

猪肠外致病性大肠杆菌的分离鉴定和药敏试验

徐引弟, 王治方, 朱文豪, 梁 跃, 郭成留
(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 从 2006—2009 年河南省发生猪高热综合征的 168 家规模化猪场 456 份病料中, 分离出粗大的革兰氏阴性杆菌, 通过培养特性试验、生化试验和 PCR 试验, 鉴定出了 149 株猪肠外致病性大肠杆菌。对分离菌进行小鼠毒力试验、血清分型及药敏试验, 结果显示, 所分离肠外致病性大肠杆菌对小鼠均有毒力, 以 O11、O161、O8、O138、O9、O101 及 O26 最为流行, 对头孢噻肟、头孢他啶、头孢哌酮、阿米卡星、头孢唑啉敏感。

关键词: 猪肠外致病性大肠杆菌; 分离; 鉴定; 药敏试验

中图分类号: S852.61⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)01-0150-04

Isolation, Identification and Drug Susceptibility of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*

XU Yir di, WANG Zhi fang, ZHU Wen hao, LIANG Yue, GUO Cheng liu
(Institute for Animal Husbandry and Veterinary Research, Henan Academy of
Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Gram negative big bacilli were isolated from 456 samples of 168 farms in Henan province which had high fever syndrome from 2006 to 2009. These strains were identified based on culture characteristics, biochemical and PCR assay. The results showed that there were a total of 149 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains. Mice virulence, serum type and drug susceptibility test results showed that these ExPEC strains were lethal to mice, among which O11, O161, O8, O138, O9, O101, and O26 were the most popular serum types. These strains were sensitive to cefotaxime, ceftazidime, cefoperazone, amikacin, and cefazolin.

Key words: ExPEC; Isolation; Identification; Drug susceptibility

大肠杆菌是一类广泛存在于自然界, 并能引起人和动物共同感染的重要人畜共患病病原。依其致病机制可分为 3 类: 共生型、肠内致病型和肠外致病型。根据猪的日龄、生理与免疫状况等差异, 疾病的发生有所不同, 常见的猪大肠杆菌病分为 3 种, 仔猪黄痢、仔猪白痢和猪水肿病, 目前这些疫病的发病机制与危害已被人们广泛认识^[1]。近几年, 北美和欧洲许多学者相继报道了一类危害严重, 可特定定居于宿主肠道外其他组织, 并严重致病的一类新的大肠杆菌菌群——肠外致病性大肠杆菌(extraintestir

nal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)。肠外致病性大肠杆菌是一类能引起人和动物肠外组织感染的重要人畜共患病病原, 可致使不同宿主发生脑膜炎、败血症、泌尿道感染和呼吸道感染。该病每年给全球公共医疗业造成巨大的财政支出, 已引起全世界的广泛关注^[1-6]。2006 年 6 月以来我国爆发的高热综合征给养猪业造成了巨大经济损失。高热综合征主要由高致病性猪呼吸与繁殖综合征引起, 同时有圆环病毒 2 型、猪瘟病毒、猪流感病毒、伪狂犬病毒的感染, 细菌性病原如猪链球菌、大肠杆菌、副猪

收稿日期: 2010-06-18

基金项目: 河南省科技攻关项目(072102140004); 河南省农业科学院孵化项目(200712)

作者简介: 徐引弟(1974), 女, 湖北浠水人, 副研究员, 博士, 主要从事动物病原微生物研究。

E-mail: xyd1206@tom.com

嗜血杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌等继发感染和混合感染。其中大肠杆菌是分离频率较高的病原,在高热综合征中起一定作用^[7-11]。鉴此,本试验对河南省规模化猪场猪肠外致病性大肠杆菌进行分离鉴定和药敏试验,为预防和控制该病的流行提供依据。

1 材料和方法

1.1 病料

2006年9-12月,从河南省发生高热综合征的168个猪场共采集病猪的肺、心血、脑、脾脏、淋巴结等共456份病料。

1.2 主要试剂及仪器

TSA (tryptic soy agar)、TSB (tryptic soy broth) 购自Difco公司。麦康凯(MC)琼脂、三糖铁(TSI)琼脂、革兰氏染色液购自郑州理利生物公司。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。*Taq* DNA聚合酶、dNTPs、DL2000 DNA Marker 均购自宝生物(大连)有限公司。O血清因子购自中国兽医药品监察所。VITEK全自动微生物分析系统为法国bioMerieux公司产品。凝胶成像系统、电泳仪均为Biorad公司产品。PCR扩增仪为Touchgene公司产品。CO₂培养箱、超低温冰箱均为RESCO产品。E200-F三目生物显微镜为Nikon公司产品。

1.3 分离鉴定

1.3.1 分离纯化 将病料接种于MC培养基,置于5%的二氧化碳培养箱,37℃培养过夜,挑取圆形、不透明、直径2~3mm的粉红色可疑菌落。取上述菌落抹片革兰氏染色后在显微镜下观察,挑取革兰氏阴性粗大杆菌菌落于MC纯化。

