



2017–2019 年中国南方五省规模化养猪场副猪格拉菌血清型、耐药性及 β -内酰胺类耐药基因 $bla_{\text{-TEM}}$ 分子特征分析

陈雨欢^{1#}, 肖敏^{2#}, 王雨萌^{1#}, 金恒琪¹, 王馨雨¹, 刘星雨¹, 夏菁¹, 王晓杜¹, 周莹珊¹, 宋厚辉^{1*}, 杨永春^{1*}

- 1 浙江农林大学动物科技学院/动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心, 浙江省动物医学与健康国际科技合作基地, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州 311300
- 2 江西正邦农业科学院, 江西 南昌 330096

陈雨欢, 肖敏, 王雨萌, 金恒琪, 王馨雨, 刘星雨, 夏菁, 王晓杜, 周莹珊, 宋厚辉, 杨永春. 2017–2019 年中国南方五省规模化养猪场副猪格拉菌血清型、耐药性及 β -内酰胺类耐药基因 $bla_{\text{-TEM}}$ 分子特征分析. 微生物学报, 2022, 62(8): 3039–3047. Chen Yuhuan, Xiao Min, Wang Yumeng, Jin Hengqi, Wang Xinyu, Liu Xingyu, Xia Jing, Wang Xiaodu, Zhou Yingshan, Song Houhui, Yang Yongchun. Characterization of serotypes, antibiotic resistance, and $bla_{\text{-TEM}}$ gene of *Glaesserella parasuis* in large-scale pig farms in 5 southern provinces of China during 2017–2019. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3039–3047.

摘要:【目的】旨在分析当前规模化养殖场副猪格拉菌(*Glaesserella parasuis*)优势血清型、耐药特性、耐药基因与分子特征。【方法】对源自规模化养猪场 21 株副猪格拉菌临床分离株, 采用 PCR 鉴定血清型; 利用 K-B 纸片扩散法鉴定其对 25 种抗生素的耐药表型; 采用 PCR 检测 $bla_{\text{-TEM}}$ 、 $bla_{\text{-NDM}}$ 和 $bla_{\text{-CTX}}$ 等 7 种耐药基因, 并采用 Chi-square test 和 Fisher exact test 分析耐药表型和耐药基因型的相关性; 耐药基因目的条带测序, 并应用 CLC Sequence Viewer 软件分析 β -内酰胺类耐药基因($bla_{\text{-TEM}}$)编码蛋白氨基酸关键位点差异与耐药性的关系。【结果】21 株副猪格拉菌临床分

基金项目: 浙江省科技重点研发计划(2019C02052); 国家自然科学基金(31972656); 国家级大学生创新创业训练项目(201910341040, 202010341038)

Supported by the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2019C02052), by the National Natural Science Foundation of China (31972656) and by the National Students' Platform for Innovation and Entrepreneurship Training Program (201910341040, 202010341038)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: YANG Yongchun, yyc@zafu.edu.cn; SONG Houhui, Songhh@zafu.edu.cn

Received: 28 November 2021; Revised: 27 January 2022; Published online: 3 March 2022

离株的优势血清型为 4 和 12 型;对 β -内酰胺类药物苯唑西林的耐药性较强,耐药菌占比达 61.9% (13/21);多重耐药菌株占比高达 90.5% (19/21); β -内酰胺类耐药基因 *bla*-TEM 携带率较高(52.4%, 11/21),且 *bla*-TEM 与 β -内酰胺类药物青霉素 G、苯唑西林和头孢拉定的耐药性显著相关,部分 *bla*-TEM 编码氨基酸存在可能与副猪格拉菌耐药能力有关的差异位点。【结论】本研究表明,规模化养猪场的副猪格拉菌多重耐药情况仍很严重,并明确了被调查区域 β -内酰胺类药物耐药率高的主要原因是携带耐药基因 *bla*-TEM,为加强对规模化养猪场副猪格拉菌耐药性监测提供理论依据。

关键词: 副猪格拉菌; *bla*-TEM; 分子特征

Characterization of serotypes, antibiotic resistance, and *bla*-TEM gene of *Glaesserella parasuis* in large-scale pig farms in 5 southern provinces of China during 2017–2019

