

张家口地区仔猪黄痢病原菌血清型 检测及药敏试验

顾小龙¹, 刘红彬²

(1. 河北北方学院 动物科技学院, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院 药学系, 河北 张家口 075000)

摘要: 为了调查张家口地区仔猪黄痢病例大肠杆菌的耐药性及流行血清型, 从发生仔猪黄痢的 20 个规模化猪场采集 90 份病料, 进行致病性大肠杆菌的分离及生化鉴定。腹腔接种小白鼠以鉴定分离菌的毒力, 采用玻板凝集试验和试管凝集试验鉴定分离菌 O 血清型, 并使用 16 种抗菌药对 50 株致病性大肠杆菌进行药敏试验。结果表明, 从 90 份病料中分离出 86 株大肠杆菌, 其中致病性大肠杆菌 79 株。79 株致病菌共有 10 种血清型, 其中 O8、O151、O149、O141 为优势血清型, 占能定型分离致病菌株的 61.1%。药敏试验结果显示, 头孢噻肟钠抑菌作用最强(94%), 其次为诺氟沙星(90%)、丁胺卡那霉素(82%)、新霉素(80%)。50 株大肠杆菌对 16 种抗菌药均有不同程度的耐药性, 对链霉素完全耐药, 其中 39 株为 5 耐以上的菌株, 占供试菌株的 78%。

关键词: 仔猪黄痢; 大肠杆菌; 血清型; 药敏试验

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)10-0142-04

Investigation on the Serotype and Antibiotic Resistance of *E. coli* Isolated from Piglet's Yellow Dysentery in Large-scale Pig Farms in Zhangjiakou

GU Xiao-long¹, LIU Hong-bin²

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Basic Medical College, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: In order to investigate the antibiotic resistance and predominant serotypes of *E. coli* of yellow dysentery, a total of 90 fecal samples were collected from 20 large-scale pig farms for isolation and identification of *E. coli*. The virulence of the isolates was tested in mice and the serotype was tested by the agglutination. Finally, a total of 86 *E. coli* isolates were obtained and 79 of them were tested to be pathogenic, among which 72 isolates were serotyped to belong to 10 kinds of serotypes and the predominant serotypes were O8, O151, O149 and O141. Among all the isolates, 50 isolates were resistant to 16 kinds of antibiotics to a greater or less degree. The highest resistance to streptomycin was 100%. The efficient antibiotics were cefotaxime sodium, norfloxacin, amikacin and neomycin, with the sensitive ratio of 94% (47/50), 90% (45/50), 82% (41/50), and 80% (40/50), respectively. All the 50 isolates showed resistance to more than 5 kinds of antibiotics.

Key words: yellow dysentery of newborn piglet; *E. coli*; serotype; drug sensitivity test

收稿日期: 2012-05-28

基金项目: 张家口市科技局项目(1012004C-2)

作者简介: 顾小龙(1976-), 男, 河北张家口人, 讲师, 硕士, 主要从事寄生虫分类及免疫防治方面的研究。

E-mail: bingli2006@126.com

仔猪黄痢是由产肠毒素大肠杆菌(*enterotoxigenic E. coli*, ETEC)引起的初生仔猪的一种急性、致死性传染病。患猪以排出黄色稀粪和急性死亡为特征,主要在生后数小时至 5 日龄以内仔猪中发病,以 1~3 日龄最为多见,1 周以上的仔猪很少发病^[1]。防治大肠杆菌病主要采用药物或疫苗接种,但大肠杆菌血清型多,各猪场的血清型种类不尽一致^[2-4],从而导致免疫效果不明显甚至无效。长期应用抗菌药物,病菌易产生耐药性^[5-7]。鉴于仔猪黄痢对养猪生产危害严重,且目前尚无对张家口地区该病主要血清型研究的报道,调查了张家口地区规模化猪场仔猪黄痢病原菌的主要血清型,并检测其耐药性,旨在为该地区有效防治仔猪黄痢提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 病料 从张家口市、宣化、涿鹿、沙城、张北等地 20 个规模化养猪场,采集黄痢仔猪的粪便或直肠拭子,或从发生黄痢后死亡猪肠道中刮取肠黏膜,共计 90 份。

1.1.2 主要试剂 16 种试验用药物由河北北方学院动物科技学院药理实验室提供,自制药敏片。16 种药物为:链霉素、红霉素、庆大霉素、四环素、哌拉西林、氨苄青霉素、壮观霉素、强力霉素、新霉素、利福平、头孢噻肟钠、复方新诺明、诺氟沙星、杆菌肽、丁胺卡那霉素、氟苯尼考。大肠杆菌生化鉴定管购自上海生工生物工程技术有限公司。大肠杆菌 O 因子血清(O1~O163)购自中国兽医药品监察所。

