方光远,谈福利,张智敏,等. 仔猪腹泻大肠杆菌耐药性和超广谱β-内酰胺酶基因检测分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(10):53-57.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.10.007

仔猪腹泻大肠杆菌耐药性和超广谱β-内酰胺酶基因检测分析

方光远[1],谈福利[1],张智敏[1],单星月[1],袁光苏[1],王喜国[2],陈俊红[1],胡志华[1],蒋加进[1],戴鼎震[1]
(1.金陵科技学院动物科学与食品工程学院,江苏南京 210038;2.乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂,江苏南京 210012)

摘要:为研究 20 日龄左右仔猪腹泻发病机理,检测仔猪腹泻大肠杆菌耐药性和超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)基因种类,分析仔猪腹泻大肠杆菌耐药特性,为兽医临床更好地预防控制仔猪腹泻大肠杆菌病提供参考,从腹泻发病仔猪粪便中分离出 34 株致病性仔猪腹泻大肠杆菌,用 10 种头孢类抗生素药敏纸片对其进行药物敏感试验,并设计针对 ESBLs 基因 *TEM*、*SHV*、*CTX-M-1*、*CTX-M-2*、*CTX-M-8*、*CTX-M-9* 的特异性引物,检测 34 株仔猪腹泻大肠杆菌 ESBLs 基因 *TEM*、*SHV*、*CTX-M-1*、*CTX-M-2*、*CTX-M-8*、*CTX-M-9* 存在情况。药敏试验结果表明,34 株仔猪腹泻大肠杆菌对 10 种头孢类抗生素的敏感度不同,其中,对头孢唑啉、头孢噻吩、头孢呋辛的耐药率为 68%、65% 和 56%,敏感率为 29%、15% 和 35%;对头孢哌酮、氨曲南的耐药率为 15%、9%,敏感率为 70%、79%。ESBLs 基因检测结果表明,34 株仔猪腹泻大肠杆菌全部检测到 *TEM* 耐药基因,检出率为 100%;检测到 1 株细菌具有 *CTX-M-9* 耐药基因,检出率为 2.8%。由于该养猪场分离出的仔猪腹泻大肠杆菌对头孢类抗生素普遍耐药,并且全部检测出 ESBLs 的 *TEM* 基因,因此建议对养猪场的头孢类抗生素使用应定期进行耐药性检测和合理规范使用。

关键词:仔猪腹泻大肠杆菌;耐药性;超广谱β-内酰胺酶基因;检测与分析
中图分类号:S852.6　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1002-1302(2023)10-0053-04

大肠杆菌对头孢菌素产生耐药性的主要机理是产生超广谱β-内酰胺酶(extended spectrum β-lactamases,ESBLs)。ESBLs 是通过质粒介导使细菌对第 3、4 代头孢菌素(主要包含头孢曲松、头孢噻肟、头孢他啶和头孢吡肟等)及单环类内酰胺抗生素氨曲南和青霉素类抗生素产生耐药的一组酶[1-2]。自从 19 世纪 80 年代欧洲国家发现并报道了第 1 例产 ESBLs 菌株后,目前已发现由质粒介导的 ESBLs 基因亚型 200 多种,其中,TEM(Temoniera)、SHV(Sulphadryl variable)和 CTX-M(Cefotaxime)基因型非常普遍[2-3]。根据基因同源性的差异把 ESBLs 分成三大类:TEM 型、SHV 型、非 TEM 非 SHV 型,其中,TEM 型和 SHV 型占大多数。最近,伴随 CTX-M 型不断增加,且本来属于 2d 亚类β-内酰胺酶 OXA 型中又出现了多种 ESBLs,所以又把 ESBLs 分类为 TEM 型、SHV 型、CTX-M 型、OXA 型、其他 5 种类型[4-5]。ESBLs 最常见的基因型是 TEM,至今已有 168 种,全球广泛分布。目前,我国滥用抗生素现象非常普遍,对超广谱β-内酰胺酶的研究较晚,抗生素产生耐药性的现象比较普遍。本试验通过检测仔猪腹泻大肠杆菌超广谱β-内酰胺酶基因型种类,分析仔猪腹泻大肠杆菌的耐药机理,为兽医临床提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料

