

# 副猪嗜血杆菌分离株的耐药性及耐药基因分析

忽占利<sup>1,2</sup> 李军星<sup>2</sup> 胡松华<sup>1</sup> 王一成<sup>2</sup> 袁秀芳<sup>2</sup> 徐丽华<sup>2</sup>

(1. 浙江大学 动物科学学院 浙江 杭州 310058; 2. 浙江省农业科学院 畜牧兽医研究所 浙江 杭州 310021)

**摘要:** 为了解浙江省规模化猪场患病猪副猪嗜血杆菌的耐药性,采用 K-B 琼脂法对 73 株 HPS 浙江株进行了 18 种临床药物的敏感性试验,同时应用 PCR 技术对 11 个相关耐药基因进行扩增、测序和比对分析。药敏试验结果显示:对磺胺类耐药的分离株比例高达 86.30%,对四环素类、氨基糖苷类、喹诺酮类、 $\beta$ -内酰胺类和氯霉素类耐药的比例分别为 65.75%、60.27%、50.68%、50.68%、46.58%,对大环内酯类耐药仅为 28.77%。PCR 分析显示:97.26% 的菌株中检测到耐药基因,多重耐药的占 84.93%。其中喹诺酮类耐药基因 *Aac(6)-Ib* 的检出率为 76.71%,氨基糖苷类耐药基因 *AadA1* 的检出率为 65.75%,磺胺类耐药基因 *Sul1* 和 *Sul2* 的检出率为 45.2% 和 10.96%,氯霉素类耐药基因 *Flor*、*CmLA*、*Cat1* 的检出率为 15.07%、8.22%、58.9%,四环素类耐药基因 *TetA* 和 *TetB* 的检出率为 4.11% 和 49.32%, $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *Tem-11* 的检出率为 35.62%,大环内酯类耐药基因 *ErmB* 的检出率为 1.37%。耐药基因型和表型符合率为:磺胺类 62.07%、 $\beta$ -内酰胺类 74.29%、氯霉素类 81.48%、四环素类 75.00%、大环内酯类 0、喹诺酮类 75.68%、氨基糖苷类 72.09%。因此,HPS 在浙江规模化猪场对临床药物已产生了耐药性,通过耐药基因检测结果确定耐药菌株具有一定的参考价值。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; 耐药性; 耐药基因

中图分类号: S432.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)04-0228-06

## Phenotype and Genotype Analysis of Antibiotic Resistance of *Haemophilus parasuis* Isolated from the Scaled Pig Farms in Zhejiang Province

HU Zhan-li<sup>1,2</sup> LI Jun-xing<sup>2</sup> HU Song-hua<sup>1</sup> WANG Yi-cheng<sup>2</sup> YUAN Xiu-fang<sup>2</sup> XU Li-hua<sup>2</sup>

(1. Institute of Animal Science Zhejiang University Hangzhou 310058, China; 2. Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science ZAAS Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** This study was conducted to investigate the resistance to common antibiotics and genes of *Haemophilus parasuis* isolated from the scaled pig farms in Zhejiang province. A total of 73 Zhejiang *H. parasuis* isolates were tested for their resistance to 18 antibiotics by K-B method. PCR was used to detect related genes. The amplified products were sequenced and aligned. The results showed that 86.30% isolates were resistant to sulfonamides, 65.75%, 60.27%, 50.68%, 50.68% and 46.58% isolates were resistant to tetracyclines, aminoglycosides, quinolones,  $\beta$ -lactam antibiotics, chloramphenicols, respectively, while only 28.77% isolates were resistant to macrolides. Resistance genes were detected in 97.26% isolates, and multiple resistance genes were found in 84.93% isolates. The rates of resistance genes *Aac(6)-Ib*, *AadA1*, *Sul1*, *Sul2*, *Flor*, *CmLA*, *Cat1*, *TetA*, *TetB*, *Tem-11* and *ErmB* were 76.71%, 65.75%, 45.2%, 10.96%, 15.07%, 8.22%, 58.9%, 4.11%, 49.32%, 35.62% and 1.37%, respectively. The coincidence of phenotype and genotype for the isolates to resist sulfonamides,  $\beta$ -lactam antibiotics, chloramphenicols, tetracyclines, macrolides, quinolones and aminoglycoside antibiotics were 62.07%, 74.29%, 81.48%, 75.00%, 0, 75.68% and 72.09%, respectively. Therefore, *H. parasuis* has developed resistance to clinically commonly used antibiotics and the results from analysis of drug-resistant gene could be used as reference to determine resistance bacteria.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; Drug resistance; Drug-resistant gene

