

内蒙古无乳链球菌耐药性及四环素耐药基因检测

杜琳 郝永清

内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010010

摘要 为了解内蒙古地区隐性乳房炎无乳链球菌分离株耐药性及耐药基因, 采集内蒙古不同地区的规模化养殖场隐性乳房炎乳样, 采用 Kirby-Bauer(K-B) 纸片扩散法测试分离株对 16 种抗菌药物的敏感性, PCR 方法检测其耐药基因。结果显示: 无乳链球菌对大部分抗生素较敏感。对其有较强抑菌作用的药物为: 青霉素 G、头孢噻肟、头孢唑啉、阿莫西林、红霉素、环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、林可霉素、呋喃妥因、万古霉素。其敏感性达到 90%~100%。该菌株对四环素有较强的耐药性, 耐药率达 77.27%。PCR 扩增四环素耐药基因 *tetM*、*tetO*、*tetK*、*tetL*, 结果显示 22 株无乳链球菌均含有 *tetM* 基因, 其基因的检出率为 100%。其中 7 株同时含有 *tetK* 基因, *tetO*、*tetL* 基因未检出。

关键词 无乳链球菌; 纸片扩散法; PCR; 耐药性; 耐药基因

中图分类号 S 852.61 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0114-06

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*), 又称 B 群链球菌, 不仅可以引起奶牛乳房炎, 还可引起妇女生殖道感染和新生儿死亡^[1-2]。抗菌药物的应用, 对控制和预防细菌引起的疾病发挥了巨大的作用。目前致病菌的耐药问题已经成为全球关注的热点, 无乳链球菌的耐药性同时也受到了重视, 较多的研究工作表明无乳链球菌对抗菌药物的耐药性在世界很多国家都十分严重。目前国内外对人源性无乳链球菌的研究较多^[3], 但对于奶牛乳房炎无乳链球菌的耐药性及耐药基因未见详细报道, 为此, 笔者对 2012—2015 年分离自内蒙古部分地区隐性乳房炎乳样的 22 株无乳链球菌进行研究, 以期查明引起内蒙古地区奶牛乳房炎的无乳链球菌耐药性及耐药基因的情况, 分析耐药性与耐药基因的关系, 为临床提供合理用药的选择范围。

1 材料与方法

1.1 病料来源

采集自内蒙古自治区不同地区的 298 份隐性乳房炎病牛乳样。

1.2 培养基及药物

培养基为加 5% 绵羊脱纤血的 MH 培养基。

药敏纸片, 由杭州天和微生物试剂有限公司生产, 包括: β -内酰胺类抗生素(青霉素 G、头孢噻肟、头孢唑啉、阿莫西林); 大环内酯类(红霉素); 氨基糖苷类(卡那霉素、庆大霉素、链霉素、阿米卡星); 喹诺酮类(环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星); 林可胺类(林可霉素); 四环素类(四环素); 硝基呋喃类(呋喃妥因); 糖肽类(万古霉素)。

1.3 试剂及仪器

2 \times start *Taq* PCR Master mix、抽提基因组试剂盒、DNA Maker、琼脂糖等, 购于宝生物工程(大连)有限公司; pEasy-T1 载体、trans-T1 感受态细胞购于北京全式金生物技术有限公司。

所用仪器包括恒温振荡培养箱、超净工作台、微量移液器、离心机、PCR 仪、凝胶成像分析仪、电泳仪等。

1.4 病原菌的分离与培养

用灭菌棉拭子轻轻蘸取采集到的乳样在 5% 绵羊脱纤血琼脂平板上划线, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h, 观察菌落形态。挑取疑似菌落进行纯培养, 并对分离获得的流行菌株编号、分离时间、分离地点等信息进行记录归档。

1.5 菌株的鉴定

1) 形态学鉴定。观察在 5% 绵羊脱纤血琼脂平

收稿日期: 2015-04-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD12B09-02)

