

山西部分地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药基因分析

王国艳¹, 范建强², 党文庆¹, 何敏¹, 王志宇¹

(1.山西农业大学动物医学学院龙城校区,山西太原 030032;2.娄烦县万顺源农牧发展有限公司,山西太原 030300)

摘要 [目的]调查山西省某肉牛场犊牛腹泻源大肠杆菌耐药基因的流行情况。[方法]采用 Kirby-Bauer 纸片法和 PCR 法,对分离出的 8 株腹泻大肠杆菌进行了 7 种临床常用药物的药物敏感试验及相关耐药基因的检测。[结果]耐 3 种药物的菌株有 1 株,耐 2 种药物的菌株有 6 株,仅有 1 株菌对 1 种药物耐受;分离的 8 株犊牛源大肠杆菌菌株对四环素、庆大霉素高度耐药,耐药率分别为 100%、87.5%;对氧氟沙星、阿米卡星、卡那霉素敏感性较高。分离的 8 株犊牛源大肠杆菌菌株的 *aph3'-II*、*TetD* 和 *TetB* 基因检出率分别为 75.0%、62.5% 和 37.5%。[结论]该肉牛场犊牛源腹泻大肠杆菌存在一定程度的耐药性。

关键词 大肠杆菌;牛腹泻;耐药基因

中图分类号 S852.61 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)12-0079-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.12.020



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Drug Resistance Gene Analysis of *Escherichia coli* from Diarrhea of Calves in ShanxiWANG Guo-yan¹, FAN Jian-qiang², DANG Wen-qing¹ et al (1. Longcheng Campus, College of Animal Medicine, Shanxi Agricultural University, Taiyuan, Shanxi 030032; 2. Loufan Wanshun Yuan Agriculture and Animal Husbandry Development Co., Ltd., Taiyuan, Shanxi 030300)

Abstract [Objective] In order to investigate the prevalence of drug resistance genes of *Escherichia coli* from diarrhea in calves of a beef cattle farm in Shanxi Province. [Method] 8 strains of *E. coli* isolated by Kirby Bauer method and PCR were tested for drug sensitivity and related drug resistance genes. [Result] The results showed that 1 strain were resistant to 3 drugs, 6 strain were resistant to 2 drugs, and only 1 strain was resistant to 1 drug. Eight strains of *E. coli* isolated from calves were highly resistant to tetracycline gentamicin, and the resistance rates were 100%, 87.5%, respectively. The sensitivity to ofloxacin amikacin kanamycin was higher. The detection rates of *aph3'-II*, *TetD* and *TetB* genes of 8 strains of *E. coli* isolated from calves were 75.0%, 62.5% and 37.5%, respectively. [Conclusion] The study indicates that there was a certain degree of resistance to *E. coli* from calf diarrhea in this cattle farm.

Key words *Escherichia coli*; Cattle diarrhea; Drug resistance genes

犊牛腹泻是一种临床表现以腹泻、脱水、发热、消瘦为主的疾病,没有明显的季节性^[1-3]。该病是由病毒、细菌、寄生虫、营养、环境等众多因素引起^[4-6],而由致病性大肠杆菌混合感染引起的占 90%^[3,7-8]。近几年,山西太原地区肉牛养殖业发展较为迅速,犊牛腹泻越来越引起人们的重视。笔者于 2019—2020 年在养殖场共采集分离出 8 株犊牛腹泻大肠杆菌,并进行了耐药表型及耐药基因的检测,旨在为养殖场犊牛大肠杆菌腹泻的防治提供科学依据。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 菌株来源。于 2019—2020 年共采集山西省太原地区某肉牛场分离的 8 株腹泻大肠杆菌,由山西农业大学龙城校区(原山西省农业科学院畜牧兽医研究所)保存。菌株编号为 1~8 号。

1.1.2 主要试剂。水解酪蛋白琼脂(MH 琼脂)培养基、Mueller-Hinton 肉汤(MH 肉汤)购自青岛宾得生物技术有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2×*Taq* Master Mix、marker、琼脂糖凝胶回收试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;药敏纸片:阿米卡星(10 μg/片)、头孢曲松(30 μg/片)、氧氟沙星(30 μg/片)、诺氟沙星(30 μg/片)、卡那霉素

