially expressed resistance genes of the mutant with the highest resistance index according to the whole genome sequencing results. The expression of key differentially expressed resistance genes in the mutant with the highest resistance index was knocked down by siRNA. [Results] Three drug-resistant *E. coli* mutants Y_{3.2-2}, Y₆₄, and Y₁₂₈₋₂ with different degrees of resistance to tigecycline were obtained after stepwise induction of drug resistance mutation, with the resistance following the order of Y_{3.2-2} < Y₆₄ < Y₁₂₈₋₂. All the mutants showed multi-drug resistance. Fourteen resistance genes were detected with varying degrees of base mutations and amino acid mutations. In the mutant Y₁₂₈₋₂ with the highest resistance index, the expression of *acrA*, *acrE*, *acrF*, *acrS*, *plsC*, *rpsJ*, *acrB*, and *macA* was up-regulated, while that of *tolC*, *marA*, *sdiA*, and *macB* was down-regulated. The resistance genes *rpsJ* and *plsC* in Y₁₂₈₋₂ were successfully interfered with at tigecycline concentrations of 1×MIC and 1/2×MIC, and the strain regained sensitivity to tigecycline. [Conclusion] Y₁₂₈₋₂ develops resistance to tigecycline by the overexpression of the ribosome binding site gene *rpsJ* and the bacterial cell membrane permeability-related resistance gene *plsC*.

Keywords: tigecycline; *Escherichia coli*; drug resistance mechanism; interference

近年来, 抗菌药物滥用现象层出不穷, 导致病原菌传播更加广泛, 耐药菌的进化和变异也更加频繁。此外, 多重耐药的泛滥使得许多治疗方案宣告无效, 特别是在重症监护病房, 死亡率可高达 100%^[1]。

替加环素是一种新型四环素类衍生抗菌药物, 因其广泛的体外抗菌活性, 被视为多重耐药菌感染的“最后一道防线”。然而, 随着替加

环素使用, 其滥用现象导致耐药率不断增加。目前, 已有不少病原菌出现替加环素耐药的报道^[2-3]。此外, 研究发现编码黄素依赖性单加氧酶的质粒携带的 *tet(X)* 基因是不同物种间传播替加环素耐药菌株的潜在方式, 正在加速其耐药基因的水平传播^[4-7]。大肠埃希菌作为重要的食源性致病菌之一, 其耐药性问题愈发严重, 多重耐药大肠埃希菌在全球范围内的流行率正在

增加^[8]。国内外多项研究调查结果显示,从环境中分离的菌株中大肠埃希菌居多,且表现为多重耐药性。其对 β -内酰胺类、大环内酯类、四环素类、磺胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类以及酰胺醇类抗菌药物的耐药率普遍较高,而对替加环素、黏菌素等仍处于敏感或低水平耐药阶段^[9-16]。

细菌获得耐药性的重要途径之一是自发突变。1999年,Dong等^[17]提出了突变选择窗(mutant selection window, MSW)理论,即最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)与防止第一步耐药突变菌株选择性增殖所需的防耐药突变浓度(mutant prevention concentration, MPC)之间的范围为突变选择窗(mutant selection window, MSW)^[18]。当抗菌药物浓度落在MSW中时能够选择性富集一步耐药突变株^[19]。研究发现,临床上感染部位的细菌数量一般在 10^{10} CFU/mL以内,而 10^{14} CFU/mL则极为罕见,若耐药菌株已发生一次突变,其再次突变的概率极小^[20]。该理论的提出为探究细菌耐药性及其作用机制提供了新的研究思路。然而,细菌的适应性突变可能导致交叉耐药性(cross resistance, CR)^[21],即细菌等微生物对一种抗菌药物产生耐药性后,同时对其他结构相似或作用机制相同的抗菌药物也表现出耐药性^[22]。Flores等^[23]研究发现,临床分离的大肠埃希菌对多西环素均耐药,对米诺环素的耐药率为70%,而对替加环素、依拉环素和奥马环素均敏感。

目前,研究细菌耐药性机制的常见技术之一是利用基因敲除技术阻碍细菌某一基因的正常功能发挥。RNA干扰(RNAi)是一种利用具有序列特异性调控功能的小RNA(small RNA, siRNA)在转录后水平下调特定基因表达的生物学机制^[24]。在干扰的起始阶段,内源性的双链RNA被Dicer酶识别并切割成21-23个碱基的RNA片段,即siRNA。在效应阶段,siRNA与核酸酶复合物结合形成RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),活化后

的RISC可以与siRNA中反义链互补的靶mRNA结合,进行转录本的切割,终止其蛋白翻译能力,最终导致基因沉默^[25]。Gong等^[26]使用siRNA技术对铜绿假单胞菌中的外排泵基因*MexB*进行干扰,通过RT-PCR技术检测干扰前后该基因的表达量,结果显示干扰后该基因的mRNA水平显著降低。Yanagihara等^[27]将金黄色葡萄球菌与siRNA共培养,RT-PCR结果显示siRNA显著抑制了凝固酶mRNA的表达。Fooladi等^[28]将铜绿假单胞菌与siRNA共培养后测定其对鞭毛蛋白mRNA的抑制情况,RT-PCR结果显示抑制效果显著。

实验室前期采用亚抑菌浓度诱导法对大肠埃希菌进行体外诱导,成功获得了高倍耐替加环素的耐药菌株。为了使菌株尽可能产生自发突变,本研究改变诱导方法,使用防耐药突变浓度的盐酸多西环素对大肠埃希菌质控菌进行分步体外诱导,以获得对替加环素耐药的交叉耐药菌株;随后,采用全基因测序、荧光定量PCR及siRNA干扰技术对耐药突变株的交叉耐药机制进行探究,以期为后续研究替加环素的天然耐药机制提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

大肠埃希菌质控菌 ATCC 25922 购自中国兽医药品监察所。

1.1.2 主要试剂和仪器

MH肉汤、LB肉汤、营养琼脂、伊红美蓝琼脂、平板计数琼脂,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;肠杆菌科细菌生化鉴定管(15种),杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组提取试剂盒、电泳用DNA marker,宝日医生物技术(北京)有限公司;50×TAE缓冲液,北京索莱宝科技有限公司;GoodView™核酸染料、琼脂糖Agarose,北京兰杰柯科技有限公司;

TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂, 天根生化科技(北京)有限公司; MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix、SGExcel FastSYBR qPCR 预混液, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

两人单面高品质垂直层流通风罩、30 L 立式压力蒸汽灭菌器、数显恒温水浴锅, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 电子分析天平, 上海精密科学仪器有限公司; 可变容量移液器, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 高电流电泳仪电源, 杭州诺扬生物技术有限公司; 韦克斯-通用水平电泳槽, 西安昊兴生物科技有限公司; 凝胶成像分析系统, 北京六一生物科技有限公司; 双光束紫外可见分光光度计, 上海洪纪仪器设备有限公司; 智能二维梯度基因扩增仪, 杭州柏恒科技有限公司; 医用荧光定量 PCR 仪, 鲲鹏(徐州)科学仪器有限公司。

1.1.3 药品

替加环素(98.00%), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 硫酸卡那霉素(94.00%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 盐酸多西环素(93.99%)、土霉素(89.70%)、阿莫西林(86.30%)、恩诺沙星(98.28%)、盐酸林可霉素(88.96%)、酒石酸泰乐菌素(93.09%)、氟苯尼考(99.20%)、硫酸新霉素(62.50%)、硫酸黏菌素(82.30%)、硫酸头孢唑肟(96.85%)、磺胺嘧啶(92.87%), 重庆布尔动物药业有限公司; 盐酸万古霉素(93.00%)、氨苄青霉素钠盐(85.00%), 北京兰杰柯科技有限公司。

1.2 盐酸多西环素及替加环素对 ATCC 25922 的最小抑菌浓度(MIC)

