

方光远,胡志华,蒋加进,等. 南京地区动物源大肠杆菌超广谱 β -内酰胺酶基因检测[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):255-257.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.088

南京地区动物源大肠杆菌超广谱 β -内酰胺酶基因检测

方光远,胡志华,蒋加进,顾亚凤,晏文梅,戴鼎震

(金陵科技学院动物科学与技术学院,江苏南京 210038)

摘要:为了研究江苏省南京地区动物源大肠杆菌的耐药特性,对南京地区发生大肠杆菌病的动物进行细菌分离培养,获得 38 株大肠杆菌,采用 PCR 方法对 38 株不同动物源大肠杆菌 TEM、SHV、CTX-M-1、CTX-M-9 型超广谱 β -内酰胺酶基因进行检测,结果表明,有 6 株大肠杆菌检测出超广谱 β -内酰胺酶基因,检出率为 15.8%。其中 3 株为 CTX-M-1 型,2 株为 CTX-M-9 型,1 株为 SHV 型。只有部分大肠杆菌对少数抗生素高敏。

关键词:大肠杆菌;超广谱 β -内酰胺酶;基因检测;南京地区

中图分类号: S852.61⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0255-03

大肠杆菌广泛存在于自然界中及动物体内,正常情况下,动物肠道内正常菌群中的大肠杆菌处于相对平衡的状态,对于保持机体健康起到十分重要的作用;但一些特殊血清型的大肠杆菌对动物有致病性,能引起发病动物出现精神沉郁、厌食、下痢等临床症状,严重时可导致发病动物死亡。随着兽医临床 β -内酰胺类抗生素的广泛使用,动物源大肠杆菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性越来越普遍,同时产生耐药性的菌株中检测出超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的概率也越来越高。ESBLs 主要由大肠杆菌、肺炎克雷伯菌产生,能对 β -内酰胺类抗生素进行水解,从而导致此类细菌对 β -内酰胺类抗生素产生耐药性^[1-3]。近年来,随着 3 代头孢菌素、单环酰胺类抗生素在临床上的广泛使用,各地产生 ESBLs 动物源大肠杆菌检出率不断增加^[4-6]。为了研究动物源大肠杆菌的耐药性,本研究采用 PCR 方法对近年来江苏省南京地区分离鉴

定的 38 株不同动物源大肠杆菌 TEM、SHV、CTX-M-1、CTX-M-9 型超广谱 β -内酰胺酶基因进行检测,现将试验过程及检测结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源 无菌采取近年来南京市范围的养殖场、宠物医院发生大肠杆菌病动物的相关病料,其中鸽病料 7 份,犊牛腹泻病料 27 份,犬病料 4 份,送至金陵科技学院兽医微生物实验室进行细菌分离培养鉴定。

1.1.2 培养基 普通营养琼脂平板、SS 琼脂平板、三糖铁琼脂斜面、普通营养肉汤均由金陵科技学院兽医微生物实验室配制。

1.1.3 微量生化发酵管 肠杆菌科细菌 GYZ-15e 生化编码鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司。微量生化编码鉴定管包括硫化氢、苯丙氨酸、葡萄糖酸盐、蛋白胨水、葡磷胨水、枸橼酸盐、尿素酶、半固体穿刺、葡萄糖、赖氨酸、鸟氨酸、棉籽糖、山梨醇、侧金盏花醇、木胶糖。

1.1.4 PCR 扩增引物及试剂 根据文献已发表的 TEM、

收稿日期:2014-10-30

基金项目:江苏省南京市科技发展指导性计划(编号:2012ZD006)。

作者简介:方光远(1965—),男,江苏宿迁人,硕士,副教授,从事兽医微生物学、兽医生物制品学教学及研究。E-mail:fanggy126@126.com。

的有效磷水平均可较为适宜。综合考虑,C3 组(能量为 12.32 MJ/kg,粗蛋白质含量为 18%,钙含量为 1.0%,有效磷含量为 0.6%)、C5 组(能量为 12.72 MJ/kg,粗蛋白质含量为 16%,钙含量为 1.0%,有效磷含量为 0.3%)2 个组合的营养成分表现消化率高,C5 饲料原料价格低于 C3。推荐 13 周龄黑羽番鸭饲料营养水平:能量为 12.32 MJ/kg,粗蛋白质含量为 16%,钙含量为 1.0%,有效磷含量为 0.6%。