(30 μg/片)、庆大霉素(10 μg/片)、四环素(30 μg/片),购自北京天坛生物制品有限公司。

1.1.3 引物的设计与合成。参照参考文献[9-11]合成相关引物,包括四环素类耐药基因(*TetA*、*TetB*、*TetD*)、β-内酰胺类耐药基因(*SHV*)、氨基糖苷类耐药基因[*aph3'-II*、*aac(6')-Ib*],引物信息见表 1。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌株复苏。将保存的菌株分别划线接种于 MH 琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基(MAC)、伊红美蓝琼脂培养基(EMB),37℃恒温过夜培养;将 EMB 培养基上生长的单个菌落接种于 MH 营养肉汤中,37℃恒温振荡培养 12~16 h。

1.2.2 药敏试验。参照美国临床实验室标准委员会^[12](NCCLS)推荐的 K-B 纸片扩散法对复苏的 8 株菌株进行药物敏感性试验,并根据临床实验室标准化协会^[13](CLSI)标准判定结果。

1.2.3 大肠杆菌耐药基因的检测。以大肠杆菌细菌基因组 DNA 为模板对分离的 8 株大肠杆菌进行 PCR 检测。PCR 扩增体系(20 μL):2×*Taq* Master Mix 10 μL,上、下引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL,各 PCR 扩增程序见表 2。对 PCR 产物进行电泳分析。

2 结果与分析

2.1 菌株复苏 8 株菌株在 MH 上呈灰白色;在 MAC 上呈砖红色或粉红色菌落,在 EMB 上呈黑绿色金属光泽菌落。

2.2 药敏试验 8 株大肠杆菌的药敏试验结果见表 3、4。由

基金项目 山西省科技厅攻关项目(201803D221025-1);山西省农业科学特色农业技术攻关项目(YGG17092)。

作者简介 王国艳(1982—),女,山西稷山人,副研究员,从事动物疫病防治、细菌耐药性及微生态制剂开发研究。

收稿日期 2021-09-20

表 3、4 可知,四环素的耐药率为 100%;对氧氟沙星、阿米卡星、卡那霉素的高敏率为均 87.5%;经过对这 8 株菌株的耐药谱分析发现,耐 3 种药物的菌株有 1 株,耐 2 种药物的菌株有 6 株,仅有 3 号菌株对 1 种药物耐药,说明该肉牛养殖场腹泻大肠杆菌有严重的多重耐药性。

表 1 耐药基因引物信息

Table 1 Primer information of drug resistance gene

药物种类 Drug type	耐药基因 Drug resistance gene	引物序列 Primer sequence	目的条带大小 Destination stripe size//bp
β-内酰胺类 β-lactams	<i>SHV</i>	5'-ATCGGTATATTTCGCTGTG-3' 5'-CCTCATTGAGTTCGGTTTCC-3'	502
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>aph3'-II</i>	5'-cTGGACTGGGCACAACAGACA-3' 5'-TCAAGAAGCGCATAGAAGGC-3'	717
	<i>acc(6')-Ib</i>	5'-CATGACCTTCCGATGCTCTA-3' 5'-GCTCGAATGCCGTGGCGTGT-3'	490
四环素类 Tetracyclines	<i>TetA</i>	5'-GCTACATCCTGCTTGCCTTC-3' 5'-CATAGATCGCCGTGAAGAGG-3'	210
	<i>TetB</i>	5'-TTGTTAGGGG AAGTTT TG-3' 5'-GTAATGGGCCAATAACACCG-3'	659
	<i>TetD</i>	5'-AAACCATTACGGCATTCTGC-3' 5'-GACCGATACACCATCCATC-3'	787

表 2 PCR 反应条件

Table 2 PCR reaction conditions

基因名称 Gene name	反应条件 Reaction conditions	PCR 产物大小 PCR product size//bp
<i>SHV</i>	95 °C 预变性 5 min, 36 个循环反应(95.0 °C 30 s, 54.0 °C 40 s, 72.0 °C 30 s), 72 °C 保温 3 min	502
<i>aph3'-II</i>	95 °C 预变性 5 min, 36 个循环反应(95.0 °C 30 s, 55.0 °C 40 s, 72.0 °C 35 s), 72 °C 保温 3 min	717
<i>acc(6')-Ib</i>	95 °C 预变性 5 min, 36 个循环反应(95.0 °C 30 s, 55.0 °C 40 s, 72.0 °C 35 s), 72 °C 保温 7 min	490
<i>TetA</i>	95 °C 预变性 5 min, 36 个循环反应(95.0 °C 30 s, 54.0 °C 40 s, 72.0 °C 30 s), 72 °C 保温 3 min	210
<i>TetB</i>	95 °C 预变性 5 min, 36 个循环反应(95.0 °C 30 s, 56.0 °C 40 s, 72.0 °C 40 s), 72 °C 保温 7 min	659
<i>TetD</i>	95 °C 预变性 5 min, 36 个循环反应(95.0 °C 30 s, 55.5 °C 40 s, 72.0 °C 40 s), 72 °C 保温 3 min	787