杜琳, 博士研究生, 研究方向: 微生物及免疫学. E-mail: 15124755758@163.com

通信作者: 郝永清, 教授, 研究方向: 微生物及免疫学. E-mail: haoyq1960@163.com

板上生长的菌落形态。选取疑似菌落进行涂片，革兰氏染色镜检，观察分离到的菌株的菌体形态。

2) 生化鉴定。无菌挑取纯培养物，采用 API 20 STREP 链球菌及有关种类的鉴定系统进行生化鉴定。

3) 分子生物学鉴定。细菌基因组 DNA 的小量提取：参照 TaKaRa 提取细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒说明书。16S rRNA 基因的 PCR 扩增：以提取出的无乳链球菌基因组 DNA 为模板，根据 GenBank 上的 DNA 序列设计通用引物。其引物序列为：Bacterial16s-F: ACGCGTCGACAGAGTTT-GATCCTGGCT, Bacterial16s-R: CGCGGATC-CGCTACCTTGTTACGACTT。反应程序为：94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 75℃ 延伸 90 s, 反应进行 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。预期目的条带大小为 1 500 bp。

4) PCR 产物的基因测序及序列分析。将 PCR 产物纯化后连接于 peasy-T1 载体上，转化至 trans-T1 感受态细胞中，选取阳性克隆送上海生工生物技术有限公司进行测序。所测基因序列与 GenBank 中已有序列进行 Blast 同源性比对。

1.6 药敏试验

采用世界卫生组织 (WHO) 推荐的 Kirby-Bauer (K-B) 纸片扩散法，测定菌株对抗菌药物的敏感

性。在加 5% 绵羊脱纤血的 MH 培养基上挑取培养 18~24 h 的细菌纯培养物，均匀溶解于 2 mL 无菌液体培养基中，用比浊仪调校浓度至 0.5 麦氏标准；校正后的菌液应在 15 min 内接种。用无菌棉拭子蘸取调好的菌液，将待检细菌混悬液涂布于平皿培养基表面。涂布均匀致密，将接种好的平板在室温下放置 3~5 min，待表面液体稍微干燥后，用无菌镊子将药敏纸片紧贴于琼脂表面，为了使药敏片与培养基紧密相贴，可用镊子轻按几下药敏片。每个平板均匀贴 4 个，每个菌株设置 3 个重复。接种好的平板放置于 37℃ 恒温培养 24 h 后，测量抑菌圈直径，取平均值。参照美国临床实验室标准化协会 (CLSI, 2009) 推荐标准^[4]进行判定，用肺炎双球菌标准株 (ATCC49619) 作为质控菌，按抑菌圈直径大小作为判定敏感度的标准，并且将其分为耐药 (R)、中度敏感 (I) 和高度敏感 (S)。

1.7 四环素耐药基因的检测

引物设计及 PCR 扩增：根据参考文献 [5] 及 GenBank 上的四环素耐药基因 DNA 序列，应用 Primer 5.0 软件分析合成 4 对引物 (表 1)。

1.8 tet 基因分析

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上观察是否有预期的目的条带并拍照。将 PCR 产物纯化后连接于 peasy-T1 载体上，转化至 trans-

表 1 耐四环素基因引物序列、反应条件以及片段长度

Table 1 Drug resistance genes of tetracycline primer sequence, the reaction conditions and the fragment length

引物 Primer name	引物序列 5'-3' Primer sequence	循环参数 Reaction conditions	片段长度/bp Fragment length
tetM-F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	94℃ 5 min→94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min 30 s, 30 个循环→72℃ 10 min	406
tetM-R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC		
tetO-F	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	94℃ 5 min→94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min 30 s, 30 个循环→72℃ 10 min	1 907
tetO-R	TGGAACATATGCCGAACCTT		
tetK-F	GTTTCTTTACCTGATATTGCA	94℃ 5 min→94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min 30 s, 30 个循环→72℃ 10 min	1 286
tetK-R	TCAAACCTGCTTTTCAGAACG		
tetL-F	TGGAGGGTGAAATGTGAA	94℃ 5 min→94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min 30 s, 30 个循环→72℃ 10 min	1 387
tetL-R	GAAATCCCTTTGAGAATGTT		