参考文献:

- [1]王阳铭,王琳,杨文清,等. 肉用仔鹅集约化饲养条件下的能量和蛋白质需要[J]. 西南农业学报,1999,12(2):104-112.
- [2]李俊波,左绍群,张克英. 生长前期丝羽乌骨鸡饲料适宜能量、蛋白水平研究[J]. 动物营养学报,2000,12(3):37-43.
- [3]陈继兰,方丽,侯水生,等. 石岐黄肉鸡不同日粮下能量利用率和氮存留率研究[J]. 中国家禽,1999,21(1):5-7.

- [4]张春雷,刘福柱,侯水生. 育雏期不同能量蛋白质水平对肉鹅生产性能影响[J]. 中国饲料,2004(18):24-25.
- [5]王宝维,孙作为. 不同能量蛋白水平对豁眼鹅雏期生长发育的影响[J]. 山东家禽,1995(2):2-4,12.
- [6]王宝维,张名爱,李文立,等. 不同钙磷水平对五龙鹅快长系早期生长发育的影响[J]. 东北农业大学学报,2004,35(6):723-729.
- [7]吉文林,段修军,董飏,等. 黑羽番鸭屠宰性能及肉品质的研究[J]. 西南农业学报,2013,26(2):795-797.
- [8]钱建中,段修军,卞友庆,等. 不同性别黑羽番鸭屠宰性能、常规肉品质分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):164-166.
- [9]孙国波,吉文林,陈章言,等. 黑羽番鸭肌肉矿物元素、营养物质含量测定[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):209-211.
- [10]张建华,戴求仲,蔺桂韬,等. 1~3 周龄黑羽公番鸭代谢能和粗蛋白质需要量的研究[J]. 动物营养学报,2012,24(8):1469-1476.

SHV、CTX-M-1、CTX-M-9 型超广谱 β -内酰胺酶基因序列,由大连宝生物有限公司设计合成 TEM、SHV、CTX-M-1、CTX-M-9 型超广谱 β -内酰胺酶基因片段上下游引物^[7]。TEM 上游引物 P1:5'-GGGGATGAGTATTCAACATTTC-3';下游引物 P2:5'-GGGCAGTTACCAATGCTTAATCA-3',预计扩增 861 bp 基因片段。SHV 上游引物 P1:5'-TCCCG-CAGATAAATCACCA-3';下游引物 P2:5'-TCGGCCT-TCACTCAAGGATG-3',预计扩增 821 bp 基因片段。CTX-M-1 上游引物 P1:5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3';下游引物 P2:5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3',预计扩增 551 bp 基因片段。CTX-M-9 上游引物 P1:5'-ATGGTGA-CAAAGAGAGAGTGCA-3';下游引物 P2:5'-CCCTTCG-GCGATGATTCT-3',预计扩增 868 bp 基因片段。试剂包括 2×*Taq* PCR Master Mix、ddH₂O、TBE 缓冲液等,均购自大连宝生物有限公司。

1.1.5 药敏纸片 抗生素药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。药敏纸片包括:苯唑西林、氨苄西林、头孢唑啉、头孢哌酮、头孢呋辛、头孢噻肟、卡那霉素、妥布霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因共计 12 种。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养 将取自鸽、犊牛腹泻、犬的病料分别接种于 SS 琼脂平板,贴上标签,37℃培养 24 h。取生长典型的单个菌落分区划线接种于 SS 琼脂平板、普通营养琼脂平板,穿刺接种于三糖铁琼脂斜面、营养肉汤中,37℃培养 24 h,观察菌落形态及菌落在三糖铁琼脂斜面及营养肉汤中的生长情况。