CHEN Yuhuan^{1#}, XIAO Min^{2#}, WANG Yumeng^{1#}, JIN Hengqi¹, WANG Xinyu¹, LIU Xingyu¹, XIA Jing¹, WANG Xiaodu¹, ZHOU Yingshan¹, SONG Houhui^{1*}, YANG Yongchun^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, Zhejiang Provincial Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine of Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China
² Academy of Jiangxi Zhengbang Agricultural Sciences, Nanchang 330096, Jiangxi, China

Abstract: [Objective] To analyze the serotypes, antibiotic resistance, and resistance genes of 21 isolates of *Glaesserella parasuis* in large-scale pig farms. [Methods] Serotypes were identified by PCR and the resistance to 25 antibiotics with the K-B disk diffusion method. Seven resistance genes, including *bla*-TEM, *bla*-NDM, and *bla*-CTX, were detected by PCR. Then chi-square test and Fisher's exact test were used to analyze the association between resistance phenotypes and genotypes. The β -lactam resistance gene *bla*-TEM was sequenced and the sequences of amino acids encoded by *bla*-TEM from different isolates were compared. Finally, the relationship between the differential sites of the amino acids and antibiotic resistance was analyzed by CLC Sequence Viewer. [Results] The isolates were dominated by serotypes 4 and 12. They showed high rate (61.9%, 13/21) of resistance to β -lactam antibiotic oxacillin and 90.5% (19/21) of the isolates demonstrated multi-antibiotic resistance. *bla*-TEM was identified in 52.4% (11/21) of the isolates, which was significantly correlated with the resistance phenotype of penicillin G, oxacillin, and cefradine. There were mutations of the amino acids encoded by *bla*-TEM among isolates, which may be related to the antibiotic resistance of the isolates. [Conclusion] Multi-antibiotic resistance of *G. parasuis* isolates is prevalent in large-scale pig farms, and the high rate of β -lactam resistance is attributed to the inborn resistance gene *bla*-TEM. The conclusion lays a theoretical basis for surveillance of antibiotic resistance of *G. parasuis* in large-scale pig farms.

Keywords: *Glaesserella parasuis*; *bla*-TEM; molecular characterization

副猪格拉菌(*Glaesserella parasuis*)原名副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, *Hps*)是一种兼性厌氧革兰阴性菌, 无运动性, 具有多种形态, 大多呈单个球杆状, 也有稍长的杆状结构或接近丝状等。副猪格拉菌可造成猪的革氏病(*Glaesser's disease*), 主要引起仔猪纤维性多发性浆膜炎、关节炎、胸膜炎和脑膜炎等, 通常见于 5-8 周龄的仔猪。该菌作为一种猪常见条件致病菌, 常继发于猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪圆环病毒 2 型等病毒感染的后期^[1], 给养猪业造成严重损失^[2]。目前副猪格拉菌已被检测出 15 种血清型, 并且仍有 8.5% 的分离株无法定型。其中 1、5、10、12、13 和 14 型菌株毒力较高, 血清型 2、4、8 和 15 型菌株具有中等毒力, 3、6、7、9 和 11 型菌株几乎没有致病力^[3-4]。该菌血清型种类随各地区地理、气候条件等差异而不同, 5、4、1、12、13 型为主要流行血清型^[5-6]。临床上仍以抗生素为主控制其流行, 主要采用大环内酯类的替米考星^[7]等抗生素进行治疗, 但临床上长期、广泛、不合理地使用抗生素直接造成耐药菌株不断增多、耐药谱日益变宽, 还出现了比较严重的多重耐药现象。

本研究对 2017-2019 年来自中国 5 省规模化养殖场的 21 株副猪格拉菌临床分离株, 利用 PCR 技术进行分子血清型鉴定, 利用 Kirby-Bauer (K-B) 纸片扩散法鉴定其耐药谱, PCR 扩增耐药基因检测耐药基因流行谱, 对耐药基因测序和氨基酸序列进行比对分析, 并分析耐药表型和基因型的相关性。分析副猪格拉菌在规模化养殖场的血清型流行趋势、耐药基因的流行谱和氨基酸变化规律, 耐药表型与基因型的关系, 为副猪格拉菌临床防控提供理论依据及抗生素的合理使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究检测的 21 株副猪格拉菌临床分离株来源于 2017 年 6 月至 2019 年 2 月有严重呼吸道症状的 5 个规模化猪场患猪的肺脏, 其中江西省吉安 9 株、广东佛山 3 株、湖北大冶 5 株、浙江金华 3 株、湖南常德 1 株, 由浙江农林大学动物预防与公共卫生实验室分离、鉴定和保存。质控菌株 *E. coli* ATCC 25922 由南京农业大学农业部动物细菌学重点实验室惠赠。

