

# 广东地区副猪嗜血杆菌的耐药表型和基因及其进化分析

万锈琳<sup>1</sup>, 李春玲<sup>2</sup>, 刘宗保<sup>3</sup>, 王国霞<sup>1</sup>, 闫鹤<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东广州 510640) (3. 深圳大学高等研究院, 广东深圳 518060)

**摘要:** 本研究探讨了广东地区副猪嗜血杆菌的亲缘关系、药物敏感性及其耐药基因的携带情况, 对分离自广东不同区域的 53 株副猪嗜血杆菌进行了 16S rRNA 进化分析, 使用 K-B 琼脂扩散法针对 21 种抗菌药物进行敏感性检测, 并通过全基因组测序分析其耐药基因携带情况。结果表明, 菌株对苯唑西林、复方新诺明、链霉素和四环素耐药率较高, 且多重耐药菌株占比较高 (84.91%)。通过与耐药基因数据库对比共检测到 21 种耐药基因, 介导 9 大类抗生素的耐药, 其中春日霉素耐药基因 *ksgA* 和杆菌肽耐药基因 *bacA* 首次在副猪嗜血杆菌被发现。氨基糖苷类和林可霉素类耐药基因携带情况与耐药表型之间符合率可达 100%。16S rRNA 分析结果显示, 不同区域来源的副猪嗜血杆菌亲缘关系较近, 且耐药基因携带情况与 16S rRNA 进化关系以及分离时间存在一定的关联性。本研究结果可对广东地区养猪业副猪嗜血杆菌疾病的防御和治疗起到指导作用。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; 进化分析; 药敏试验; 全基因组测序; 耐药基因

文章编号: 1673-9078(2020)08-23-30

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.1021

## Evolutionary Analysis of *Glaesserella parasuis*-resistant Phenotypes and Drug Resistance Genes in Guangdong

WAN Xiu-lin<sup>1</sup>, LI Chun-ling<sup>2</sup>, LIU Zong-bao<sup>3</sup>, WANG Guo-xia<sup>1</sup>, YAN He<sup>1</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

(3. Institute for Advanced Study, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

**Abstract:** In this study, the genetic relationship, drug sensitivity, and drug resistance genes carried by *Glaesserella parasuis* in Guangdong province were investigated. The evolution of 16S rRNA of the 53 *Glaesserella parasuis* strains isolated from different regions in Guangdong was analysed, and their susceptibility to 21 antibacterial drugs was analyzed using the K-B disc diffusion method and the carried drug resistance genes were analyzed using the whole genome sequencing (WGS). Results showed that the strains had high drug resistance rates to oxacillin, trimethoprim-sulfamet, streptomycin and tetracycline, and the multi-drug resistant strains accounted for a relatively high rate (84.91%). A comparison with the drug resistance gene database revealed 21 drug resistance genes that mediate resistance to 9 major classes of antibiotics, among which kasugamycin-resistant gene, *ksgA*, and bacitracin-resistant gene, *bacA*, were detected for the first time. The coincidence rate between the aminoglycoside and lincomycin resistance genes and the resistance phenotypes reached 100%. The 16S rRNA gene analysis a close genetic relationship between the *Glaesserella parasuis* strains from different regions, and a correlation between to the carried drug-resistant genes and the 16S rRNA evolution and isolation time. The results of this study can be used to guide the prevention and treatment of *Glaesserella*

引文格式:

万锈琳,李春玲,刘宗保,等.广东地区副猪嗜血杆菌的耐药表型和基因及其进化分析[J].现代食品科技,2020,36(8):23-30

WAN Xiu-lin, LI Chun-ling, LIU Zong-bao, et al. Evolutionary analysis of *Glaesserella parasuis*-resistant phenotypes and drug resistance genes in Guangdong [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 23-30

收稿日期: 2019-10-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31571934; 31772776)

作者简介: 万锈琳 (1995-), 女, 在读研究生, 研究方向: 病原微生物

通讯作者: 李春玲 (1965-), 研究员, 研究方向: 动物微生物与免疫学; 共同通讯作者: 闫鹤 (1972-), 女, 副研究员, 研究方向: 食品微生物

*parasuis* diseases in Guangdong.

**Key words:** *Glaesserella parasuis*; evolutionary analysis; drug sensitivity test; whole genome sequencing; drug resistance gene

副猪嗜血杆菌 (*Glaesserella parasuis*) 是一种革兰氏阴性巴斯德氏菌属 (*Pasteurella*) 的细菌, 是定植于健康仔猪上呼吸道的一种常在菌, 但同时也是猪革拉泽氏病 (Glasser's disease) 的病原体<sup>[1,2]</sup>。随着规模养猪业的发展, 副猪嗜血杆菌病的发病率和死亡率呈上升趋势, 这已经对养猪业造成了很大的经济损失<sup>[3,4]</sup>。另一方面, 该细菌在环境中普遍存在, 流行于我国各地, 因此该病菌感染成为危害养猪业发展的呼吸系统性疾病之一<sup>[5,6]</sup>。抗生素治疗作为预防和控制这种感染的主要手段, 但抗生素的滥用, 甚至被作为猪的促生长剂而长期大量使用, 致使各类抗生素耐药细菌普遍存在于养殖环境中<sup>[7,8]</sup>。在中国, 副猪嗜血杆菌对抗生素的耐药率逐步上升, 导致治疗选择抗生素上受到限制<sup>[9]</sup>。此外, 该菌常呈现多重耐药表型, 给临床治疗带来了更大的挑战。