采用微量肉汤稀释法测定最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。取 96 孔板, 每行前 11 孔加入 100 μL 的 MH 肉汤; 再向每行第 1 孔加入 100 μL 、8 $\mu\text{g/mL}$ 的盐酸多西环素或替加环素, 混匀后吸出 100 μL 至第 2 孔, 依次倍比稀释至第 9 孔后吸出 100 μL 弃去; 向每行 1–10 孔加入 1×10^6 CFU/mL 菌悬液 5 μL ,

使每孔菌悬液终浓度约为 1×10^4 CFU/mL; 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 16–18 h 后观察结果, 无细菌生长的最低药物浓度判定为 MIC 值。

1.3 体外诱导 ATCC 25922 耐药

取 3×10^{10} CFU/mL ATCC 25922 菌悬液 90 μL , 将菌悬液加入至 1 $\times$ MIC、2 $\times$ MIC、4 $\times$ MIC、8 $\times$ MIC、16 $\times$ MIC、32 $\times$ MIC 的含药平板中, 用涂布棒均匀涂抹, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24–72 h 后观察结果, 无菌落生长的最低药物浓度判定为耐药突变浓度(mutant prevention concentrations, MPC)。在 MIC–MPC 之间选取药物浓度配制含药平板, 将菌悬液接种于含药平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24–48 h 后观察结果; 取单菌落, 测定盐酸多西环素和替加环素的 MIC, 将 MIC 值较诱导前 ≥ 4 倍的判定为一步突变菌株。将筛选得到的突变菌株在伊红美蓝琼脂(eosin-methylene blue agar, EMB)平板上传代 10 次, 并测定 MIC 值, 若 MIC 值不发生变化, 则判定为稳定耐药突变株, 菌种于–80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以同样方法获得二步和三步耐药突变株。对诱导所得耐药突变株进行生化鉴定、耐药谱、最小杀菌浓度(minimal bacteriocidal concentration, MBC)测定。

1.4 替加环素对 ATCC 25922、耐药突变株时间-杀菌曲线的测定

取单菌落于含 5 mL LB 肉汤的试管内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\times\text{g}$ 振荡培养至 OD_{600} 为 0.5 备用; 根据待测菌株 ATCC 25922 和 Y₁₂₈₋₂ 对替加环素的 MIC 设置浓度梯度, 按 1:100 比例将菌悬液与各浓度药液依次混合, 使其终浓度分别为 0 $\times$ MIC、1/4 $\times$ MIC、1/2 $\times$ MIC、1 $\times$ MIC、2 $\times$ MIC、4 $\times$ MIC 及 8 $\times$ MIC; 分别在孵育时间 0、2、4、6、8、10、12、24 h 取菌悬液 90 μL , 均匀涂抹于平板计数琼脂; 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 16–24 h 后进行计数, 并绘制时间-杀菌曲线。

1.5 检测耐药突变株相关耐药基因变异情况

Sanger 测序和序列拼接、物种注释及基因

组组分和功能分析均由广东美格基因科技有限公司完成。根据测得的全基因序列, 使用 SnapGene、EditSeq 和 MegAlign 软件对相关耐药基因的碱基序列和氨基酸序列进行比对, 分析突变情况。

1.6 体外诱导耐药突变株耐药基因表达量测定

引物根据 NCBI 中基因序列及全基因组测序中的基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 和 NCBI 设计, 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。对 Y₁₂₈₋₂ 高倍耐药株进行耐药基因表达量的测定(表 1)。

RNA 抽提根据总 RNA 提取试剂盒步骤操

作; 反转录按 cDNA 第一链合成试剂盒步骤操作, 反转录合成 cDNA。荧光定量 PCR 检测的反应体系(10 μ L): 2 $\times$ SGExcel FastSYBR Mixture 5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.2 μ L, 模板 1 μ L, RNase-free ddH₂O 3.6 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环; 溶解曲线根据医用荧光定量 PCR 仪推荐程序进行设定。

1.7 体外诱导耐药突变株耐药机制的初步验证

1.7.1 siRNA 的转化

siRNA 干扰引物由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成。其中末尾的 TT 是悬垂碱基,

表1 目的基因荧光定量PCR扩增引物

Table 1 Fluorescence quantitative PCR amplification primers for target genes

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences (5'→3')	碱基数 Base count (bp)	退火温度 $T_m/^{\circ}$ C	扩增片段 Amplicon size (bp)
<i>gapA</i>	F: CGTATCGGTTCGCATTGTTTT	20	57.1	230
	R: ACTTCGTCCCATTTTCAGGTTAG	22	57.6	
<i>acrA</i>	F: TCACCTTTCGCACTGTCGTAT	21	59.9	127
	R: GTCCTCAAGTTAGCGGGATTAT	22	57.8	
<i>acrB</i>	F: TTGGCAGACGCACGAACA	18	58.6	120
	R: AG AAGAGCACGCACCACTACAC	22	61.9	
<i>tolC</i>	F: ATCGTGATGCTGCCTTTGAA	20	57.4	132
	R: CACTGGTCGCGTTAGAGTTGA	21	59.7	
<i>marA</i>	F: CTGAAGGAAAGTAACGAGCCG	21	58.3	140
	R: GATTCGCCCTGCATATTGGT	20	58.9	
<i>acrE</i>	F: CAGGTTTTTCCTCCTGCCCT	20	60.7	92
	R: CACCGACGTGAGCTTTCTCT	20	60.4	
<i>acrF</i>	F: AGTGCAGGTGCAGAACAAC	20	58.9	168
	R: GAGGCCACATAGTCCGAGAT	20	58.0	
<i>acrS</i>	F: CCAGCCGTCAAGTGTTC	20	58.3	109
	R: CGCGTGGCGCTATCTACT	18	60.1	
<i>sdiA</i>	F: CGCATCAGAGCCATCAGACT	20	60.4	115
	R: CGCTGGGCTTTTGTCTTT	20	60.1	
<i>macA</i>	F: AAAGCCTGTTTACGGTGCT	20	60.9	88
	R: CGTTAACCTTTTCCGGCGTC	20	58.4	
<i>macB</i>	F: TATCGGTATTGCGTCGGTGG	20	59.8	71
	R: TATCCGCCAGCACCATTGT	20	60.8	
<i>rpsJ</i>	F: AATCGTCGAGACTGCCAAGC	20	56.1	192
	R: ATCAGAGCATCAACGGTTTT	20	59.5	
<i>plsC</i>	F: CAATCACCAGACCGTTGTGC	20	59.0	80
	R: CGTCCCGATTATTCCCGTGT	20	60.2	

以便双链进入细胞后解链并靶向目标基因(表2)。

采用 CaCl_2 法制备感受态细胞, 在 50 μL 感受态细胞中加入 5 μL 该引物, 混匀后置于冰上 30 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴休克 90 s, 再冰浴 3 min, 向转化后的细菌中加入 1 mL LB, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 $\times g$ 培养 30–60 min, 至菌悬液浓度约为 1×10^6 CFU/mL。

1.7.2 转化后的耐药突变株在不同替加环素浓度下的生长情况测定

每个基因设置 1 $\times$ MIC、1/2 $\times$ MIC、1/4 $\times$ MIC 浓度组, NC 为阴性对照组。另外再设置药物对照组、菌悬液对照组、肉汤对照组和空白对照组, 各组分别设置 3 个重复孔。向上述孔内加入对应的含 siRNA 菌悬液 10 μL 、对应的 siRNA 引物 2 μL , 立即在酶标仪上测定此时(即 0 h) 600 nm 处的 OD 值; 前 8 h 每隔 1 h 补加 2 μL 对应的 siRNA 引物, 同时在 24 h 内每隔