1.2 试剂

NAD 辅酶和大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清购自 Thermo Scientific 有限公司; 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)购自广东环凯为神武科技有限公司; 药敏片购自杭州微生物试剂有限公司; KOD plus Neo 购自东洋纺生物有限公司; PCR Mix、质粒 DNA 小量提取试剂盒、细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒等购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.3 细菌培养条件

副猪格拉菌在含有 10% 胎牛血清和 0.03% NAD 辅酶的 TSB 液体培养基或 TSA 固体培养基中培养, 液体在 37 °C 振荡培养; 固体于 37 °C、5% CO₂ 静置培养; *E. coli* 在 LB 肉汤中培养。

1.4 血清型鉴定

参照 Howell 等^[8]报道提供的引物进行血清型分型, 14 对副猪格拉菌血清型分型引物序列见表 1。模板为提取的细菌基因组 DNA, 以此作为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 血清型分型引物

Table 1 The primers for serotyping

Gene name	Primer sequences (5'→3')	Product length/bp	Molecular serotype
<i>funB</i>	F: GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG R: CTGTGTATAATCTATCCCCGATCATCAGC	180	1
<i>wzx</i>	F: GGCACCTGAATAAGGGATAATTGTAAGT R: CTAACAAGTTAGGTATGGAGGGTTTTGGTG	295	2
<i>glyC</i>	F: TCCACATGAGGCCGCTTCTAATATACT R: CATGGTGTATTATCCTGACTTGGCTGT	650	3
<i>wciP</i>	F: CTTTCCACAACAGCTCTAGAAACC R: GGTTAAGAGGTAGAGCTAAGAATAGAGG	320	4
<i>wcwK</i>	F: CCATACATCTGAATTCCTAAGC R: CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG	450	5 or 12
<i>gltI</i>	F: CCTATTCTGTCTATAAGCATAGACAGGAC R: GATTCTGATGATTTTTGGCTGACGGAACG	360	6
<i>funQ</i>	F: CGATAAACATAACAATTCCTGGCAC R: CTCCGATTCATCTTTTCTATGTGG	490	7
<i>scdA</i>	F: CTCCATAGAACCTGCTGCTTGAG R: GGAAGGGGATTACTACTACCTGAAAG	650	8
<i>funV</i>	F: CCTTAAATAGCCTATGTCTGTACC R: AGCCACATCAATTTAGCCTCATCA	710	9
<i>funX</i>	F: GCACTGTCATCAATAACAATCTTAAGACG R: GGTGACATTTATGGGCGAGTAAGTC	790	10
<i>amtA</i>	F: GGACGCCAAGGAGTATTATCAAATG R: CCATCTCTTTAACTAATGGGACTG	890	11
<i>gltP</i>	F: CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC R: GCTGGAGGAGTTGAAAGAGTTGTTAC	840	13
<i>funAB</i>	F: GCTCCCAAGATTAAACCACAAGCAAG R: GCTGGTTATGACTATTCTTTTCGCG	730	14
<i>funI</i>	F: CCTATATCATTTGTTGGATGTACG R: CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC	550	15

1.5 副猪格拉菌的药敏试验

采用 K-B 纸片扩散法进行 25 种抗生素 (表 2) 的药敏试验, 判定标准参照美国临床和实验室标准协会 (CLSI, 2020) 进行。

1.6 副猪格拉菌耐药基因鉴定

参照刘英玉^[9]报道的耐药基因引物, 交由金唯智生物科技有限公司合成。以 21 株副猪格拉菌的基因组 DNA 为模板, 分别扩增 *bla*-TEM、*bla*-OXA、*bla*-CTX、*bla*-SHV、*bla*-IMP、*bla*-DHA 和 *bla*-NDM 共 7 种 β -内酰胺类抗生素耐药基因, PCR 产物经核酸凝胶电泳分析检测。