副猪嗜血杆菌的多重耐药表现通常与其同时携带多种耐药基因有关<sup>[10-15]</sup>。通过使用传统的 PCR 方法, 已在此类细菌中检测出了多种耐药基因, 如 *tetB*、*bla<sub>ROB-1</sub>*、*aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id*、*floR*、*sul1* 和 *sul2* 等<sup>[11,16-18]</sup>。近年来, 随着高通量测序技术的发展, 全基因组测序 (Whole Genome Sequencing, WGS) 和比较基因组分析已被证明是预测菌株潜在耐药遗传特性的有力工具。相较于传统的 PCR 方法, 由于不依赖引物, WGS 可以更全面的揭示细菌所携带的耐药基因。目前, 国内外已有研究者通过 WGS 方法研究副猪嗜血杆菌的耐药基因携带情况<sup>[19,20]</sup>。

鉴于目前对广东地区副猪嗜血杆菌整体耐药情况与进化之间的关系尚缺乏了解。因此本研究旨在以基因组学大数据为依托, 深入解析了耐药基因在副猪嗜血杆菌间的传播网络和规律; 进一步通过菌株亲缘关系分析, 揭示菌株耐药与遗传进化关系的相关性, 为副猪嗜血杆菌的临床治疗和防控提供科学的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

53 株副猪嗜血杆菌分离自 2007-2017 年广东省的 12 个地级市 (云浮、阳江、肇庆、惠州、韶关、河源、汕头、广州、江门、佛山、东莞、清远) 的猪场, 包括肺部、脾脏、血液、脑、气管等组织, 对其编号为 GZH1~GZH53。药物敏感质控菌株为大肠埃希菌

(*Escherichia coli*) ATCC 25922。

### 1.2 培养基和主要试剂

胰蛋白大豆琼脂 (Trypticsoy Agar, TSA)、胰蛋白大豆肉汤 (Trypticsoy Broth, TSB), 广州环凯微生物科技有限公司; 新鲜牛血清, 杭州四季青材料有限公司产品, 使用前经 56 °C 灭活 30 min; 辅酶 I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, NAD), 大连美仑生物技术有限公司产品; 抗生素药敏片, 杭州微生物试剂有限公司; *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL)、琼脂糖, 日本 TaKaRa 公司; 引物, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒, 2×*Taq* PCR Mix, Marker DL2000, 北京博迈德生物技术有限公司; 核酸染料, 上海捷瑞生物工程有限公司。

### 1.3 16S rRNA 基因 PCR 扩增与序列分析

利用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取细菌 DNA。采用 16S rRNA 基因通用全长引物, 引物序列为 127F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')。预期目的片段为 1465 bp。PCR 反应体系及条件参考文献<sup>[21]</sup>。将 PCR 扩增产物委托上海美吉生物医药科技有限公司测序, 然后将得到的 16S rDNA 序列提交到 NCBI 核酸数据库中进行 BLAST 在线分析。利用 MEGA7 软件计算序列碱基组成, 用 Kitumra-2-Parameter-Distance 双参数模型计算遗传距离, 利用 Neighbor-Joining tree (NJ) 法构建系统发育树 (1000 bootstraps), 分析 53 株菌的进化关系。

### 1.4 药物敏感性试验

按照美国临床实验室标准研究所 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的嗜血杆菌属药敏试验抗生素选择原则<sup>[22]</sup>, 结合临床用药和研究需要, 对 53 株副猪嗜血杆菌进行 21 种 9 大类抗菌药物敏感试验。其中, β-内酰胺类药敏纸片 5 种: 头孢唑啉 (CZ, 30 μg)、头孢三嗪 (CRO)、头孢拉定 (RAD, 30 μg)、苯唑西林 (OXA, 1 μg)、阿莫西林 (AMX, 10 μg); 氨基糖苷类药敏纸片 3 种: 卡那霉素 (KAN, 30 μg)、链霉素 (STR, 10 μg)、庆大霉素 (GEN, 10 μg); 四环素类药敏纸片 2 种: 四环素 (TET, 30 μg)、强力霉素 (DX, 30 μg); 喹诺酮类药敏纸片 2 种: 环丙沙星 (CIP, 5 μg)、氧氟沙星 (OFX, 5 μg); 氯霉

素类药敏纸片 2 种: 氟苯尼考 (F, 30  $\mu\text{g}$ )、氯霉素 (CHL, 30  $\mu\text{g}$ ); 大环内酯类药敏纸片 4 种: 阿齐霉素 (AZI, 15  $\mu\text{g}$ )、红霉素 (ERY, 15  $\mu\text{g}$ )、罗红霉素 (RO, 15  $\mu\text{g}$ )、乙酰螺旋霉素 (ASP, 30  $\mu\text{g}$ ); 磺胺类、多粘菌素类及林可霉素类药敏纸片各 1 种, 分别为: 复方新诺明 (SXT, 1.25/23.75  $\mu\text{g}$ )、多粘菌素 B (P, 300  $\mu\text{g}$ )、林可霉素 (CLI, 2  $\mu\text{g}$ )。将副猪嗜血杆菌分离株接种于液体培养基震荡培养至菌液 OD<sub>625 nm</sub> 值在 0.08~0.13 (0.5 麦氏浊度) 时进行药敏试验, 药敏试验参考文献采用琼脂扩散法 (K-B 法) 测定抑菌圈直径<sup>[23]</sup>, 计算副猪嗜血杆菌对不同抗菌药物的耐药率。

