

# 羊源大肠杆菌 Vero 毒素基因及耐药表型与耐药基因分析

刘爱辉<sup>1</sup> 韩红霞<sup>2</sup> 赵朝山<sup>1</sup>

1.河南省滑县动物卫生监督所,河南滑县 456400;

2.河南省滑县动物疫病预防控制中心,河南滑县 456400

**摘要** 采用 K-B 法进行 21 种抗菌药物的敏感性试验;用 PCR 技术检测大肠杆菌的 Vero 毒素基因、耐药基因的携带情况。结果显示,所有分离株对多粘菌素 B 敏感,对青霉素和红霉素的耐药率为 100%,对氨苄西林、恩诺沙星、磺胺甲氧嘧啶的耐药率分别为 43.1%、34.4%、32.7%,对其他药物的耐药率较低。三重以上耐药菌株占总菌株数的 86.2%,耐药最多的菌株可耐 19 种抗生素。10 株大肠杆菌扩增到 VT2 基因。从 19 种常见的耐药基因中扩增到 3 种 β-内酰胺酶类、2 种四环素类、2 种磺胺类和 3 种喹诺酮类耐药基因。研究表明,耐药基因在羊源大肠杆菌中分布广泛,但耐药表型与耐药基因之间无绝对相关性。

**关键词** 羊;大肠杆菌;药物敏感性;Vero 毒素;耐药基因

大肠杆菌是一种重要的人畜共患病原菌,可经食物和水传播,羊、牛等家畜是其主要宿主。近年来,随着养羊业的迅速发展,由致病性大肠杆菌引起羊发病现象较为常见。羊大肠杆菌病分为成年羊和羔羊的大肠杆菌病,后者以 3~4 月龄较易感,以拉稀、呼吸困难和共济失调为主要特征。当环境突变引起动物应激反应、消耗大量能量和降低抵抗力时,诱发本病,其发病急、死亡快,往往来不及治疗,且易与产气荚膜梭菌引起的羊猝狙、羔羊痢疾相混淆,给养羊业带来极大危害。

## 1 材料与方法

1)菌株来源。58 株羊源大肠杆菌采自河南省散养或规模化羊场腹泻病死羊粪便,经常规生化试验和 PCR 鉴定确定为大肠杆菌,由河南省高等学校环境与畜产品安全重点学科开放实验室保存,质控标准菌株(大肠埃希氏菌 ATCC25922)购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2)材料。胰蛋白大豆琼脂和胰蛋白大豆肉汤培养基购自美国 BD 公司,四季青特级新生牛血清购

收稿日期:2017-01-12

刘爱辉,男,1986 年生,助理兽医师。

## 5 治疗

首先用药物治疗,在发病少时涂抹用药,用 5 份来苏尔溶液溶于 100 份温水中,兑好后再加入 5 份敌百虫即可涂抹于病羊患处。还可以颈部皮下注射伊维菌素或阿维菌素治疗,每千克注射 0.2 mg,隔 1 周再治疗 1 次。其次要求健康羊与病羊隔离,从病羊身上清除下来的毛、痂皮要集中销毁,并进行彻底消毒,治疗过的病羊应在没有螨虫污染过的地方活动采食。最后加强养殖环境的卫生管理,阻

断疾病传播途径。严格做好粪污处理和病死羊的无害化处理,要保证羊舍通风、干燥、宽敞,及时对用具、场地做好消毒工作,有效控制和消灭传染源。

## 6 回访

通过给该户提供治疗方案,用药治疗 2 个疗程,20 d 后兽医去检查羊 2 次用药后的情况,又采集病料在显微镜下检验,没有活螨出现。

加强了从放牧到舍饲各个环节的管理,饲料营养均衡了,羊的营养状况得以改善,羊膘情逐渐好转。

自浙江天杭生物科技有限公司。生化鉴定管和药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。*Taq* DNA 聚合酶购自上海 SANGON 公司;PCR 引物由上海 SANGON 公司合成。