2 h 测定 1 次 600 nm 处的 OD 值, 绘制生长曲线。

1.7.3 转化后所得耐药突变株 *rpsJ*、*plsC* 基因表达量的测定

采用 RT-PCR 方法, 在转入 siRNA 后的 24–48 h 内对各转化后所得菌株的目的基因进行表达量测定。

2 结果与分析

2.1 体外诱导 ATCC 25922 内结果

经盐酸多西环素诱导后, 得到 3 株不同耐药程度的耐药突变株, 分别为 $Y_{3.2-2}$ 、 Y_{64} 及 Y_{128-2} 。经 EMB 平板空白传代培养 10 代后, 结果见表 3。

标准菌株 ATCC 25922 的 MPC 值为 4 $\mu\text{g/mL}$ 。经盐酸多西环素诱导后, $Y_{3.2-2}$ 的 MPC 值为

表2 siRNA干扰引物

Table 2 siRNA interference primers

引物名称 Primers name	siRNA 序列 siRNA sequences (5'→3')
NC	Sense strand: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT Antisense strand: ACGUGACACGUUCGGAGAATT
<i>rpsJ</i> 80	Sense strand: GUCUGGUUGACAUCGUUGATT Antisense strand: UCAACGAUGUCAACCAGACTT
<i>rpsJ</i> 156	Sense strand: CAGAACAGUGAAGCGCUCUTT Antisense strand: AGAGCGCUUCACUGUUCUGTT
<i>rpsJ</i> 292	Sense strand: GCAGAACCAAAGAAUCCGUTT Antisense strand: ACGGAUUCUUUGGUUCUGCTT
<i>plsC</i> 132	Sense strand: GCGGCAGGAUUUCGACAAUTT Antisense strand: AUUGUCGAAAUGCUGCCGCTT
<i>plsC</i> 602	Sense strand: GCAAGACGGCCAAACAUAUTT Antisense strand: AUAUGUUUGGCCGUCUUGCTT
<i>plsC</i> 697	Sense strand: GCUGAUAAUCACGGUAAUATT Antisense strand: UAUUACCGUGAUUUACAGCTT
<i>acrE</i> 173	Sense strand: GCACCAAUGCUGUAUCGUAUTT Antisense strand: AUACGAUAAGCAUUGGUGCTT
<i>acrE</i> 496	Sense strand: GCUCGAAUCAAUUCUUGCUUTT Antisense strand: AAGCAAGAUUGAUGCGAGCTT
<i>acrE</i> 958	Sense strand: GCAACCGUGCUGAUUGUUATT Antisense strand: UAACAAUCAUCACGGUUGCTT

表3 诱导前后菌株MIC值

Table 3 MIC values of strains before and after induction

抗菌药物 Antimicrobial agents	ATCC 25922 MIC (μg/mL)	Y _{3.2-2} MIC (μg/mL)	Y ₆₄ MIC (μg/mL)	Y ₁₂₈₋₂ MIC (μg/mL)
盐酸多西环素 Doxycycline hydrochloride	0.500 0	32.000 0	64.000 0	128.000 0
替加环素 Tigecycline	0.062 5	0.250 0	0.500 0	1.000 0

64 μg/mL, Y₆₄ 的 MPC 值为 80 μg/mL, Y₁₂₈₋₂ 的 MPC 值为 135 μg/mL。菌株耐药倍数越大, MPC 值越高, 二者呈正相关。

选择指数(selection index, SI)是 MPC 与 MIC 的比值, 可用于比较菌株对抗菌药物选择耐药突变的能力。标准菌株 ATCC 25922 的 SI 值为 8.00, 经盐酸多西环素诱导后 Y_{3.2-2} 的 SI 值为 2.00, Y₆₄ 的 SI 值为 1.25, Y₁₂₈₋₂ 的 SI 值为 1.05。菌株耐药倍数越大, SI 值越小, 二者呈负相关。

2.2 诱导所得耐药突变株的生化鉴定结果

各菌株的生化特性均符合大肠埃希菌的标准(表 4)。

2.3 诱导所得耐药突变株的耐药谱

结果显示 Y_{3.2-2} 对盐酸林可霉素、酒石酸泰乐菌素及硫酸黏菌素敏感, 对其余抗菌药物均表现出不同程度的耐药性; Y₆₄ 对酒石酸泰乐菌素和硫酸黏菌素敏感, 对其余抗菌药物均表现出不同程度的耐药性; Y₁₂₈₋₂ 对盐酸林可霉素和硫酸卡那霉素敏感, 对其余抗菌药物均表现出不同程度的耐药性(表 5)。

2.4 替加环素对诱导所得耐药突变株的最小杀菌浓度(MBC)结果

随着菌株耐药性的增加, MBC 值逐渐增大, 二者呈正相关(表 6)。

2.5 替加环素对诱导所得耐药突变株的时间-杀菌曲线结果

时间杀菌曲线通常分为对数增长期、平稳期、下降期和灭菌期。替加环素对 Y₁₂₈₋₂ 的时

表4 诱导前后菌株生化鉴定结果

Table 4 Biochemical identification results of strains before and after induction

检测试剂 Test kit	ATCC 25922	Y _{3.2-2}	Y ₆₄	Y ₁₂₈₋₂
硫化氢 Hydrogen sulfide	-	-	-	-
苯丙氨酸 Phenylalanine	-	-	-	-
葡萄糖酸盐 Gluconate	-	-	-	-
蛋白胨水 Peptone water	-	-	-	-
葡磷胨水(VP 试验) Glucose water (VP test)	-	-	-	-
枸橼酸盐 Citrate	-	-	-	-
尿素 Urea	-	-	-	-
半固体 Semisolid	+	+	+	+
葡萄糖产气 Glucose gas production	+	+	+	+
赖氨酸 Lysine	+	+	+	+
鸟氨酸 Ornithine	+	-	+	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-	-
木糖 Xylose	+	+	+	+
侧金盏花醇 Adonitol	-	+	-	-
山梨醇 Sorbitol	+	+	+	+
氨基酸对照 Amino acid control	-	-	-	-

+: 90%–100% positive reaction; -: 0–10% positive reaction.

间-杀菌曲线结果与其对 ATCC 25922 的变化情况相似, 但在 1×MIC、2×MIC、4×MIC 及 8×MIC 药物浓度下, Y₁₂₈₋₂ 从 2 h 开始菌悬液浓度已呈现明显下降趋势, 且各浓度的斜率较 ATCC 25922 更小。结果表明, 替加环素对耐药

表5 诱导前后菌株耐药谱

Table 5 Drug resistance spectrum of strains before and after induction

抗菌药物 Antimicrobial agents	ATCC 25922 MIC (μg/mL)	Y _{3.2-2} MIC (μg/mL)	Y ₆₄ MIC (μg/mL)	Y ₁₂₈₋₂ MIC (μg/mL)
土霉素 Oxytetracycline	0.250 0	256.000 0	256.000 0	256.000 0
阿莫西林 Amoxicillin	0.250 0	1 024.000 0	1 024.000 0	1 024.000 0
硫酸头孢喹肟 Cefquinome sulfate	0.062 5	4.000 0	4.000 0	1 024.0000
氨苄青霉素钠 Ampicillin sodium	4.000 0	4 096.000 0	4 096.000 0	4 096.000 0
恩诺沙星 Enrofloxacin	0.007 8	1.000 0	4.000 0	4.000 0
盐酸林可霉素 Lincomycin hydrochloride	512.000 0	1 024.000 0	2 048.000 0	1 024.000 0
酒石酸泰乐菌素 Tylosin tartrate	256.000 0	256.000 0	512.000 0	1 024.000 0
磺胺嘧啶 Sulfadiazine	16.000 0	512.000 0	512.000 0	512.000 0
氟苯尼考 Florfenicol	4.000 0	1 024.000 0	2 048.000 0	512.000 0
氯霉素 Chloramphenicol	2.000 0	512.000 0	512.000 0	256.000 0
硫酸黏菌素 Colistin sulfate	0.250 0	0.250 0	0.250 0	4.000 0
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	0.12 50	2.000 0	0.500 0	32.000 0
硫酸卡那霉素 Kanamycin sulfate	2.000 0	16.000 0	8.000 0	4.000 0
万古霉素 Vancomycin	32.000 0	128.000 0	128.000 0	128.000 0