试验时间:2021 年 12 月 10 日至 2022 年 4 月 10 日;地点:金陵科技学院动物科学与食品工程学院兽医微生物实验室。

1.1.1　病料　南京某养猪场 34 份仔猪腹泻粪便[3]。

1.1.2　菌株　34 份腹泻仔猪粪便进行细菌分离培养获得 34 株细菌,经鉴定均为仔猪腹泻大肠杆菌[3],冻干保存备用。

1.1.3　试剂　琼脂糖、2×*Taq* PCR mix、DL2000 DNA Marker 等购自南京擎科生物有限公司;普通营养琼脂平板、SS 琼脂平板、普通营养肉汤等自行配制。

收稿日期:2022-06-27
基金项目:江苏省大学生创新训练计划重点项目(编号:202013573017Z);动物药品创新与制备"创客"虚拟班(编号:2017008);江苏省农业科技创新与推广挂县强农富民工程(编号:SJKJ016)。
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、兽医生物制品学研究。E-mail:fgy@jit.edu.cn。

1.2　方法

1.2.1　细菌复苏纯化培养　取保存的 34 株仔猪腹泻大肠杆菌冻干菌种，接种普通营养琼脂平板、SS 琼脂平板和普通营养肉汤，放入培养箱内培养。

1.2.2　细菌药敏试验　购自杭州滨河微生物试剂有限公司 10 种头孢类抗生素药敏纸片为头孢唑啉、头孢噻吩、头孢呋辛、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、头孢西丁和氨曲南。药敏试验采用常规纸片法进行。菌液制备：挑选普通营养琼脂平板上分离培养好的大肠杆菌菌落置于灭菌的 0.9% 氯化钠溶液中，制成均匀悬液，使其浊度与 0.5 麦氏单位比浊管浊度一致。用灭菌棉签蘸取制备好的菌液，均匀涂布整个平板表面。用灭菌镊子夹取药敏纸片 1 张，贴在平板表面，1 块平板上贴 4 种不同的药敏纸片，各药敏纸片间间隔 ≥ 30 mm，且纸片距平板边缘 ≥ 15 mm。操作完成的平板放入恒温培养箱中 37 ℃ 24 h 后，仔细观察，并测量各药敏纸片抑菌圈直径。结果判定参考《抗微生物药物敏感试验执行标准(CLSI－M100－S20)》。

1.2.3　细菌超广谱 β－内酰胺酶耐药基因检测

1.2.3.1　细菌 ESBLs 耐药基因 PCR 扩增引物　根据已发表文献的 ESBLs *TEM*、*SHV*、*CTX－M－1*、*CTX－M－2*、*CTX－M－8*、*CTX－M－9* 基因序列，设计合成 TEM、SHV、CTX－M－1、CTX－M－2、CTX－M－8、CTX－M－9 上下游引物(表 1)。

表 1　供试基因上下游引物

基因	上下游引物(5′→3′)	长度(bp)
TEM	F：TCCGTGTCGCCCTTATTC；R：CAGTGAGGCACCTATCTCG	830
SHV	F：TCTCCCTGTTAGCCACCCTG；R：CCCGCAGATAAATCACCACA	756
CTX－M－1	F：AATTAGAGCGGCAGTCGG；R：CCACAACCCAGGAAGCAG	588
CTX－M－2	F：TTGCGATGTGCAGTACCAG；R：ATATCCCGACGGCTTTCC	631
CTX－M－8	F：CGTTAAGCGGATGATGCT；R：TTCTGCCTTCTGCTCTGG	808
CTX－M－9	F：TTGACCGTATTGGGAGTTTG；R：GCTGAAGCCAGCACATCG	870

1.2.3.2　细菌 DNA 模板制备及 ESBLs 耐药基因 PCR 检测　取各仔猪腹泻大肠杆菌营养肉汤培养物 1 mL，4 ℃ 10 000 r/min 离心 3 min，去除上清，加生理盐水 1 mL 摇匀；再同上离心洗涤 1 次，弃上清液，取 1 mL 生理盐水加入管中摇匀，作为细菌 DNA 模板。PCR 反应条件：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 变性 45 s，56 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；然后 72 ℃延伸 10 min[3-6]。PCR 基因片段检测：用 1 倍 TBE 缓冲液配备 1.2% 琼脂凝胶 100 mL，加入 5 μL Goldview 倒板冷却后，取各 PCR 产物 10 μL 加样后电泳。电泳仪设定电压 120 V、电流 130 mA、时间 45 min，电泳后采用紫外检测仪观察结果。

