李海利，朱文豪，张青娴，等. 胸膜肺炎放线杆菌对四环素类抗生素的耐药分析及相关基因检测[J]. 畜牧与兽医，2021，53(1)：121-124.
LI H L，ZHU W H，ZHANG Q X，et al. Analyses of tetracycline resistance and associated genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine，2021，53(1)：121-124.

胸膜肺炎放线杆菌对四环素类抗生素的耐药分析及相关基因检测

李海利，朱文豪，张青娴，游一，方剑玉，焦文强，徐引弟，
许峰，王治方，郎利敏，张立宪，王克领
(河南省农业科学院畜牧兽医研究所，河南 郑州 450002)

摘要： 四环素类药物是在兽医临床中常用的一类抗生素，为了解胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*，APP)对四环素类抗生素的耐药情况，本研究对从临床分离鉴定的 85 株 APP 进行了四环素类抗生素临床耐药情况和相关基因的分析和检测。应用药敏纸片法进行药敏试验，结果：APP 对四环素的耐药率较高为 76.5%，其次为金霉素 54.1%、美他环素 48.2%、多西环素 45.9%、土霉素 28.2%、米诺霉素 25.9%、替加环素 22.3%。采用 PCR 方法对四环素类 10 种耐药基因 *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetH*、*tet1*、*tetL1* 和 *tetL2* 进行检测，结果：*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetH*、*tet1*、*tetL2*、*tetL1* 耐药基因的扩增阳性率分别为 78.8%、41.2%、15.3%、8.2%、21.2%、15.3%、43.5%、24.7% 和 30.6%，而 *tetL1* 扩增则全部阴性，未检出其耐药基因。本研究结果为四环素类抗生素在猪传染性胸膜肺炎临床上的应用和新药研发提供了一定的理论依据。

关键词： 猪胸膜肺炎放线杆菌(APP)；四环素类抗生素；耐药基因
中图分类号： S855 **文献标志码：** A **文章编号：** 0529-5130(2021)01-0121-04

Analyses of tetracycline resistance and associated genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*

LI Haili，ZHU Wenhao，ZHANG Qingxian，YOU Yi，FANG Jiangyu，JIAO Wenqiang，
XU Yindi，XU Feng，WANG Zhifang，LANG Limin，ZHANG Lixian，WANG Keling
(Animal Husbandry and Veterinary Research Institute，Henan Academy of Agricultural Sciences，Zhengzhou 450002，China)

Abstract: Tetracycline antibiotics are commonly used in veterinary clinic. In order to understand the drug-resistant status of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) to tetracycline antibiotics，85 APP strains isolated and identified from clinical cases were analyzed and tested in this study. First，drug resistance phenotype identification was conducted using the drug sensitive paper method，the drug resistance rate of APP to tetracycline was 76.5%，followed by 54.1% aureomycin，48.2% methacycline，45.9% doxycycline，28.2% oxytetracycline，25.9% minoramycin and 22.3% tetracycline. PCR was used to detect ten antibiotic resistance genes of tetracycline，including *tetA*，*tetB*，*tetC*，*tetD*，*tetE*，*tetG*，*tetH*，*tet1*，*tetL1 and tetL2*. The results were that *tetA*，*tetB*，*tetC*，*tetD*，*tetE*，*tetG*，*tetH*，*tet1*，*tetL2* and *tetL1* showed positive amplification rates of resistance genes which were 78.8%，41.2%，15.3%，8.2%，21.2%，15.3%，43.5%，24.7% and 30.6%，respectively，while *tetL1* amplification was all negative and no resistance genes were detected. The results of this study provided a theoretical basis for clinical application of tetracycline antibiotics to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and for development of new drugs.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP)；tetracycline antibiotic；drug-resistant gene