表6 诱导前后菌株MBC值

Table 6 MBC values of strains before and after induction

Strains	MBC (μg/mL)
ATCC 25922	0.125
Y _{3.2-2}	0.500
Y ₆₄	1.000
Y ₁₂₈₋₂	4.000

突变株的作用时间长于质控菌，且杀菌持续时间更长，杀菌效果不如质控菌理想，差异不显著(图 1、图 2)。

2.6 耐药基因突变结果

根据测序结果对比 ATCC 25922 与 Y₁₂₈₋₂ 的相关耐药基因，发现介导大肠埃希菌对替加环素耐药的相关耐药基因 *acrA*、*acrB*、*tolC*、*acrR*、*marA*、*marR*、*soxR*、*acrE*、*acrF*、*sdiA*、*acrS*、*plsC*、*rpsJ* 均发生了不同程度的突变(表 7)。

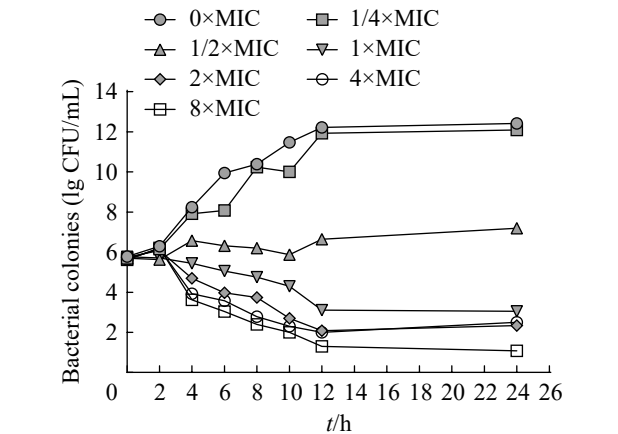


图1 ATCC 25922时间-杀菌曲线
Figure 1 Time-sterilization curves of ATCC 25922.

2.7 体外诱导耐药突变株荧光定量 PCR 结果

Y₁₂₈₋₂ 的 *acrA*、*acrE*、*acrF*、*acrS* 和 *plsC* 基因表达极显著上调($P<0.001$)；*rpsJ* 基因表达显著上调($P<0.05$)；*acrB* 和 *macA* 基因表达上调不显著($P>0.05$)；*tolC*、*marA*、*sdiA* 和 *macB* 基因

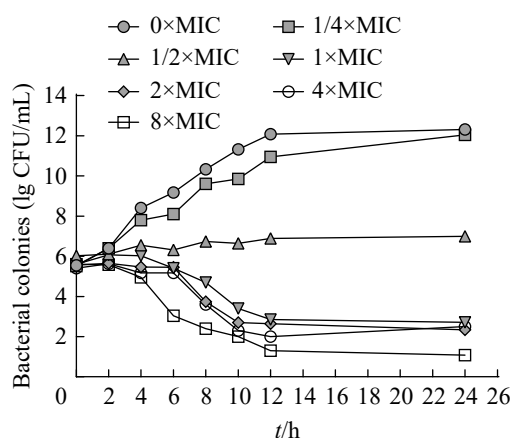


图2 Y₁₂₈₋₂时间-杀菌曲线

Figure 2 Time-sterilization curves of Y₁₂₈₋₂.

表达下调不显著($P>0.05$)。各耐药突变株中, 仅 *acrE* 和 *acrS* 基因的相对表达量差异极显著($P<0.001$) (图 3)。

2.8 干扰后各基因在不同浓度替加环素下的生长情况

2.8.1 1×MIC、1/2×MIC 及 1/4×MIC 替加环素浓度下 *rpsJ* 基因干扰结果

试验组 *rpsJ* 80、*rpsJ* 156、*rpsJ* 292 分别取自 *rpsJ* 基因的不同片段。各试验组菌株的生长趋势均低于阴性对照组, 表明 *rpsJ* 基因在 3 个药物浓度下均被成功干扰, Y₁₂₈₋₂ 恢复对替加环素的敏感性, 细菌生长受到抑制(图 4)。

2.8.2 1×MIC、1/2×MIC 及 1/4×MIC 替加环素浓度下 *plsC* 基因干扰及统计结果

plsC 干扰结果见图 5, 试验组 *plsC* 132、*plsC* 602、*plsC* 697 分别取自 *plsC* 基因的不同片段。除 *plsC* 697 外, 其余各试验组菌株的生长趋势均低于阴性对照组, 表明 *plsC* 基因在 3 个药物浓度下均被成功干扰, Y₁₂₈₋₂ 恢复对替加环素的敏感性, 细菌生长受到抑制。

2.9 干扰后所得耐药突变株 *rpsJ*、*plsC* 基因的表达量变化结果

向 Y₁₂₈₋₂ 分别转入各 siRNA 引物后, *rpsJ*

80、*rpsJ* 156 和 *rpsJ* 292 的相对表达量均较 Y₁₂₈₋₂ 极显著降低($P<0.001$); *plsC* 132 和 *plsC* 602 的相对表达量显著降低($P<0.05$)。 *plsC* 697 的相对表达量较 Y₁₂₈₋₂ 增加。NC 阴性对照的相对表达量与 Y₁₂₈₋₂ 无显著差异($P>0.05$) (图 6)。

3 讨论与结论

本研究通过在 MIC-MPC 之间选择盐酸多西环素浓度, 成功用盐酸多西环素诱导出 3 株对替加环素不同程度耐药的突变株。进一步比较各耐药突变株的 SI 值时发现, 结果与张雨菡等^[29]的研究报道基本一致: 随着耐药倍数的增加, SI 值逐渐减小, 表明该耐药突变株发生下一次突变的概率较小。Linkevicius 等^[30]研究发现, 在诱导大肠埃希菌产生对替加环素耐药的自发突变体时, 替加环素倾向于选择突变率较高的低水平耐药突变。结合本研究的所有测序结果及诱导结果来看, 诱导所得耐药突变株对替加环素的耐药水平同样处于低水平耐药阶段, 并且产生了多个基因突变。尽管一些临床耐药监测结果显示各类菌株对替加环素等药物表现出一定的敏感性, 但本研究诱导所得耐药突变株对 9 种常见抗菌药物呈现不同程度的多重耐药性, 因此临床合理使用抗菌药物显得尤为重要。

耐药基因表达量结果显示, 诱导后的各耐药突变株耐药机制十分复杂。Y₁₂₈₋₂ 的 *acrAB* 表达量较其余 2 株增加, 而 *macAB* 表达量呈降低趋势。分析 2 种外排泵的作用机制发现, MacAB-TolC 依赖 ATP 水解供能, 而 AcrAB-TolC 利用质子驱动力, 且研究表明 *tolC* 基因与 MacA 的亲和力更大^[31]。因此, 初步认为在本研究的低倍耐药突变株中 MacAB-TolC 发挥主要作用; 而在高倍耐药突变株中 AcrAB-TolC 发挥主要作用。研究表明, 当 *tolC* 基因缺失时, 细菌对药物的敏感性将显著增加^[32]。各耐药突变株 *tolC* 表达量与诱导前相比变化并不明显, 甚