T1 感受态细胞中，选取阳性克隆交予上海生工生物技术有限公司进行测序。所测基因序列与 GenBank 中已有序列进行 Blast 同源性比对。

2 结果与分析

2.1 无乳链球菌的分离与鉴定

对 298 份乳样进行分离鉴定，共分离得到 22 株

无乳链球菌。其中呼和浩特地区 15 株,巴彦淖尔地区 2 株,鄂尔多斯地区 5 株,其具体信息见表 2。

表 2 2012—2015 从内蒙古各地区分离获得的牛源无乳链球菌病流行菌株信息

Table 2 *Streptococcus agalactiae* strains isolated from bovine in Inner Mongolia used in this study in 2012—2015

编号 Strain code	采集地点 Isolation locality	时间 Time
1	呼和浩特金川开发区 Jinchuan Development Zone in Hohhot City	2012.11
2	呼和浩特金川开发区 Jinchuan Development Zone in Hohhot City	2012.12
3	呼和浩特土默特左旗 Tumotezuqi in Hohhot	2012.12
4	呼和浩特金川开发区 Jinchuan Development Zone in Hohhot City	2013.03
5	呼和浩特金川开发区 Jinchuan Development Zone in Hohhot City	2013.03
6	呼和浩特金川开发区 Jinchuan Development Zone in Hohhot City	2013.03
7	呼和浩特和林格尔县 Helingeer County in Hohhot City	2013.06
8	呼和浩特和林格尔县 Helingeer County in Hohhot City	2013.06
9	呼和浩特和林格尔县 Helingeer County in Hohhot City	2013.06
10	呼和浩特托克托县 Togtoho County in Hohhot City	2013.10
11	呼和浩特土默特左旗 Tumotezuqi in Hohhot	2014.04
12	呼和浩特土默特左旗 Tumotezuqi in Hohhot	2014.04
13	呼和浩特土默特左旗 Tumotezuqi in Hohhot	2014.04
14	呼和浩特和林格尔县 Helingeer County in Hohhot City	2014.08
15	呼和浩特和林格尔县 Helingeer County in Hohhot City	2014.08
16	巴彦淖尔市 Bayannur City	2014.12
17	巴彦淖尔市 Bayannur City	2014.12
18	鄂尔多斯达拉特旗 Dalate in Erdos City	2015.01
19	鄂尔多斯达拉特旗 Dalate in Erdos City	2015.01
20	鄂尔多斯达拉特旗 Dalate in Erdos City	2015.01
21	鄂尔多斯达拉特旗 Dalate in Erdos City	2015.01
22	鄂尔多斯达拉特旗 Dalate in Erdos City	2015.01

对分离到的菌株鉴定结果如下:无乳链球菌在普通培养基上生长不良,在 5% 绵羊脱纤血琼脂平板上呈淡灰白色、隆起、闪光的小菌落。其菌落形态如图 1。



图 1 5% 绵羊脱纤血琼脂培养基上生长的无乳链球菌
Fig.1 *Streptococcus agalactiae* grown on 5% defibrinated sheep blood culture medium

分离株经革兰氏染色,在光学显微镜油镜下观察,呈革兰氏阳性,长链状。其菌体形态见图 2。

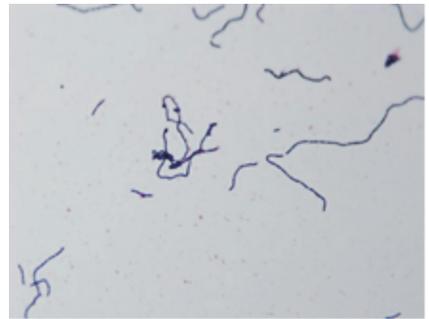


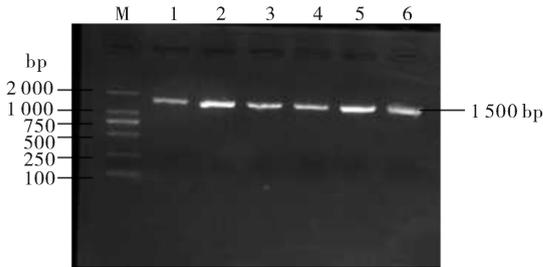
图 2 油镜下无乳链球菌的形态

Fig.2 Morphological characteristics of *Streptococcus agalactiae* under oilmicroscopic morphology