猪传染性胸膜肺炎是危害养猪业的一种严重的呼吸道疾病，在规模化养猪场普遍流行，其病原菌为胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*，APP)[1]。该病原血清型众多，目前报道的有 20 多种，而且不同血清型之间缺乏交叉保护性，这也是猪传染性胸膜肺炎难防难控的最主要原因[2]。生长猪感染 APP 后出现生长发育缓慢、饲料利用率低，育肥猪出现急性死亡、口鼻流血等症状[3]。目前，该病在世界范围内广泛流行，严重威胁规模化养猪业的发展，给各国养猪业造成巨大的经济损失[4]。四环

收稿日期：2020-03-25；修回日期：2020-10-12
基金项目：河南省科技攻关(国际科技合作)项目(182102410038)
第一作者：李海利，男，博士，副研究员，主要从事动物疫病临床诊断及防控研究方面的工作，E-mail：haili8693@sina.com。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

素类抗生素是兽医临床常用的一类抗生素，应用抗生素治疗该病能挽回部分经济损失，但不能根治[5]。康复后的猪往往成为带菌者，持续排毒，成为传染源，严重威胁其他健康猪。经抗生素治疗后常引起细菌耐药性增强，导致多重耐药或者超级耐药，给临床治疗带来极大挑战[6]。

四环素、土霉素等四环素类抗生素是临床常用的抗生素，这类抗生素具有共同多环并四苯羧基酰胺母核衍生物[7]。四环素类抗生素易导致细菌产生耐药性，并且具有交叉耐药性。这类抗生素的杀菌机制是引起细菌细胞膜的通透和抑制蛋白质的合成。四环素类抗生素耐药决定因子 TetM、TetO、OtrA、TetS、TetT、TetQ、TetB（P）、TetW、Tet（32）和 Tet（36）与核糖体相互作用保护细菌自身免受四环素作用的蛋白质。这些耐药决定因子位于细菌质粒和转座子上[8]。目前，国内外有关 APP 对四环素类抗生素耐药基因的研究报道较少，APP 四环素类耐药现状和耐药流行分子特征也不清楚。本研究就分离鉴定的胸膜肺炎放线杆菌对四环素类抗生素的耐药基因进行了系统研究，为今后猪传染性胸膜肺炎的防制和新药研发提供基础，为临床用药和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 培养基及试剂

脑心浸液肉汤（含有蛋白胨、酵母浸膏、葡萄糖、甘油、脂肪酸、10% 马血清和 100 μg/mL NAD）、Buffer、*Taq* 酶等购于 Sigma 生物技术有限公司。

1.2 APP 菌株及其复苏

2013—2019 年临床分离鉴定的 85 株胸膜肺炎放线杆菌菌株，-80 ℃保存。将分离鉴定的 85 株 APP 接种于脑心浸液肉汤（添加 10%马血清和 100 μg/mL NAD），置于 37 ℃的 CO_2（5%～10%）培养箱中培养 24 h，挑取菌落进行下一步试验。

1.3 APP 菌株药物敏感试验

采用圆纸片扩散法检测 APP 对四环素类药物的敏感性，包括：四环素、土霉素、金霉素、多西环素、美他环素、米诺霉素和替加环素，根据抑菌环直径判定药物的敏感度[9]。

1.4 APP 核酸提取

将每株细菌接种脑心浸液肉汤（含有蛋白胨、酵母浸膏、葡萄糖、甘油、脂肪酸、10%马血清和 100 μg/mL NAD），置于 37 ℃的 CO_2（5%～10%）培养箱中培养 24 h，收集细菌，提取 DNA。

1.5 耐药基因的 PCR 检测

设计了 10 对特异性较高的引物（表 1），分别检测 *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetH*、*tet1*、*tetL1* 和 *tetL2* 共 10 种耐药基因[10]，引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 耐药基因引物及扩增片段大小