### 1.5 全基因组测序与抗性基因注释

53 株副猪嗜血杆菌委托深圳华大基因股份有限公司进行全基因组测序, 测序使用 Illumina HiSeq 4000 平台进行, 将测序所得 raw reads 序列利用 SOAP de novov 1.05 软件进行拼接组装, 并通过 PGAP (Prokaryotic genome annotation pipeline) 进行基因预测与功能注释。采用 Glimmer 3.02 软件进行开放阅读

框 (Open reading frame, ORF) 预测, 将所有预测蛋白序列与 NR(非冗余蛋白数据库)、Swiss-Prot 数据库、eggNOG (Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups) 和抗性基因 ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database) 数据库进行 BLASTp ( $E < 1e^{-10}$ ) 比对, 根据注释结果, 选取被注释为具有介导耐药功能的蛋白序列, 认定其为抗性基因。

### 1.6 耐药基因型与耐药表型符合率统计

对 1.4 得到的抗生素敏感性检测结果与 1.5 得到的耐药基因型预测结果对比统计, 分析副猪嗜血杆菌分离株耐药表型与耐药基因型的相关性。耐药基因型与耐药表型符合率计算公式为: 呈现出对某种抗生素耐药表型且含有相应耐药基因的菌株数/含有抗该种抗生素耐药基因的菌株数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 副猪嗜血杆菌对 21 种抗生素的药敏情况

表 1 53 株副猪嗜血杆菌对抗生素的耐药情况/株 (%)

Table 1 Results of antimicrobial susceptibility test for the 53 isolates of *Glaesserella parasuis*

药物种类	抗生素	耐药	中介	敏感
$\beta$ -内酰胺类 50(94.34)	头孢唑啉	2 (3.77)	3 (5.66)	48 (90.57)
	头孢三嗪	9 (16.98)	0 (0)	44 (83.02)
	头孢拉定	8 (15.09)	7 (13.21)	38 (71.7)
	苯唑西林	50 (94.34)	0 (0.00)	3 (5.66)
	阿莫西林	15 (28.30)	1 (1.89)	37 (69.81)
氨基糖苷类 35(66.04)	卡那霉素	16 (30.19)	8 (15.09)	29 (54.72)
	链霉素	34 (64.15)	5 (9.43)	14 (26.42)
	庆大霉素	6 (11.32)	1 (1.89)	46 (86.79)
四环素类 31(58.49)	四环素	30 (56.60)	5 (9.43)	18 (33.96)
	强力霉素	10 (18.87)	2 (3.77)	41 (77.36)
喹诺酮类 31(58.49)	氧氟沙星	11 (20.75)	5 (9.43)	37 (69.81)
	环丙沙星	22 (41.51)	0 (0.00)	31 (58.49)
多粘菌素类 9(16.98)	多粘菌素	9 (16.98)	1 (1.89)	43 (81.13)
氯霉素类 14(26.42)	氟苯尼考	11 (20.75)	4 (7.55)	38 (71.70)
	氯霉素	7 (13.21)	1 (1.89)	45 (84.91)
磺胺类 40(75.47)	复方新诺明	40 (75.47)	1 (1.89)	12 (22.64)
	阿奇霉素	8 (15.09)	0 (0.00)	45 (84.91)
大环内酯类 30(56.60)	红霉素	5 (9.43)	26 (49.06)	22 (41.51)
	罗红霉素	14 (26.42)	16 (30.19)	23 (43.40)
	乙酰螺旋霉素	29 (54.72)	21 (39.62)	3 (5.66)
林可霉素类 29(54.72)	林可霉素	29 (54.72)	14 (26.42)	10 (18.87)