收稿日期: 2013-03-24

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y3100491)

作者简介: 忽占利(1975-),男,河北石家庄人,硕士,主要从事兽医临床和兽医药理学实践和试验研究。

通讯作者: 胡松华(1958-),男,浙江衢州人,教授,博士生导师,主要从事中药免疫学研究。

王一成(1957-),男,浙江温岭人,研究员,硕士生导师,主要从事猪病防控研究。

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪 Glasser's 病的病原,引起猪多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎等<sup>[1]</sup>,是目前影响浙江省养猪业最严重的细菌病之一。副猪嗜血杆菌在环境中普遍存在,健康的猪群当中也能发现。当猪感染其他病原时(如猪繁殖和呼吸道综合症、圆环病毒病、猪瘟、流感)易继发本病,从2周龄的仔猪到4月龄的育肥猪均可感染,此病常见于5~8周龄的保育猪,发病率为10%~15%,严重感染死亡率可达50%<sup>[2]</sup>。

虽然疫苗免疫是当前防治 HPS 有效的方法之一,鉴于 HPS 血清型众多、毒株间致病力的差异性大、对 HPS 保护性抗原和毒力因子研究不足,疫苗免疫的效果并不理想。然而副猪嗜血杆菌病用抗生素进行治疗有较好的效果,如果流行很严重,抗生素治疗效果不佳,会造成耐药菌株的产生。随着抗菌药物的广泛使用, HPS 耐药率及其 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub> 在总体上均呈现出升高的趋势。一直对 HPS 高度敏感的药物也显示出敏感性降低的迹象<sup>[3]</sup>。

许多研究认为,细菌的耐药性与其携带的耐药基因密切相关,有关 HPS 耐药基因方面的研究报道较少,已报道的副猪嗜血杆菌的耐药基因有四环素耐药基因(*TetB*), $\beta$ -内酰胺类耐药基因 *bla<sub>ROB</sub>* 及林可霉素类耐药基因 *Inu( C)*<sup>[4]</sup>。为了解浙江省规模化养猪场 HPS 的耐药情况,本研究采用 K-B 琼脂法

和聚合酶链反应(PCR)扩增技术对来自浙江省规模化猪场患病猪的73个HPS分离株进行了耐药表型和基因型分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

本试验检测的73株HPS,是从2009年9月29日至2012年4月30日,由浙江省农科院畜牧所猪病组从浙江省规模化猪场采集HPS病猪的肺脏、脾脏、心脏、胸腔液、腹腔液、关节液,通过接种TSA平板,分离、纯化、PCR鉴定,并由浙江省农科院畜牧所猪病组实验室保存。

### 1.2 主要试剂

犊牛血清购自杭州四季青有限公司;2.5%烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)由上海生工生物工程技术服务有限公司;Taq DNA聚合酶、dNTP购自上海生物工程有限公司,1 000 bp DNA Marker 购自宝生物(大连)有限公司。

七大类18种抗生素标准药敏纸片,15种自杭州天和微生物有限公司购置,3种(30  $\mu$ g/片氟苯尼考、30  $\mu$ g/片头孢噻唑、300  $\mu$ g/片磺胺六甲氧)药敏片由浙江省农科院畜牧所猪病组实验室制作,原料由广州天王动物保健公司提供。