引物名称	引物序列（5′→3′）	扩增片段/bp
tetA-1	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	500
tetA-2	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	
tetB-1	CATTAATAGGCGCATCGCTG	925
tetB-2	TGAAGGTCATCGATAGCAGG	
tetC-1	GCCGGAAGCGAGAAGAATCA	880
tetC-2	GCTGTAGGCATAGGCTTGGT	
tetD-1	ACACTGCTGGACGCGATG	1 050
tetD-2	TCCGCACTCTGCTGTGTC	
tetE-1	GTGATGATGGCACTGGTCAT	1 200
tetE-2	CTCTGCTGTACATCGCTCTT	
tetG-1	TGATCGTGGGTCTTGACG	1 130
tetG-2	TGCGAATGGTCTGCGTAG	
tetH-1	TTATACTGCTGATCACCG	1 050
tetH-2	CATCCCAATAAGCGACGC	
tet1	GCTCAYGTTGAYGCAGGAA	500
tet2	AGGATTTGGCGGSACTTCKA	
tetL1-1	CCTGCGAGTACAAACTGG	1 020
tetL1-2	TCAAGGTAACCAGCCAAC	
tetL2-1	GTGAATACGTCTTATTCACAG	1 370
tetL2-2	TTAGCCATGTCTCCGCGA	

PCR 反应体系为 22 μL：0.22 mmol/L dNTPs 5 μL，0.04 U/μL *Taq* 酶 1 μL，10.5 μmol/L 引物 5 μL，1.5 mmol/L Mg^{2+} 2 μL，水 9 μL。PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 2.5 min；95 ℃变性 50 s，55 ℃退火 32 s，72 ℃延伸 3.2 min，33 个循环；最后 72 ℃延伸 4.2 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳，然后进行回收和测序。

2 结果与分析

2.1 药敏试验

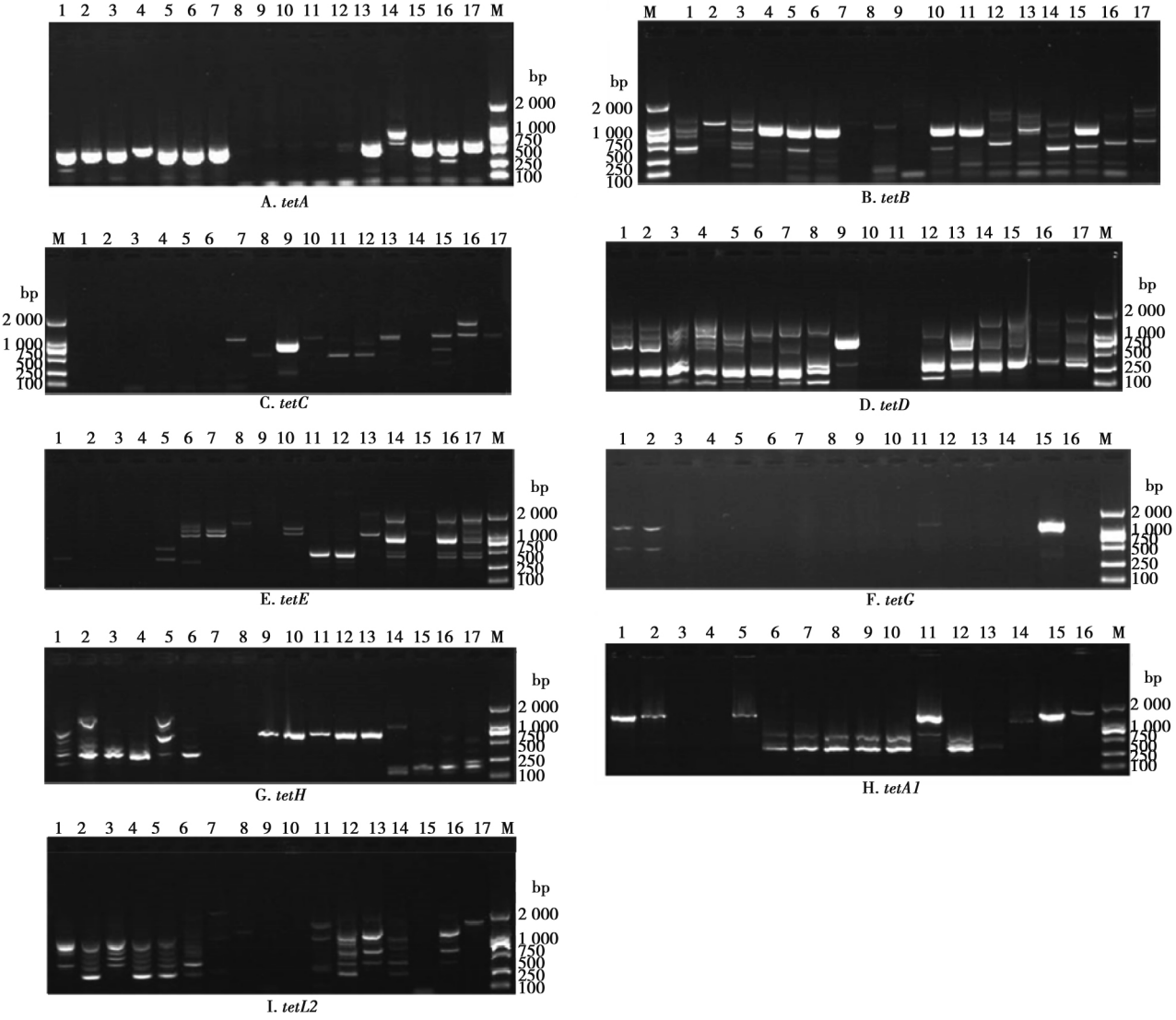
APP 对各药物的耐药率分别为：四环素 76.5%（65/85），土霉素 28.2%（24/85），金霉素 54.1%（46/85），多西环素 45.9%（39/85），美他环素 48.2%（41/85），米诺霉素 25.9%（22/85），替加环素 22.3%（19/85）。