用 K-B 法测定 53 株副猪嗜血杆菌对 21 种抗生素的耐药情况见表 1。检测出除 GMH1 之外的其他 52 株副猪嗜血杆菌至少对 1 种抗菌药物耐受, 对  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、喹诺酮类、多粘菌素类、氯霉素类、磺胺类、大环内酯类及林可霉素类药物耐药率分别为 94.34%、66.04%、58.49%、58.49%、16.98%、26.42%、75.47%、56.60%、54.72%。其中对头孢唑啉、头孢三嗪、头孢拉定、庆大霉素、强力霉素、多粘菌素、氯霉素、阿奇霉素及红霉素的耐药水平较低。此外, 对  $\beta$ -内酰胺类药物阿莫西林、林可霉素类药物林可霉素、氨基糖苷类药物卡那霉素、喹诺酮类药物氧氟沙星和环丙沙星、氯霉素类药物氟苯尼考及大环内酯类药物罗红霉素和乙酰螺旋霉素呈现一定水平的耐药。在众多兽药抗生素中, 四环素是最早用于临床治疗副猪嗜血杆菌病的主要药物, 对四环素耐药现象也已被广泛的发现<sup>[17,24]</sup>。本试验对四环素类药物的耐药率为 58.49%, 明显高于杨守深等<sup>[25]</sup>和徐成刚等<sup>[16]</sup>的研究结果, 却又明显低于胡军勇等<sup>[26]</sup>和陆国林等<sup>[27]</sup>的研究结果, 耐药率分别高达 78.3%和 96.2%。对四环素类耐药率存在明显的地域性差异, 且在同一省市耐药性也出现明显差异, 这可能跟不同猪场的用药背景有较大关系。目前, 青霉素和氨基糖苷类药物被用作治疗副猪嗜血杆菌感染的常用治疗药物, 临床上也已发现大量对  $\beta$ -内酰胺和氨基糖苷类药物耐受的副猪嗜血杆菌<sup>[11,17,18,28]</sup>。本实验对  $\beta$ -内酰胺类药物苯唑西林的耐药率最高, 有 50 株 (94.34%), 其次对氨基糖苷类药物链霉素耐药率达到 64.15%, 均具有较高的耐药水平。2018 年魏海林等<sup>[29]</sup>对四川省分离得到的 97 株副猪嗜血杆菌的  $\beta$ -内酰胺类药物药敏特性及质粒介导耐药基因进行研究, 发现分离株对  $\beta$ -内酰胺类抗生素严重耐药且存在严重的多重耐药情况, 耐药基因的携带率较高, 但 2009 年, 张盼锋等<sup>[30]</sup>对广东省地区的 3 株副猪嗜血杆菌病原的药敏试验结果表明对  $\beta$ -内酰胺类药物较为敏感, 对链霉素不敏感, 这可能与近几年  $\beta$ -内酰胺类药物的大量使用导致对该类抗生素耐药率升高或者地区差异有关。本研究中, 11 株分离于 2008 年的菌株, 1 株分离于 2009 年的菌株均呈现出对  $\beta$ -内酰胺类药物耐药, 由此推测可能是由于不同猪场抗生素使用情况不同导致的结果差异。徐成刚等<sup>[16]</sup>的研究表明华南地区副猪嗜血杆菌对氨基糖苷类有较强得耐药性。同样, 本研究所测试的 53 株菌对氨基糖苷类药物耐药率达到 66.04%。针对磺胺类药物, 徐成刚等<sup>[16]</sup>的研究表明副猪嗜血杆菌对磺胺类药物的耐药率最高, 这与本研究结果总的耐药率高达 75.47%相一致。

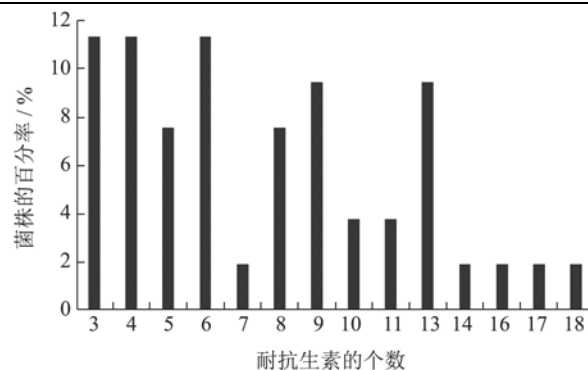


图1 副猪嗜血杆菌的多重耐药情况

Fig.1 The multi-resistance of *G. parasuis* isolates

从 53 株副猪嗜血杆菌的多重耐药(包括耐不同种类的药物, 以及耐同类药物中的不同药物)分析结果可以看出(图 1), 84.91% (45/53) 株菌呈现出多重耐药, 其中主要以 3 重、4 重和 6 重耐药为主, 占比均为 11.32%。仅有一株菌 GMH1 表现出全敏感。这与 2018 年魏海林等<sup>[29]</sup>发现分离株存在严重的多重耐药情况相一致。这一结果充分表明广东地区的副猪嗜血杆菌耐药性情况严重, 其防控形势比较严峻。

## 2.2 耐药基因预测结果

53 株副猪嗜血杆菌经 WGS 检测, 共发现 21 种耐药基因(表 2)。3 种  $\beta$ -内酰胺类耐药基因中, 53 株 (100%) 均携带 *pbp1a* 和 *pbp3a*, 9 株 (16.98%) 同时携带超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (extended spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs) 耐药基因 *bla<sub>ROB-1</sub>*; 4 种氨基糖苷类耐药基因中, 以 *ant(3'')-Ia* (14 株, 26.42%)、*aph(3'')-Ib* (11 株, 20.75%) 和 *aph(6)-Id* (9 株, 16.98%) 为主, 其中 9 株 (16.98%) 同时携带这三者, 4 株 (7.55%) 同时携带四者; 磺胺类耐药基因有 3 种, 主要基因 *sul2* 和 *dfxA3* 分别有 53 株 (100%) 和 52 株 (98.11%) 细菌携带, 有 3 株 (5.66%) 同时携带 *sul1*; 5 种四环素耐药基因中, 18 株 (30.19%) 携带 *tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetH* 和 *tetR*, 且有 16 株同时携带 *tetB* 和 *tetR*, 其中有两株同时携带 *tetC* 和 *tetD*, 且另有两株菌同时携带 *tetH*, 1 株同时携带 *tetH* 和 *tetR*, 其余菌株携带其中一种; 氯霉素耐药基因共 2 种, 各有 4 株 (7.55%) 携带 *catA7* 和 *floR*; 另外在 53 株菌中均检测到春日霉素耐药基因, 50 株菌(除 GMH53、GMH10、GMH7) 均检测到杆菌肽耐药基因, 部分菌株中还检测到氟喹诺酮和林可霉素耐药基因(表 2)。

传统针对耐药基因的检测一般针对药敏表型, 选取相对应的耐药基因, 采用 PCR 方法进行检测。徐成刚等<sup>[16]</sup>对 130 株华南地区副猪嗜血杆菌进行四环素耐药基因携带情况的检测, 发现 *tetB* 基因在耐四环素的