表 3 药敏试验结果

Table 3 Results of drug sensitivity test

序号 No.	抗生素 Antibiotic	高度敏感株 High sensitivity 株	中度敏感株 Moderate sensitivity//株	耐药株 Resistance 株	高敏率 High sensitivity rate//%	耐药率 Resistance rate//%
1	庆大霉素	0	1	7	0	87.5
2	氧氟沙星	7	1	0	87.5	0
3	卡那霉素	7	1	0	87.5	0
4	阿米卡星	7	1	0	87.5	0
5	头孢曲松	6	1	1	75.0	12.5
6	诺氟沙星	6	2	0	75.0	0
7	四环素	0	0	8	0	100

表 4 大肠杆菌菌株的耐药谱

Table 4 Drug resistance spectrum of *Escherichia coli* strains

菌株号 Strain number	耐药数 Number of drug resistance	耐药谱 Drug resistance spectrum	菌株数 Number of bacteria//株	百分比 Percentage %
5	3	庆大霉素、四环素、头孢曲松	1	12.5
1、2、4、6、7、8	2	庆大霉素、四环素	6	75.0
3	1	四环素	1	12.5

2.3 耐药基因的 PCR 检测结果 该研究选取了 6 种耐药基因,通过 PCR 方法对 8 株分离菌株进行耐药基因检测,结果见图 1。结果表明,8 株菌株分别携带不同的耐药基因,具体

结果见表 5。由表 5 可知,氨基糖苷类 *aph3'-II* 基因的检出率较高,为 75.0%;未检测到 *aac(6')-Ib* 基因。四环素类 *TetD* 基因的检出率为 62.5%;*TetB* 基因的检出率较低,为 37.5%;