表1 引物序列及相关信息

Tab.1 Primer sequences and relative information

抗生素类别 Antibiotic category	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	基因长度/bp Gene length	ID
磺胺类 Sulfanilamides	<i>Sul1</i>	5'-GTGACGGTGTTCGGCATTCT-3'	779	3399458
		5'-TCCGAGAAGGTGATTGCGCT-3'		
	<i>Sul2</i>	5'-TTCGGCATCGTCAACATAACCT-3'	727	7324562
$\beta$ -内酰胺类 $\beta$ -lactam		5'-CGTGTGTGCGGATGAAGTCAG-3'		
	<i>Tem-11</i>	5'-AGGAAGAGTATGATTCAACA-3'	535	7003432
		5'-CTCGTCGTTTGCTATGGC-3'		
氯霉素类 Chloramphenicols	<i>Flor</i>	5'-GGCTTTCGTCATTGCCGTCTC-3'	679	4929479
		5'-ATCGGTAGGATGAAGGTGAGGA-3'		
	<i>CmLA</i>	5'-TGCCAGCAGTGCCGTTTAT-3'	900	6106479
		5'-CACCGCCCAAGCAGAAGTA-3'		
四环素类 Tetracyclines	<i>Cat1</i>	5'-TTTATCCGGCCTTTATTACATTTC-3'	388	AY617066
		5'-ACCACCTTGTCGCCTTGC-3'		
	<i>TetB</i>	5'-TGGTTAGGGGCAAGTTTGG-3'	640	3267155
		5'-GAGCATTGGTAAGGCTC-3'		
	<i>TetA</i>	5'-GCTACATCCTGCTTGCCCTTG-3'	210	X61367
大环内酯类 Macrolides		5'-CATAGATCGCCGTGAAGAGG-3'		
	<i>ErmB</i>	5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3'	616	9988306
喹诺酮类 Quinolones		5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'		
	<i>Aac(6')-Ib</i>	5'-TATGAGTGGCTAAATCGA-3'	394	1238789
氨基糖苷类 Aminoglycoside		5'-CCCCTTCTCTCGTAGCA-3'		
	<i>AadA1</i>	5'-TTTGCTGTTACGGTGAC-3'	497	4290806
		5'-GCTCCATTGCCAGTCG-3'		

### 1.3 药敏试验

药敏试验采用 Kirby-Bauer( K-B) 纸片扩散法。具体方法及判定标准参见( 美国临床实验室标准委员会 NCCLS) ( 2005) 标准。依据 NCCLS 标准, 区分敏感、中介、耐药。所用抗生素包括磺胺六甲氧嘧啶( Sulfamonomethoxine)、复方新诺明( Cotrimoxazole)、头孢拉定( Cefradine)、青霉素( Penicillin)、阿莫西林( Amoxicillin)、头孢噻吩( Cefthiofur)、强力霉素( Doxycycline)、四环素( Tetracycline)、氯霉素( Chloromycetin)、氟苯尼考( Florfenicol)、阿奇霉素( Azithromycin)、红霉素( Erythromycin)、氧氟沙星( Ofloxacin)、恩诺沙星( Enrofloxacin)、环丙沙星( Ciprofloxacin)、卡那霉素( Kanamycin)、链霉素( Streptomycin)、壮观霉素( Spectinomycin)。

### 1.4 耐药基因的检测

采用聚合酶链反应( PCR) 扩增技术对 73 株 HPS 进行 11 种耐药基因的检测。由北京六合华大基因科技股份有限公司杭州分部完成 *SulI*、*Sul2*<sup>[5]</sup>、*Tem-1*<sup>[6]</sup>、*Flor*、*CmLA*<sup>[7]</sup>、*CatI*<sup>[8]</sup>、*TetA*<sup>[9]</sup>、*TetB*<sup>[4]</sup>、*ErmB*<sup>[10]</sup>、*Aac( 6')-Ib*<sup>[11]</sup>、*AadAI*<sup>[12]</sup> 耐药基因引物的合成, 引物序列和扩增长度( 表 1)。煮沸法提取 HPS 浙江株的 DNA 模板, PCR 技术进行扩增( 25  $\mu$ L 反应体系), 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s 56  $^{\circ}$ C 退火 45 s 72  $^{\circ}$ C 1 min 延伸 31 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 12  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物在 1.5% 的凝胶中电泳, 电泳条件为: 电压 110 V 电泳

时间 30 min, 电泳结束后用凝胶成像仪成像分析。

PCR 扩增产物通过 PMD18-T 连接到感受态上, 再进行 PCR 扩增, 回收目的条带, 送至上海生物工程有限公司进行序列测定, 并与 GenBank 中的相应耐药基因序列进行 BLAST 比对, 吻合率达 99% 以上的确定为阳性对照( 图 1)。