1.7 副猪格拉菌耐药基因 *bla*-TEM 序列分析比对及遗传进化分析

针对各菌株已经确定的耐药基因, 依据 NCBI 设计其全长 cDNA 引物序列: forward primer: 5'-CATGCCATGGGCATGAGTATTCACATTTCCGTGTCG-3'/reverse primer: 5'-CCGC TCGAGCCAATGCTTAATCAGTGAGGCAC-3', 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成; PCR 扩增耐药基因 *bla*-TEM 的全长 cDNA, 由金唯智公司测序。利用 Editseq、Clustalx1.83 和 MegAlign 软件对获得的 *bla*-TEM 基因序列进行序列比对分析。

1.8 副猪格拉菌耐药表型与耐药基因相关性分析

采用卡方检验(Chi-square test)和费希尔精确检验(Fisher exact test)分析耐药基因与耐药表型的相关性。统计学差异使用 95%置信区间(95% CI)和比值比(OR)表示, 当 $P < 0.05$ 时, 则相关性显著。

2 结果与分析

2.1 副猪格拉菌优势血清型

根据 PCR 结果判定、扩增技术鉴定副猪格拉菌的血清型, 并计算各种血清型副猪格拉菌的占比。结果显示, 21 株副猪格拉菌分离株分布于 2、4、5、7、10、12、13 和 15 型等 8 个血清型。其中, 优势血清型为 4 和 12 型, 分别占比 33.3% (7/21) 和 23.8% (5/21); 其次为血清型 2 型、7 型和 13 型, 各占比 9.5% (2/21); 5 型、10 型和 15 型各占比 4.8% (1/21)。

2.2 副猪格拉菌耐药谱型分析

参照 CLSI 标准判定药敏试验结果。表 2 显示, 被检 25 种抗生素中, 副猪格拉菌分离株对 β -内酰胺类的 8 种抗生素(氨苄西林、羧苄西林、哌拉西林、头孢氨苄、头孢呋辛、头孢他啶、头孢曲松、头孢哌酮)、氨基糖苷类 2 种抗生素(庆大霉素和卡那霉素)、四环素类的多西环素和喹诺酮类的氧氟沙星 12 种抗生素 100% 敏感; 对环丙沙星、米诺环素、多粘菌素 E、丁胺卡那、新霉素、替米考星和红霉素高度敏感, 敏感菌占 81.0% 以上; 对 β -内酰胺类的苯唑西林耐受性较高, 耐药菌占 61.9%。此外, 副猪格拉菌菌株还存在严重的多重耐药现象, 多重耐药菌占比 90.5% (19/21)。上述结果表明, 在被检规模化养殖场中, 虽然有多种副猪格拉菌候选敏感药物, 但是副猪格拉菌也呈现出较严重的耐药性。

表 2 副猪格拉菌分离株对常用抗生素的敏感性
Table 2 Sensitivity of *G. parasuis* isolates to commonly used antibiotics

Antibiotics	Percentage of resistant isolates/%	Percentage of sensitive isolates/%
Penicillin G	47.6	52.4
Oxacillin	61.9	38.1
Ampicillin	0	100.0
Carbenicillin	0	100.0
Piperacillin	0	100.0
Cefalexin	0	100.0
Cephazolin	38.1	61.9
Cefradine	47.6	52.4
Cefuroxim	0	100.0
Ceftazidime	0	100.0
Ceftriaxone	0	100.0
Cefoperazone	0	100.0
Amikacin	19.0	81.0
Gentamicin	0	100.0
Kanamycin	0	100.0
Neomycin	19.0	81.0
Tetracycline	23.8	76.2
Doxycycline	0	100.0
Minocycline	14.3	85.7
Norfloxacin	23.8	76.2
Ofloxacin	0	100.0
Ciprofloxacin	4.8	95.2
Erythromycin	19.0	81.0
Tilmicosin	19.0	81.0
Polymyxin E	14.3	85.7

2.3 副猪格拉菌耐药基因检测结果

采用 PCR 技术对 21 株副猪格拉菌进行了 *bla*-TEM、*bla*-OXA、*bla*-CTX、*bla*-SHV、*bla*-IMP、*bla*-DHA 和 *bla*-NDM 共 7 种 β -内酰胺类抗生素耐药基因的检测。其中, 11 株(52.4%)菌株 β -内酰胺类耐药基因 *bla*-TEM 阳性, 所有菌株均不携带其他被检耐药基因, β -内酰胺耐药菌株 *bla*-TEM 的阳性率为 84.6% (11/13)。