1.2.2 细菌染色镜检 取纯培养获得的单个菌落在洁净载玻片上涂片,火焰干燥固定后,进行革兰氏染色,在普通光学显微镜油镜下进行观察。

1.2.3 细菌的生化特性鉴定 取上述 38 株分离菌纯培养物,分别接种于肠杆菌科细菌 GYZ-15e 生化编码鉴定管硫化氢、苯丙氨酸、葡萄糖酸盐、蛋白胨水、葡磷胨水、枸橼酸盐、尿素酶、半固体穿刺、葡萄糖、赖氨酸、鸟氨酸、棉籽糖、山梨醇、侧金盏花醇、木胶糖中,置于 37℃恒温培养箱中培养 18~24 h,观察结果。

1.2.4 细菌超广谱 β -内酰胺酶基因 PCR 检测 DNA 模板制备:分别取 37℃培养 18~24 h 的 38 株分离菌肉汤培养物 2 mL,用冷冻离心机 4℃10 000 r/min 离心 2 min,倾去上清液,加入无菌水 2 mL 混匀,再同上离心洗涤 1 次,倾去上清液,再加入无菌水 2 mL 混匀,4℃保存备用。25 μ L PCR 反应体系:*Taq* PCR Mix 12.5 μ L、上游引物及下游引物各 1 μ L、ddH₂O 10 μ L、DNA 模板 0.5 μ L。PCR 反应条件:94℃预变性 8 min;94℃变性 45 s,56℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 基因片段检测:取 PCR 产物 10 μ L 加样到 12 g/L 琼脂糖凝胶中,于 110 V 50 mA 核酸电泳槽中电泳 45 min,电泳后在凝胶成像系统中观察检测 TEM、SHV、CTX-M-1、CTX-M-9 型超广谱 β -内酰胺酶基因片段。

1.2.5 超广谱 β -内酰胺酶基因阳性大肠杆菌药敏试验 对检测出超广谱 β -内酰胺酶基因的 6 株大肠杆菌菌株按常规纸片法进行药敏试验。在乙醇灯火焰旁,用灭菌接种环取

上述大肠杆菌纯培养物致密划线于普通营养琼脂平板表面,用无菌镊子将各种药敏纸片(直径 6 mm)分别贴于培养基表面,每块平板贴 3 种,呈等边三角形,各片距离相等。每贴完 1 个药敏纸片,镊子要在火焰上灼烧,以保证无菌。放在 37℃培养箱中 24 h 后取出观察并测量抑菌圈直径。细菌对药物的敏感程度判定标准为:抑菌圈直径大于 20 mm 为极度敏感,15~20 mm 为高度敏感,10~14 mm 为中度敏感,小于 10 mm 为低度敏感,0 mm 为不敏感。

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养结果

将取自鸽、犊牛腹泻、犬的病料分别接种于 SS 琼脂平板 37℃培养 24 h 后,获得 38 株细菌,均为圆形、隆起、湿润、边缘整齐、表面光滑、直径 3~4 mm 的红色菌落。上述 38 株细菌接种于普通营养琼脂平板上生长的单个菌落呈圆形、隆起、湿润、边缘整齐、表面光滑、无色半透明状,直径 3~4 mm。接种于普通营养肉汤 37℃培养 24 h 后,肉汤呈浑浊状态,底部有黏性沉淀。穿刺接种于三糖铁琼脂培养基 37℃培养 24 h 后,培养基斜面呈黄色,底部有大量气泡,不产生 H₂S。

2.2 细菌形态染色特性镜检结果

将上述 38 株细菌纯培养后获得的单个菌落进行革兰氏染色,镜检可见两端钝圆、散在革兰氏阴性中等大小杆菌,大小为(1~3) μ m×(0.4~0.7) μ m。

2.3 细菌生化特性鉴定结果

38 株分离菌纯培养物分别接种于肠杆菌科细菌 GYZ-15e 生化编码鉴定管,置于 37℃恒温培养箱中培养 18~24 h,分离菌生化特性鉴定结果见表 1。根据上述生化反应结果,计算每株细菌鉴定总值,查《肠杆菌科细菌生化鉴定编码册》对应的编码检索表,可得鸽 7 株、犊牛腹泻 27 株、犬 4 株病料中的细菌鉴定值均为 06365,鉴定结果均为大肠杆菌。