用 API 20 STREP 链球菌及有关种类的鉴定系统对分离株进行生化鉴定,将鉴定结果经 API Staph apiweb TM 软件处理,其中有 20 株的相似率

为 99.9%，2 株菌的相似率为 99.4%，均可判断其为无乳链球菌。

用通用引物对 22 个菌株进行 16S rRNA 基因的扩增。所得 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，均扩增出约 1 500 bp 大小的片段(图 3)，与目的片段大小相同。在 NCBI 上进行 Blast 比对，与无乳链球菌同源性均在 99% 以上。



M:DL2 000 DNA marker; 1-6:16S rRNA genes.

图 3 部分无乳链球菌菌株的 16S rRNA 电泳

Fig.3 Electrophoretic graph of 16S rRNA amplified from part of *Streptococcus agalactiae* strains

2.2 药敏试验结果

本次试验分离到的无乳链球菌对药敏试验的大部分抗生素均较敏感。对其有较强抑菌作用的药物为：青霉素 G、头孢噻肟、头孢唑啉、阿莫西林、红霉素、环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、林可霉素、呋喃妥因、万古霉素。其敏感性达到 90%~100%。对其有较强耐药性的药物为四环素，其菌株耐药率达 77.27%。药敏试验结果详见表 3。

表 3 牛源无乳链球菌对常见药物的敏感性试验结果¹⁾

Table 3 Drug sensitivity test of the isolated bacterial strain

抗菌药物 Antimicrobial drugs	药物敏感程度/% Sensitive degree		
	S	I	R
青霉素 G Penicillin G	95.45	4.55	0.00
头孢噻肟 Cefotaxime	100.00	0.00	0.00
头孢唑啉 Cefazolin	100.00	0.00	0.00
阿莫西林 Amoxicillin	90.91	9.09	0.00
红霉素 Erythromycin	100.00	0.00	0.00
卡那霉素 Kanamycin	77.27	18.18	4.55
庆大霉素 Gentamicin	81.82	18.18	0.00
链霉素 Streptomycin	72.73	27.27	0.00
阿米卡星 Amikacin	72.73	22.73	4.55
环丙沙星 Ciprofloxacin	95.45	4.55	0.00
恩诺沙星 Enrofloxacin	100.00	0.00	0.00
氧氟沙星 Ofloxacin	95.45	4.55	0.00
林可霉素 Lincomycin	100.00	0.00	0.00
四环素 Tetracycline	13.64	9.09	77.27
呋喃妥因 Nitrofurantoin	100.00	0.00	0.00
万古霉素 Vancomycin	100.00	0.00	0.00

1)S:高度敏感 High sensitivity; I:中度敏感 Moderate sensitivity; R:耐药 Low or no sensitivity.

2.3 PCR 扩增结果

利用合成的 4 对引物对 22 株牛源无乳链球菌的四环素耐药基因进行检测，并将测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对，结果表明：22 株牛源无乳链球菌均含有 *tetM* 基因(部分菌株 *tetM* 基因检测如图 4)，其基因的检出率为 100%，其中 7 株同时含有 *tetK* 基因(部分菌株 *tetK* 基因检测见图 5)，*tetO*、*tetL* 基因未检出(表 4)。

表 4 四环素耐药性与四环素耐药基因的关系

Table 4 Relationship between tetracycline resistance and tetracycline resistance genes

菌株编号 Strain code	药物敏感性 Sensitive degree	耐药基因 Tetracycline resistance gene			
		<i>tetM</i>	<i>tetK</i>	<i>tetO</i>	<i>tetL</i>
1	R	+	-	-	-
2	R	+	-	-	-
3	R	+	+	-	-
4	S	+	-	-	-
5	R	+	-	-	-
6	R	+	-	-	-
7	R	+	-	-	-
8	R	+	+	-	-
9	I	+	-	-	-
10	R	+	-	-	-
11	R	+	-	-	-
12	I	+	-	-	-
13	R	+	+	-	-
14	R	+	-	-	-
15	R	+	+	-	-
16	S	+	-	-	-
17	S	+	-	-	-
18	R	+	-	-	-
19	R	+	+	-	-
20	R	+	+	-	-
21	R	+	+	-	-
22	R	+	-	-	-

