

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.06.04

猪源耐黏菌素大肠杆菌 PFGE 分型及耐药性研究

吴宁鹏¹, 吕小月¹, 于辉², 周娟²

(1.河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008; 2.河南省动物卫生监督所, 郑州 450008)

[收稿日期] 2017-11-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 06-0021-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为了解河南省焦作市、许昌市规模化养殖厂耐黏菌素大肠杆菌的流行情况, 对分离到的 32 株耐黏菌素大肠杆菌使用微量肉汤稀释法检测其药物敏感性, 并采用脉冲场凝胶电泳 (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 对分离株进行分型研究。结果显示, 32 株耐黏菌素大肠杆菌对四环素、多西环素、磺胺异噁唑、复方新诺明的耐药率均高达 90% 以上, 32 株猪源大肠杆菌可分为 30 种带型。结果表明, 两地市养殖场猪源大肠杆菌耐药性普遍存在, 且以多重耐药为主, PFGE 分型结果显示, 32 株耐黏菌素大肠杆菌整体上表现出较大的遗传多样性, 但不同菌株存在着不同程度的亲缘关系。

[关键词] 大肠杆菌; 黏菌素; 脉冲场凝胶电泳

Study on PFGE Typing and Drug Resistance of Swine *Escherichia coli*

WU Ning-peng¹, LV Xiao-yue¹, YU Hui², ZHOU Juan²

(1. Henan Institute of Veterinary Drug Control, Zhengzhou 450008, China; 2. Henan Animal Health Inspection, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: To investigate the epidemic status of the *Escherichia coli* isolated from swine, thirty-two *E. coli* isolates collected from Jiaozuo, Xuchang city, Henan province were subject to identifications of the antibiotics resistance and PFGE typing by microbroth dilution method and pulsed field gelelectrophoresis. Result showed that 32 clinic isolates were resistant to tetracycline, doxycycline, sulfonamidoxazole, paediatric compound sulfamethoxazole tablets, drug resistance rates were all above 90%. 32 swine *E. coli* isolates can be divided into 30 PFGE types. The study indicated that the resistance of *E. coli* in the farms was widespread, and multidrug resistance accounted for the most. PFGE results showed that the prevalence of *E. coli* in the farms of Jiaozuo, Xuchang, Kaifeng may be caused by the spread of many kinds of genotypes of stains.

Key words: *E. coli*; colistin; PFGE

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*), 通常称为大肠杆菌, 为肠杆菌科, 埃氏菌属的革兰氏阴性菌。猪感染大肠杆菌通常引起仔猪肠道传染性疾病, 常见

的有仔猪黄痢、仔猪白痢和水肿病三种^[1]。近年, 随着抗菌药物的不当使用, 耐药菌株越来越多, 耐药问题日趋严重^[2], 因此对大肠杆菌进行长期的监

测研究工作十分重要。脉冲场凝胶电泳 (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 是近年发展起来的一种重要的分离大分子量线性 DNA 分子的电泳技术,因其重复性好,分辨力强被誉为细菌分子分型技术的“金标准”,被广泛应用于分子分型研究^[3]。通过微生物分型可以鉴定菌株是否一致、比较它们的亲缘关系,对于细菌性传染病的监测、传染源的追踪、传播途径的调查和识别有着非常重要的意义^[4]。

碳青霉烯类抗菌药物通常被认为是治疗泛耐药肠杆菌的最后手段,而黏菌素是治疗耐碳青霉烯类病原体感染的关键药物,因此,耐黏菌素的菌株的传播,会严重影响临床治疗的有效性^[5]。本研究对 2014、2015 年分离于河南省焦作市、许昌市养殖场的耐黏菌素大肠杆菌进行 PFGE 基因分型及耐药性研究,以达到对河南省内耐黏菌素大肠杆菌流行情况的准确判断,从而对耐黏菌素大肠杆菌引起的疾病的防治提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 2014 与 2015 年从河南省焦作市、许昌市规模化养殖厂健康猪或病猪中分离并保存的共 333 株大肠杆菌中 32 株耐黏菌素大肠杆菌。沙门菌标准菌株 H9812 由河南农业大学牧医工程学院微生物实验室提供。