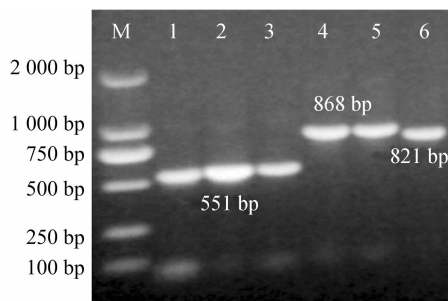
表 1 分离菌生化特性鉴定结果

项目	分离菌株		
	鸽 7 株	犊牛腹泻 27 株	犬 4 株
硫化氢	0	0	0
丙苯氨酸	0	0	0
葡萄糖酸盐	0	0	0
蛋白胨水	4	4	4
葡磷胨水	2	2	2
枸橼酸盐	0	0	0
尿素酶	0	0	0
半固体穿刺	2	2	2
葡萄糖产气	1	1	1
赖氨酸	4	4	4
鸟氨酸	2	2	2
棉籽糖	0	0	1
山梨醇	4	4	4
侧金盏花醇	0	0	0
木胶糖	1	1	1
鉴定总值	06365	06365	06365

2.4 细菌超广谱 β -内酰胺酶基因 PCR 检测结果

测定结果表明,分离得到的 4 株犬源大肠杆菌中,2 株 1

号、2 号犬源大肠杆菌具有 CTX-M-1 型 ESBLs 基因片段,2 株 3 号、4 号犬源大肠杆菌具有 CTX-M-9 型 ESBLs 基因片段。在 27 株犍牛腹泻大肠杆菌中,有 1 株 13 号犍牛腹泻大肠杆菌产 CTX-M-1 型 ESBLs 基因片段。在分离到的 7 株鸽大肠杆菌中,有 1 株 9 号鸽大肠杆菌具有 SHV 型 ESBLs 基因片段。所有菌株均未扩增出 TEM 型条带(图 1)。



M—DL2000 DNA marker; 1—13号犍牛腹泻大肠杆菌;
2~5—1~4号犬大肠杆菌; 6—9号鸽大肠杆菌。

图1 6株动物源大肠杆菌超广谱 β -内酰胺酶基因片段 PCR 电泳图

2.5 超广谱 β -内酰胺酶基因阳性大肠杆菌药敏试验结果

对检测出超广谱 β -内酰胺酶基因的 6 株大肠杆菌菌株按常规纸片法进行药敏试验,结果见表 2。药敏试验结果表明,6 株大肠杆菌对青霉素类药物氨苄西林、苯唑西林均不敏感,产生很强的耐药性;对头孢唑啉、头孢哌酮、头孢呋辛大部分菌株不敏感,产生耐药性;对氨基糖苷类药物卡那霉素、妥布霉素不太敏感;4 号犬大肠杆菌对头孢噻肟产生耐药性,其他 5 株菌较敏感;6 株菌对诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星敏感度不一致,可能与不同动物使用上述 3 种药物程度不同有关;5 株菌对呋喃妥因均高度敏感。其中 1~4 号犬大肠杆菌对大多数抗生素都不敏感,耐药性较强,这可能与宠物医院滥用抗生素有关。鸽大肠杆菌虽然测定出具有 SHV 型 ESBLs 基因片段,但对多种药物高度或中度敏感,具体原因有待进一步分析。

表 2 超广谱 β -内酰胺酶基因阳性大肠杆菌药敏试验结果

药名	抑菌圈直径(mm)					
	13 号犍牛腹泻 <i>E. coli</i>	1 号犬 <i>E. coli</i>	2 号犬 <i>E. coli</i>	3 号犬 <i>E. coli</i>	4 号犬 <i>E. coli</i>	9 号鸽 <i>E. coli</i>
苯唑西林	0	0	0	0	0	0
氨苄西林	0	0	0	0	0	0
头孢唑啉	0	0	0	0	0	21
头孢哌酮	0	0	20	14	9	20
头孢呋辛	0	0	0	0	0	18
头孢噻肟	13	15	14	14	0	21
卡那霉素	0	13	0	0	0	18
妥布霉素	9	7	0	0	0	17
诺氟沙星	15	18	17	0	0	0
氧氟沙星	0	13	15	11	8	23
左氧氟沙星	17	20	17	0	0	22
呋喃妥因	17	22	16	19	19	16