副猪嗜血杆菌中广泛存在。2018年 Yongda Zhao 等<sup>[18]</sup>研究也发现 *tetB* 基因广泛存在于副猪嗜血杆菌中。应用全基因组测序和与耐药基因数据库同源比对的方法,本研究除了检测出 *tetB* 基因,同时还发现了大量的 *tetR* 基因以及少量 *tetC*、*tetD* 和 *tetH* 基因的存在,其中大多数菌株同时携带多种该类型基因。2018年 Yongda Zhao 等<sup>[18]</sup>研究表明副猪嗜血杆菌对喹诺酮类抗生素的抗性较低且验证得出是由于 *gyrA* 和 *parC* 突变导致喹诺酮耐药,并检测得到氯霉素耐药基因 *floR* 在副猪中广泛存在。本研究中预测得到一种喹诺酮类抗性基因 *norA* (3.77%) 及 2 种氯霉素抗性基因 *floR* (9.43%) 和 *catA7* (7.55%)。由此可以推断对喹诺酮药物的耐药性研究应着眼于 *gyrA* 和 *parC* 突变。针对氯霉素类耐药性研究,表型和基因型符合率达到 88.89%,因此可以通过监测 *floR* 和 *catA7* 基因对临床用药进行预判。磺胺类药物也是一种常用的兽用抗生素, Yongda Zhao 等<sup>[18]</sup>研究检测到两种磺胺类耐药基因 *sul1* 和 *sul2*,本研究除发现这两种基因外还揭示出 *dfrA3* 基因,且该种基因在 53 株菌种高频率出现,占比达到 98.11%。此外,本研究中,还检测到 2 种在副猪嗜血杆菌未曾被发现的抗性基因,糖肽类抗性基因 *bacA* 及春日霉素抗性基因 *ksgA*。针对这两种抗生素可展开进一步的检测分析。通过本研究表明通过 WGS 及生物信息学分析可以很好的弥补传统分析方法不全面、不稳定的缺陷,对临床用药具有指导和借鉴作用。

质粒作为介导抗性基因转移的重要媒介被广泛研究。2005年 John F. Lancashire 等<sup>[7]</sup>在副猪嗜血杆菌中发现携带 *tetB* 基因的质粒。同样,有研究表明在副猪嗜血杆菌中发现的 *bla<sub>ROB-1</sub>* 也与质粒相关<sup>[11,18]</sup>。2015年 Beibei Li 等<sup>[31]</sup>和 2018年 J.S.Zhang 等<sup>[32]</sup>分别在副猪嗜血杆菌中发现携带 *floR* 基因的质粒。在本研究中,这三类耐药基因均有被发现。最新研究结果表明,位于质粒上的耐药基因在介导细菌耐药时要远比位于染色体上的基因更为活跃<sup>[33]</sup>,因此,副猪嗜血杆菌出现较高的对四环素、 $\beta$ -内酰胺和氯霉素耐药可能主要由携带 *tetB*、*bla<sub>ROB-1</sub>* 和 *floR* 基因的质粒介导。这一研究结果提醒我们在分析副猪嗜血杆菌耐药时应格外注意此类基因。2010年 Liping Chen 等<sup>[34]</sup>在副猪嗜血杆菌种发现一个质粒携带林可霉素类耐药基因 *lunC*。除此之外,目前尚未有其他报道该基因在副猪嗜血杆菌中出现。得益于全基因组测序方法的应用,在本研究中,在 3 株菌株的基因组中发现了 *lunC* 基因。由此推测这 3 株菌表现出对林可霉素的耐药有可能是由携带该基因的质粒介导。

表 2 53 株副猪嗜血杆菌携带耐药基因型/株 (%)

Table 2 Results of resistance gene detection for the 53 isolates of

<i>Glaesserella parasuis</i>		
耐药基因类型	携带耐药基因型	菌株构成比
$\beta$ -内酰胺类 53 (100)	<i>bla<sub>ROB-1</sub></i>	9 (16.98)
	<i>pbp1a</i>	53 (100)
	<i>pbp3a</i>	53 (100)
氨基糖苷类 16 (30.19)	<i>aac(6)-Ie</i>	5 (9.43)
	<i>ant(3'')-Ia</i>	14 (26.42)
	<i>aph(3'')-Ib</i>	11 (20.75)
四环素类 18 (33.96)	<i>aph(6)-Id</i>	9 (16.98)
	<i>tetB</i>	16 (30.19)
	<i>tetC</i>	2 (3.77)
	<i>tetD</i>	2 (3.77)
糖肽类 50 (94.34)	<i>tetH</i>	3 (5.66)
	<i>tetR</i>	18 (33.96)
	<i>bacA</i>	50 (94.34)
氯霉素类 9 (16.98)	<i>catA7</i>	4 (7.55)
	<i>floR</i>	5 (9.43)
氟喹诺酮类 2 (3.77)	<i>norA</i>	2 (3.77)
春日霉素 53 (100)	<i>ksgA</i>	53 (100)
林可霉素 3 (5.66)	<i>lunC</i>	3 (5.66)
	<i>sul1</i>	3 (5.66)
磺胺类 53 (100)	<i>sul2</i>	53 (100)
	<i>dfrA3</i>	52 (98.11)