β -内酰胺类药物耐药表型与耐药基因相关性分析结果显示, 副猪格拉菌对青霉素 G、苯唑西林和头孢拉定 3 种药物的耐药表型与耐药基因 *bla*-TEM 呈显著相关($OR > 1$, $P < 0.05$, 表 3),

头孢唑林与耐药基因 *bla*-TEM 不相关(OR=4.8, 95% CI=0.68–33.80, *P*=0.183)。

2.4 副猪格拉菌耐药基因 *bla*-TEM 的氨基酸比对

对其中 8 株副猪格拉菌临床分离株的 *bla*-TEM 基因进行测序,利用 CLC Sequence Viewer 软件

对 *bla*-TEM 编码的氨基酸序列进行比对,各菌株中 *bla*-TEM 基因编码的氨基酸相似性较高,菌株 JX201810 存在 3 个氨基酸差异位点(37Q→K、82I→V、182V→A), GD201901 存在 2 个氨基酸差异位点(82I→V, 182V→A), JX201706 有 1 个氨基酸差异位点(284K→R) (图 1)。

表 3 副猪格拉菌临床分离株 β-内酰胺类药物耐药表型与耐药基因的相关性

Table 3 Associations between phenotypes and genotypes of β-lactams in *G. parasuis* strains

Antibiotics	Number of resistance isolates	Number of P+/G+	Number of P-/G-	OR	95% CI	<i>P</i>
Penicillin G	10	9	9	40.50	3.09–530.29	0.002
Oxacillin	13	10	7	23.33	1.99–273.29	0.008
Cefradin	10	9	9	40.50	3.09–530.29	0.002
Cephazolin	8	6	8	4.80	0.68–33.80	0.183

An association is significant if the *P* value is lower than 0.05.

