

晏云涛,俸江琴,赵 汝,等.猪源大肠杆菌对氨基糖苷类药物耐药性及耐药基因检测[J].江苏农业科学,2019,47(11):222-224.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.050

猪源大肠杆菌对氨基糖苷类药物 耐药性及耐药基因检测

晏云涛,俸江琴,赵 汝,高 洪,王红丹,苗淑淑

(云南农业大学动物医学院,云南昆明 650201)

摘要:为调查云南大理某地区猪源致病性大肠杆菌对链霉素、卡那霉素、新霉素、妥布霉素、阿米卡星和庆大霉素的耐药性,并获悉氨基糖苷类 2 个耐药基因 *strA*、*strB* 的携带情况,试验采用抗菌药物敏感试验纸片法探究 55 株大肠杆菌对 6 种氨基糖苷类药物的耐药性,通过常规 PCR 检测 *strA*、*strB* 携带率。结果表明,链霉素、卡那霉素、新霉素、妥布霉素、阿米卡星和庆大霉素的耐药率依次为 50.9%、40.0%、30.9%、43.6%、12.7%、41.8%。*strA*、*strB* 检出率分别为 76.4% 和 72.7%,同时含有 2 种耐药基因的频率高达 50.9%,说明云南大理受检地区猪源致病性大肠杆菌的耐药情况严重。

关键词:猪源致病性大肠杆菌;耐药性;耐药基因;氨基糖苷;聚合酶链式反应

中图分类号:S858.282.61⁺2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)11-0222-03

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是肠杆菌科细菌的模式种,是在特定条件下可引起人畜共患病的一种病原菌,是在养猪业中最常见的病原菌之一。大肠杆菌可引起败血症、水肿病、新生仔猪腹水和仔猪黄白痢等多种疾病,并且具有较高的发病率和死亡率^[1]。

为避免大肠杆菌病的产生,农户与猪场通常会把氨基糖苷类药物加入饲料中饲喂畜禽^[2],以便对各种大肠杆菌疾病进行预防和控制,但随着抗菌药物的广泛应用和在疾病治疗中的不当使用,常导致猪场环境中大肠杆菌耐药菌株产生,对氨基糖苷类药物的耐药性发生变化^[3-4]。大肠杆菌耐药菌株对氨基糖苷类的耐药机制主要有 3 种:一是细胞内膜转运异常使药物在细菌体内的蓄积减少或者细菌外膜蛋白通透性发生改变;二是出现氨基糖苷类钝化酶;三是药物作用靶位改变^[5-6],使药物进入细菌后不可以有效地与核糖体结合而产生耐药性。杨慧等发现,饲料中添加铜盐导致猪铜抗性基因的产生,同时协同选择了氨基糖苷类药物 *strA*、*strB* 耐药基因的产生^[7]。这些认识有利于对云南大理猪源致病性大肠杆菌耐药性、耐药基因进行研究。

本试验采用笔者所在实验室分离保存的云南大理部分地区猪源致病性大肠杆菌进行 6 种氨基糖苷类抗生素耐药性检测,*strA* 和 *strB* 属于编码磷酸转移酶的基因,用来编码修饰链霉素钝化基因,对耐药基因进行 PCR 扩增,获悉其耐药性与耐药基因关系,以明确云南大理被检测区猪源致病性大肠杆菌对氨基糖苷类药物的耐药情况,旨在为今后的兽医临床用

药提供参考,为猪源致病性大肠杆菌在畜禽体内的抗逆机制和耐药机制研究提供帮助。

1 材料和方法

1.1 试验菌株

云南农业大学动物医学院病理实验室保存的 55 株,于 2017 年 6 月从云南省大理市部分猪场腹泻仔猪粪便中分离纯化好的猪源致病性大肠杆菌。

1.2 主要试剂

药敏纸片,购自杭州微生物试剂有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒,购自北京百泰克生物技术有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;其他试剂,均为实验室常规试剂。

1.3 药敏试验

选用抗菌药物敏感试验纸片法对 6 种氨基糖苷类药物(链霉素、妥布霉素、新霉素、庆大霉素、卡那霉素和阿米卡星)进行药敏试验。药敏试验判断标准参见美国临床实验室标准委员会(CLSI)所推荐的抗菌药物敏感试验纸片法^[8]。