未检测到 *TetA* 基因。也未检测到 β -内酰胺类 *SHV* 基因。

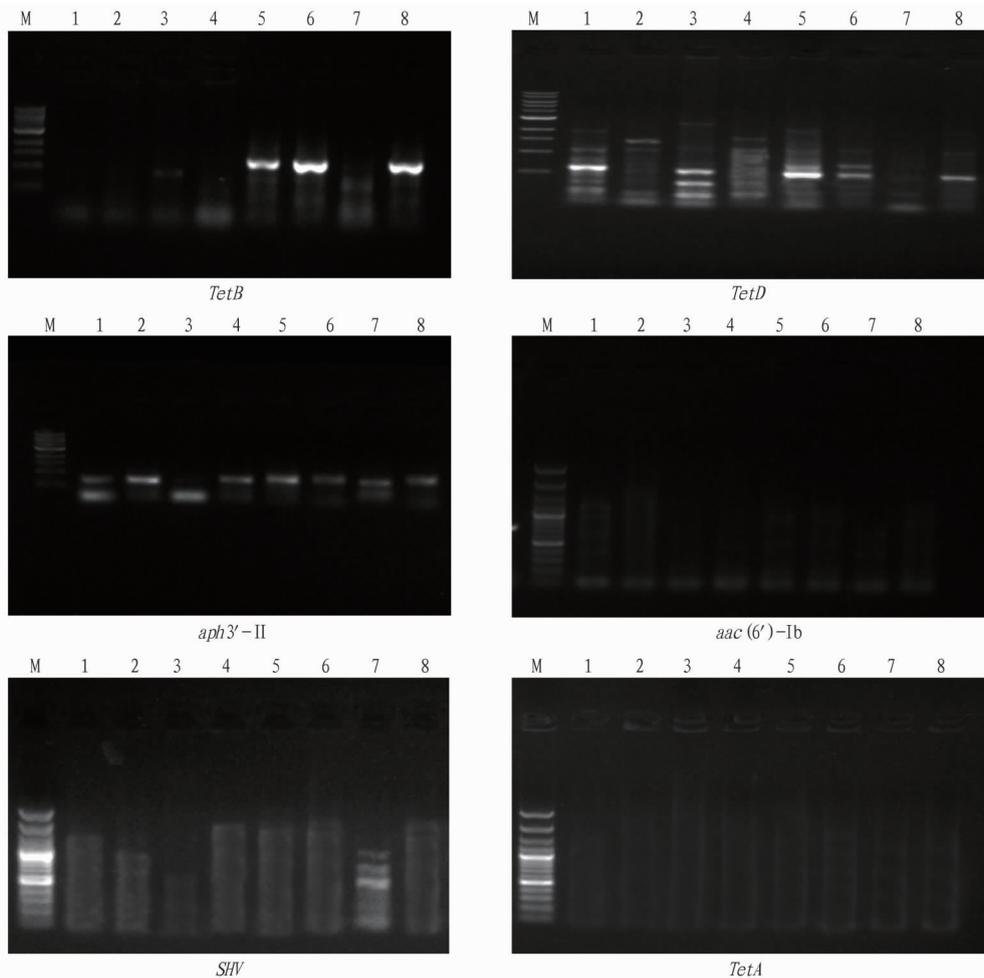


图 1 8 株大肠杆菌 6 种耐药基因电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of 6 drug resistance genes of 8 strains of *Escherichia coli*

表 5 6 种耐药基因检出结果

Table 5 Detection results of 6 drug resistance genes

药物种类 Drug type	耐药基因 Drug resistance gene	阳性菌株数 Number of positive bacteria	检出率 Detection rate//%
β -内酰胺类 β -lactams	<i>SHV</i>	ND	ND
氨基糖苷类 A aminoglycosides	<i>aph3'</i> -II	6	75.0
	<i>acc(6')</i> -Ib	ND	ND
四环素类 Tetracyclines	<i>TetA</i>	ND	ND
	<i>TetB</i>	3	37.5
	<i>TetD</i>	5	62.5

注:ND 表示未检出

Note:ND means not detected

3 小结

随着人们生活水平的不断提高,对牛肉的需求也不断增加,肉牛规模化养殖在不断发展,抗生素被用于预防疾病,提高经济效益的同时,也刺激细菌产生耐药性。细菌耐药性的产生对动物疾病的治疗有很大的影响,对健康养殖危害极大。该研究选取 2019—2020 年从山西省太原地区某肉牛场分离的 8 株牛源腹泻大肠杆菌进行敏感药物筛选试验,其中耐 3 种药物的菌株有 1 株,耐 2 种药物的菌株有 6 株,仅 1 株

菌对 1 种药物耐受;所有菌株对阿米卡星、卡那霉素、氧氟沙星均高度敏感,可以作为该养殖场的优先选择药物。所有菌株对四环素均耐药,对氨基糖苷类药物庆大霉素的耐药率均为 87.5%。李慧等^[14]对宁夏地区 66 株牛源大肠杆菌进行耐药性,检出显示庆大霉素的耐药率为 15.15%;高海慧等^[15]研究表明,宁夏地区 164 株牦牛腹泻源大肠杆菌对头孢唑啉的耐药率达到 95%。这些报道表明,不同地区分离的腹泻大肠杆菌菌株的耐药性不同,山西省太原地区某肉牛养殖场的腹泻大肠杆菌菌株有其耐药表征。

对 6 种耐药基因检测的结果表明,该养殖场分离的腹泻大肠杆菌携带的耐药基因主要是氨基糖苷类 *aph3'*-II 基因,检出率为 75.0%。四环素类 *TetD* 基因,检出率为 62.5%;*TetB* 基因的检出率为 37.5%。吴同垒等^[16]对秦皇岛地区肉牛腹泻大肠杆菌耐药基因的检测结果表明,四环素类 *TetD* 基因检出率较低,为 33.3%,说明不同地区肉牛腹泻大肠杆菌菌株的耐药基因存在不同。

因此,在预防和治疗牦牛腹泻大肠杆菌病时,要定期进行敏感药物筛选试验,为临床上合理用药提供科学指导,避免长期使用同样的药物,探索新的治疗方法。

(下转第 104 页)

向根系分配,使地上部和根系分配的比例发生变化,细根的周转速度加快,根系分泌物增多,导致植物向根系分配的碳增多,从而提高碳素固定量。对桐花树而言,叶的碳储量高于根、茎,其叶片的主要作用是进行光合作用,对环境的变化比较敏感,在短期试验中桐花树叶生物量增加明显。试验表明,CO₂ 摩尔分数升高,短期内会增强红树林生态系统的光合能力,对于植物生长形态以及生理指标的影响在短期内有显著提升效应,有利于红树植物碳汇能力的提升。