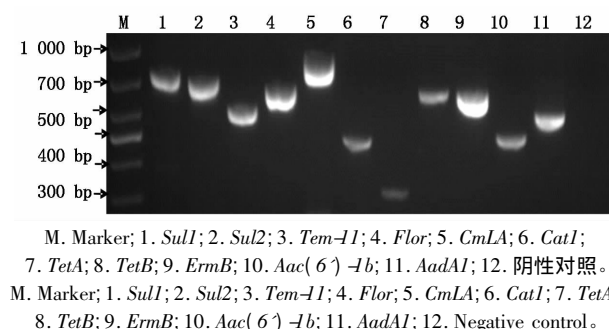


图 1 目的基因电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of the amplified antimicrobial resistance genes

## 2 结果与分析

### 2.1 73 株 HPS 药敏试验结果

参照 NCCLS 手册( 2005 版) 标准判定药敏试验结果, 发现 HPS 浙江株对不同药物的敏感性存在差异。HPS 浙江株对磺胺六甲氧嘧啶、复方新诺明、四环素、恩诺沙星、链霉素敏感性较低; 对头孢拉定、头孢噻吩、强力霉素、氯霉素、阿奇霉素、青霉素敏感性较高( 表 2)。

表 2 HPS 浙江株的药物敏感性分析

Tab. 2 Analysis of drug sensitivity in HPS Zhejiang isolate

药敏片 Drug sensitive slips	敏感/% Sensitive	耐药/% Resistance	药敏片 Drug sensitive slips	敏感/% Sensitive	耐药/% Resistance
头孢拉定 Cefradine	60. 27	34. 25	红霉素 Erythromycin	46. 58	26. 03
头孢噻吩钠 Cefthiofur	63. 01	35. 62	阿奇霉素 Azithromycin	64. 38	20. 55
青霉素 Penicillin	58. 90	39. 73	氧氟沙星 Ofloxacin	54. 79	36. 99
阿莫西林 Amoxicillin	32. 88	47. 95	环丙沙星 Ciprofloxacin	31. 51	38. 36
磺胺六甲氧嘧啶 Sulfamonomethoxine	12. 33	82. 19	恩诺沙星 Enrofloxacin	10. 96	67. 12
复方新诺明 Cotrimoxazole	15. 07	82. 19	卡那霉素 Kanamycin	34. 25	38. 36
强力霉素 Doxycycline	83. 56	12. 33	链霉素 Streptomycin	24. 66	58. 90
四环素 Tetracycline	24. 66	75. 34	壮观霉素 Spectinomycin	45. 20	39. 73
氟苯尼考 Florfenicol	56. 16	32. 88	氯霉素 Chloromycetin	80. 82	10. 96

此外, HPS 浙江株存在严重的多重耐药性, 89. 04% 的菌株对 2 种或 2 种以上的药物具有耐药性( 表 3)。从时间段上分析, 随时间的变化 HPS 浙江株的耐药性也表现不同( 图 2), HPS 浙江株对  $\beta$ -内酰胺类、氯霉素类的耐药性有明显的下降趋势, 对磺胺类药物的耐药性一直维持较高水平。

### 2.2 HPS 浙江株耐药基因检测结果

通过采用聚合酶链反应( PCR) 扩增技术对 73

株 HPS 浙江株进行 11 种耐药基因的检测, 发现 97. 26% 的菌株检测到耐药基因的存在。其中 *CatI*、*Aac( 6')-Ib*、*AadAI* 耐药基因的检出率均在 50% 以上, *CmLA*、*TetA*、*ErmB* 耐药基因的检出率在 10% 以下。携带不同药物类型耐药基因的检出率显示: 含氯霉素类、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药基因菌株的检出率均高于 60%, 四环素类、磺胺类的耐药基因的检出率在 50% 左右, 说明该菌具备了对这几

类药物较高的耐药性或者具备了对这几类药物很高的潜在耐药性。 $\beta$ -内酰胺耐药基因的检出率也高达 35.62% ,说明该菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素也具有或潜在具有了较高的耐药性。大环内酯类的耐药基因

的检出率很低 ,说明该菌产生 *ErmB* 的条件可能不成熟( 表 4) 。其中 ,有 84.93% 的菌株携带多重耐药基因( 表 5) 。上述结果表明 ,HPS 浙江株的基本耐药和多重耐药情况相当严重。