1.1.3 试验动物 昆明小白鼠(体质量 20~30 g, 586 只,公母各半),由河北北方学院实验动物中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 病原分离 将病料接种于麦康凯培养基,37℃下培养 24~48 h。挑取单个粉红色菌落分别接种于普通培养基、伊红美蓝培养基、SS 培养基,37℃下培养 24~48 h,挑取单个菌落涂片,革兰氏染色,显微镜下检查细菌形态和染色特点。

1.2.2 毒力鉴定 将分离株接种营养肉汤,37℃下培养 24 h,取培养物稀释至 10 亿个/mL,腹腔接种 4 只昆明小白鼠,0.1 mL/只;同时设 4 只对照鼠,每只对照鼠腹腔注射肉汤 0.1 mL。观察小白鼠发病及死亡情况。取病死鼠和对照鼠心血接种麦康凯培养基,37℃下培养 24~48 h 后涂片染色镜检。毒力判断标准:4 只小白鼠全部死亡判为强毒力,死亡 2~3 只判为中毒力,死亡 1 只判为低毒力,不致

死判为无毒力。

1.2.3 生化鉴定 取有毒力的菌株进行糖类发酵试验及生化反应。

1.2.4 O 型血清型鉴定 按试剂盒说明书进行。

1.2.5 药敏试验 挑选 50 株分离菌,采用纸片法药敏试验,判定标准:抑菌圈直径小于 10 mm 为耐药,10~15 mm 为中敏,大于 15 mm 为高敏。

2 结果与分析

2.1 分离菌培养特性

从 20 个猪场共分离细菌 90 株,其中 86 株菌在麦康凯平板上形成表面光滑、中等大小、红色、圆形的菌落;在普通培养基上形成光滑、圆形凸起、灰白色菌落;在 SS 平板上不生长;在伊红美蓝平板上形成金属光泽的菌落;革兰氏染色见红色、中等大小、钝圆、杆状细菌、单个或成对存在的菌体,符合大肠杆菌的特征。

2.2 分离菌毒力试验

将 86 份分离菌株接种小鼠,通过小白鼠毒力试验,获得 79 株致病性大肠杆菌,分离率达 91.9%(表 1)。将病死小白鼠的心血进行细菌分离培养,革兰氏染色,显微镜下检查细菌形态和染色特点,结果同 2.1。

表 1 分离菌毒力试验结果

毒力类型	菌株数/株	所占比例/%
无毒力	7	8.1
强毒力	23	26.7
中毒力	38	44.2
低毒力	18	20.9

2.3 分离菌生化试验结果

对 79 株致病性大肠杆菌进行 12 项生化试验,结果均符合大肠杆菌的特征(表 2),大多数分离菌能发酵各种碳水化合物,产酸又产气(H_2 和 CO_2);大多数分离菌发酵乳糖迟缓,不发酵的仅为少数;MR 试验全部为阳性;VP 试验全部为阴性;大部分分离菌不能分解尿素,不能产生硫化氢,不能利用柠檬酸盐。

2.4 血清型鉴定和优势血清型分析

在 79 个分离菌株中,2 株自凝,5 株菌未能定型,其余 72 株菌能定 O 型血清型,占分离菌株的 91.1%。定型菌株分布在 10 个血清型中,其中 O8、O151、O149 和 O141 4 种血清型占能定型菌株的 61.1%,定为张家口地区仔猪黄痢大肠杆菌的优势血清型(表 3)。

表 2 79 株分离菌生化试验结果

项目	阳性菌株数/株	阳性菌株率/%
葡萄糖	79	100
蔗糖	79	100
乳糖	73	92.4
麦芽糖	77	97.5
甘露醇	79	100
山梨醇	70	88.6
硫化氢	2	2.5
尿素	2	2.5
柠檬酸盐	0	0
三铁糖	76	96.2
VP 试验	0	0
MR 试验	79	100

表 3 72 株大肠杆菌血清型鉴定结果

血清型	菌株数/株	所占比例/%	来源猪场数/个
O8	14	19.4	11
O151	12	16.7	9
O149	9	12.5	5
O141	9	12.5	5
O54	6	8.3	3
O147	6	8.3	3
O60	5	6.9	3
O101	4	5.6	2
O138	4	4.2	3
O45	3	3.9	2

2.5 分离菌药敏试验结果

2.5.1 耐药谱 50 株大肠杆菌对 16 种抗生素的敏感性结果见图 1。全部受检菌株均表现不同程度的耐药性,5 重耐药以上菌株共有 42 株(84%),2~4 重耐药有 8 株(16%)。其中,8 重耐药菌株 9 株,所占比例最大(18%),其次为 10 重耐药、7 重耐药和 6 重耐药(分别占 14%、12%和 12%),12 重耐药菌有 2 株(4%)。