2　结果与分析

2.1　细菌复苏纯化培养结果与分析

在普通营养琼脂平板上分区划线接种 34 株仔猪腹泻大肠杆菌菌种冻干粉，37 ℃培养 24 h 后，菌落均生长良好，呈圆形、湿润、无色半透明状菌落[4-6](图 1)。SS 琼脂平板上生长出圆形、光滑的红色菌落[4-6](图 2)。营养肉汤中呈均匀、浑浊状态，底部出现黏性沉淀物，液面管壁出现菌环。

图1　普通营养琼脂上菌落形态

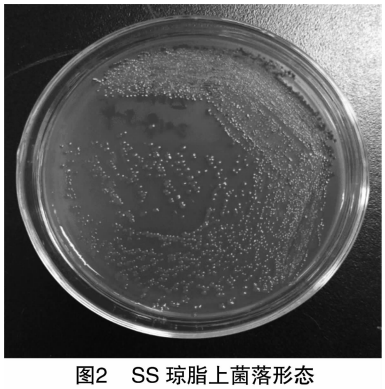


图2　SS 琼脂上菌落形态

2.2　细菌药敏试验结果与分析

由表 2 结合《抗微生物药物敏感试验执行标准(CLSI－M100－S20)》的判断标准可知,34 株仔猪腹泻大肠杆菌对头孢唑啉、头孢噻吩、头孢呋辛、头孢哌酮、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢西叮、氨曲南 10 种抗生素的敏感度不同,其中,对头孢唑啉、头孢噻吩、头孢呋辛的耐药率比较高,分别为 68%、65% 和 56%,敏感率比较低,分别为 29%、15% 和 35%,这可能与临床使用上述 3 种抗生素较多有关;对头孢哌酮、氨曲南的耐药率比较低,分别为 15% 和 9%,敏感率比较高,分别为 70% 和 79%,这可能与临床使用上述 2 种抗生素较少有关。

表 2　细菌药敏试验结果

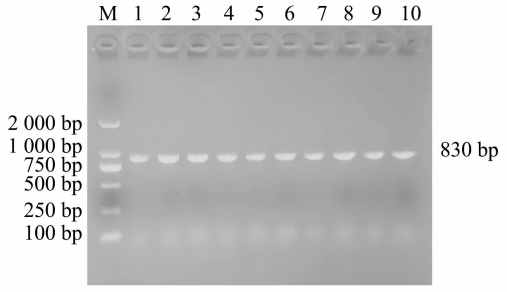
编号	抑菌圈直径(mm)									
	头孢唑啉	头孢噻吩	头孢呋辛	头孢哌酮	头孢曲松	头孢噻肟	头孢他啶	头孢吡肟	头孢西丁	氨曲南
1	0	0	0	23	21	28	25	26	18	25
2	21	15	11	0	0	0	7	0	18	7
3	9	16	18	23	20	0	0	24	15	24
4	0	0	0	21	25	20	19	9	11	23
5	22	0	24	23	21	24	11	25	22	29
6	13	0	21	21	29	23	24	28	14	28
7	13	11	14	25	14	16	26	20	20	29
8	12	9	12	23	23	23	22	24	17	24
9	13	0	12	29	19	19	21	26	19	25
10	0	0	0	26	0	21	15	24	0	20
11	21	14	0	21	23	8	7	13	0	25
12	11	9	0	21	21	0	22	27	15	24
13	22	19	21	21	21	29	24	10	18	23
14	21	16	19	16	9	27	0	13	14	25
15	0	15	20	0	17	0	0	0	0	25
16	0	0	0	13	0	23	25	24	18	18
17	7	0	0	12	18	0	20	24	14	19
18	24	13	0	21	20	18	16	25	0	24
19	0	0	0	21	9	23	0	0	11	27
20	25	0	0	22	27	21	0	0	16	29
21	8	20	0	13	19	0	21	25	21	23
22	7	0	0	20	27	0	27	25	15	26
23	0	0	0	21	23	19	20	18	14	22
24	12	21	16	27	27	29	28	14	0	29
25	20	15	16	16	11	0	12	0	0	10
26	21	16	20	19	0	20	17	21	17	18
27	0	0	0	9	16	0	0	20	15	17
28	12	15	17	24	25	24	18	26	12	21
29	0	0	19	21	25	18	20	23	18	26
30	0	0	18	24	0	0	13	0	20	28
31	0	0	0	13	0	23	0	24	17	25
32	21	18	19	23	22	20	21	25	20	24
33	9	0	21	25	19	22	24	18	18	23
34	15	18	22	28	29	24	14	17	24	28
敏感度	68% R 3% I 29% S	65% R 20% I 15% S	56% R 9% I 35% S	15% R 15% I 70% S	26% R 27% I 47% S	32% R 33% I 35% S	38% R 9% I 53% S	32% R 3% I 65% S	38% R 24% I 38% S	9% R 12% I 79% S