表7 Y₁₂₈₋₂耐药基因突变情况

Table 7 Mutations of Y₁₂₈₋₂ resistance genes

基因 Gene	碱基突变 Base substitution			氨基酸突变 Amino acid substitution	
<i>acrA</i>	310 G→A	394 T→C	504 A→G	104 A→T	
	528 T→C	543 T→C	561 A→G		
	735 G→A	882 T→C	975 G→A		
	1 029 C→T				
<i>tolC</i>	39 C→T	339 T→A	357 G→A	233 T→A	
	372 A→G	423 G→T	543 A→G		
	697 A→G	732 C→G	747 T→C		
	756 A→G	792 C→T	816 G→A		
	822 C→T	831 A→G	849 C→T		
	858 A→G	1 080 T→C	1 086 C→T		
	1 110 A→G	1 119 T→C	1 149 T→C		
	1 284 G→A	1 413 G→T			
<i>acrB</i>	150 T→C	423 G→C	444 T→C	596 N→H	
	465 T→C	477 A→G	522 C→T		
	576 A→G	627 A→G	636 T→C		
	645 A→G	648 T→G	783 A→G		
	792 T→C	795 G→C	801 A→G		
	891 G→A	978 G→A	981 T→C		
	990 A→G	1 062 A→T	1 075 T→C		
	1 257 G→T	1 290 C→T	1 470 G→A		
	1 653 T→C	1 713 A→G	1 761 G→A		
	1 786 A→C	1 959 T→C	2 028 C→T		
	2 064 A→T	2 268 T→C	2 316 C→T		
	2 400 G→A	2 472 T→C	2 583 A→G		
	2 667 T→G	2 709 A→G	2 808 T→G		
	2 829 A→C	2 919 C→T	2 922 A→G		
	2 938 T→C				
<i>marA</i>	165 T→C	2 938 T→C	264 C→G	127 N→S	
	342 T→C	380 A→G			
<i>acrS</i>	21 T→C	27 C→T	77 A→G	26 Q→R	75 D→E
	120 T→C	225 T→A	234 C→G	213 K→Q	220 I→M
	240 G→A	261 G→A	288 T→C		
<i>acrR</i>	468 T→C	637 A→C	660 A→G		
	105 T→C	219 C→A	293 A→G	26 Q→R	75 D→E
<i>soxR</i>				213 K→Q	220 I→M
	99 C→T	126 T→C	171 C→T	74 R→G	
	210 C→G	213 A→G	220 C→G		
	243 A→C	351 T→C	414 A→C		
<i>acrF</i>	444 A→G				
	27 G→A	99 C→T	117 G→A	148 G→D	338 Q→H
	138 G→A	180 A→G	210 C→T	379 T→A	428 R→K
	315 A→G	441 T→A	443 G→A	500 V→T	
	543 G→A	693 C→T	780 G→A		
	783 T→C	861 G→A	864 C→T		
	870 G→T	885 C→T	888 C→T		
	972 T→C	993 T→A	1 011 C→T		

(待续)

(续表7)

基因 Gene	碱基突变 Base substitution	氨基酸突变 Amino acid substitution			
	1 014 G→C	1 023 G→A	1 029 G→A		
	1 041 C→T	1 053 A→G	1 083 C→T		
	1 089 G→A	1 095 A→G	1 096 T→C		
	1 101 A→C	1 113 T→G	1 119 T→C		
	1 122 C→G	1 135 A→G	1 137 A→G		
	1 146 A→C	1 173 T→C	1 176 G→A		
	1 188 T→C	1 197 A→G	1 209 A→G		
	1 212 T→G	1 215 T→C	1 218 T→C		
	1 233 C→G	1 236 T→G	1 257 A→G		
	1 272 A→G	1 278 C→G	1 281 C→A		
	1 283 G→A	1 302 G→A	1 323 G→A		
	1 329 A→G	1 344 A→G	1 350 G→A		
	1 380 T→C	1 383 C→T	1 386 A→T		
	1 389 A→T	1 419 T→C	1 422 T→C		
	1 428 A→G	1 443 A→T	1 446 A→T		
	1 452 T→G	1 455 G→A	1 456 C→T		
	1 464 C→T	1 470 C→T	1 486 T→C		
	1 491 G→C	1 497 A→C	1 498 G→A		
	1 499 T→C	1 503 T→A	1 506 C→T		
	1 527 A→T	1 530 A→T	1 548 C→T		
	1 554 T→C	1 572 T→C	1 584 T→C		
	1 590 T→C	1 614 G→A	1 830 A→G		
	1 935 A→G	1 959 A→G	1 995 T→C		
	2 082 G→A	2 109 C→T	2 148 C→T		
	2 257 T→C	2 517 T→C	2 538 T→A		
	2 553 G→T	2 586 A→G	2 598 T→C		
	2 736 A→G	2 745 A→G	2 979 G→T		
	2 997 A→G	3 006 C→G	3 024 C→A		
	3 063 G→A	3 087 T→C	3 090 A→T		
<i>acrE</i>	132 G→A	186 C→T	308 G→A	103 S→N	
	414 T→C	510 C→T	561 C→T	327 N→D	
	684 C→A	744 G→A	833 T→C		
	855 G→A	879 C→T	948 A→G		
<i>marR</i>	979 A→G	1 047 C→T	1 053 T→A		
	186 A→G	189 G→A	207 G→A	103 S→G	137 H→Y
	276 T→C	307 A→G	360 T→C		
	409 C→T				
<i>plsC</i>	29 C→T	44 T→G	59 G→T	199 0→D	
	80 C→T	110 T→C	128 T→C		
	143 G→A	161 G→A	170 A→G		
	302 C→T	326 C→T	371 G→A		
	383 C→T	386 G→A	407 G→A		
	410 G→A	425 A→T	470 G→A		
	473 A→G	545 C→T	549 T→C		
<i>rpsJ</i>	1 0→C	282 A→C	284 0→A	8 A→K	9 F→0
	293 A→0			92 E→A	93 C→M
				94 R→Q	95 S→I

至呈现下降趋势, 且外排泵的调控机制十分复杂, 各基因之间既存在自身抑制, 又存在相互抑制或相互促进, 因此初步认为上述 2 种外排泵在本研究所得诱导耐药突变株中不发挥主要作用。此外, 当 AcrAB-TolC 的功能被破坏后, AcrEF 会有代偿作用。同时, 调控基因 *acrS* 的过表达能有效降低 *acrAB* 的转录水平, 从而上调 *acrEF* 等^[33-36]。本研究中 *acrS* 表达量显著增加, 最终认为 AcrEF-TolC 在本研究的诱导耐药突变株中起主要作用。各耐药突变株的核糖体

蛋白 *rpsJ* 和磷脂转移酶 *plsC* 表达量也出现不同程度的增加, 表明除外排泵作用机制外还存在多种耐药机制。后续需要设计更加全面的验证方法, 以深入探究该耐药突变株的耐药机制。

研究发现, siRNA 进入细胞后其活性约在 24 h 达到峰值, 持续 48 h 后, 近 99% 的 siRNA 会被降解^[37]。此外, siRNA 含量和加入方式与其干扰效果存在一定联系, 分次加入较一次性加入效果更好^[38]。因此, 为确保 siRNA 的有效浓度及干扰效果, 试验中在前 8 h 每小时加入一

