

仔猪腹泻大肠杆菌分离鉴定与 I 类整合子检测

方光远¹, 邵金凤², 王 纾¹, 樊金云¹, 陈俊红¹, 戴鼎震¹

(1. 金陵科技学院动物科学与技术学院, 江苏 南京 210038; 2. 江苏省启东市吕四港镇人民政府, 江苏 启东 226200)

摘 要: 为了分析南京某养猪场仔猪腹泻发病原因, 对腹泻仔猪粪便中分离获得的 10 株细菌进行培养特性观察、染色镜检、生化鉴定、药敏试验和 I 类整合子酶基因片段及耐药基因盒检测。结果表明, 该 10 株细菌均为大肠杆菌, 对头孢哌酮和头孢噻肟全部敏感, 对链霉素、氨苄西林、四环素、氯霉素、多粘菌素 B 和复方新诺明全部耐药, 对诺氟沙星敏感度高低不等; 10 株分离菌均检测出 I 类整合子酶基因片段, 8 株分离菌检测出 4 种 I 类整合子耐药基因盒。试验结果为临床预防和控制仔猪腹泻大肠杆菌病提供了理论依据。

关键词: 仔猪腹泻大肠杆菌; 分离鉴定; 耐药性; I 类整合子

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1672-755X(2019)03-0084-05

Isolation, Identification and Class I Integron Detection of *Escherichia coli* from Piglets with Diarrhea

FANG Guang-yuan¹, SHAO Jin-feng², WANG Shu¹, FAN Jin-yun¹, CHEN Jun-hong¹, DAI Ding-zhen¹

(1. Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China;

2. People's Government of Lyusigang Town, Qidong 226200, China)

Abstract: In order to analyze the cause of diarrhea in piglets in a pig farm in Nanjing, 10 strains bacteria were obtained by collecting the diarrhea piglet feces. The culture characteristics observed, staining microscopy and biochemical identification of 10 strains bacteria were tested. The results showed that 10 strains of isolated bacteria are all *E. coli*. The drug sensitivity test, class I integron enzyme gene fragment and class I integron drug resistance gene cassette of 10 strains of *E. coli* were detected. The results showed that 10 strains of isolated bacteria were all sensitive to cefoperazone and cefotaxime. Streptomycin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, polymyxin B, and sulfamethoxazole are all resistant, and the sensitivity to norfloxacin varies. Class I integrase enzyme gene fragments were all detected in 10 strains bacteria, and 4 class I integron resistance gene cassettes were detected in 8 strains bacteria. The test results provide a theoretical basis for the clinical prevention and control of piglet diarrhea colibacillosis.

Key words: Diarrhea *E. coli* in piglets; isolation and identification; drug resistance; class I integron

仔猪腹泻是仔猪常见临床疾病, 通常由致病性大肠杆菌感染引起。有 3 种临床表现型: 仔猪黄痢(7 d 内发生)、仔猪白痢(10~30 d 发生)和断奶后仔猪水肿病。其中仔猪黄痢和仔猪白痢主要是由产肠毒素大肠杆菌引起, 仔猪黄、白痢发病率有时高达 50%, 病死率达 20%。仔猪水肿病在仔猪断奶后 1~2 周发

收稿日期: 2019-07-28

基金项目: 金陵科技学院校级“创客”虚拟班建设项目(2017ck008); 金陵科技学院大学生创新训练计划项目(201913573019Z)