注:S 为敏感,I 为中介,R 为耐药。

2.3　细菌耐药基因检测结果与分析

34 株仔猪腹泻大肠杆菌菌株超广谱 β－内酰胺酶 *TEM*、*SHV*、*CTX－M－1*、*CTX－M－2*、*CTX－M－8*、*CTX－M－9* 基因片段 PCR 检测结果表明,其中 34 株仔猪腹泻大肠杆菌均被检测到超广谱 β－内酰胺酶 *TEM* 基因片段,7 号菌株细菌被检测到 *CTX－M－9* 基因片段,其他基因片段未被检测到。

2.3.1　*TEM* 耐药基因检测结果与分析　由图 3、图 4 可知,34 株仔猪腹泻大肠杆菌均检测到 *TEM* 耐药基因,该耐药基因检出率为 100%。



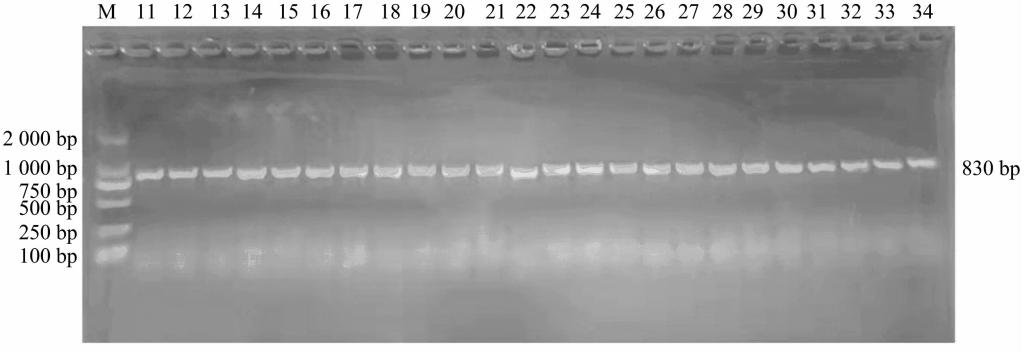
M—DL 2 000 DNA Marker；1~10—1~10 号菌株

图3　1~10 号仔猪腹泻大肠杆菌 *TEM* 耐药基因 PCR 检测结果

2.3.2　*CTX－M－9* 耐药基因检测结果与分析　由图 5、图 6 可知，34 株仔猪腹泻大肠杆菌 7 号菌株被检测到 *CTX－M－9* 耐药基因，该耐药基因检出率为 2.8%。

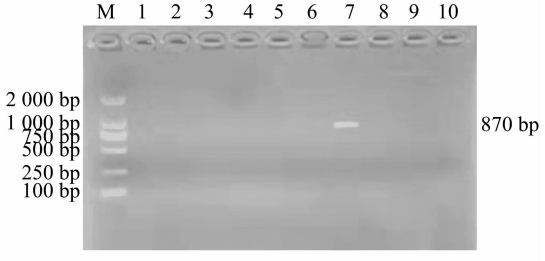
3　讨论

头孢类抗生素是兽医临床抗细菌感染治疗中最常应用的抗生素，随着 3 代头孢类抗生素的大量应用，细菌对头孢类抗生素耐药现象越来越严重，细菌对此类药物耐药的很大一部分因素是产生