2.2 APP 耐药基因的 PCR 检测

采用 PCR 方法对四环素类抗生素耐药基因（*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetH*、*tet1*、

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tetL1、*tetL2*）进行检测，结果显示，*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetH*、*tet1*、*tetL2*、*tetL1* 耐药基因的耐药率分别为 78.8%（67/85）、41.2%（35/85）、15.3%（13/85）、8.2%（7/85）、21.2%（18/85）、15.3%（13/85）、43.5%（37/85）、24.7%（21/85）、30.6%（26/85）、*tetL1* 全部阴性，未检出其耐药基因。部分检测结果的电泳图谱见图 1 至图 9。



M. DL2000 DNA Marker；1～17. 部分样品

图 1　部分样品耐药基因检测结果

3　讨论

四环素类抗生素是广谱抗菌药物，是兽医临床常用的一类抗生素类预防或者治疗性药物，在规模化养猪生产中被广泛应用，长期应用或者不合理应用，常常造成细菌耐药，出现多重耐药菌株或者超级耐药菌株[11]。四环素类药物的抗药性普遍存在于细菌中，其耐药的主要机制是抑制蛋白质的合成和诱导活性外排系统[12]。APP 血清型众多，根据报道目前有 20 多个，各血清型之间既无交叉反应，又无交叉免疫力。市场上现有疫苗菌株大多是单个血清型或者双重血清型，预防效果有限，这就给猪传染性胸膜肺炎的防控带来了极大挑战。

APP 是猪细菌病中最重要的一种病原菌，世界范围内均有分布。该菌可导致各种年龄段的猪发病，可引起育肥猪的急性死亡。感染该菌后，病原菌迅速导致猪肺脏纤维素性出血、坏死性胸膜肺炎、胸腔粘连。耐过的猪肺脏中常有坏死骨片，其含有致命性的载量细菌，抗生素类药物很难穿透这种坏死骨片，成为带菌传染源，从而引起该病的暴发。该菌不同菌株