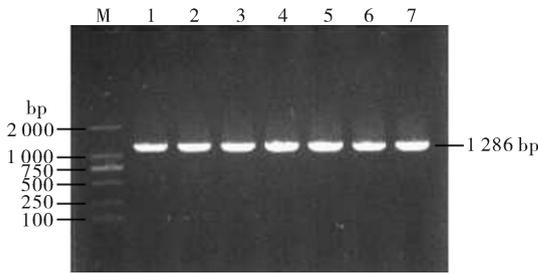
注：+：PCR 阳性，即携带该基因；-：PCR 阴性，即不携带该基因。Note: +:PCR positive,it means the stains carry the *tet* gene; -:PCR negative,it means the stains do not carry the *tet* gene.



M:DL2 000 marker; 1-11:*tetM*.

图 4 部分菌株 *tetM* 基因 PCR 检测

Fig.4 Electrophoretic graph of *tetM* amplified from *Streptococcus agalactiae* strains



M:DL2 000 marker; 1-7;*tetK* gene.

图 5 部分菌株 *tetK* 基因 PCR 检测

Fig.5 Electrophoretic graph of *tetK* amplified from *Streptococcus agalactiae* strains

3 讨论

3.1 流行病学分析

无乳链球菌是奶牛乳房炎感染的主要病原菌之一,选择性应用青霉素 G 等 β -内酰胺类抗生素化学预防是奶牛养殖场常用的预防手段之一^[6-8]。尽管采集乳样的牧场之前防治应用过一段时间的 β -内酰胺类药物,但本次试验结果表明,内蒙古地区牛源无乳链球菌对青霉素 G 等 β -内酰胺类药物仍高度敏感, β -内酰胺类药物仍可作为治疗的首选药物,并对其应进行连续监测,及时调整治疗方案。

3.2 四环素耐药性与耐药基因的关系

本次试验结果表明,四环素的耐药率为 77.27%,中度敏感率为 9.09%。通过对临床分离的无乳链球菌的检测,所有分离株均含有四环素耐药基因 *tetM*,表明 *tetM* 是内蒙古地区无乳链球菌中的流行 *tet* 基因,此外 *tetK* 基因也有较低的检出率,且有 7 株同时含有 *tetM* 和 *tetK* 基因。同时含有 2 种 *tet* 基因的菌株达 31.82%,说明在内蒙古地区 *tetM* 或 *tetM* 加 *tetK* 是导致无乳链球菌四环素耐药的主要机制。

在我国其他地区对无乳链球菌进行耐药基因的检测,四环素耐药基因主要以 *tetM* 和 *tetO* 为主^[9]。*tetK* 基因主要存在于耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌中^[10]。在我国人医分离的无乳链球菌中有少量菌株含有 *tetK* 基因^[11],本次试验首次在我国牛源无乳链球菌中扩增出 *tetK* 基因。

细菌产生四环素耐药性的原因有多种,其中包括核糖体保护机制、药物排出泵机制、酶钝化机制等。在本研究中存在的基因 *tetM* 是编码核糖体保护蛋白的基因,使四环素无法与细菌核糖体结合而无效^[12]。*tetK* 基因与药物排出泵机制相关。药物

排出泵是将细胞内的四环素由导出泵排出细胞外,从而使四环素无法发挥作用^[11-13]。四环素耐药性很少由于自身突变引起,多为获得性,并可以在不同物种之间转移,导致其在人源、动物源和环境性分离菌之间广泛传播和流行。这些耐药基因常与相同或相似的质粒、转座子或接合转座子结合,因此,共生菌可能作为耐药基因的贮存库,对耐药基因在动物和人类病原菌的保存和传播起着至关重要的作用^[12]。本次试验中扩增出的 *tetK* 基因就可能来自共生菌。