1.1.2 主要仪器和试剂 动物源细菌耐药性药敏检测板,购自上海星佰生物技术有限公司;营养琼脂培养基、脑心浸萃液琼脂培养基,购自北京路桥公司;蛋白酶 K、限制性内切酶 *Xba* I 购自宝生物工程(大连)有限公司;PFGE 专用琼脂糖为 Bio-Rad 公司配套产品;细胞悬浮液(CSB)、细胞裂解液(CLB)均为新鲜配制;CHEF-MapperXA 型脉冲电泳仪、GELDOC 凝胶成像系统购自 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 使用药敏检测板对 32 株耐黏菌素大肠杆菌进行药敏试验,结果判定依照美国临床实验室标准委员会推荐的标准。

1.2.2 PFGE 分型

1.2.2.1 细菌的培养 将受试菌株和标准菌株

H9812 划线接种于营养琼脂培养基,37℃ 过夜培养。

1.2.2.2 胶块的制备 挑取适量的过夜培养的新鲜菌落制备菌悬液,加入 10 μL 的蛋白酶 K 和 200 μL 溶化的 56℃ 的 1% SeaKem Gold 1% SDS 琼脂糖。

1.2.2.3 细胞裂解 将胶块于细胞裂解液中(5 mL CLB,25 μL 蛋白酶 K)裂解,水浴摇床 55℃,165 r/min 孵育 5 h。

1.2.2.4 裂解后洗胶 分别用超纯水和 TE 缓冲液洗涤胶块。

1.2.2.5 酶切 用刀片切下约 1/3 的小胶块,加入 *Xba* I 酶切体系,37℃ 水浴 3 h。

1.2.2.6 电泳 弃去酶切体系,将胶块按顺序置于梳子上,倒入溶解的 1% 的琼脂糖制胶;使用 CHEF-mapperXA 型脉冲场凝胶电泳仪和 0.5×TBE 进行电泳。

1.2.2.7 染色与图像的获取 将凝胶置于 500 mL 含 1 μg/mL 的 EB 溶液中染色 30 min,然后纯水脱色 30 min,用凝胶成像系统 Gel Doc 获取胶图,并用 Bio Numerics 软件聚类分析。

2 结果与分析

2.1 药敏试验 32 株猪源大肠杆菌分离株对 13 种临床常用抗菌药物耐药情况见表 1。

药敏试验结果表明,32 株猪源耐黏菌素大肠杆菌对四环素的耐药性(100%)最为普遍,其次是磺胺异噁唑(96.8%),多西环素(96.8%),复方新诺明(90.6%),耐药率均高达 90% 以上,对氟苯尼考、氨苄西林、大观霉素、恩诺沙星的耐药率分别为 87.5%、84.4%、81.3%、59.4%,均在 50% 以上,对氧氟沙星(46.9%)、庆大霉素(31.3%)、阿莫西林/棒酸(12.5%)耐药率较低,对头孢噻唑耐药率最低(0)。

2.2 PFGE 32 株猪源耐黏菌素大肠杆菌的聚类分析见图 1,其中 M14~39 于 2014 年分离于许昌,2015M29、2015M31 于 2015 年分离于许昌,2015M32、2015M35、2015M38、2015M39 于 2015 年分离于焦作,分离株共存在 30 种带型,其中,1、2、3、4 带型间相似性在 90% 以上,各菌株带型间基本无差异,可认为是同一流行亚种,5、6、7、8、9 各带型

间相似性约为 85%,可能存在克隆相关,其他带型相似性均低于 85%,说明亲缘关系较远,菌株遗传基因之间不紧密相关,流行病学上可能不存在相关性。

表 1 32 株猪源大肠杆菌耐药情况

Tab 1 Antimicrobial resistance of 32 chicken *E.coli* isolates

抗菌药 Antimicrobials	耐药 Resistance	耐药率/% Resistance Rate	抗菌药 Antimicrobials	耐药 Resistance	耐药率/% Resistance Rate
氧氟沙星	15	46.9	多西环素	31	96.8
恩诺沙星	19	59.4	头孢噻呋	0	0
黏菌素	32	100	氟苯尼考	28	87.5
四环素	32	100	磺胺异噁唑	31	96.8
庆大霉素	10	31.3	复方新诺明	29	90.6
大观霉素	26	81.3	氨苄西林	27	84.4
阿莫西林/棒酸	4	12.5			