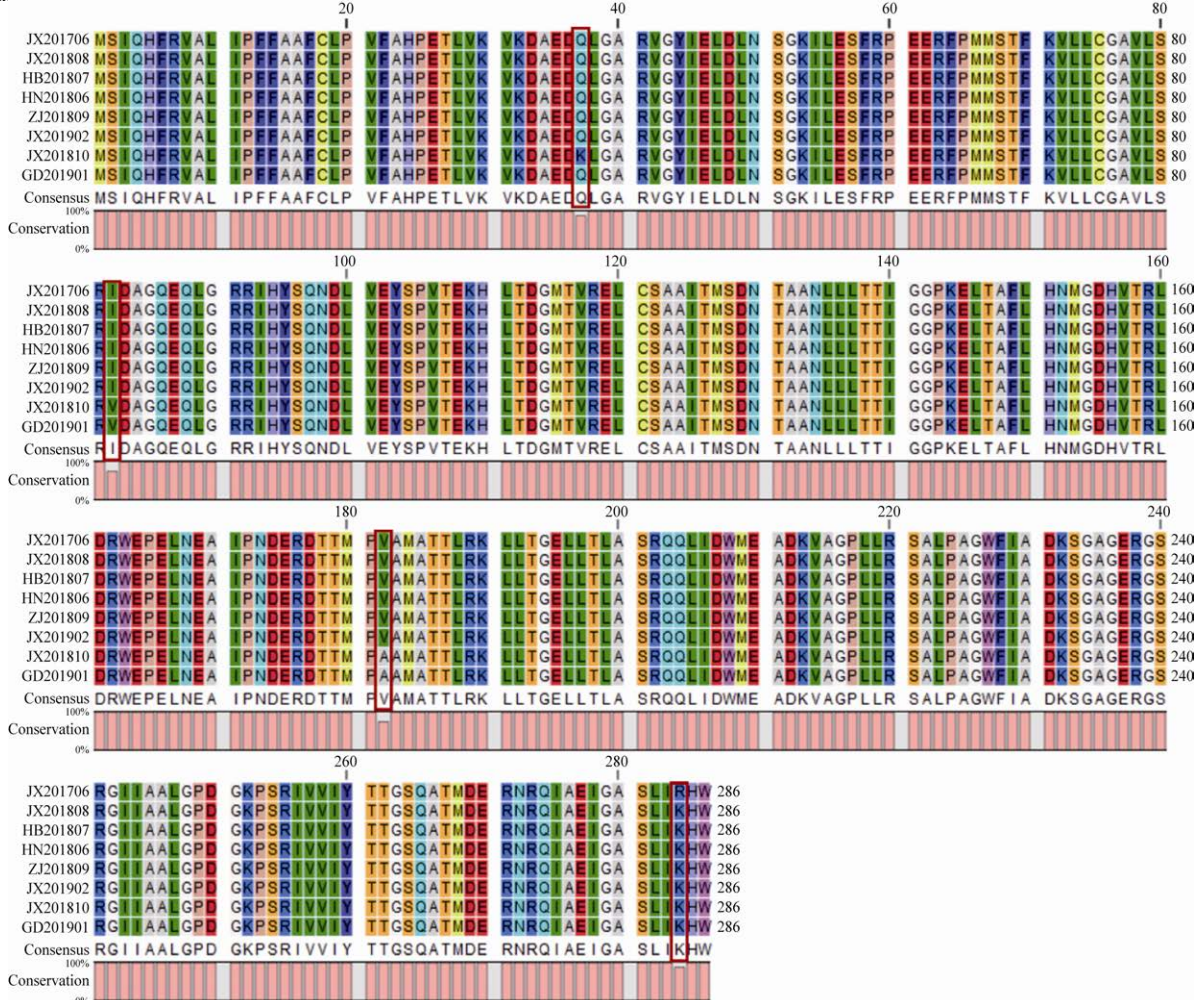


图 1 副猪格拉菌分离株中 *Bla*-TEM 氨基酸序列相似性

Figure 1 Similarity of *Bla*-TEM amino acid sequences from *G. parasuis* isolates.

3 讨论与结论

副猪格拉菌作为影响养猪业的重要细菌性病原之一, 每年对养猪业造成巨大的经济损失。针对该菌的流行, 养殖场主要使用抗生素进行该病的预防和治疗, 由于长期大量使用抗生素, 一方面导致细菌的耐药情况越来越严重, 特别是多重耐药的增加; 另一方面抗生素残留导致食品卫生安全问题严重。因此研究副猪格拉菌的流行菌株特征, 对科学防控该病具有重要意义。

副猪格拉菌在全球范围内呈散发流行态势, 欧洲、澳大利亚、巴西和北美以 4、5 和 13 型为主要流行的血清型^[10]。在国内不同的省份和地区副猪格拉菌流行情况也有所差异。邱文彬等^[11]对山东省 2016–2018 年副猪格拉菌临床分离株鉴定 4 型和 5 型最为流行, 1 型和 12 型次之。王迪等^[12]对安徽省副猪格拉菌临床分离株鉴定 4、13、7 和 5 型为优势血清型。本研究 21 株副猪格拉菌临床分离株的分子血清型鉴定结果表明, 4 型和 12 型为流行的优势血清型, 这与江军等^[13]分析的 2010–2015 年浙江省副猪格拉菌流行血清型结果基本一致。

抗菌药物的使用是控制副猪格拉菌感染的有效手段。由于长期、广泛和不合理使用抗菌药, 猪群对抗菌药物的依赖性不断增加, 导致临床上副猪格拉菌耐药菌株频繁产生、耐药谱日益扩大。本研究检测了 21 株副猪格拉菌对 25 种药物的敏感性, 较系统地建立耐药图谱, 为浙江省规模化猪场选择用药提供了依据。结果显示, 虽然副猪格拉菌对 12 种被检药物敏感, 但是对另外 13 种抗生素, 包括常用于治疗副猪格拉菌感染的替米考星等药物呈现出不同程度的耐受, 特别是对苯唑西林的耐受率