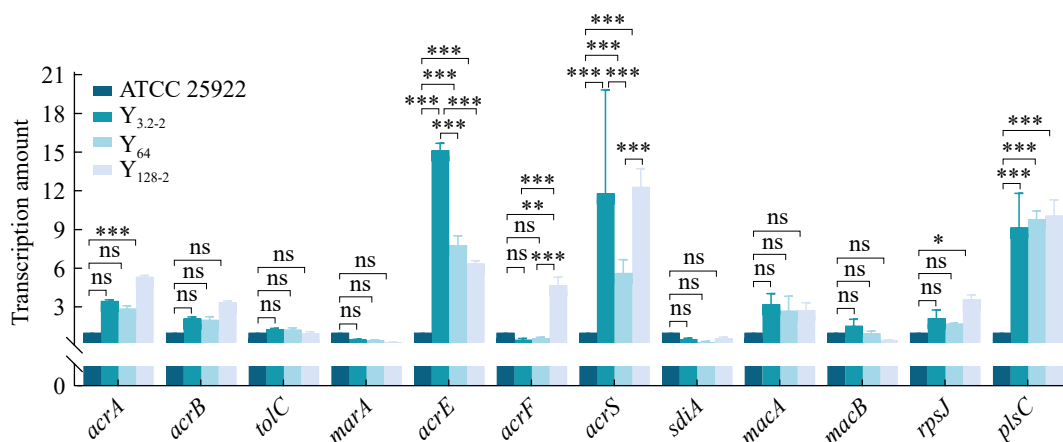


图3 各耐药突变株耐药基因相对表达量统计学结果

Figure 3 Statistical results of relative expression levels of resistance genes in various drug-resistant mutant strains. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

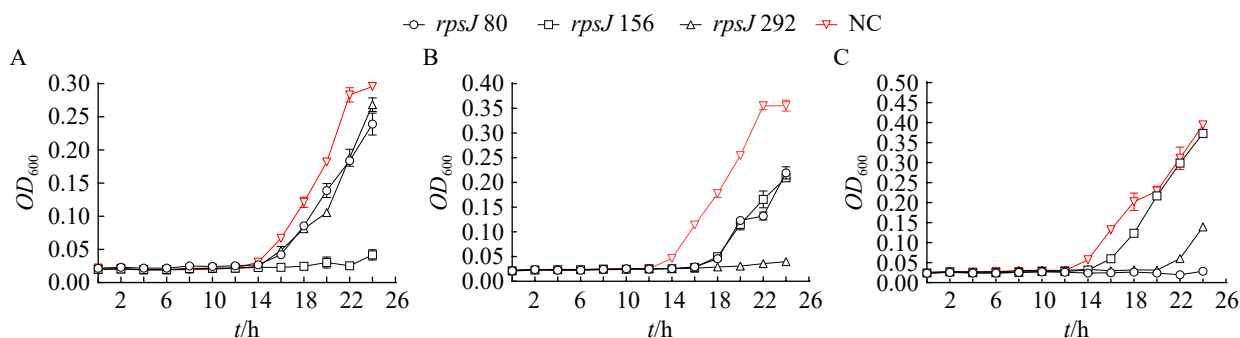


图4 不同替加环素浓度下 *rpsJ* 基因干扰结果。A: $1\times$ MIC 替加环素 *rpsJ* 基因干扰结果; B: $1/2\times$ MIC 替加环素 *rpsJ* 基因干扰结果; C: $1/4\times$ MIC 替加环素 *rpsJ* 基因干扰结果。

Figure 4 Results of *rpsJ* gene interference under different tigecycline concentrations. A: Results of *rpsJ* gene interference with $1\times$ MIC tigecycline; B: Results of *rpsJ* gene interference with $1/2\times$ MIC tigecycline; C: Results of *rpsJ* gene interference with $1/4\times$ MIC tigecycline.

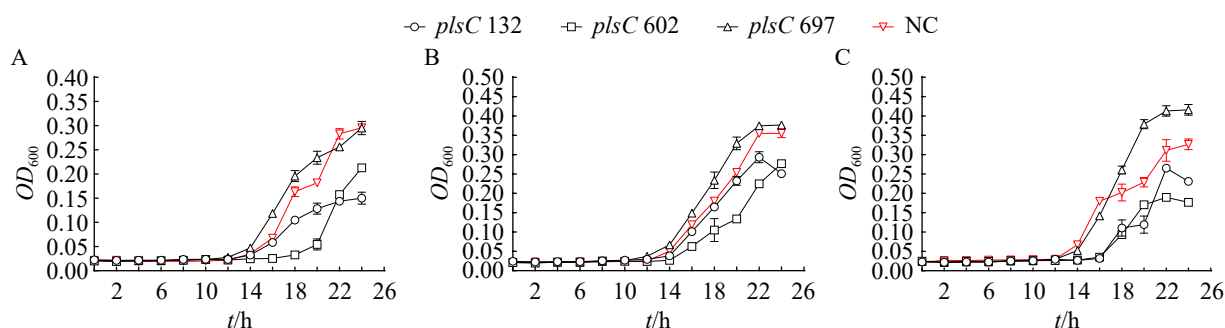


图5 不同替加环素浓度下 $plsC$ 基因干扰结果。A: $1\times\text{MIC}$ 替加环素 $plsC$ 基因干扰结果; B: $1/2\times\text{MIC}$ 替加环素 $plsC$ 基因干扰结果; C: $1/4\times\text{MIC}$ 替加环素 $plsC$ 基因干扰结果。

Figure 5 Results of $plsC$ gene interference under different tigecycline concentrations. A: Results of $plsC$ gene interference with $1\times\text{MIC}$ tigecycline; B: Results of $plsC$ gene interference with $1/2\times\text{MIC}$ tigecycline; C: Results of $plsC$ gene interference with $1/4\times\text{MIC}$ tigecycline.

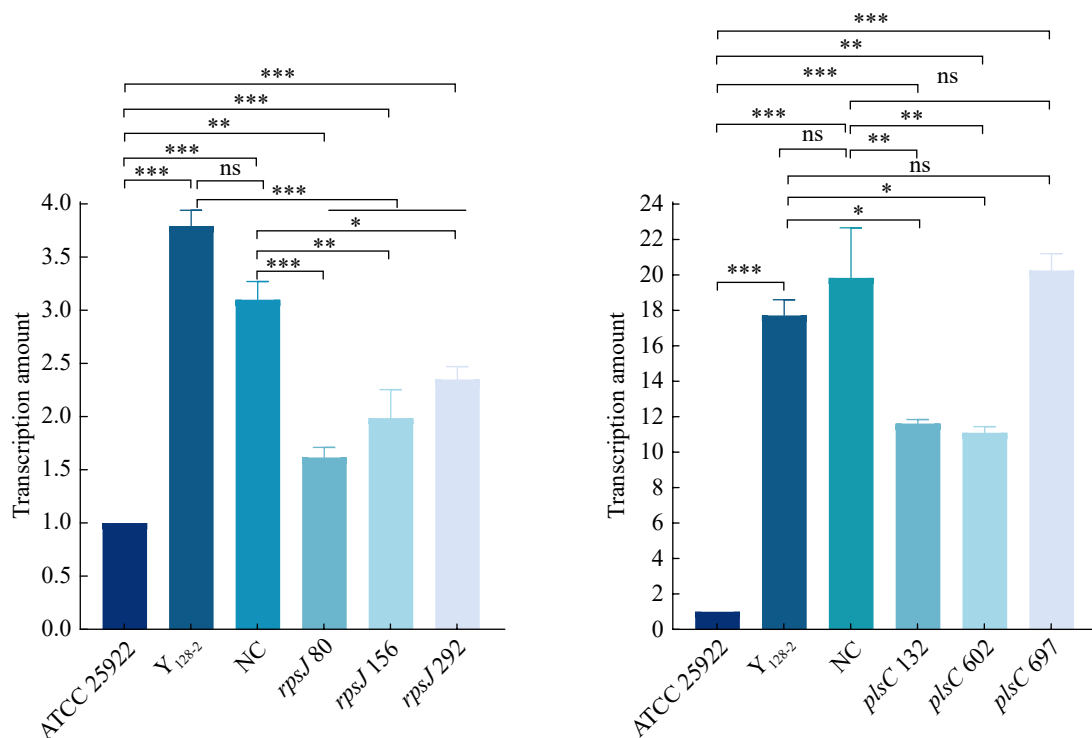


图6 干扰后所得耐药突变株 $rpsJ$ 、 $plsC$ 基因的表达量变化结果

Figure 6 Changes in the expression levels of $rpsJ$ and $plsC$ genes in drug-resistant mutant strains obtained after interference. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