作者简介: 方光远(1965—), 男, 江苏宿迁人, 副教授, 硕士, 主要从事兽医微生物学和兽医生物制品学研究。

病,急性死亡率几乎为100%,亚急性死亡率为60%~80%,严重地制约着养猪业的发展^[1]。近年来由于抗生素的广泛应用,尤其是不规范的使用,导致细菌的耐药性越来越严重。而整合子作为一种遗传基因,介导了细菌耐药性机制,特别是在革兰氏阴性细菌中,整合子在抗生素耐药性的传播中更为显著^[2]。本试验通过采集南京某猪场的10份腹泻仔猪粪便,通过细菌分离培养获得10株分离菌,经培养特性观察、涂片染色镜检和生化鉴定试验鉴定为仔猪腹泻大肠杆菌。同时为了解仔猪腹泻大肠杆菌中Ⅰ类整合子的存在情况,先进行药敏试验获得分离菌耐药情况,然后通过PCR试验检测其Ⅰ类整合子酶基因和Ⅰ类整合子耐药基因盒存在情况,从而获得仔猪腹泻大肠杆菌耐药性数据,并分析其耐药性与Ⅰ类整合子的关系,为更好地预防和控制仔猪腹泻大肠杆菌病,挑选合理有效的治疗药物提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源 南京某养猪场10份腹泻仔猪粪便。对有临床腹泻病例的新生仔猪,无菌采取10份腹泻仔猪粪便,带回金陵科技学院兽医微生物实验室进行细菌分离培养。

1.1.2 培养基 普通营养琼脂平板、SS琼脂平板,由金陵科技学院兽医微生物实验室自行配制。

1.1.3 试剂 肠杆菌科微量生化鉴定管、药敏纸片(购自杭州滨和微生物试剂有限公司)、2×Taq PCR mix、ddH₂O、TBE缓冲液、Goldview、DL 2000 DNA Marker(购自南京基天生物技术有限公司)。

1.1.4 仪器 2F-401B可见紫外检测仪(上海顾村电光仪器厂)、Labcycler梯度PCR扩增仪(德国圣欧集团)、CX41RF显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌分离培养 将无菌采取的10份仔猪腹泻粪便分区划线接种于普通琼脂平板和SS琼脂平板中,放入恒温培养箱37℃培养24h,观察菌落形态。

1.2.2 分离细菌染色观察 取分离培养的单个细菌菌落在洁净载玻片上涂片固定,革兰氏染色后镜检观察。

1.2.3 分离细菌生化鉴定 将分离培养出的单个细菌菌落纯培养物用接种针接种于肠杆菌科微量生化鉴定管,接种后放置在恒温箱37℃培养24h后取出观察结果。

1.2.4 分离细菌药敏试验 药敏试验采用常规纸片法进行。结果判断参考CLSI/NCCLS M100-S18抗微生物药物敏感性试验执行标准。

1.2.5 Ⅰ类整合子酶基因片段检测试验 根据参考文献^[3]设计了一对扩增Ⅰ型整合子酶基因片段引物。上游引物Int I E-P1:5'-CCT CCC GCA CGA TGA TC-3'。下游引物Int I E-P2:5'-TCC ACG CAT CGT CAG GC-3'。预计扩增出基因片段280 bp。PCR扩增采用25 μL扩增体系。PCR程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,53℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸5 min。PCR扩增产物用加有Goldview 5 μL·(100 mL)⁻¹的1.2%琼脂糖凝胶进行电泳后,在紫外检测仪下进行观察并照相。

1.2.6 Ⅰ类整合子耐药基因盒检测试验 根据参考文献^[3]设计了一对扩增Ⅰ型整合子耐药基因盒引物。上游引物Int I B-F:5'-GGC ATC CAA GCA GCA AG-3'。下游引物Int I B-R:5'-AAG CAG ACT TGA CCT GA-3'。PCR采用30 μL扩增体系。PCR程序为:94℃预变性4 min;94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸3 min,35个循环;72℃延伸10 min。PCR扩增产物观察与上述Ⅰ类整合子酶基因PCR产物观察方法相同。

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养结果

10份仔猪腹泻病料在普通琼脂平板上分区划线培养后,均生长出圆形、隆起、湿润、边缘整齐、表面光滑、直径2~3 mm、无色半透明菌落(图1)。在SS琼脂平板上也均生长出圆形、隆起、湿润、边缘整齐、表面光滑、直径2~3 mm、红色菌落(图2)。

2.2 细菌染色观察结果

10 株分离菌经革兰氏染色镜检均可以看见两端钝圆、散在的革兰氏阴性中等大小杆菌,细菌呈红色,大小约为(2~4) $\mu\text{m}\times(0.4\sim0.7)$ μm ,没有芽孢(图 3)。