从本次试验结果分析,耐药性菌株含有 *tet* 基因,其中同时含有 *tetM* 和 *tetK* 基因的菌株与药敏试验结果相符,均表现为四环素耐药。这表明用 PCR 方法同时检测 *tetM* 和 *tetK* 基因对于快速诊断无乳链球菌的耐药性有一定的可靠性和实用价值。有 3 株菌携带 *tetM* 基因,但并不对四环素耐药,这可能与基因不表达或表达量低有关。

由于四环素存在多种耐药基因,且基因分布比较复杂,为了完全弄清内蒙古地区四环素基因的分布情况,还需要进行更广泛更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] PARK C J, VANDEL N M, RUPRAI D K, et al. Detection of group B streptococcal colonization in pregnant women using direct latex agglutination testing of selective broth [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 408-409.
- [2] KOSSAIBATI M A, ESSLEMONT R J. The costs of production diseases in dairy herds in England [J]. Vet J, 1997, 154: 41-51.
- [3] 申阿东,朱荫芝,杨永弘,等. B 组链球菌血清型分布和抗生素敏感性试验研究 [J]. 中华围产医学杂志, 2001(4): 23-35.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement: M09-A9-2009 [S]. USA: CLSI, 2009.
- [5] HORACIO A L, PATRICIA V, PAOLA J, et al. Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4688-4694.
- [6] 张中文,吴国娟,刘风华,等. 北京地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 北京农学院学报, 2002, 17(4): 42-47.
- [7] 朱贤龙,谢芝勋,刘加波,等. 广西奶牛隐性乳房炎的检测及病原分离、鉴定和药敏试验报告 [J]. 广西农业科学, 2004(6): 488-490.
- [8] 齐永华,陈桂香,王承民,等. 中原地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 安徽农业科学, 2006(14): 38-39.

- [9] 陈惠玲,邓家德,叶惠芬,等.侵入性感染B族链球菌对红霉素及四环素的耐药基因检测[J].中华医院感染学杂志,2010(10):1354-1357.
- [10] 张志军,曹海燕,刘延媛,等.医院感染金黄色葡萄球菌耐药表型与耐药基因研究[J].中华医院感染学杂志,2015(9):1924-1926.
- [11] 陈惠玲,邓家德,叶惠芬.B族链球菌的耐药性及红霉素与四环素耐药基因检测[J].实用医学杂志,2010,26(3):477-479.
- [12] 代敏,王雄清,殷桂兰.四环素耐药基因的生化 and 遗传机制研究进展[J].绵阳师范学院学报,2006,25(5):72-78.
- [13] 代敏,王雄清,彭成,等.乳牛乳腺炎病原菌的质粒提取及其四环素耐药基因的扩增[J].中国兽医科学,2009(4):33-35.

Drug resistance and tetracycline resistance gene identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine in Inner Mongolia

DU Lin HAO Yongqing

College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China

Abstract In order to understand drug resistance and tetracycline resistance gene of *Streptococcus agalactiae* epidemic strains, the prevalent strains of *S. agalactiae* from the main bovine culture area of Inner Mongolia Autonomous Region were detected through Kirby-Bauer (K-B) method and PCR. Drug susceptibility testing indicated that the *S. agalactiae* isolated strains were sensitive to most antibiotics. The *S. agalactiae* isolates were susceptible to penicillin, cefotaxime, cefazolin, amoxicillin, erythromycin, ciprofloxacin, enrofloxacin, ofloxacin, clindamycin, nitrofurantoin, and vancomycin with susceptibilities rates of 90% to 100%. In contrast, the *S. agalactiae* isolates were resistant to tetracycline with resistance rates of 77.27%. Four resistance genes including *tetM*, *tetO*, *tetK*, and *tetL* were characterized by PCR. All strains carried the resistance gene *tetM* and 7 strains also carried the resistance gene *tetK*. The resistance genes *tetO* and *tetL* were not detected. The results indicated that the resistance gene were related to the resistant type of antimicrobial agents and was important for further research and clinical therapy resistance mechanisms.

Keywords *Streptococcus agalactiae*; K-B method; PCR; drug resistance; resistance gene

(责任编辑:边书京)