3 结论与讨论

超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是一类由细菌质粒介导的

β -内酰胺酶,能使细菌对青霉素类,第一代、第二代、第三代头孢菌素 β -内酰胺类抗生素,氨基糖苷类(不包括第四代头孢菌素或碳青霉烯类)产生耐药性。ESBLs 主要由大肠杆菌、肺炎克雷伯菌产生,是该类细菌对 β -内酰胺酶类抗生素产生耐药性最重要的机制。目前已发现 200 余种超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs),根据编码基因同源性不同分为:TEM (temoniera)、SHV (sulphadryl variable)、CTX-M (cefotaxime)、OXA (oxacillin)、其他 5 类。CTX-M 型 ESBLs 主要由大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌等细菌产生,根据基因序列同源性不同,将 CTX-M 型 ESBLs 分为 4 组,分别为 CTX-M-1 组、CTX-M-2 组、CTX-M-8 组、CTX-M-9 组。我国主要为 CTX-M 型,以 CTX-M-1 组与 CTX-M-9 组最为常见;其次为 SHV 型;欧美国家常见的 TEM 型 ESBLs 在我国罕见。研究表明,38 株动物源大肠杆菌 ESBLs 基因总检出率为 15.8%,其中 3 株为 CTX-M-1 型,2 株为 CTX-M-9 型,1 株为 SHV 型。只有部分大肠杆菌对少数抗生素高敏,说明含有 ESBLs 的大肠杆菌对常规抗生素已产生较强的耐药性;但大肠杆菌对氟喹诺酮类、呋喃类抗菌化学药物敏感性较高,这与这些药物抑制大肠杆菌的核酸复制有关。因此治疗大肠杆菌感染时,应先通过药敏试验对发病动物选用高度敏感药物来进行治疗,才能取得满意的效果。大肠杆菌的特点是易形成耐药性,而且大肠杆菌可通过菌毛将其耐药性质粒传递给其他大肠杆菌,所以大肠杆菌的耐药性形成较快,环境中大肠杆菌耐药性菌株越来越多,所以在治疗大肠杆菌病时,应采用轮换用药、穿梭用药、联合用药的方法避免或延缓大肠杆菌耐药性的产生^[8-9]。

参考文献:

- [1] 刘保光,肖尚修,吴 华,等. 鸭大肠杆菌超广谱 β -内酰胺酶的检测及药物敏感性分析[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(9):188-191.
- [2] 李蓓蓓,张学英,李菁华,等. 长春地区部分医院革兰阴性杆菌超广谱 β -内酰胺酶的基因类型及分布[J]. 吉林大学学报:医学版,2010,36(1):205-209.
- [3] 周学章,张仁参,贾 芳,等. 宁夏牛源克雷伯菌和大肠埃希菌分离株产超广谱 β -内酰胺酶基因型检测[J]. 宁夏大学学报:自然科学版,2010,31(3):260-263.
- [4] 余 婷,谢 敏,冀智佩,等. 宁夏地区牛源大肠埃希菌 ESBLs 检测及耐药性分析[J]. 动物医学进展,2013,34(3):25-28.
- [5] 张 陆,蒋 月,盛鹏飞,等. 腹泻犍牛大肠杆菌血清型抗菌药物耐药性耐药基因鉴定及脉冲场凝胶电泳分型[J]. 中国兽医杂志,2013,49(9):15-17.
- [6] 夏利宁,向 发,郭庆勇,等. 新疆不同地区牛源大肠杆菌耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(2):203-207.
- [7] 苑 丽,刘建华,胡功政,等. 鸡大肠杆菌 TEM 和 CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶基因分型研究[J]. 中国农业科学,2010,43(20):4310-4316.
- [8] 陈朝喜,田淑琴,郭伟娜. 156 株犬源大肠杆菌耐药谱型分析[J]. 安徽农业科学,2011,39(3):1467-1468.
- [9] 张美君,廖晓萍,王秀梅,等. 宠物源大肠杆菌的血清型和毒力基因及耐药性调查[J]. 中国预防兽医学报,2011,33(8):601-605.