定量的 siRNA。试验结果显示, $rpsJ$ 和 $plsC$ 各试验组在 $1\times\text{MIC}$ 及 $1/2\times\text{MIC}$ 的部分时间点 OD_{600} 值明显低于阴性对照组, 表明干扰目的基因后在一定程度上恢复了 Y_{128-2} 对替加环素的敏

感性, 使得菌株生长受到抑制。

通过 RT-PCR 技术测定目的基因 mRNA 的相对表达量可以进一步辅助分析 siRNA 对目的基因的转化及表达调控情况^[38]。Motamedi 等^[39]

将幽门螺旋杆菌制备成感受态细胞后加入 siRNA 进行自然转化, 随后利用 RT-PCR 技术检测对 *ureB* 和 *cagA* 基因 mRNA 水平的影响, 效果显著。本研究向 Y₁₂₈₋₂ 分别转入 *rpsJ* 和 *plsC* 基因的 siRNA 后, 分别测定各基因的 mRNA 表达量。与空白对照 Y₁₂₈₋₂ 相比, 二者表达量较转入前有所降低, 说明转入成功, 且成功影响了基因的表达。同时, NC 阴性对照组的相对表达量与空白对照无明显差异, 证明其对基因的转录无影响。根据刘德雪等^[40]的试验方法对比空白组和试验组的 mRNA 表达量, *rpsJ* 80 的抑制率为 57.36%、*rpsJ* 156 为 47.61%、*rpsJ* 292 为 38.01%; *plsC* 132 的抑制率为 34.43%、*plsC* 602 为 37.32%, 其中 *rpsJ* 156 的抑制效果最好。因此, 认为本研究诱导所得 Y₁₂₈₋₂ 对替加环素产生交叉耐药性的主要作用机制是核糖体结合位点相关耐药基因 *rpsJ* 和细菌细胞膜通透性相关耐药基因 *plsC* 的突变。

综上所述, 本研究证明通过盐酸多西环素体外诱导大肠埃希菌使其对替加环素产生一定耐药性, 且其产生的耐药机制十分复杂。在干扰试验中, 分别从外排泵机制、细胞膜通透性机制及核糖体结合位点 3 个方面选择目标基因, 可全面掌握不同方面的耐药机制。试验过程中存在的不足主要是尚未系统地验证全基因测序所得到的耐药机制。然而, 研究发现四环素有 2 种进出细菌的途径: 一种是通过被动扩散, 另一种是主动运输^[41]。替加环素作为一种新型的四环素类药物, 其结构在一定程度上与四环素相似, 因此其主要耐药机制很可能并非传统的 AcrAB-TolC 等外排泵引起的, 提示可从细菌细胞膜通透性等其他方面加以研究, 为全球耐药性问题提供更多解决思路和方案。

作者贡献声明

黄歆如: 方案策划、数据分析、调查研究、方法设计; 郭刘玲: 数据分析、有效验证、初稿写作、写作审编; 吴俊伟: 方案策划、提供

资源; 唐鑫: 数据分析、有效验证、写作审编; 邓开锋: 提供资源。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 王慧萍, 王佩, 高艳玲, 王云霞, 王超, 田莉莉, 郭雯, 王萌. 2020–2022 年西安地区三甲医院重症医学科静脉导管相关血流感染病原菌特征及耐药性分析[J]. 华南预防医学, 2023, 49(12): 1551-1555.
WANG HP, WANG P, GAO YL, WANG YX, WANG C, TIAN LL, GUO W, WANG M. Pathogenic characteristics and drug resistance of venous catheter-related bloodstream infections in the intensive care department of class A tertiary hospitals in Xi'an, 2020–2022[J]. South China Journal of Preventive Medicine, 2023, 49(12): 1551-1555 (in Chinese).
- [2] SHOALA ARE, NASSAR Y, EL-KHOLY AA, SOLIMAN NS, ABDEL-FATTAH A, EL-GHAWABY H. Clinical predispositions, features, and outcomes of infections with carbapenem-resistant *Enterobacteriales* among critical care patients[J]. Indian Journal of Critical Care Medicine, 2025, 29(1): 36-44.
- [3] SUN Y, CAI Y, LIU X, BAI N, LIANG BB, WANG R. The emergence of clinical resistance to tigecycline[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 41(2): 110-116.
- [4] HIRABAYASHI A, HA VTT, NGUYEN AV, NGUYEN ST, SHIBAYAMA K, SUZUKI M. Emergence of a plasmid-borne tigecycline resistance in *Klebsiella pneumoniae* in Vietnam[J]. Journal of Medical Microbiology, 2021, 70(3): 001320.
- [5] HIRABAYASHI A, DAO TD, TAKEMURA T, HASEBE F, TRANG LT, THANH NH, TRAN HH, SHIBAYAMA K, KASUGA I, SUZUKI M. A transferable IncC-IncX3 hybrid plasmid cocarrying *bla*_{NDM-4}, *tet*(X), and *tmexCD3-toprJ3* confers resistance to carbapenem and tigecycline[J]. mSphere, 2021, 6(4): e0059221.
- [6] CUI ZH, ZHENG ZJ, TANG T, ZHONG ZX, CUI CY, LIAN XL, FANG LX, HE Q, WANG XR, CHEN C, HE B, WANG MG, LIU YH, LIAO XP, SUN J. Rapid detection of high-level tigecycline resistance in Tet(X)-producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter* spp. based on MALDI-TOF MS[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 583341.
- [7] UMAR Z, CHEN QW, TANG B, XU YC, WANG JZ, ZHANG HM, JI K, JIA X, FENG YJ. The poultry pathogen *Riemerella anatipestifer* appears as a reservoir for Tet(X) tigecycline resistance[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(12): 7465-7482.
- [8] ALLOCATI N, MASULLI M, ALEXEYEV MF, di ILIO C. *Escherichia coli* in Europe: an overview[J]. International Journal of Environmental Research and