表 3 HPS 浙江 73 株多重耐药分析

Tab.3 Analysis of HPS multi-resistance rate									
多重耐药 Multi-resistance	0 种	1 种	2 种	3 种	4 种	5 种	6 种	7 种	8 种
耐药菌株 Resistant strains	3	5	3	9	3	6	2	6	4
百分率/% Percentage	4.11	6.85	4.11	12.33	4.11	8.22	2.74	8.22	5.48
多重耐药 Multi-resistance	9 种	10 种	11 种	12 种	13 种	14 种	15 种	16 种	17 种
耐药菌株 Resistant strains	5	6	6	2	2	2	4	3	2
百分率/% Percentage	6.85	8.22	8.22	2.74	2.74	2.74	5.48	4.11	2.74

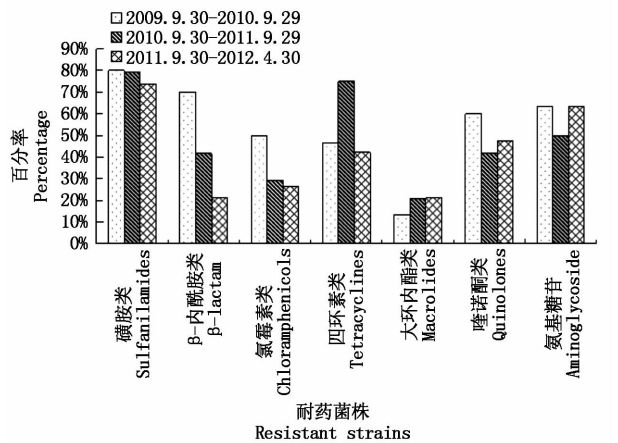


图 2 不同时期的 HPS 浙江株的耐药率

Fig.2 HPS antimicrobial resistance rate in different period

将 73 株 HPS 浙江株按采集的时间分成 3 个阶段 ,结果显示 ,HPS 浙江株对耐  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类药物耐药基因的检出率有下降趋势 ,对

耐氯霉素类耐药基因的检出率逐渐上升 ,对耐大环内酯类药物耐药基因检出率非常低 ,对耐四环素类、喹诺酮类耐药基因检出率是中间突出两端低的变化趋势( 图 3) 。

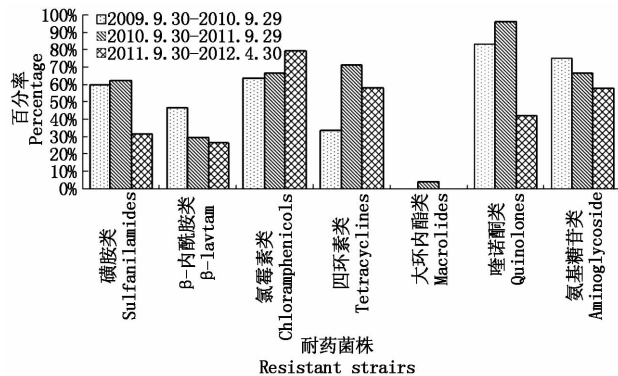


图 3 不同时期的 HPS 浙江株耐药基因的检出率

Fig.3 HPS resistance genes rate in different period

表 4 阳性菌株检出率

Tab.4 Results of HPS resistant genes detected by multiplex PCR					
抗生素 Antibiotics	耐药基因 Resistant genes	阳性菌株 Positive strain	百分比/% Percentage	阳性菌株总和 Positive strain	百分比总和/% Percentage
磺胺类 Sulfanilamides	<i>Sul1</i>	33	45.20	39	53.42
	<i>Sul2</i>	8	10.96		
$\beta$ -内酰胺类 $\beta$ -lactam	<i>Tem-11</i>	26	35.62	26	35.62
氯霉素类 Chloramphenicols	<i>Flor</i>	11	15.07	50	68.49
	<i>CmLA</i>	6	8.22		
	<i>Cat1</i>	43	58.90		
四环素类 Tetracyclines	<i>TetA</i>	3	4.11	38	52.05
	<i>TetB</i>	36	49.32		
大环内酯类 Macrolides	<i>ErmB</i>	1	1.37	1	1.37
喹诺酮类 Quinolones	<i>Aac(6')-Ib</i>	56	76.71	56	76.71
氨基糖苷类 Aminoglycoside	<i>AadA1</i>	48	65.75	48	65.75