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的致病力差别较大，高毒力菌株可导致高死亡率[13]。

猪传染性胸膜肺炎的防控主要依靠严格的生物安全措施、卫生防疫制度及疫苗预防接种。市场上的疫苗主要有灭活疫苗和亚单位毒素疫苗[14]。由于本病原的血清型较多，互相之间的交叉免疫能力差，各血清型之间交叉保护性不强。猪感染 APP 后应及早采取药物治疗，抗生素的选择需要依据药物敏感性试验结果和现场药物使用情况而定。

本研究结果表明，分离鉴定的 85 株 APP 对四环素类药物耐药基因 *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetH*、*tet1*、*tetL2* 的耐药率分别为 78.8%、41.2%、15.3%、8.2%、21.2%、15.3%、43.5%、24.7%、30.6%，*tetL1* 全部阴性，未检出其他耐药基因。APP 对四环素的耐药率最高为 76.5%，其他依次为金霉素、美他环素、多西环素、土霉素、米诺霉素和替加环素，药敏试验结果与耐药基因基本一致。本研究就 APP 对四环素类抗生素的耐药性及耐药基因进行了系统的研究，为抗生素的应用和新药研发及临床应用提供了基础。

参考文献:

[1] ARTEAGA BLANCO L A, CRISPIM J S, FERNANDES K M, et al. Differential cellular immune response of galleria mellonella to *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Cell Tissue Res, 2017, 370 (1): 153-168.

[2] DOREY L, HOBSON S, LEES P. What is the true *in vitro* potency of oxytetracycline for the pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2017, 40 (5): 517-529.

[3] CZYZEWSKA-DORS E, DORS A, KWIT K, et al. Pig lung immune cytokine response to the swine influenza virus and the *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection [J]. J Vet Res, 2017, 61 (3): 259-265.

[4] GABNER S, EGERBACHER M, GASSE H, et al. Detection of PR-39, a porcine host defence peptide, in different cell sub-linages in pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Histol Histopathol, 2017, 32 (10): 1077-1088.

[5] GONZALEZ W, GIMENEZ-LIROLA L G, HOLMES A, et al. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIV toxin antibody in serum and oral fluid specimens from pigs inoculated under experimental conditions [J]. J Vet Res, 2017, 61 (2): 163-171.

[6] HATHROUBI S, LOERA-MURO A, GUERRERO-BARRERA A L, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms: Role in pathogenicity and potential impact for vaccination development [J]. Anim Health Res Rev, 2018, 19 (1): 17-30.

[7] LIU J F, MA Q Y, ZHU R N, et al. An anti-Propionibacterium acnes antibody shows heterologous resistance to an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection independent of neutrophils in mice [J]. Immunol Res, 2017, 65 (6): 1124-1129.

[8] MAKRAI L, SARKOZI R, FODOR L. Carbon source utilisation and evaluation of the Biolog system in the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Acta Vet Hung, 2019, 67 (3): 327-337.

[9] 中华人民共和国卫生部医政司. 纸片法抗菌药物敏感试验标准: WS/T125—1999 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.

[10] DENISE M, ALEXANDRA R, SANDRA L, et al. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitonsillarum* [J]. Vet Microbiol, 2007, 122 (2) 146-156.

[11] TESHIMA K, HIRANO H, USHIYAMA K, et al. Isolation and characterization of atypical *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15 lacking the apxIICA genes in Japan [J]. J Vet Med Sci, 2019, 81 (3): 480-485.

[12] YUAN F, LIU J, YOU W, et al. Generation, safety and immunogenicity of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* quintuple deletion mutant SLW07 [J]. Vaccine, 2018, 36 (14): 1830-1836.

[13] XIONG J, ZHU Q, YANG S, et al. Comparison of pharmacokinetics of tilmicosin in healthy pigs and pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. N Z Vet J, 2019, 67 (5): 257-263.

[14] YEE S, BLACKALL P J, TURNI C. Genetic diversity and toxin gene distribution among serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from Australian pigs [J]. Aust Vet J, 2018, 96 (1-2): 17-23.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net