M—DL 2 000 DNA Marker；11~34—11~34 号菌株

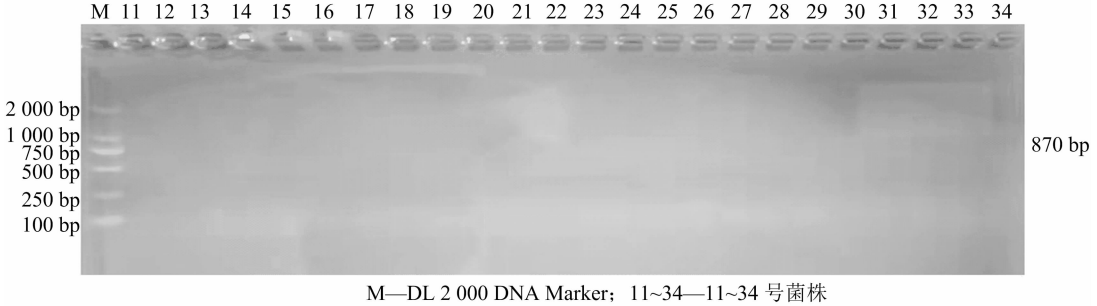
图4　11~34 号仔猪腹泻大肠杆菌 TEM 耐药基因 PCR 检测结果



M—DL 2 000 DNA Marker；1~10—1~10 号菌株

图5　1~10 号仔猪腹泻大肠杆菌 *CTX-M-9* 耐药基因 PCR 检测结果

β－内酰胺酶和 ESBLs。TEM 型耐药基因是 ESBLs 中最常见的基因型，至今已有 168 种，呈全球性分布，也是我国最常见的 ESBLs[7]。本试验结果表明，34 株仔猪腹泻大肠杆菌全部检测到 *TEM* 耐药基因，阳性率为 100%；检测到 1 株 *CTX－M－9* 耐药基因，检测率为 2.8%。Kawamura 等报道，TEM 可水解羧苄西林、苯唑西林或头孢菌素；SHV 具有水解头孢噻肟巯基的功能；CTX－M 对头孢噻肟水解作用很大，对头孢他啶水解作用很小[8]。根据本试验药敏试验和耐药基因检测结果可知，34 株仔猪腹泻大肠杆菌对 10 种抗生素耐药性和敏感性情况差别较大，但检测出 *CTX－M－9* 耐药基因的 7 号菌株对头孢噻肟的耐药性明显比其他未检测出的菌株高。34 株仔猪腹泻大肠杆菌全部检测到 *TEM* 耐药基因，说明该猪场仔猪腹泻致病性大肠杆菌对头孢类抗生素均已经产生耐药，应重视。由于检测的仔猪腹泻大肠杆菌菌株数较少，检测出的 ESBLs 基因类型也较少，仔猪腹泻大肠杆菌具体的耐药特性和 ESBLs 基因分布状况有待更进一步探索。



M—DL 2 000 DNA Marker；11~34—11~34 号菌株

图6　11~34 号仔猪腹泻大肠杆菌 *CTX-M-9* 耐药基因 PCR 检测结果

高安妮,娄运生,刘迎霞,等. 夜间增温下施生物炭和硅肥对冬小麦生长、生理及产量的影响[J]. 江苏农业科学,2023,51(10):57 - 64.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2023.10.008

夜间增温下施生物炭和硅肥对冬小麦生长、生理及产量的影响

高安妮[1,2], 娄运生[1,2], 刘迎霞[2], 杜泽云[2], 郭峻泓[2], 潘德丰[2]
(1. 南京信息工程大学气象灾害预报预警与评估协同创新中心,江苏南京 210044;
2. 南京信息工程大学江苏省农业气象重点实验室,江苏南京 210044)