(61.9%)较高, 有 90%以上的菌株为多重耐药。这说明, 当前规模化猪场副猪格拉菌耐药情况较严重。

副猪格拉菌耐药性的产生不仅与使用抗菌药物的频率有关, 还与携带的耐药基因有关。在外界抗生素选择压力下, 其耐药机制可发生改变引起耐药性, 耐药基因是细菌产生耐药性的重要影响因素之一。产生 β -内酰胺酶是革兰氏阴性菌产生耐药的重要机制, TEM 型的 β -内酰胺酶在中国南部地区副猪格拉菌分离株中最为常见^[14]。耐药基因鉴定结果显示, 本研究副猪格拉菌临床分离株 *bla*-TEM 携带率为 52.4%, β -内酰胺类耐药副猪格拉菌菌株 *bla*-TEM 基因的携带率为 81.8%。革兰氏阴性菌的质粒、转座子和整合子等抗生素抗性基因(ARG)移动元件的水平基因转移, 以及 ARG 宿主增殖的垂直基因转移, 可促进抗药性扩散^[15]。随着抗生素在各大规模化养殖场中大量使用, *bla*-TEM 在细菌间已广泛流行和传播。2016–2017 年, 源自江苏 14 个养猪场的大肠杆菌 *bla*-TEM 携带率为 18.5%^[16]; 2005–2017 年, 我国西北地区养猪场 β -内酰胺(ESBL)阳性大肠杆菌 *bla*-TEM 携带率为 68.2%^[17]; 2014–2017 年国内规模化养猪场副猪格拉菌分离株 *bla*-TEM 阳性率 6.3%^[12]。本研究中, 2017–2019 年所有副猪格拉菌或 β -内酰胺类耐药副猪格拉菌菌株的 *bla*-TEM 携带率, 都分别远高于上述 2017 年前已报道细菌 *bla*-TEM 的携带率。这进一步证明, *bla*-TEM 基因广泛存在于养殖场内多种细菌且携带率较之前显著提高, 导致 β -内酰胺类抗生素的耐药谱增宽, 因此, 为了降低耐药性, 应该科学使用抗生素。

同时, 研究发现副猪格拉菌耐药基因 *bla*-TEM 与 β -内酰胺类药物青霉素 G、苯唑西林和头孢拉定耐药性呈显著相关, 但存在部分

β -内酰胺类药物耐药但未鉴定出耐药基因的副猪格拉菌菌株，其原因可能是菌株存在未检测的耐药基因^[18]。进一步比对分析副猪格拉菌耐药基因 *bla*-TEM 的氨基酸序列与耐药性，发现部分 *bla*-TEM 编码氨基酸位点的突变可能与副猪格拉菌对 β -内酰胺类药物的耐药能力有关。

综上所述，本研究源自规模化猪场有呼吸道症状猪的副猪格拉菌临床分离株的血清型当前仍为 4 和 12 型，但多重耐药情况仍很严重， β -内酰胺类耐药基因 *bla*-TEM 携带率较高且部分 *bla*-TEM 编码氨基酸 *bla*-TEM 存在可能与副猪格拉菌耐药能力有关的差异位点，*bla*-TEM 与 β -内酰胺类药物青霉素 G、苯唑西林、头孢拉定的耐药性显著相关。因此，应加强规模化养猪场副猪格拉菌耐药性及耐药基因的监测。