通过试验得到红树植物秋茄、桐花树数在 700 μmol/mol CO₂ 情景下碳储量与植物的根、茎变化值,根据试验数据构建碳储量方程,并将海南东寨港实测秋茄、桐花树茎高、基径代入方程,估算出在 700 μmol/mol CO₂ 情景下海南东寨港秋茄、桐花树碳储量分别为 96.61、63.22 t/hm²,表明红树植物秋茄、桐花树在 CO₂ 高摩尔分数下有着较强的固碳潜力,秋茄碳储量显著高于桐花树,可以为全球 CO₂ 摩尔分数不断升高的环境下,东寨港红树林的碳潜力应对气候变化的相关工作提供科学依据与参考^[27-28]。

参考文献

- [1] 赵慧卿,李青玉.2030 年 CO₂ 排放地区分配及对经济增长的影响研究[J].云南财经大学学报,2018,34(11):70-79.
- [2] 潘伟,熊建武.电力消耗、经济增长与 CO₂ 排放量的实证分析:基于中国面板数据[J].中国管理科学,2018,26(3):152-159.
- [3] MUHAMMAD B.Energy consumption,CO₂ emissions and economic growth in developed,emerging and Middle East and North Africa countries[J].Energy,2019,179:232-245.
- [4] LIU X Y,BAE J.Urbanization and industrialization impact of CO₂ emissions in China[J].Journal of cleaner production,2018,172:178-186.
- [5] 江睿,吴云超,陈丕茂.珠江口港澳岛红树林湿地沉积物碳、氮分布研究[J].南方水产科学,2021,17(1):1-9.
- [6] 徐晓然,谢跟踪,邱彭华.1964—2015 年海南省八门湾红树林湿地及其周边土地景观动态分析[J].生态学报,2018,38(20):7458-7468.
- [7] CUI X W,LIANG J,LU W Z,et al.Stronger ecosystem carbon sequestration potential of mangrove wetlands with respect to terrestrial forests in subtropical China[J].Agricultural and forest meteorology,2018,249:71-80.
- [8] 李亚芳,杜飞雁,王亮根,等.基于生物性状分析方法的不同恢复阶段无瓣海桑人工林湿地大型底栖动物生态功能研究[J].南方水产科学,2018,14(3):10-18.

- [9] SAHU S K,KATHIRESAN K.The age and species composition of mangrove forest directly influence the net primary productivity and carbon sequestration potential[J/OL].Biocatalysis and agricultural biotechnology,2019,20 [2021-04-27].https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101235.
- [10] LOVELOCK C E,FOURQUREAN J W,MORRIS J T.Modeled CO₂ emissions from coastal wetland transitions to other land uses:Tidal marshes,mangrove forests,and seagrass beds[J].Frontiers in marine science,2017,4:1-11.
- [11] 王宗林,吴沿友,邢德科,等.泉州湾红树林湿地土壤 CO₂ 通量周期性变化特征[J].应用生态学报,2014,25(9):2563-2568.
- [12] 李翠华,蔡裕硕,颜秀花.2010—2018 年海南东寨港红树林湿地碳收支的变化分析[J].海洋通报,2020,39(4):488-497.
- [13] 高宇.中国典型红树林湿地沉积物碳库分布特征及控制因子研究[D].北京:清华大学,2019.
- [14] 颜葵.海南东寨港红树林湿地碳储量及固碳价值评估[D].海口:海南师范大学,2015.
- [15] 王法明,唐剑武,叶思源,等.中国滨海湿地的蓝色碳汇功能及碳中和对策[J].中国科学院院刊,2021,36(3):241-251.
- [16] 陈顺洋,安文硕,陈彬,等.红树林生态修复固碳效果的主要影响因素分析[J].应用海洋学报,2021,40(1):34-42.
- [17] 张莉,郭志华,李志勇.红树林湿地碳储量及碳汇研究进展[J].应用生态学报,2013,24(4):1153-1159.
- [18] 马欢,秦传新,陈丕茂,等.南海柘林湾海洋牧场生物碳储量研究[J].南方水产科学,2017,13(6):56-64.
- [19] 辛琨,颜葵,李真,等.海南岛红树林湿地土壤有机碳分布规律及影响因素研究[J].土壤学报,2014,51(5):1078-1086.
- [20] 高春,胡杰龙,颜葵,等.海南东寨港红树林土壤二氧化碳和甲烷排放通量研究[J].湿地科学,2017,15(3):351-357.
- [21] 刘琚,张齐生,周培国,等.CO₂ 摩尔分数倍增对秋茄湿地碳、氮循环影响的模拟[J].东北林业大学学报,2017,45(5):80-84.
- [22] 张鑫,邹定辉,徐智广,等.大气 CO₂ 浓度升高和氮加富对羊栖菜生理生化特征的影响[J].南方水产,2007,3(3):35-40.
- [23] 杨玉楠,刘晶,MYAT THIRI.海南东寨港红树林湿地污染监测与评价研究[J].海洋环境科学,2020,39(3):399-406.
- [24] 郑聚锋,潘根兴,程混,等.从《IPCC 2006 国家温室气体排放清单增补:2013 湿地》谈湿地温室气体计量进展及问题[J].地球科学进展,2014,29(10):1120-1125.
- [25] 李森,蔡厚才,陈万东,等.海岸带生态恢复区不同林龄红树林对 CH₄ 和 CO₂ 排放通量的影响[J].生态环境学报,2020,29(12):2414-2422.
- [26] 吴庭天,丁山,陈宗铸,等.基于 LUCC 和景观格局变化的海南东寨港红树林湿地动态研究[J].林业科学研究,2020,33(5):154-162.
- [27] 耿晓东,旭日.梯度增温对青藏高原高寒草甸生态系统碳交换的影响[J].草业科学,2017,34(12):2407-2415.
- [28] 张小明,邹德堂,赵宏伟,等.模拟大气 CO₂ 变化仪器开顶式气室安装与测试[J].黑龙江农业科学,2015(1):156-158.