## 2.3 耐药表型与耐药基因型符合率

53 株菌均检测出  $\beta$ -内酰胺和磺胺类耐药基因,但有 3 株菌呈现对  $\beta$ -内酰胺类药物敏感,符合率达到 94.34% (50/53),40 株菌呈现对磺胺类药物耐药,符合率达到 75.47% (40/53)。18 株菌检测出四环素类耐药基因,但有 31 株菌呈现对四环素类药物耐药,符合率达到 88.89% (16/18)。16 株菌检测出氨基糖苷类耐药基因,但有 35 株菌呈现对氨基糖苷类药物耐药,符合率达到 100% (16/16)。9 株菌检测出氯霉素类耐药基因,但有 14 株菌呈现对氯霉素类药物耐药,符合率达到 88.89% (8/9)。2 株菌检测出喹诺酮类耐药基因,但有 31 株菌呈现对喹诺酮类药物耐药,符合率达到 50% (1/2)。3 株菌检测出林可霉素类耐药基因,但有 29 株菌呈现对林可霉素类药物耐药,符合率达到 100% (3/3)。但并未预测到大环内酯类耐药基因。

## 2.4 16S rRNA 系统发育树与耐药情况的关系

分离菌株经 PCR 扩增及电泳后,检测其扩增条带

大小约 1500 bp, 与预期大小片段一致。根据 53 株副猪嗜血杆菌 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA7 中 Kitumra 双参数模型计算遗传距离, 计算结果表明 53 株副猪嗜血杆菌遗传距离介于 0.00~0.17, 且大部分小于 0.10, 属于种内差异。

53 株副猪嗜血杆菌之间的遗传进化树关系(图 2)表明, 11 种不同血清学型的 53 菌株分为 12 个进化谱系, 其中, 3 株血清型分别为 12、4 和 2 型的菌株位于同一个分支, 且分离自不同时间与地区, 与其他菌株的进化距离较远。观察进化树可知, 进化关系的远

近与分离时间、分离地点、分离组织无较大关系, 由此可以推测广东不同地区来源的副猪嗜血杆菌亲缘关系较近。

目前, 基于 16S rRNA 构建系统进化树分析菌株同源性及亲缘关系的方法已较为普遍, 但对于副猪嗜血杆菌主要是研究血清型与进化之间的关系, 尚未将菌株的耐药情况与进化关系相结合进行研究。本研究将耐药表型和基因型与 16S rRNA 进化关系相对应(图 2)。