图 1 普通营养琼脂上菌落形态

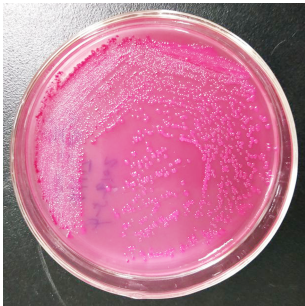


图 2 SS 琼脂上菌落形态



图 3 分离菌镜检结果(1 000 $\times$)

2.3 分离细菌生化鉴定结果

从 10 份仔猪腹泻粪便中分离培养出的 10 株分离菌生化鉴定结果见表 1。根据表 2.2 试验结果,按照肠杆菌科细菌 GYZ-15e 生化鉴定编码册介绍的计算鉴定总值方法,计算每株细菌鉴定总值。10 株分离菌鉴定值分别为 06365、06364、06355、06357、06354、06315、06351、06376、06366、06377,查询肠杆菌科细菌 GYZ-15e 生化鉴定编码册中的检索表,鉴定结果表明 10 株分离菌均为大肠杆菌。

表 1 分离菌生化特性鉴定结果

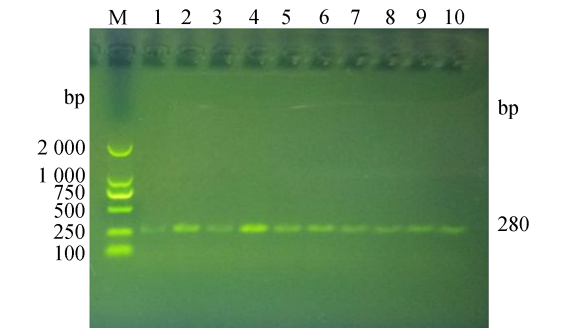
菌株 编号	各项实验分值															鉴定 总值
	硫化 氢	丙苯 氨酸	葡萄糖 酸盐	蛋白 胨水	葡磷 胨水	枸橼 酸盐	尿素 酶	半固体 穿刺	葡萄糖 产气	赖氨 酸	鸟氨 酸	棉子 糖	山梨 醇	侧金盏 花醇	木胶 糖	
1	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	2	0	4	0	1	06365
2	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	2	0	4	0	0	06364
3	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	0	1	4	0	1	06355
4	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	0	1	4	2	1	06357
5	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	2	0	4	0	0	06354
6	0	0	0	4	2	0	0	2	1	0	0	1	4	0	1	06315
7	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	0	0	0	0	1	06351
8	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	2	1	4	2	0	06376
9	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	2	0	4	2	0	06366
10	0	0	0	4	2	0	0	2	1	4	2	1	4	2	1	06377

2.4 分离细菌药敏试验结果

根据表 2 可知,10 株分离菌对头孢类抗生素头孢哌酮、头孢噻肟、头孢曲松、头孢吡肟全部敏感;10 株分离菌对氨基糖苷类抗生素链霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星,青霉素类抗生素氨苄西林,四环素类抗生素四环素、米诺环素,酰胺醇类抗生素氯霉素,多肽类抗生素多粘菌素 B,磺胺类抗菌药物复方新诺明全部耐药;10 株分离菌对氟喹诺酮类抗菌药物诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星敏感度高低不等,大多数菌株耐药,少数敏感。