摘要:气候变暖是全球气候变化的显著特征之一,表现为昼夜不对称增温,即夜间温度增幅大于白天。夜间增温明显影响冬小麦生产,通过施肥能否调控夜间增温的不利影响尚不清楚。通过田间模拟试验,采用 3 因素 3 水平正交试验设计,研究了夜间增温条件下施用生物炭和硅肥对冬小麦生长、生理特性及产量的影响。夜间增温设 W0(常温对照)、W1(5 mm 铝箔膜覆盖)和 W2(11 mm 铝箔膜覆盖)3 个水平,夜间用铝箔膜覆盖植株冠层以模拟增温(19:00—06:00);施生物炭设 B0(对照)、B1(5 t/hm^2 生物炭)和 B2(17.5 t/hm^2 生物炭)3 个水平;施硅肥设 Si0(对照)、Si1(200 kg/hm^2 钢渣)和 Si2(200 kg/hm^2 矿粉)3 个水平。结果表明,W1 和 W2 处理使全生育期 5cm 土层夜间均温分别升高 0.72 ℃和 0.34 ℃,10 cm 土层升高 0.22 ℃和 0.18 ℃。夜间增温降低冬小麦关键生育期分蘖数、株高、叶面积指数(LAI)和产量,提高叶绿素含量(SPAD 值)、叶片净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)和气孔导度(G_s)。与 W0 处理相比,W1 处理胞间 CO_2 浓度(C_i)降低 0.41%、W2 处理提高 0.75%;W1 和 W2 处理分别减产 39.34% 和 46.16%。施用生物炭可提高冬小麦分蘖数、株高、P_n、LAI 和 T_r,降低 G_s 和 C_i。与 B0 处理相比,B1 处理使叶片 SPAD 值降低 2.98%,B2 处理则升高 0.51%;B1 处理使叶片 G_s 降低 2.44%,B2 处理降低 7.32%;B1 和 B2 处理分别增产 5.97% 和 22.76%。施硅肥可提高分蘖数、LAI、SPAD 值和 P_n,降低株高、G_s、T_r 和 C_i。与 Si0 处理相比,Si1 和 Si2 处理分别减产 16.44% 和 20.18%。研究认为,施用生物炭(17.5 t/hm^2)可有效缓解夜间增温对冬小麦生产的不利影响,提高产量。

关键词:夜间增温;生物炭;硅肥;冬小麦;产量;生理特性
中图分类号:S512.1$^+$10.6　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1002 - 1302(2023)10 - 0057 - 08

政府间气候变化专门委员会(IPCC)第 6 次评估报告指出,2014—2018 年全球地表平均气温已升高 1.04 ℃,预计 2021—2030 年全球升温幅度将达 1.5 ℃[1]。气候变暖呈现明显的非对称性,即夜间最低气温增幅大于日间最高气温,冬春季增温趋势明显高于夏秋季[2-4]。温度是影响作物生长发育、生理代谢和产量构成的重要因素[5]。小麦是我国主要粮食作物,气候变暖使小麦生产面临的不确定

收稿日期:2022 - 06 - 10
基金项目:国家自然科学基金(编号:41875177);中国地质调查局地质调查项目(编号:DD20190305)。
作者简介:高安妮(1997—),女,安徽宿州人,硕士研究生,主要从事气候变化与农业研究。E - mail:annygao1215@163.com。
通信作者:娄运生,博士,教授,主要从事气候变化与农业气象研究。E - mail:yslou@nuist.edu.cn。

参考文献:

[1]Suzhaeva L V, Egorova S A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, isolated from children's intestinal microbiota[J]. Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika, 2020, 65(10): 638 - 644.
[2]李蓓菡,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]方光远,邵金凤,王　纾,等. 仔猪腹泻大肠杆菌分离鉴定与Ⅰ类整合子检测[J]. 金陵科技学院学报,2019,35(3):84 - 88.
[4]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.
[5]方光远,张　莉,陆宇超,等. 犬源大肠杆菌超广谱β - 内酰胺酶基因检测[J]. 畜牧与兽医,2014,46(12):70 - 73.
[6]方光远,张　莉,陆宇超,等. 犊牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定和耐药性检测[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(9):273 - 277.
[7]王　瑶,徐英春,杨启文,等. 19 家医院大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中 TEM 型β - 内酰胺酶的研究[J]. 临床检验杂志,2008,26(2):85 - 89.
[8]Kawamura K, Nagano N, Suzuki M, et al. ESBL - producing *Escherichia coli* and its rapid rise among healthy people[J]. Food Safety, 2017, 5(4): 122 - 150.