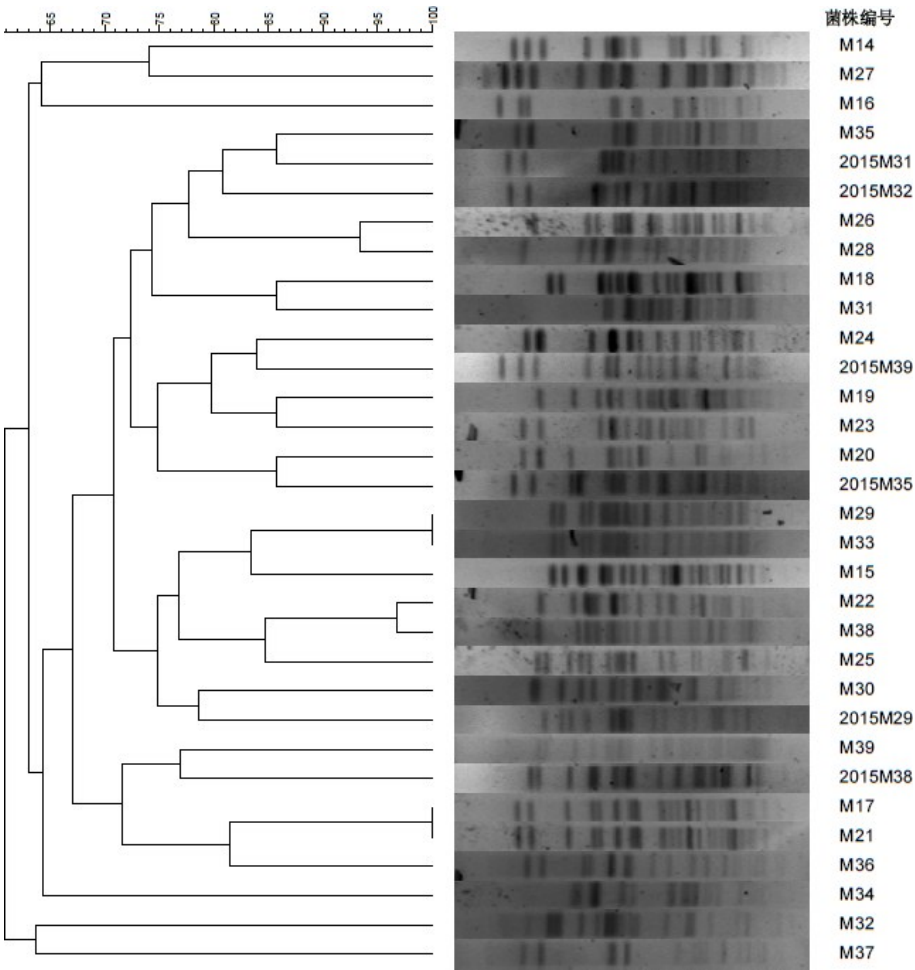


图 1 32 株耐黏菌素大肠杆菌 PFGE 聚类分析图

Fig 1 The cluster analysis of 32 strains of Colistin resistance *E.coli*

3 讨论与小结

来自中国、英国和美国多所大学的研究者在期刊《柳叶刀·传染病》上宣布^[6],发现了一种新形式的抗药性,首次在肠杆菌科中发现了质粒介导的黏菌素抗性机制,MCR-1。在此之前,黏菌素耐药性仅由染色体突变介导,从未有过耐药基因水平转移的报道。面对最后的防线之一多粘菌素,而且这种抗药性还在肉用动物和人类中同时存在,可能是因为该药的农业使用。这种抗药性可在细菌之间轻易地转移,而且可能已经蔓延至多个国家。

为了对河南省许昌市、焦作市两规模化养殖场黏菌素耐药菌株作流行病学分析,对分离于两地市的黏菌素耐药大肠杆菌进行药敏试验和分子分型研究,研究发现,32 株猪源耐黏菌素大肠杆菌对四环素的耐药性最为普遍,其次是磺胺异噁唑,多西环素,复方新诺明,耐药率均高达 90% 以上,此外,对氟苯尼考、氨苄西林、大观霉素、恩诺沙星的耐药率均在 50% 以上,对氧氟沙星(46.9%)、庆大霉素(31.3%)、阿莫西林/棒酸(12.5%)耐药率较低,对头孢噻唑耐药率最低,为 0。分离株对多种抗菌药物耐受,耐药谱广,可能与 PFGE 型较多有关。