2.5 分离细菌 I 类整合子酶基因片段检测结果

10 株仔猪腹泻粪便分离菌均扩增出 280 bp I 类整合子酶基因片段,阳性率 100%。PCR 扩增产物电泳结果见图 4。



M:DL2000 DNA Marker; 1~10:仔猪腹泻大肠杆菌分离菌株

图 4 I 类整合子酶基因片段 PCR 产物电泳图谱

表 2 分离菌药敏试验结果											
药名	不同编号菌株的抑菌圈直径/mm										敏感程度
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
氨苄西林	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%R
头孢哌酮	22	21	23	22	21	22	21	22	26	23	100%S
头孢噻肟	29	25	29	28	28	25	26	29	29	30	100%S
头孢曲松	26	26	30	28	26	26	26	27	29	28	100%S
头孢吡肟	25	21	25	25	27	22	23	25	25	24	100%S
头孢西丁	19	15	19	16	16	15	18	19	18	16	50%S,50%I
链霉素	0	9	0	8	0	0	0	0	0	0	100%R
庆大霉素	11	12	11	12	10	11	10	10	11	10	100%R
卡那霉素	12	10	13	13	12	12	11	10	13	13	100%R
阿米卡星	10	11	11	14	7	10	11	10	12	12	100%R
四环素	0	11	0	0	0	0	0	0	8	0	100%R
米诺环素	7	7	9	10	8	11	8	7	10	11	100%R
氯霉素	0	0	0	10	0	0	8	8	11	0	100%R
多粘菌素 B	0	0	8	0	0	0	0	0	8	7	100%R
诺氟沙星	0	10	17	10	0	8	12	0	12	17	20%S,80%R
氧氟沙星	8	8	18	9	8	8	16	8	12	17	30%S,70%R
环丙沙星	0	0	22	12	0	0	0	0	14	15	10%S,90%R
复方新诺明	9	8	0	0	0	0	8	9	0	0	100%R

注:S表示敏感、I表示中介、R表示耐药

2.6 分离细菌 I 类整合子耐药基因盒检测结果

10 株分离菌中有 8 株细菌 PCR 扩增出 I 类整合子耐药基因盒,阳性率 80%。共扩增出 4 种大小不同的耐药基因盒基因片段。PCR 扩增产物电泳结果见图 5。

4 种耐药基因盒基因片段分别约为 200 bp、800 bp、1 800 bp、2 000 bp。其中各菌株耐药基因盒基因片段如下:1 号 200 bp,2 号 1 800 bp,3 号无,4 号 1 800 bp,5 号 200 bp,6 号 800 bp、1 800 bp,7 号 1 800 bp、2 000 bp,8 号 2 000 bp,9 号 200 bp,10 号无。

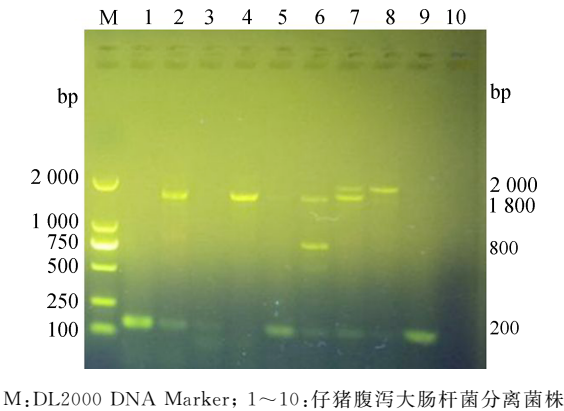
挑选耐药基因盒基因片段清晰的菌株再次进行 I 类整合子耐药基因盒 PCR 扩增,电泳后切取 PCR

扩增产物琼脂糖凝胶进行胶回收纯化后,送南京基天生物技术有限责任公司测序。测序结果在 NCBI 网进行 BLAST 同源性对比,发现 8 种耐药基因,分别是季胺盐复合耐药蛋白酶基因 qacEdelta1(200 bp),氯霉素乙酰转移酶基因 catB3(1 800 bp、2 000 bp),利福平核糖基化转移酶基因 arr-3(1 800 bp),氨基糖苷腺苷转移酶基因 accA4-cr、aadA1、aadA5(800 bp、1 800 bp、2 000 bp),二氢叶酸还原酶基因 dfrA1、dfrA17(1 800 bp、2 000 bp)。上述结果与各菌株药敏试验结果基本一致。没有检测出耐药基因盒的 3 号和 10 号 2 株分离菌,对部分抗菌药物抑菌圈直径大于其它 8 株检测出耐药基因盒的分离菌。

3 结论与讨论

3.1 细菌分离鉴定结果

10 份仔猪腹泻粪便,通过细菌分离培养获得 10 株分离菌,经培养特性观察、涂片染色镜检和生化鉴定试验鉴定结果表明,该 10 株分离菌均为大肠杆菌。上述鉴定结果也与杨海峰等^[4]报道的从江苏泰州地区腹泻仔猪粪便中分离到的大肠杆菌相符合。