(上接第 81 页)

参考文献

- [1] 荔霞,王胜义,刘永明,等.犊牛腹泻病及其药物防治研究进展[J].中国畜牧兽医,2010,37(10):161-165.
- [2] 喻华英,周丽婷.致犊牛腹泻埃希氏菌 *eaeA* 基因克隆和序列分析[J].西北农业学报,2013,22(4):1-5.
- [3] 罗甜甜,王仲兵,雷宇平,等.山西省北部地区舍饲犊牛大肠杆菌病主要病原的分离和耐药性调查研究[J].中国动物检疫,2012,29(3):42-44.
- [4] VALAT C,FOREST K,AUVRAY F,et al.Assessment of adhesins as an indicator of pathovar-associated virulence factors in bovine *Escherichia coli* [J].Appl Environ Microbiol,2014,80(23):7230-7234.
- [5] CONSTABLE P D.Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea[J].J Vet Intern Me,2004,18(1):8-17.
- [6] 陆承平.兽医微生物学[M].3版.北京:中国农业出版社,2001.
- [7] PIANCIOLA L,D' ASTEK B A,MAZZEO M,et al.Genetic features of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in Argentina[J].Int J Med Microbiol,2016,306(2):123-130.
- [8] BLOOD D C,HENDERSON J A.Veterinary medicine[M].Baltimore,Maryland:The Williams and Wilkins Company,1960.
- [9] SHAHBAZI S,ASADI KARAM M R,HABIBI M,et al.Distribution of ex-

- tended-spectrum β-lactam,quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Tehran,Iran[J].J Glob Antimicrob Resist,2018,14:118-125.
- [10] 张金宝,马春芳,余婷,等.宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌毒力基因检测和耐药性分析[J].畜牧兽医学报,2016,47(1):177-182.
- [11] 岳山,刘宇,刘通,等.黑龙江某牛场腹泻犊牛大肠杆菌致病株分离鉴定及耐药性和耐药基因检测[J].黑龙江八一农垦大学学报,2016,28(6):79-82.
- [12] SAIDANI M,MESSADI L,SUDANI A,et al.Epidemiology,antimicrobial resistance, and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in clinical bovine mastitis in Tunisia[J].Microb Drug Resist,2018,24(8):1242-1248.
- [13] 刘少昆.京津部分地区犊牛腹泻大肠杆菌分离鉴定及耐药性分析[D].长春:吉林农业大学,2016.
- [14] 李慧,张华雷,齐亚银.石河子地区某规模化牛场致犊牛腹泻的病原分析[J].黑龙江畜牧兽医,2018(23):102-104.
- [15] 高海慧,高小斐,冯卫平,等.宁夏地区犊牛腹泻源大肠杆菌的分离鉴定[J].畜牧与兽医,2019,51(11):114-117.
- [16] 吴同奎,李巧玲,张志强,等.2017—2018 年秦皇岛地区犊牛源腹泻大肠杆菌耐药性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2019(10):100-104.