3)药敏试验。按标准纸片琼脂扩散法对分离的细菌进行药敏试验。以大肠埃希氏菌 ATCC25922 为质控标准菌株,测定 58 株羊源大肠杆菌对抗生素药物的敏感性。

4)PCR 扩增及序列测定分析。PCR 模板的制备:首先使用接种环挑取单菌落,使其悬浮于含 100  $\mu$ L 无菌三蒸水的 1 mL 离心管中,沸水水浴 5 min,然后置于冰水混合物中 5 min,10 000 r/min 离心 3 min,取上清置 4  $^{\circ}$ C 保存备用。PCR 反应体系:10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L,25 mmol/L  $MgCl_2$  2  $\mu$ L, 2  $\mu$ mol/L dNTPs 1  $\mu$ L,10  $\mu$ g/mL 上、下游引物各 1  $\mu$ L,2 IU/ $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L,无菌水 16  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L。PCR 反应条件为:94  $^{\circ}$ C 变性 4 min;然后按照各自的退火温度进入 30 个循环,94  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 60 s;最后一个循环 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,出现与预期大小相当的条带为阳性。PCR 阳性产物由上海 SANGON 公司进行测序,测序结果与 GenBank 中相应的 Vero 毒素基因和耐药基因序列进行同源性分析。根据药敏试验和耐药基因的检测结果,分析耐药情况及耐药基因流行类型。

## 2 结 果

1)药敏试验。所有分离株对多粘菌素 B 敏感,对青霉素和红霉素的耐药率为 100%,对氨基西林、恩诺沙星、磺胺甲氧嘧啶、环丙沙星、头孢拉定、阿奇霉素、头孢克洛的耐药率分别为 43.1%、34.4%、32.7%、27.5%、25.9%、25.9%、20.7%,对其他药物的耐药率均低于 20%。菌株多重耐药现象也比较严重,三重以上耐药菌株占总菌株数的 86.2%,三耐和四耐最为严重,为 63.8%,有些菌株甚至可耐 19 种抗生素。

2)Vero 毒素基因的检测。58 株大肠杆菌中,没有扩增到 *VT1* 基因,有 10 株扩增到 *VT2* 基因。测

序结果显示,*VT2* 基因序列与 NCBI 数据库已发布的相应的基因序列有 99%同源性。

3)耐药基因的检测。58 株  $\beta$ -内酰胺酶类耐药菌株扩增到 *Bla<sub>CMY-2</sub>*、*Bla<sub>TEM-type</sub>* 和 *Bla<sub>CTX-type</sub>* 基因,含有 *Bla<sub>CMY-2</sub>* 基因的菌株为 1 株,含有 *Bla<sub>TEM-type</sub>* 基因的 15 株,含有 *Bla<sub>CTX-type</sub>* 基因的 2 株,有 1 株同时检测到 *Bla<sub>TEM-type</sub>* 基因和 *Bla<sub>CTX-type</sub>* 基因。11 株四环素类耐药菌株有 1 株扩增到 *TetM* 基因,2 株扩增到 *TetB* 基因。19 株磺胺类耐药菌株有 6 株扩增到 *Sul I* 基因,13 株扩增到 *Sul II* 基因,但 2 种基因未同时检测到。20 株恩诺沙星耐药菌株有 3 株、5 株、4 株分别扩增到 *QnrA*、*QnrB* 和 *QnrS* 基因,有 1 株同时检测到 *QnrA* 和 *QnrB* 基因。测序结果显示,各耐药基因序列均与 NCBI 数据库已发布的相应的耐药基因序列有 99%同源性。

## 3 讨 论

大肠杆菌病已成为动物的常见病和多发病。羊、牛是大肠杆菌的主要宿主,后者是肠道菌群的共生菌,是毒力基因和耐药基因的贮存库,也可通过食物链或接触的方式将毒力基因和耐药基因传播和扩散,给人类健康和公共卫生带来安全隐患。大肠杆菌产生 *VT1* 和 *VT2* 毒素或只产生 *VT2* 毒素,*VT2* 毒素被认为是主要的毒力因子。国外报道了携带多重耐药基因的大肠杆菌可能含有 Vero 毒素基因,本研究从多重耐药羊源大肠杆菌中也可检测到 *VT2* 毒素基因。因此,动物源致病菌耐药性与相关耐药基因的监测对临床合理使用抗生素和公共卫生具有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] 苏洋洋,宋萍,孙鏊国,等.一例山羊大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J].畜禽业,2014,302(6):8-9.
- [2] 吴忆春.羊源 O78 型大肠杆菌的分离及 16S rDNA 序列分析[J].中国畜牧兽医,2014,41(5):240-243.
- [3] 马红霞,贾绍娟,刘玉堂,等.不同动物源性大肠杆菌的耐药性检测[J].中国兽医杂志,2008,44(6):81-83.