1.4 细菌基因组 DNA 的提取

按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书中方法进行细菌基因组 DNA 的提取,最后溶于 40 μ L TE 缓冲液中备用。

1.5 PCR 扩增

参照文献[9],在 GenBank 上,找到序列并下载序列,用 Primer 5.0 引物设计软件设计相应引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列及信息见表 1。

PCR 反应体系见表 2。

PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 3.0 min;94 $^{\circ}$ C 0.5 min,55 $^{\circ}$ C 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 1.0 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。在 1% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定,结果在紫外灯下观察并用凝胶成像系统进行拍照记录保存。

收稿日期:2018-02-27

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660704);云南省现代农业生猪产业技术体系建设项目(编号:云财农 2009[171])。

作者简介:晏云涛(1994—),女,云南昆明人,硕士研究生,主要从事畜禽寄生虫病研究。E-mail:495175735@qq.com。

通信作者:赵 汝,硕士,讲师,主要从事动物病理学研究。E-mail:1353644726@qq.com。

表 1 引物核苷酸序列

基因	引物序列 (5'→3')	参考文献
<i>strA</i>	F: TGCTCCTCTTCTCCATCC	[9]
	R: CGCCGCCAATATGTCTA	
<i>strB</i>	F: ATGATGCAGATCGCCATGTA	[9]
	R: CGGTCGTAGAGGCAATCTG	

表 2 PCR 反应体系

试剂	剂量(μL)
PCR Master mix	12.5
水	9.5
底物	2.0
上游引物	0.5
下游引物	0.5

表 3 55 株云南大理猪源致病性大肠杆菌药敏试验结果

药物	耐药		中敏		敏感	
	菌株数	比例(%)	菌株数	比例(%)	菌株数	比例(%)
链霉素	28	50.9	10	18.2	17	30.9
卡那霉素	22	40.0	30	54.5	3	5.5
新霉素	17	30.9	37	67.3	1	1.8
妥布霉素	24	43.6	17	30.9	14	25.5
阿米卡星	7	12.7	7	12.7	41	74.5
庆大霉素	23	41.8	9	16.4	23	41.8

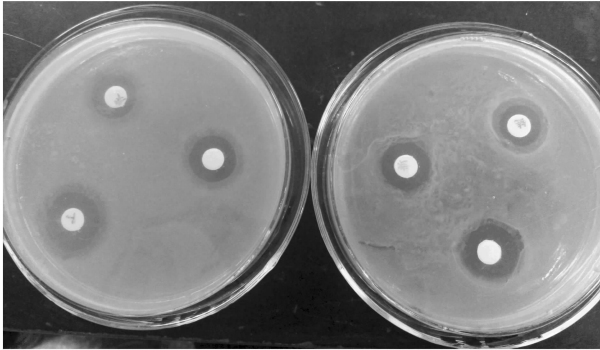


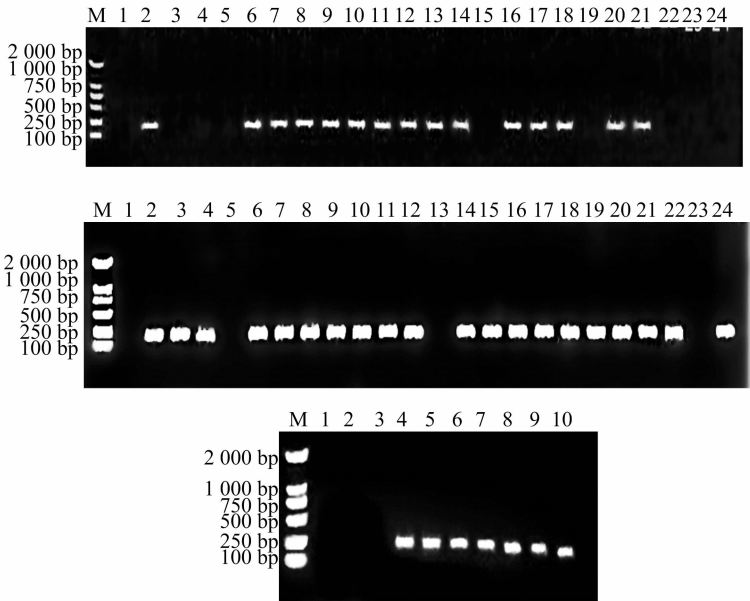
图1 药敏试验结果

2 结果和分析

2.1 药敏试验结果

药敏试验结果(表3、图1)显示,分离纯化后的55株云南大理部分地区猪源致病性大肠杆菌对链霉素的耐药率最高,达50.9%,其次是妥布霉素(43.6%)、庆大霉素(41.8%)、卡那霉素(40.0%)、新霉素(30.9%),耐药率最低的是阿米卡星(12.7%)。