- Public Health, 2013, 10(12): 6235-6254.
- [9] 刘凯迪, 罗华东, 王琳琳, 王长珍, 王民歌, 廖晓萍. 东南沿海地区水禽源大肠杆菌耐药表型及耐药基因型的调查[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(12): 4690-4701.
LIU KD, LUO HD, WANG LL, WANG CZ, WANG MG, LIAO XP. Investigation on drug resistant phenotype and genotype of *Escherichia coli* from waterfowl in southeast coastal China[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(12): 4690-4701 (in Chinese).
- [10] 苏梦茹. 动物源替加环素耐药大肠杆菌的分离鉴定及分子特征分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
SU MR. Isolation and identification of tigecycline-resistant *Escherichia coli* from animal sources and molecular characterization[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023 (in Chinese).
- [11] 张锦熙. 哈尔滨市猪源大肠杆菌耐药性和耐药基因的检测分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
ZHANG JX. Detection and analysis of drug resistance and drug resistance genes of porcine *Escherichia coli* in Harbin[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [12] ROTH N, KÄSBOHRER A, MAYRHOFFER S, ZITZ U, HOFACRE C, DOMIG KJ. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: a global overview[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(4): 1791-1804.
- [13] 杨琳. 湖北省和广东省5个生猪屠宰场沙门菌的污染情况及其耐药性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
YANG L. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in five pig slaughterhouses in Hubei Province and Guangdong Province[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [14] BENDER JK, CATTOIR V, HEGSTAD K, SADOWY E, COQUE TM, WESTH H, HAMMERUM AM, SCHAFFER K, BURNS K, MURCHAN S, NOVAIS C, FREITAS AR, PEIXE L, del GROSSO M, PANTOSTI A, WERNER G. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: towards a common nomenclature[J]. *Drug Resistance Updates*, 2018, 40: 25-39.
- [15] GAMBHIR MR, LAL S, SHAIKH SH, ZAIDI SAS, KHUHO FA, KANHAR AR, PHUL TA, KHUHO R, MAILTO RR, MAILTO MA. Unsafe sips: prevalence of pathogenic bacterial diversity in drinking water of khairpur city pakistan[J]. 2025, 3(1): 141-148.
- [16] HU Y, LIU XW, REN YY, LIU DM, LIU YC, XIA Q, LI YW, WANG CX. Epidemiology analysis of carbapenemase-producing *Escherichia coli* in a hospital in Henan Province from 2021 to 2023[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2025, 59(1): 53-61.
- [17] DONG Y, ZHAO X, DOMAGALA J, DRLICA K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(7): 1756-1758.
- [18] 刘森, 刘海凤, 郑风劲. 耐药突变选择窗与抗菌药物耐药突变浓度的研究进展[J]. 四川解剖学杂志, 2012, 20(2): 55-58.
- LIU M, LIU HF, ZHENG FJ. Research of mutant prevention concentration and mutant selection window[J]. *Sichuan Journal of Anatomy*, 2012, 20(2): 55-58 (in Chinese).
- [19] 孙瑶, 徐雯雅, 周翠, 吴庆, 陈栋江, 徐春泉, 叶建中, 周铁丽. 庆大霉素诱导粪肠球菌耐药及其对氯霉素协同敏感相关特性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(2): 228-234.
SUN Y, XU WY, ZHOU C, WU Q, CHEN LJ, XU CQ, YE JZ, ZHOU TL. Study on the characteristics of collateral sensitivity to chloramphenicol of evolved gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2023, 48(2): 228-234 (in Chinese).
- [20] 杨大伟, 冯宝仪, 丁焕中, 王贤玉, 陈杖榴. 细菌耐药突变选择窗: 抗菌药治疗新概念[J]. 养禽与禽病防治, 2008(3): 2-5.
- [21] 吴梦慧, 刘方佳, 李东华, 盛席静, 刘泉, 戴梦红, 吴敏. 细菌中交互敏感性的分子机制及用药策略[J]. 中国兽医杂志, 2024, 60(7): 102-107.
WU MH, LIU FJ, LI DH, SHENG XJ, LIU Q, DAI MH, WU M. Molecular mechanisms and medication strategies of collateral sensitivity in bacteria[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(7): 102-107 (in Chinese).
- [22] SAKENOVA N, CACACE E, ORAKOV A, HUBER F, VARIK V, KRITIKOS G, MICHIELS J, BORK P, COSSART P, GOEMANS CV, TYPAS A. Systematic mapping of antibiotic cross-resistance and collateral sensitivity with chemical genetics[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 10(1): 202-216.
- [23] FLORES H, LUETHY P, DOUB JB. Discordant susceptibilities of *Enterobacteriales* to different tetracycline classes[J]. *Cureus*, 2024, 16(12): e74917.
- [24] 李爽, 闫更轩, 田缘, 张淑梅, 潘钰. RNA干扰技术防控作物真菌病害研究进展[J]. 北方园艺, 2024(3): 127-136.
LI S, YAN GX, TIAN Y, ZHANG SM, PAN Y. Research progress on prevention and control of crop fungal diseases by RNA interference techniques[J]. *Northern Horticulture*, 2024(3): 127-136 (in Chinese).
- [25] DANA H, CHALBATANI GM, MAHMOODZADEH H, KARIMLOO R, REZAIEAN O, MORADZADEH A, MEHMANDOOST N, MOAZZEN F, MAZRAEH A, MARMARI V, EBRAHIMI M, RASHNO MM, ABADI SJ, GHARAGOUZLO E. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA[J]. *International Journal of Biomedical Science*, 2017, 13(2): 48-57.
- [26] GONG FY, ZHANG DY, ZHANG JG, WANG LL, ZHAN WL, QI JY, SONG JX. siRNA-mediated gene silencing of MexB from the MexA-MexB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *BMB Reports*, 2014, 47(4): 203-208.
- [27] YANAGIHARA K, TASHIRO M, FUKUDA Y, OHNO H, HIGASHIYAMA Y, MIYAZAKI Y, HIRAKATA Y, TOMONO K, MIZUTA Y, TSUKAMOTO K, KOHNO S. Effects of short interfering RNA against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57(1): 122-126.
- [28] FOOLADI AAI, AGHELMANSOUR A, NOURANI MR. Evaluation of the pathogenesis of *Pseudomonas*

- aeruginosa*'s flagellum before and after flagellar gene knockdown by small interfering RNAs (siRNA)[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2013, 6(3): 273-278.
- [29] 张雨茜, 王丽平, 陆承平. 氟喹诺酮类抗菌药对临床分离猪链球菌的防耐药变异浓度测定及一步耐药突变株的筛选[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(1): 71-76.
- ZHANG YH, WANG LP, LU CP. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus suis* and screen of single-step resistant mutants[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2011, 42(1): 71-76 (in Chinese).
- [30] LINKEVICIUS M, SANDEGREN L, ANDERSSON DI. Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in *Escherichia coli*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(12): 2809-2819.
- [31] TIKHONOVA EB, DASTIDAR V, RYBENKOV VV, ZGURSKAYA HI. Kinetic control of TolC recruitment by multidrug efflux complexes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(38): 16416-16421.
- [32] 朱莉丽. 大肠埃希菌多重耐药外排泵 AcrAB-TolC 主动外排机制的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- ZHU LL. Research of active efflux mechanism of AcrAB-TolC multi-drug efflux pump of *Escherichia coli*[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2013 (in Chinese).
- [33] WESTON N, SHARMA P, RICCI V, PIDDOCK LJ. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae[J]. Research in Microbiology, 2018, 169(7/8): 425-431.
- [34] HIRAKAWA H, TAKUMI-KOBAYASHI A, THEISEN U, HIRATA T, NISHINO K, YAMAGUCHI A. AcrS/EnvR represses expression of the acrAB multidrug efflux genes in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(18): 6276-6279.
- [35] 张传珍. 环丙沙星异质性耐药沙门菌的鉴定、毒力评价及机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020.
- [36] 佟海山, 李乾学, 邓彦宏, 孙智勇, 邓旭明. 大肠杆菌多重耐药调节基因 AcrR 和 MarR 突变[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(7): 10-12.
- TONG HS, LI QX, DENG YH, SUN ZY, DENG XM. The mutation of multidrug resistant regulation genes AcrR and MarR in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2007, 43(7): 10-12 (in Chinese).
- [37] HANAHAN D, JESSEE J, BLOOM FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria[J]. Methods in Enzymology, 1991, 204: 63-113.
- [38] 鲁玉侠. 食源微生物耐药基因水平传播抑制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- LU YX. Study on horizontal transmission inhibition of drug resistance gene of food-borne microorganisms[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010 (in Chinese).
- [39] MOTAMEDI H, ABIRI R, SALARI F, JALILI C, ALVANDI A. Reduction of UreB and CagA expression level by siRNA construct in *Helicobacter pylori* strain SS1[J]. BMC Microbiology, 2023, 23(1): 401.
- [40] 刘德雪, 范梦昊, 程伟涛, 曹宴榕, 韩婉钰, 胡广伟. 脊尾白虾 Duox 基因鉴定及其免疫功能研究[J]. 大连海洋大学学报, 2025, 40(1): 34-43.
- LIU DX, FAN MH, CHENG WT, CAO YR, HAN WY, HU GW. Identification of the Duox gene in *Exopalaemon carinicauda* and preliminary study on its immune function[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2025, 40(1): 34-43 (in Chinese).
- [41] 夏婉秋. 四环素类和氨基糖苷类药物残留检测方法的建立[D]. 保定: 河北农业大学, 2023.
- XIA WQ. Establishment of detection method for tetracycline and aminoglycoside residues[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2023 (in Chinese).