脉冲场电泳(PFGE)技术重复性好,特异性、分辨性高,作为一种成功的基因分型方法,广泛应用于各种病原微生物分型和溯源中。在欧美等发达国家中,许多公共卫生实验室采用 PFGE 技术进行 DNA 指纹图谱鉴定,确定食源性疾病发生时致病菌的种属^[7-8]。美国疾病预防控制中心(CDC)通过建立细菌基因分型国家电子网络(PulseNet),将来自各地市的病人或可疑食品样本的细菌 PFGE 实验结果与全国各地的结果进行比较,根据来自同一亲代的个体具有共同的遗传物质,故可以在 PFGE 实验中表现出相同的指纹图谱这一原理,确定各地致病菌的亲缘关系,追溯共同的致病食品的源头所在^[9-10]。目前美国已应用这种方式成功地查获了多起食源性疾病的源头食品,并通过对生产这些食品的单位进行有效地干预控制^[11],从根本上防止了食源性疾病的发生^[12]。

32 株耐黏菌素大肠杆菌整体上表现出较大的

遗传多样性,但不同菌株存在着不同程度的亲缘关系,其中,带型 5 中菌株 M35 和 2015M31 分别于 2014 年,2015 年分离于许昌,其带型具有较高的同源性,可能是许昌该养殖厂优势流行的菌株,菌株 M20 与 2015M35 分别于 2014 年,2015 年分离于许昌和焦作,其带型间相似性约为 85%。

综上所述,本研究为猪源耐黏菌素大肠杆菌的流行病学提供了一些本底数据,为今后大肠杆菌的监测提供数据参考,为临床筛选安全敏感抗菌药物,初步建立细菌耐药性流行病学调查数据库及疾病流行和暴发过程中的追踪溯源提供参考。

参考文献:

- [1] 曾俊棋,岳万福. 猪源大肠杆菌耐药性与毒力的研究[J]. 现代畜牧兽医, 2016, (1): 38-44.
Zeng J Q, Yue W F. Study on the Resistance and Toxicity of *Escherichia coli* in Swine[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, (1): 38-44.
- [2] 王克领,张青娴,徐引弟,等. 河南地区猪源性大肠杆菌血清型鉴定与耐药性调查[J]. 河南农业科学, 2014, (9): 164-167.
Wang K L, Zhang Q X, Xu Y D, et al. Serotype Identification and Drug Resistance Investigation of Swine *Escherichia coli* in Henan Area[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2014, (9): 164-167.
- [3] 叶蕊,石丽媛,王鹏,等. 脉冲场凝胶电泳技术简介及其在细菌分子分型中的应用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, (2): 182-185.
Ye R, Shi L Y, Wang P, et al. Brief introduction of pulsed-field gel electrophoresis and its application in bacterial molecular typing[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2013, (2): 182-185.
- [4] 张惠媛,汪琦,张昕,等. 进出口食品中单核增生李斯特菌的血清分型与脉冲场凝胶电泳分型分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, (5): 407-411.
Zhang H Y, Wang Q, Zhang X, et al. Analysis on pulsed-field gel electrophoresis and serotyping of *Listeria monocytogenes* isolates from import and export food[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2012, (5): 407-411.
- [5] Johnson A P, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance[J]. J Med Microbiol, 2013,

- 62(Pt4): 499–513.
- [6] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China; a microbiological and molecular biological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2): 161–168.
- [7] Felix B, Danan C, Van Walle I, *et al.* Building a molecular *Listeria monocytogenes* database to centralize and share PFGE typing data from food, environmental and animal strains throughout Europe[J]. *J Microbiol Methods*, 2014, 104: 1–8.
- [8] Magnusson S H, Guethmundsdottir S, Reynisson E, *et al.* Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and *fla*-SVR sequencing[J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 111(4): 971–981.
- [9] 游兴勇,刘成伟,朱应飞,等. 江西省食源性沙门菌血清分型及脉冲场凝胶电泳指纹图谱研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, (6): 528–532.
- You X Y, Liu C W, Zhu Y F, *et al.* Serotyping and PFGE type of *Salmonella* isolates from food in Jiangxi Province[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, (6): 528–532.
- [10] Bakhshi B, Kalantar M, Rastegar-Lari A, *et al.* PFGE genotyping and molecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat[J]. *Iran J Vet Res*, 2016, 17(3): 177–183.
- [11] Lytsy B, Engstrand L, Gustafsson A, *et al.* Time to review the gold standard for genotyping vancomycin-resistant enterococci in epidemiology: Comparing whole-genome sequencing with PFGE and MLST in three suspected outbreaks in Sweden during 2013–2015[J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 54: 74–80.
- [12] Murase T, Nakamura A, Matsushima A, *et al.* An epidemiological study of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): several PFGE patterns observed in isolates from a food poisoning outbreak[J]. *Microbiol Immunol*, 1996, 40(11): 873–875.
- (编辑:侯向辉)