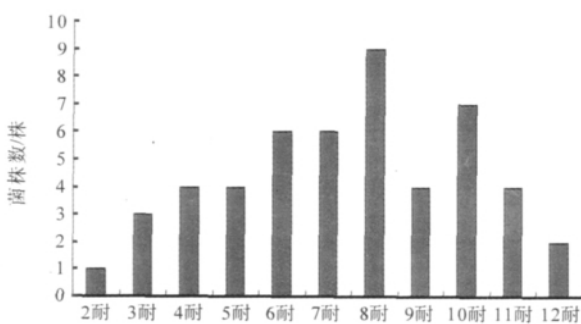


图 1 50 株大肠杆菌耐药谱

2.5.2 药敏试验 由表 4 可见,16 种抗生素中抑菌作用最强的为头孢噻肟钠,敏感菌株占 94%,其次为诺氟沙星(90%)、丁胺卡那霉素(82%)、新霉素(80%)。大肠杆菌对以下药物耐药:链霉素

(100%)、哌拉西林(92%)、氨苄青霉素(92%)、氟苯尼考(88%)、红霉素(80%)、四环素(74%)、庆大霉素(66%)、利福平(64%)。

表 4 50 株大肠杆菌对 16 种抗菌药的敏感率 %

药品名称	高敏	中敏	耐药
哌拉西林	0	8(4/50)	92(46/50)
链霉素	0	0	100(50/50)
庆大霉素	2(1/50)	32(16/50)	66(33/50)
红霉素	0	20(10/50)	80(40/50)
四环素	0	26(13/50)	74(37/50)
氨苄青霉素	0	8(4/50)	92(46/50)
壮观霉素	2(1/50)	60(30/50)	38(19/50)
强力霉素	6(3/50)	62(31/50)	32(16/50)
新霉素	70(35/50)	10(5/50)	20(10/50)
利福平	4(2/50)	32(16/50)	64(32/50)
头孢噻肟钠	90(45/50)	4(2/50)	6(3/50)
复方新诺明	12(6/50)	58(29/50)	30(15/50)
诺氟沙星	82(41/50)	8(4/50)	10(5/50)
杆菌肽	6(3/50)	66(33/50)	28(14/50)
丁胺卡那霉素	74(37/50)	8(4/50)	18(9/50)
氟苯尼考	0	12(6/50)	88(44/50)

3 讨论

本次调查中,共分离到 79 株致仔猪黄痢大肠杆菌,以 O8、O151、O149 和 O141 血清型为主,占已定型菌株的 61.1%,同时这些血清型来源的猪场也较多,代表了目前张家口规模化猪场仔猪黄痢大肠杆菌流行的主要血清型。从国内报道的各地区猪源致病性大肠杆菌 O 血清型来看,各省市的流行血清型有较大差别,存在多样性、地区性,且同一地区不同猪场的流行血清型可能有所不同,同一个猪场可能存在许多种血清型。王秀梅等^[2]调查的优势血清型为 O8、O54、O64 和 O119。田国宝等^[8]调查的优势血清型为 O20、O60、O98、O141、O138、O8、O139。比较北京、上海、重庆、广东、广西、四川、黑龙江、山东、江苏、福建、浙江、河南、辽宁、山东、安徽等地区报道的血清型^[2-5,8-12],除都有 O8 外,其他血清型差异较大。本次调查结果说明,张家口地区仔猪黄痢大肠杆菌的血清型有自己的特点。

对于仔猪黄痢的防治,常采用疫苗接种或使用抗菌药物,但大肠杆菌血清型多,不同地区猪场的优势血清型不同,有必要确定各地区甚至某个猪场致病性大肠杆菌的血清型,从而选用与该场血清型相同的疫苗进行接种,避免免疫失败的发生。使用抗菌药仍然是目前防制仔猪黄痢的主要方法,但由于抗菌药的严重滥用,导致耐药菌株越来越多,由于细菌的耐药性能通过质粒或染色体介导 (下转第 152 页)

参考文献:

- [1] Kitching R P. Foot-and-mouth disease; current world situation[J]. Vaccine, 1999, 17: 1772-1774.
- [2] 杨苏珍, 李清州, 张改平, 等. 口蹄疫诊断技术研究进展[J]. 河南农业科学, 2009(10): 36-38.
- [3] 倪卫忠, 孙泉云. 动物对口蹄疫病毒的免疫应答及口蹄疫疫苗的质量评估[J]. 现代农业科技, 2008(16): 273-274.
- [4] 杨苏珍, 张改平, 鲍登克, 等. O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白的原核表达及功能鉴定[J]. 华北农学报, 2009, 24(6): 11-14.
- [5] 刘颖, 冉多良, 马扬. 正向间接血凝试验监测家畜 O 型口蹄疫抗体[J]. 现代农业科技, 2007(19): 181-182.
- [6] 韩惠瑛, 师汇, 左光明. 口蹄疫流行原因分析与我国防控措施[J]. 山西农业科学, 2007, 35(3): 76-78.
- [7] Paek S H, Lee S H, Cho J H, *et al.* Development of rapid one-step immunochroma-tographic assay [J]. Methods, 2000, 22(1): 53-60.
- [8] 刘新生, 王永录. 口蹄疫病毒株 AF/72 结构蛋白 VP1 克隆及其 T 细胞表位预测[J]. 华北农学报, 2010, 25

(5): 28-32.

- [9] 莫丽娜, 肖开鹏, 张运, 吴殿军. 口蹄疫的防控[J]. 现代农业科技, 2009(16): 315-316.
- [10] 丁伯良, 马吉飞, 李志荣. 天津市养殖小区动物防疫问题的调查报告[J]. 天津农业科学, 2007, 13(3): 1-4.
- [11] 袁丽, 郭凤英. 春季猪口蹄疫病的发生与防治[J]. 现代农业科技, 2011(5): 347-348.
- [12] 刘加邦, 律秀岩, 吴金柱, 等. 预防奶牛口蹄疫流行的具体措施[J]. 天津农业科学, 1999, 5(4): 30-31.
- [13] 帅起义. 微生态制剂对猪免疫应答及生长性能的影响[J]. 山西农业科学, 2011, 39(11): 1210-1212.
- [14] Chenard G, Miedema K, Moonen P, *et al.* A solid-phase blocking ELISA for detection of type O foot-and-mouth disease virus antibodies suitable for mass serology[J]. J Virol Met, 2003, 107: 89-98.
- [15] Araujo J P, Montassier H J, Pinto A A. Liquid-phase blocking sandwich enzyme linked immunosorbent assay for detect ion of antibodies against foot and mouth disease virus in water buffaloesera[J]. Am J Ve Res, 1996, 57(6): 840-843.

(上接第 144 页) 在细菌间互相传播和扩散^[6], 细菌的多重耐药相当普遍, 导致抗菌药治疗效果差。本次调查发现, 50 株大肠杆菌对 16 种药物的敏感率存在较大差异, 且不同猪场大肠杆菌的耐药谱不同, 表明仔猪黄痢大肠杆菌存在广泛的耐药性, 且以多重耐药为主, 这与其他地区的报道结果一致^[2-3, 5, 7, 13]。在治疗仔猪黄痢时, 建议猪场最好结合药敏试验筛选敏感药物进行治疗。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 215-217.
- [2] 王秀梅, 蒋红霞, 廖晓萍, 等. 猪源致病性大肠杆菌的血清型、毒力基因及抗菌药耐药性的调查[J]. 中国农业科学, 2010, 43(19): 4109-4115.
- [3] 秦四海, 段晓玲. 规模化养猪场仔猪黄痢病原菌血清型检测及其药敏试验[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(10): 43-47.
- [4] 孙广力, 孙刚, 李书华, 等. 黑龙江省规模化养猪场大肠杆菌病血清型流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004(7): 90-91.
- [5] 刘梦元, 吴斌, 刘建杰, 等. 规模化猪场大肠杆菌的耐药

性监测及血清流行病学调查[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 16-18.

- [6] 雷连成, 江文正, 韩文瑜, 等. 致病性大肠杆菌的耐药性监测[J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(1): 12-13.
- [7] 曹翠萍, 宁海强, 孙丽, 等. 中药对大肠杆菌抑制作用及耐药性诱导作用的研究[J]. 西南农业学报, 2007, 20(5): 1101-1104.
- [8] 田国宝, 王红宁, 黄勇, 等. 规模化猪场大肠杆菌耐药性和血清型变化趋势[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(10): 31-33.
- [9] 王红琳, 熊忠良, 周绍凤, 等. 湖北省仔猪致病性大肠杆菌血清型鉴定[J]. 动物医学进展, 2002, 23(3): 68-69.
- [10] 陈一兵, 苗晓青, 高崧, 等. 猪腹泻病例分离大肠杆菌的血清型分布[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(9): 36-38.
- [11] 傅彩霞, 郑瑞峰, 郭峰, 等. 北京部分地区仔猪大肠杆菌病血清型调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(3): 79-80.
- [12] 谢永平, 杨威, 陈泽祥, 等. 广西地区猪大肠杆菌血清型调查及耐药性检测[J]. 广西农业科学, 2010, 41(4): 380-382.
- [13] 王自然. 中药组方对猪大肠杆菌病的抑菌及临床治疗试验[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(2): 33-34.