表 5 HPS 浙江株携带多重耐药基因的检出率

Tab.5 Results of HPS multiresistance genes detected by multiplex PCR								
耐药基因/个 Resistance genes	0	1	2	3	4	5	6	7
阳性菌株/株 Positive strain	2	9	7	13	14	19	6	3
百分比/% Percentage	2.74	12.33	9.59	17.81	19.18	26.03	8.22	4.11

2.3 药敏试验与耐药基因检测结果的对比分析

73 株 HPS 浙江株中表现出耐药的菌株中不能

完全检测出对应耐药基因的存在 ,其中检测到磺胺类、 $\beta$ -内酰胺类、氯霉素类、四环素类、喹诺酮类、氨

基糖苷类耐药基因菌株的耐药表型符合率在 60% 以上,而检测到大环内酯类耐药基因菌株的表型符合率为零(表 6)。

表 6 耐药基因型和表型符合率

Tab. 6 The coincidence rate of resistant genotype and phenotype

抗生素 Antibiotics	磺胺类 Sulfanilamides	$\beta$ -内酰胺类 $\beta$ -lactam	氯霉素类 Chloramphenicols	四环素类 Tetracyclines	大环内酯类 Macrolides	喹诺酮类 Quinolones	氨基糖苷类 Aminoglycoside
耐药菌株 Resistance strain	58	35	27	40	17	37	43
含耐药基因菌株 Strain carrying resistance gene	36	26	22	30	0	28	31
表型符合率/% Phenotypic coincidence rate	62.07	74.29	81.48	75.00	0	75.68	72.09

### 3 结论与讨论

本试验检测了 73 株 HPS 浙江株对 18 种药物的敏感性,较系统地建立 HPS 浙江株耐药图谱。结果显示,部分药物对 HPS 浙江株敏感,为浙江省规模化猪场选择用药提供了依据。华中农大检测 2007-2008 年从全国筛选的 110 株 HPS 中有 91.8% 对 1 种以上药物耐药<sup>[3]</sup>,本次监测发现, HPS 浙江株存在普遍的耐药性,95.98% 的菌株对 1 种以上的药物表现耐药;在 HPS 多重耐药方面,国外报道 30 株 HPS 西班牙测试菌株中有 20 株(66.7%)能耐受 3 种或 3 种以上的药物<sup>[13]</sup>,本次试验有 84.93% 的 HPS 浙江株对 3 种以上药物具有耐受性。试验结果还显示, HPS 浙江株对  $\beta$ -内酰胺类、氯霉素类的耐药性存在下降的趋势,可能与近年来农业部加大对养殖业禁止使用头孢类和氯霉素的检查力度有关。对大环内酯类药物的耐药性上升的原因,可能跟替米考星和克拉霉素的广泛应用有一定关系。对磺胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药性没有趋势性的变化且维持较高水平,可能与这三类药物为养殖上的主要用药有关。对四环素类的耐药性先升高后降低,可能与该类药物的使用有关。以上结果说明:如果长期降低某类药物的使用, HPS 对该类药物的耐药性有显著降低,如果长期使用某种药物, HPS 对该类药物的耐药性会维持较高的水平,因此,为降低细菌的耐药性,维护食品安全,应严格控制抗生素的使用。

在革兰氏阴性肠道菌中,共有 3 种对磺胺类药物具有抗性的二氢叶酸合成酶,其编码基因分别被命名为 *Sul1*、*Sul2* 和 *Sul3*<sup>[14]</sup>。对 HPS 浙江株中磺胺类耐药基因 *Sul1* 的检出率(45.20%)高于 *Sul2* 的检出率(8%),且耐药表型符合率为 62.07%,说明 *Sul1* 是影响猪源 HPS 浙江株产生对磺胺类药物耐药的主要基因。

产生  $\beta$ -内酰胺酶是细菌(尤其是革兰阴性菌)耐药最常见的机制,约占总耐药机制的 80%<sup>[15]</sup>,目

前编码  $\beta$ -内酰胺酶的基因分为 *Shv*、*Tet*、*Ctx2m*、*Oxa* 及其他等 5 种基因型<sup>[16]</sup>,我国主要流行的  $\beta$ -内酰胺酶的基因主要为 *Tem*、*Shv*、*Ctx2M*。携带 *Tem* 的菌株主要耐头孢他啶、头孢泊肟、头孢噻吩等,其耐药表型和耐药基因型的符合率较高为 91.0%<sup>[17]</sup>。本试验对 *Tem-11* 的检出率为 43.46%,表型符合率为 74.29%,说明 *Tem-11* 是 HPS 对  $\beta$ -内酰胺酶产生耐药的主要耐药基因。