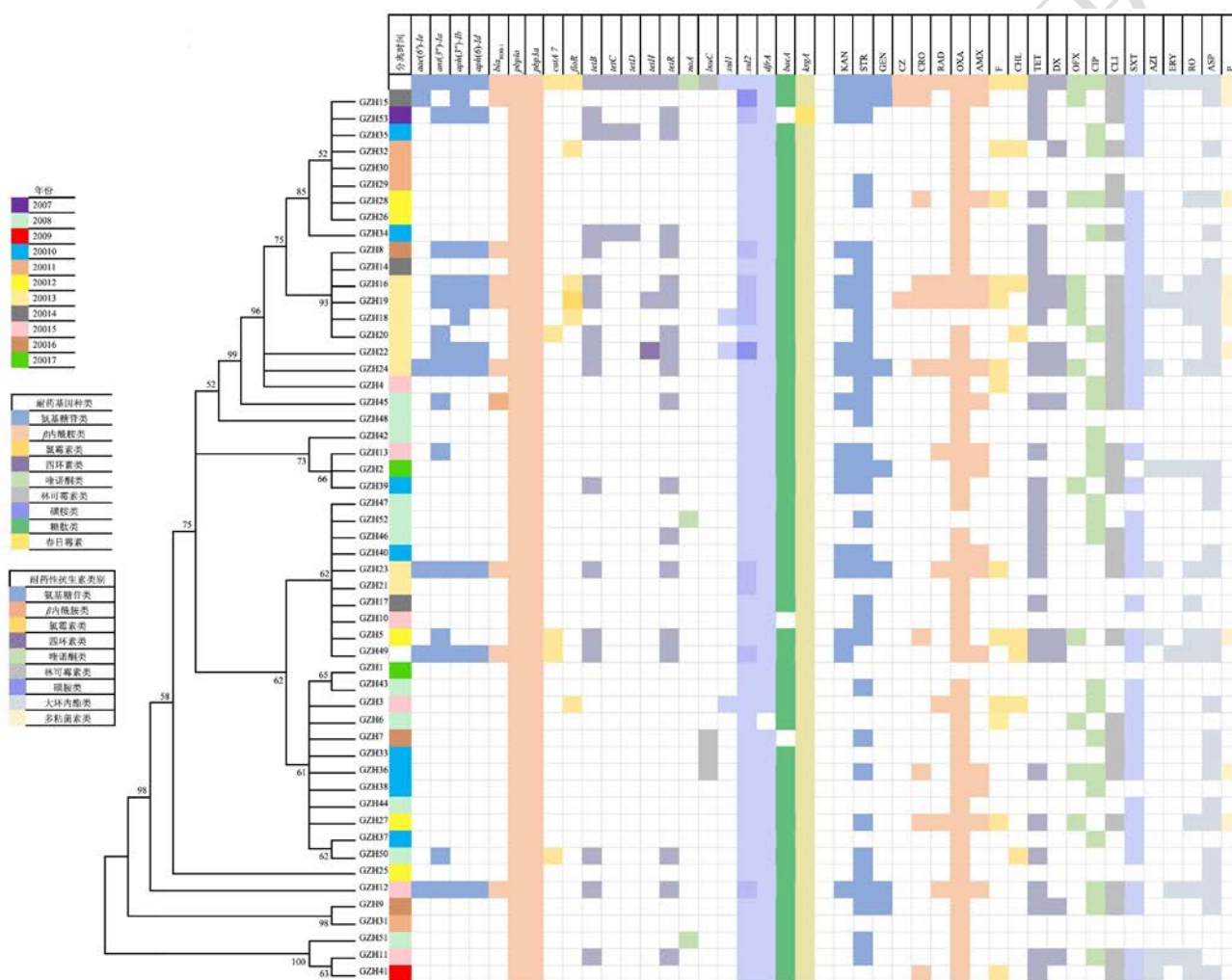


图 2 基于副猪嗜血杆菌 16S rRNA 基因核苷酸序列的系统进化树与耐药表型及基因型的对应关系

Fig.2 Resistance profiles across the 16S rRNA phylogeny of the *G. parasuis* isolates

结果显示, 含林可霉素耐药基因 *lnuC* 的三株菌的亲缘关系相对于其他菌株更为接近, 且其中两株菌均为血清 5 型, 分离自 2010 年, 这表明这 3 株菌可能来自同一个祖先。除此以外, 发现位于同一分支且年份相近的菌株, 血清型大致相同且耐药基因型也都相似, 但耐药表型存在一定差异, 这表明菌株遗传进化过程中伴随着耐药基因的协同进化, 但可能由于后期菌株生长环境的不同导致耐药表型发生变化。

### 3 结论

副猪嗜血杆菌已成为目前影响猪场经济效益的典型细菌性疾病之一。在中国, 抗生素滥用现象在养殖业中普遍存在, 这无疑会导致耐药性副猪嗜血杆菌的滋生和扩散。本研究对从广东不同地区分离得到 53 株副猪嗜血杆菌的耐药表型和耐药基因型与进化关系之间的分析发现, 副猪嗜血杆菌耐药情况较为严重,

而耐药基因携带情况与耐药表型之间符合率较高但仍有一定差异,且亲缘关系较近的菌株其耐药基因型较为相似。应长期对副猪嗜血杆菌耐药性进行监测,尽量减少由副猪嗜血杆菌感染引起的猪 Glasser's 病的潜在危险。

### 参考文献

- [1] Boerlin P, Poljak Z, Gallant J, et al. Genetic diversity of *Haemophilus parasuis* from sick and healthy pigs [J]. Vet Microbiol, 2013, 167(3-4): 459-467
- [2] Martin D L F A, Gutierrez M C, Perez M C, et al. Effect of different vaccine formulations on the development of Glasser's disease induced in pigs by experimental *Haemophilus parasuis* infection [J]. J Comp Pathol, 2009, 140(2-3): 169-176
- [3] 江军,姜平,王一成,等.浙江省副猪嗜血杆菌血清型调查及其潜在毒力相关基因分析[J].畜牧与兽医,2016,48(8):1-7  
JIANG Jun, JIANG Ping, WANG Yi-cheng, et al. Serotype investigation and analysis of potential virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* in Zhejiang [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 48(8): 1-7
- [4] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control [J]. Vet Microbiol, 2004, 99(1): 1-12
- [5] 王翔,庄艳.猪副猪嗜血杆菌病的诊断及其综合防治[J].中国畜禽种业,2010,6(1):67  
WANG Xiang, ZHUANG Yan. Diagnosis and comprehensive control of *Haemophilus parasuis* in pigs [J]. China livestock and poultry breeding industry, 2010, 6(1): 67
- [6] 王圣花.副猪嗜血杆菌的药敏试验[J].山东畜牧兽医,2018, 9(1):4-5  
WANG Sheng-hua. Drug sensitivity test of *Haemophilus parasuis* [J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2018, 39(1): 4-5
- [7] Lancashire J F, Terry T D, Blackall P J, et al. Plasmid-encoded *tetB* tetracycline resistance in *Haemophilus parasuis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(5): 1927-1931
- [8] Xu R, Yang Z H, Wang Q P, et al. Rapid startup of thermophilic anaerobic digester to remove tetracycline and sulfonamides resistance genes from sewage sludge [J]. Sci Total Environ, 2018, 612: 788-798
- [9] Zhou X, Xu X, Zhao Y, et al. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates [J]. Vet Microbiol, 2010, 141(1-2): 168-173
- [10] Feng S, Xu L, Xu C, et al. Role of *acrAB* in antibiotic resistance of *Haemophilus parasuis* serovar 4 [J]. Vet J, 2014, 202(1): 191-194
- [11] San M A, Escudero J A, Catalan A, et al. Beta-lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid pB1000 bearing *bla<sub>ROB-1</sub>* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(6): 2260-2264
- [12] Yang S S, Sun J, Liao X P, et al. Co-location of the *erm(T)* gene and *bla<sub>ROB-1</sub>* gene on a small plasmid in *Haemophilus parasuis* of pig origin [J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(8): 1930-1932
- [13] Moleres J, Santos-Lopez A, Lazaro I, et al. Novel *bla<sub>ROB-1</sub>*-bearing plasmid conferring resistance to beta-lactams in *Haemophilus parasuis* isolates from healthy weaning pigs [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(9): 3255-3267
- [14] 黄美玲,袁远华,黄淑坚.副猪嗜血杆菌分离鉴定及药敏试验[J].广东畜牧兽医科技,2013,38(1):23-25  
HUANG Mei-ling, YUAN Yuan-hua, HUANG Shu-jian. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Haemophilus parasuis* [J]. Guangdong Animal Husbandry & Veterinary Technology, 2013, 38(1): 23-25
- [15] 蒋增海,徐耀辉,邓同炜,等.副猪嗜血杆菌分离鉴定及药敏试验[J].动物医学进展,2016,37(6):124-128  
JIANG Zeng-hai, XU Yao-hui, DENG Tong-wei, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Haemophilus parasuis* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(6): 124-128
- [16] 徐成刚,郭莉莉,张建民,等.华南地区副猪嗜血杆菌的耐药性特点及四环素耐药基因携带情况[J].中国农业科学,2011, 44(22):4721-4727  
XU Cheng-gang, GUO Li-li, ZHANG Jian-min, et al. Resistance to antibiotics and distribution of tetracycline resistance determinants in *Haemophilus parasuis* from pigs in south China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(22): 4721-4727
- [17] Wissing A, Nicolet J, Boerlin P. The current antimicrobial resistance situation in Swiss veterinary medicine [J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2001, 143(10): 503-510
- [18] Zhao Y, Guo L, Li J, et al. Characterization of antimicrobial resistance genes in *Haemophilus parasuis* isolated from pigs in China [J]. PeerJ, 2018, 6: e4613
- [19] Nicholson T L, Brunelle B W, Bayles D O, et al. Comparative genomic and methylome analysis of non-virulent D74 and virulent Nagasaki *Haemophilus parasuis* isolates [J]. PLoS