参考文献

- [1] 何欣怡, 周叶, 周群, 曹慧, 宋鑫, 岳华, 张斌. Loop6、Loop7 和 Loop8 参与副猪嗜血杆菌 OmpP2 抗血清的杀菌作用研究. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(6): 639–645.
He XY, Zhou Y, Zhou Q, Cao H, Song X, Yue H, Zhang B. Loop6, Loop7, and Loop8 participated in the bactericidal efficacy study of the *H. parasuis* OmpP2 antiserum. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(6): 639–645. (in Chinese)
- [2] Zhang P, Zhang CY, Aragon V, Zhou X, Zou M, Wu CM, Shen ZQ. Investigation of *Haemophilus parasuis* from healthy pigs in China. *Veterinary Microbiology*, 2019, 231: 40–44.
- [3] Zhao YD, Wang Q, Li J, Lin XH, Huang XH, Fang BH. Epidemiology of *Haemophilus parasuis* isolates from pigs in China using serotyping, antimicrobial susceptibility, biofilm formation and ERIC-PCR genotyping. *PeerJ*, 2018, 6: e5040.
- [4] Wang LY, Ma LN, Liu YA, Gao PC, Li YQ, Li XR, Liu YS. Multilocus sequence typing and virulence analysis of *Haemophilus parasuis* strains isolated in five provinces of China. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 44: 228–233.
- [5] 李新果, 刘占, 马宁宁, 邓梦梦, 郭子仪, 杨霞, 王新卫, 王川庆, 陈陆. 副猪嗜血杆菌重组抗原蛋白对小鼠的免疫效果评价. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(5): 534–540.
Li XG, Liu Z, Ma NN, Deng MM, Guo ZY, Yang X, Wang XW, Wang CQ, Chen L. Evaluation of immune efficacy of recombinant antigen protein of *Haemophilus parasuis* on mice. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(5): 534–540. (in Chinese)
- [6] Wang ZH, Zhao Q, Wei HL, Wen XT, Cao SJ, Huang XB, Wu R, Yan QG, Huang Y, Wen YP. Prevalence and seroepidemiology of *Haemophilus parasuis* in Sichuan Province, China. *PeerJ*, 2017, 5: e3379.
- [7] Zhang L, Zhao L, Liu YH, Liu JF, Li XQ. Pharmacokinetics of tilmicosin in healthy pigs and in pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 18(4): 431–437.
- [8] Howell KJ, Peters SE, Wang JH, Hernandez-Garcia J, Weinert LA, Luan SL, Chaudhuri RR, Angen Ø, Aragon V, Williamson SM, Parkhill J, Langford PR, Rycroft AN, Wren BW, Maskell DJ, Tucker AW, Consortium B. Development of a multiplex PCR assay for rapid molecular serotyping of *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(12): 3812–3821.
- [9] 刘英玉. 副猪嗜血杆菌耐药性调查和耐药机制研究. 华中农业大学博士学位论文, 2013
- [10] Jia AQ, Zhou RY, Fan HY, Yang KJ, Zhang JM, Xu YD, Wang GP, Liao M. Development of serotype-specific PCR assays for typing of *Haemophilus parasuis* isolates circulating in Southern China. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017, 55(11): 3249–3257.
- [11] 邱文彬, 于江, 张玉玉, 沈文慧, 杨杰, 陈智, 孙文博, 陈蕾, 张凡, 张丽丽, 杨桂文, 吴家强. 副猪嗜血杆菌流行病学调查及两株分离株耐药性和致病性分析. *家畜生态学报*, 2020, 41(2): 64–71.
Qiu WB, Yu J, Zhang YY, Shen WH, Yang J, Chen Z, Sun WB, Chen L, Zhang F, Zhang LL, Yang GW, Wu JQ. Epidemiological investigation of *Haemophilus parasuis* and the drug resistance and pathogenicity analysis of two isolates. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2020, 41(2): 64–71. (in Chinese)
- [12] 王迪, 陈章, 邢刚, 何长生, 刘晓露, 魏建忠, 孙裴, 刘雪兰, 李郁. 89 株副猪嗜血杆菌临床分离株血清型、基因型鉴定与分析. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(11): 2802–2811.
Wang D, Chen Z, Xing G, He CS, Liu XL, Wei JZ, Sun P, Liu XL, Li Y. Identification and analysis of serotype

- and genotype of 89 clinical isolates of *Haemophilus parasuis*. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(11): 2802–2811. (in Chinese)
- [13] 江军, 姜平, 王一成, 李军星, 袁秀芳, 徐丽华, 吴旺霞. 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. *畜牧与兽医*, 2016, 48(8): 1–7.
Jiang J, Jiang P, Wang YC, Li JX, Yuan XF, Xu LH, Wu WX. Serotype investigation and analysis of potential virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* in Zhejiang. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 48(8): 1–7. (in Chinese)
- [14] Guo LL, Zhang JM, Xu CG, Ren T, Zhang B, Chen JD, Liao M. Detection and characterization of β -lactam resistance in *Haemophilus parasuis* strains from pigs in South China. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012, 11(1): 116–121.
- [15] Zhao YD, Guo LL, Li J, Huang XH, Fang BH. Characterization of antimicrobial resistance genes in *Haemophilus parasuis* isolated from pigs in China. *PeerJ*, 2018, 6: e4613.
- [16] Shafiq M, Huang JH, Ur Rahman S, Shah JM, Chen L, Gao Y, Wang ML, Wang LP. High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring *mcr-1* and *bla* CTX-M-15 recovered from pigs. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 2135–2149.
- [17] Liu XQ, Liu HX, Wang L, Peng Q, Li YQ, Zhou HC, Li QF. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from swine in Northwest China. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1756.
- [18] 忽占利, 李军星, 胡松华, 王一成, 袁秀芳, 徐丽华. 副猪嗜血杆菌分离株的耐药性及耐药基因分析. *华北农学报*, 2013, 28(4): 228–233.
Hu ZL, Li JX, Hu SH, Wang YC, Yuan XF, Xu LH. Phenotype and genotype analysis of antibiotic resistance of *Haemophilus parasuis* from the scaled pig farms in Zhejiang Province. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(4): 228–233. (in Chinese)

(本文责编 李磊)