细菌对氯霉素类药物中氯霉素和甲砒霉素产生耐药性的机制已较为清楚:机制一是通过 *Cat* 基因调控合成乙酰化转移酶使药物转化为无抗菌活性的代谢产物;机制二是通过 *CmLA* 基因调控菌体的泵出机制使药物在菌体内聚集减少。在 1996 年,日本的 Kim 等首次从鱼的巴氏杆菌质粒中发现耐氟苯尼考的基因并克隆测序将其命名为 *pp-flor*,随后, Bolton 等相继从沙门氏菌、大肠杆菌等病原菌中克隆得到耐氟苯尼考的耐药基因 *Flor*<sup>[18]</sup>。这 3 种耐药基因在 HPS 浙江株中均能检测到, *Cat1* 的检出率(58.90%)高于 *Flor*(15.07%)和 *CmLA*(8.225%),耐药表型的符合率达 70%,说明 *Cat1* 是 HPS 浙江株的主要耐药基因。

药物导出泵机制是将进入细胞内的四环素由导出泵排出细胞外,四环素类药物排出泵机制相关的耐药基因包括: *TetA*、*TetB*、*TetC*、*TetD*、*TetE*、*TetG*、*TetH*、*TetI*、*TetJ*、*TetZ*、*Tet30*、*Tet31*、*TetK*、*TetL*、*OtrB*、*Tcr3*、*TetPA*、*TetV* 和 *TetY* 等<sup>[19]</sup>。对猪体内细菌及肠道菌而言,其决定导出泵的耐药性基因以 *TetB* 为主<sup>[20]</sup>。2011 年,宋德平等<sup>[4]</sup>报道 *TetB* 是介导 HPS 对四环素耐药的主要因素之一。本试验检测到四环素耐药基因 *TetB* 的检出率达(41.89%)高于 *TetA*(4.11%),且耐药表型的符合率高达 80.56%,进一步验证了 *TetB* 是介导 HPS 对四环素耐药的主要因素之一。

氨基糖苷类药物耐药机制有 3 种,分别是降低药物吸收或降低药物在细胞膜的通透性;改变核糖体的结合位点;产生药物功能基团灭活酶。第 3 种

是氨基糖苷类药物耐药的普遍机制,细菌能够产生 50 多种分别编码乙酰转移酶、腺苷转移酶和磷酸转移酶的基因。其中 *AadAI* (65.89%) 基因在猪大肠杆菌中检出最多<sup>[21]</sup>。本试验对 *AadAI* 的检出率为 56.08% 表型符合率为 66.67%,说明 *AadAI* 是 HPS 浙江株对氨基糖苷产生耐药性的主要耐药基因。

细菌对喹诺酮类药物的耐药机制主要是染色体介导的靶位改变、膜通透性改变和主动外排。近年来,质粒介导的喹诺酮类药物 (Plasmid mediated quinolone resistance, PMQR) 耐药基因 *QnrA*、*QnrB*、*QnrS* 相继出现, *Aac*(6)-Ib 和 *QepA* 这 2 种质粒介导的耐药基因也被证实<sup>[22]</sup>。本试验对 *Aac*(6)-Ib 的检出率为 76.71%,且表型符合率为 75.68%,说明 *Aac*(6)-Ib 是 HPS 浙江株对喹诺酮类产生耐药性的主要耐药基因。

对耐大环内酯类耐药基因 *ErmB* 的检出率为 2.03% 表型符合率为 0,说明 HPS 浙江株已经存在耐大环内酯类药物的耐药基因,但是 *ErmB* 不是 HPS 对大环内酯类的主要耐药基因。