2.2 耐药基因检测结果



M 表示 DNA 标准 DL2000; 编号 1 表示阴性对照; 编号 2~24、2~10 表示大肠杆菌分离株。下图同

图2 55 株大肠杆菌分离株 *StrA* 扩增产物

2.2.2 目的基因 *strB* 扩增结果 由图3可知,在55株云南大理部分地区猪源致病性大肠杆菌中出现40株阳性菌株, *strB* 阳性率为72.7%,所得条带片段大小为326 bp。

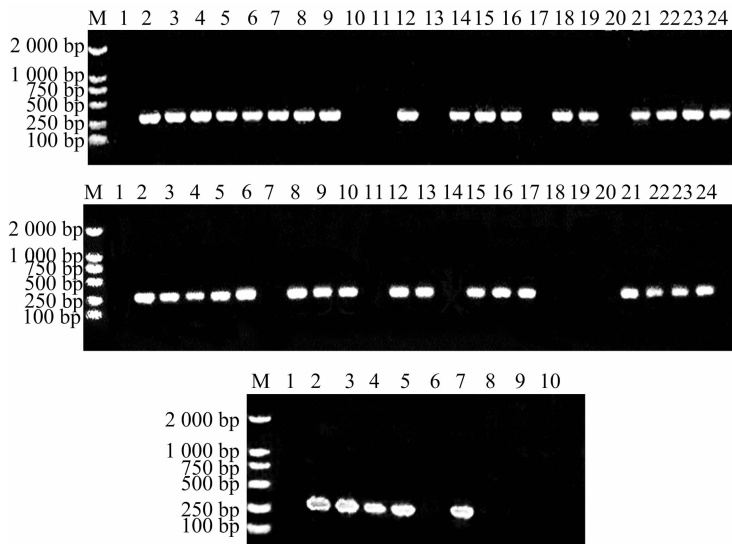
3 讨论

展天松等对江苏地区大肠杆菌耐药性分析结果显示,对阿米卡星耐药率最低,仅为15.7%,对链霉素耐药率最高为62.9%^[10],与本研究结果大致相同,原因可能是链霉素价格较为低廉,抗菌谱广,众多农户长期大量使用此类药物预防和

2.2.1 目的基因 *strA* 扩增结果 由图2可知,在55株云南大理部分地区猪源致病性大肠杆菌中出现42株阳性菌株, *strA* 阳性率为76.4%,所得条带片段大小为197 bp。

治疗疾病。朱永江等对40株畜禽大肠杆菌常用氨基糖苷类抗生素进行药敏试验,结果显示,对卡那霉素耐药率高达57.5%^[11],与本试验结果存在较大出入,产生此种现象原因可能是不同地区养殖模式和预防观念不同,也可能与研究基数有关,或与地区用药差异有关,相关影响因素还需进一步调查。

金文杰等在对216株大肠杆菌进行检测时,检测到编码修饰链霉素的钝化酶基因 *strA* 的阳性率为56%, *strB* 的阳性率为65.7%^[12]。本试验中,在55株云南大理部分地区猪源致病性大肠杆菌中 *strA* 阳性率为76.4%, *strB* 阳性率为

图3 55 株大肠杆菌分离株 *StrB* 扩增产物

72.7%,其中有 28 株菌株同时存在 *strA* 和 *strB* 耐药基因,占 50.9%,表明猪源致病性大肠杆菌普遍携带耐药基因 *strA* 和 *strB*,进一步说明大肠杆菌的耐药性和耐药基因存在关系。