M:DL2000 DNA Marker; 1~10:仔猪腹泻大肠杆菌分离菌株
图 5 I 类整合子酶基因盒 PCR 产物电泳图谱

3.2 分离菌耐药情况

近年来各地不同的仔猪腹泻大肠杆菌表现出不同的耐药程度,这可能与目前养殖业普遍的抗生素及抗菌药物不规范使用有关。文彩芳等^[1]对分离的38株仔猪腹泻大肠杆菌进行药敏试验,发现对氨苄西林、林可霉素、四环素和磺胺嘧啶耐药率高达100%、100%、92.11%、89.47%。杨海峰等^[4]从江苏泰州地区分离到的49株仔猪腹泻大肠杆菌对氯霉素、氟苯尼考、氨苄西林、四环素、庆大霉素和恩诺沙星等的耐药率分别达到100%、97.96%、95.92%、89.80%、59.18%和51.02%;对多黏菌素E和头孢噻唑的耐药率也达到44.90%和32.65%。上述结果与本试验中分离到的10株仔猪腹泻大肠杆菌药敏试验结果基本相符合。试验结果表明南京某养猪场的耐药情况十分严重,而头孢类药物则没有发生耐药情况,这可能是因为头孢类药物价格比较昂贵,该猪场平时太过依赖于使用其它价廉常见药物。

3.3 I类整合子与耐药性关系

整合子通常位于可移动遗传基因上,在同种或不同种属细菌间均可传播耐药性,使细菌对抗菌药物呈现耐药^[2],故而近年来备受各地研究者关注。薛原等^[5]从75株猪源大肠杆菌中检出含I类整合子的56株,检出率为74.7%,共检测出5种I类整合子,5种I类整合子中检测出的基因盒主要为dfr17(甲氧苄啶耐药基因)和aadA5(链霉素、大观霉素耐药基因),dfr17编码氨基糖苷转移酶,aadA5编码二氢叶酸还原酶。蒋月等^[6]从82株宠物源(犬、猫)大肠杆菌中检测出60株含I类整合子酶,阳性率73.17%,其中有57株(95%)耐药基因盒阳性,并检测出5种耐药基因盒组合形式:dfrA15、aadA22、dfrA16+aadA2、dfrA17+aadA5、dfrA12+orfF+aadA2。在本试验检测的10株仔猪腹泻大肠杆菌中,10株细菌均检测出I类整合子酶基因片段,有8株细菌检测到4种不同的I类整合子耐药基因盒,为qacEdelta1(200 bp)、accA4-cr+aadA1+aadA5(800 bp)、catB3+arr-3+accA4-cr+aadA1+aadA5+dfrA1+dfrA17(1 800 bp)、catB3+accA4-cr+aadA1+aadA5+dfrA1+dfrA17(2 000 bp),试验结果与上述报道基本符合,8株分离菌含有的耐药基因盒表达的耐药基因与药敏试验结果一致,另2株没有检测到I类整合子耐药基因盒的分离菌对药物的敏感程度高于8株有I类整合子耐药基因盒的分离菌。试验结果说明仔猪腹泻大肠杆菌的I类整合子耐药基因盒的存在确实与细菌耐药性有密切关系,且整合子检测有助于了解细菌耐药基因型,为临床合理用药以期降低耐药性提供了合理可靠的理论依据。

参考文献:

- [1] 文彩芳,郝立新,赵珊,等.四川宜宾地区规模猪场腹泻仔猪大肠杆菌耐药性监测及血清型鉴定[J].养猪,2015(1):113-115
- [2] Michael R G. Integrons: past, present, and future[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2014, 78(2): 257-277
- [3] 刘玉芹,闫平,董淑珍,等.河北部分腹泻仔猪源大肠杆菌整合子-基因盒的分子流行病学调查[J].黑龙江畜牧兽医, 2018(8): 98-100
- [4] 杨海峰,陈晓兰,吴萌,等.仔猪腹泻源大肠杆菌耐药性调查及耐药基因检测[J].畜牧与兽医, 2019, 51(5): 66-69
- [5] 薛原,陈建飞,张秀英,等.猪源多重耐药大肠杆菌中整合子的检测[J].中国兽医学报, 2011, 31(10): 1467-1470
- [6] 蒋月,盛鹏飞.宠物源大肠杆菌耐药性与整合子关系的研究[J].畜牧与兽医, 2013, 45(8): 79-82

(责任编辑:湛江)