结果显示,有部分菌株检测到耐药基因,而不表现耐药性,说明虽然菌株存在耐药基因,而耐药表现的条件不充分,表现为基因沉默。而有的菌株药敏试验发现耐药,但没有检测到耐药基因,说明该菌株的耐药性不是该基因决定的,还有其他未检测的耐药基因存在。现阶段通过检测细菌耐药基因来指导用药的方法有多通路耐药基因芯片,该芯片能检测 2 000 多个耐药基因,但是该方法在国内畜牧业中应用还不成熟,成本很高,不具有实际实用意义。

HPS 浙江株对临床药物产生了较普遍的耐药性,对比药敏试验和耐药基因的检测结果,磺胺类、 $\beta$ -内酰胺类、氯霉素类、四环素类、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药基因型与耐药表型符合率在 60% 以上,说明通过耐药基因检测结果确定耐药菌株具有一定的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis epidemiology and control [J]. *Vet Microbiol*, 2004, 99(1): 1-12.
- [2] 中国兽医学会. 2010 年执业兽医资格考试应试指南 (上) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 644-646.
- [3] 周学利. 副猪嗜血杆菌分离株的血清分型及其耐药性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [4] 宋德平, 肖根辉, 王萍, 等. 副猪嗜血杆菌江西分离株药物敏感性及四环素耐药基因 *tet*(B) 分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(10): 785-789.
- [5] 刘开成, 郑增忍, 单虎, 等. 不同地区猪源大肠埃希

- 菌磺胺类药物耐药性研究 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32(4): 76-79.
- [6] 齐亚银, 张莉, 王静梅, 等. 动物源粪肠球菌对 7 种抗生素耐药表型及耐药基因检测 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(30): 962-965.
- [7] 杨鑫, 王红宁, 张安云, 等. 大肠杆菌氯霉素类耐药基因三重 PCR 检测试剂盒的研究与应用 [J]. *中国兽医杂志*, 2009, 2(45): 11-13.
- [8] 廖成水, 程相朝, 张春杰, 等. 鸡源致病性沙门氏菌新近分离株的耐药性与耐药基因 [J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(07): 751-755.
- [9] 张纯萍, 宁宜宝, 宋立. 健康鸡猪体内大肠杆菌对四环素的耐药性及耐药基因分布 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(12): 2578-2583.
- [10] 徐丽慧, 王贤军, 王敏敏, 等. 肺炎链球菌大环内酯类药物耐药性及耐药基因 *erm*、*erf* 的检测 [J]. *中国学术期刊电子出版社*, 1994-2011: 313-317.
- [11] 张烽, 潘宇红. 1 株携带多种喹诺酮类药物耐药机制肺炎克雷伯菌的发现 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(17): 2553-2555.
- [12] 马孟根, 王红宁, 余勇, 等. 大肠埃希氏菌和沙门菌氨基糖苷耐药基因 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科技*, 2005, 35(4): 277-283.
- [13] De la Fuente A J, Tucker A W, Nacas J. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain [J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 120: 184-191.
- [14] 周万蓉, 王红宁, 张安云, 等. 猪和野生动物源大肠杆菌及沙门菌中磺胺类药物耐药基因的检测 [J]. *中国兽医科学*, 2007, 37(4): 287-290.
- [15] Jacoby G A, Archer G L. New mechanism of bacterial resistance to antimicrobial agents [J]. *New England journal medicine*, 2004, 324: 601-605.
- [16] Bradford P A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, Epidemiology and detection of this important resistance threat [J]. *Clinical Microbiol Rev*, 2001, 14: 933-951.
- [17] 叶满玉, 王红宁, 田国宝, 等. 猪鸡致病性大肠杆菌沙门氏菌对  $\beta$ -内酰胺类药耐药表型和基因检测 [J]. *中国兽医杂志*, 2010, 46(3): 15-18.
- [18] 杜向党, 阎若潜, 沈建忠. 氯霉素类药物耐药机制的研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2004, 25(2): 27-29.
- [19] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65(2): 232.
- [20] Lee C, Langlois B E, Dawson K A. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from tree herds with different histories of antimicrobial agent exposure [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(5): 1467.
- [21] 汤景元, 王红宁, 张鹏举, 等. 95 个猪场大肠杆菌耐药表型及氨基糖苷类药物耐药基因型调查 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(4): 472-477.
- [22] 黄彬, 陈茶, 汤晓丽, 等. 肺炎克雷伯菌对喹诺酮类及氨基糖苷类耐药基因检测及耐药机制分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(1): 5-7.