云南大理部分地区猪源致病性大肠杆菌对氨基糖苷类药物的耐药特性有所改变,在用药时需选有效药。其中,合理用药是关键,合理选择用药,具体为开发新药、使用以耐万古霉素肠球菌(VRE)^[13]和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)^[14]为靶点的新抗生素和发展生物制剂;目前,已知黄连、金银花、艾叶、五倍子 4 类中药水提物对大肠杆菌表现出明显的抑菌效果^[15],寻找安全有效治疗猪大肠杆菌病的药物是畜牧养殖业中亟待解决的关键问题。耐药性的差异可为畜场合理选用兽药提供依据,掌握不同时期大肠杆菌的耐药情况,便于防控大肠杆菌疾病,以选择合理的方案进行用药。抗菌药物的大量使用,使细菌更容易自发突变,加快耐药性传播和扩散。不同猪场大肠杆菌可能存在不同的耐药谱和耐药率,兽医临床应根据本场病原菌的药敏特征正确选用合适的防治药物。

4 结论

55 株云南大理部分地区猪源致病性大肠杆菌对 6 种氨基糖苷类抗生素存在不同程度的耐药率,使这 6 种氨基糖苷类药物不能完全有效发挥作用,其中对链霉素耐药率最高,达到 50.9%,且检测到编码修饰链霉素的钝化酶基因 *strA* 阳性率为 76.4%,*strB* 阳性率为 72.7%,充分说明耐药基因与耐药表型具有一定相关性。大肠杆菌耐药性的普遍存在对畜牧业具有一定的影响,需要进一步控制。只有抑制耐药性的产生、阻断耐药机制的形成,才能真正地防治云南大理部分地区猪源致病性大肠杆菌疾病。

参考文献:

- [1]李迎晓,焦凤超,易本驰,等.猪源大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J].江苏农业科学,2013,41(1):217-218.
- [2]梁乔,赵凤菊,顾贵波,等.辽宁地区猪源大肠埃希菌氨基糖苷类抗生素耐药基因的检测与分析[J].河南农业科学,2017,46(6):134-137.

- [3]He W Z,Zhang X H,Zhang J,et al. Riboswitch control of induction of aminoglycoside resistance acetyl and adenyl - transferases [J]. RNA Biology,2013,10(8):1266-1273.
- [4]Niu H Y,Yu H,Hu T P,et al. The prevalence of aminoglycoside - modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high - level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China [J]. Brazilian Journal of Microbiology,2016,47(3):691-696.
- [5]张凤珍. 大肠杆菌耐药机制和消除耐药性方法概述[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2009,24(2):184-187.
- [6]李基棕,周碧君,文明,等. 猪场环境中大肠杆菌的耐药性检测及其耐药机理[J]. 中国兽医科学,2012,42(1):78-82.
- [7]杨慧,姜中其. 猪源大肠杆菌、沙门氏菌和葡萄球菌铜抗性与其抗菌药物耐药性的相关性初探[C]//中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学会第十一届会员代表大会暨第十三次学术讨论会与中国毒理学会兽医毒理专业委员会第五次学术研讨会论文集. 长沙,2015:224-245.
- [8]张俊丰,陈琳,魏冬霞,等. 92 株猪腹泻大肠杆菌的耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(11):153-156.
- [9]Shaw P C,Liang C T,Kam K M,et al. Presence of *StrA* - *StrB* gene within a streptomycin - resistance operon in a clinical isolate of *Shigella flexneri*[J]. Pathology,1996,28(4):356-358.
- [10]展天松,李军朝,邹宇靖,等. 动物源性大肠杆菌对氨基糖苷类药物的耐药性及其耐药基因的检测[J]. 畜牧与兽医,2016,48(10):94-97.
- [11]朱永江,吕文新,吴铁花,等. 40 株动物源性大肠杆菌耐药性分析及氨基糖苷修饰酶耐药基因的检测[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(22):115-117.
- [12]金文杰,秦爱建,郑志明,等. 禽致病性大肠杆菌中四种抗氨基糖苷类药物耐药基因的分子流行病学调查[J]. 中国预防兽医学报,2007,29(5):401-404.
- [13]张利霞,胡同平,郭翔,等. 万古霉素耐药肠球菌感染的流行病学研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(20):2103-2105.
- [14]翟蕙,李家斌. 万古霉素单用及联合用药对 MRSA 耐药性的影响[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(29):16-20.
- [15]韦嫔,谭艾娟,吕世明,等. 中药消除致病性大肠杆菌耐药性的研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):127-129.