- One, 2018, 13(11): e205700
- [20] Li Y, Kwok A H, Jiang J, et al. Complete genome analysis of a *Haemophilus parasuis* serovar 12 strain from China [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e68350
- [21] Angen O, Oliveira S, Ahrens P, et al. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis* [J]. Vet Microbiol, 2007, 119(2-4): 266-276
- [22] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals-Fourth Edition: Approved Standard VET01-A4 [S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2013
- [23] Pruller S, Turni C, Blackall P J, et al. Towards a standardized method for broth microdilution susceptibility testing of *Haemophilus parasuis* [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(1): 264-273
- [24] Eaves L E, Blackall P J, Fegan M. Characterisation and antimicrobial sensitivity of haemophilii isolated from pigs [J]. Aust Vet J, 1989, 66(1): 1-4
- [25] 杨守深,孙坚,范克伟,等.广东地区副猪嗜血杆菌的耐药性调查及遗传相关性分析[J].中国兽医科学,2016,46(7):858-864  
YANG Shou-shen, SUN Jian, FAN Ke-wei, et al. Investigation of antimicrobial resistance and genetic correlation analysis of *Haemophilus parasuis* isolated from Guangdong province [J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(7): 858-864
- [26] 胡军勇,汤细彪,汤电,等.临床分离猪链球菌和副猪嗜血杆菌多重耐药性监测[J].华中农业大学学报,2012,31(5):623-628  
HU Jun-yong, TANG Xi-biao, TANG Dian, et al. Clinical isolation of *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis* for multi-drug resistance monitoring [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(5): 623-628
- [27] 陆国林,何海健.浙江省副猪嗜血杆菌的分离鉴定与药敏试验[J].中国兽医科学,2010,40(6):622-625  
LU Guo-lin, HE Hai-jian. Isolation and identification of *Haemophilus parasuis* strains from Zhejiang province and their sensitivity tests to drugs [J]. Chinese Veterinary Science, 2010, 40(6): 622-625
- [28] Fuente A J, Tucker A W, Navas J, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain [J]. Vet Microbiol, 2007, 120(1-2): 184-191
- [29] 魏海林,付丹,王正皓,等.四川省副猪嗜血杆菌分离株  $\beta$ -内酰胺类药物药敏特性及质粒介导耐药基因检测研究[J].中国预防兽医学报,2018,40(3):186-189  
WEI Hai-lin, FU Dan, WANG Zheng-hao, et al. Detection of  $\beta$ -lactam drug susceptibility and plasmid mediated drug-resistance genes in *Haemophilus parasuis* isolates of Sichuan province [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(3): 186-189
- [30] 张盼锋,仇微红,刘宇,等.广东省副猪嗜血杆菌病原的分离鉴定及药敏试验[J].黑龙江畜牧兽医,2009(13):88-89  
ZHANG Pan-feng, CHOU Wei-hong, LIU Yu, et al. Isolation and identification of *Haemophilus parasuis* pathogen and drug susceptibility test in Guangdong province [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2009, (13): 88-89
- [31] Li B, Zhang Y, Wei J, et al. Characterization of a novel small plasmid carrying the florfenicol resistance gene *floR* in *Haemophilus parasuis* [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(11): 159-3161
- [32] Zhang J S, Xia Y T, Zheng R C, et al. Characterisation of a novel plasmid containing a florfenicol resistance gene in *Haemophilus parasuis* [J]. Vet J, 2018, 234: 24-26
- [33] Liu Z, Klumper U, Liu Y, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal activity and hosts of antibiotic resistance genes in activated sludge [J]. Environ Int, 2019, 129: 208-220
- [34] Chen L C L, Cai X C X, Wang X W X, et al. Characterization of plasmid-mediated lincosamide resistance in a field isolate of *Haemophilus parasuis* [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(10): 2256-2258

(上接第 183 页)

- [31] Wei C Y, Liao N B, Zhang Y, et al. *In vitro* fermentation behaviors of fucosylated chondroitin sulfate from *Pearsonothuria graeffei* by human gut microflora [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102: 1195-1201