1.3.2 生化试验 将可疑菌落做TSI、氧化酶试验后,接种VITEK全自动微生物分析系统,进行GNI鉴定。

1.3.3 PCR鉴定 将上述初步鉴定的细菌进一步用PCR方法确定。用接种环取少许被检菌落于100μL无菌PBS中,混匀,取1μL菌悬液作PCR模板。参照文献^[12],根据大肠杆菌*uidA*基因(NO. CP00468)序列设计引物, P1: 5'-ATGAAAGCTG-GCTACAGGAAGGCG-3', P2: 5'-GGTTTATG-CAGCAACGAGACGTCA-3', 扩增片段大小为264bp, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。反应体系(50μL): 10×缓冲液5μL, 2mmol/L dNTPs 1μL, 10μmol/L上下游引物各1μL, *Taq*酶1μL, 模板1μL, 灭菌ddH₂O 40μL。反应条件: 94℃变性4min; 94℃ 1min, 59℃ 1min, 72℃ 30s, 共35个循环; 最后72℃延伸10min。

PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶进行电泳, PCR产物回收后测序。

1.3.4 小鼠毒力试验 将分离菌株接种TSB培养基, 37℃ 250r/min振摇培养12h。用生理盐水稀释菌数约为10⁹ cfu/mL, 腹腔注射小白鼠0.2mL; 同时设生理盐水阴性对照。接种后观察发病及死亡情况, 剖检小白鼠, 无菌取其心血分离细菌并鉴定。

1.4 血清分型

按大肠杆菌属诊断血清使用说明书进行, 取分离鉴定好的菌落接种麦康凯琼脂, 37℃培养18~24h, 于洁净玻片上滴10μL O因子血清, 取少量菌苔与血清混匀, 轻轻摇动玻片, 2min内呈现明显凝集者为阳性, 呈均匀混浊者为阴性。阳性时以生理盐水作对照试验。

1.5 药敏试验

将分离鉴定好的菌接种于TSA平板, 涂匀, 选取相应的抗生素的药敏纸片贴于培养基上。于37℃含5%的CO₂培养箱, 培养12h, 测量抑菌环直径并判定结果。

2 结果与分析

2.1 分离鉴定试验结果

2.1.1 培养特性与镜检 分离的细菌在TSA培养基上培养12h, 长成直径2~3mm不透明黄色菌落, 在MC培养基上培养12h, 长成直径2~3mm不透明粉红色菌落(图1)。革兰氏染色均为阴性短粗杆菌或粗大长杆菌, 多散在(图2A), 有的呈短的球杆状, 部分呈长链状(图2B)。

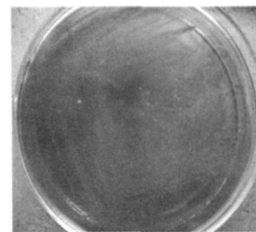


图1 猪肠外致病性大肠杆菌菌落形态

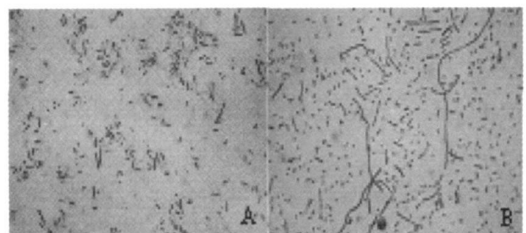
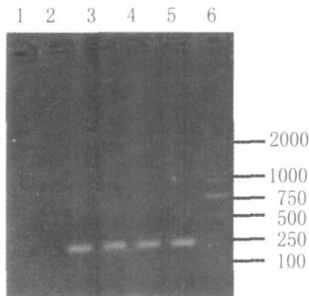


图2 猪肠外致病性大肠杆菌菌体形态

2.1.2 生化试验结果 TSI 试验为 A/A, 氧化酶试验阴性, VITEK 全自动微生物分析系统生化试验结果表明, 分离的可疑菌符合猪大肠杆菌的生化特征。

2.1.3 PCR 鉴定结果 对上述经鉴定的可疑菌进行猪大肠杆菌的 PCR 鉴定, 产物经琼脂糖凝胶电泳, 证实大小均与预期大小一致(图 3)。PCR 产物测序结果表明, 上述菌落分别与猪大肠杆菌 *uidA* 基因(NO. CP00468)序列 100% 同源(序列略)。综合以上鉴定结果, 共鉴定出猪肠外致病性大肠杆菌 149 株, 其中分离自肺 123 株, 心血 25 株, 1 株分离自脑。



M. DL2000; 1. H₂O; 2-5. 猪肠外致病性大肠杆菌

图 3 猪肠外致病性大肠杆菌 PCR 扩增结果

2.1.4 小鼠毒力试验结果 将分离的细菌接种小鼠, 接种小鼠 24 h 内死亡, 取死亡鼠心血接种 MC 琼脂平皿。结果分离出与以上一致的纯的细菌, 证明为猪肠外致病性大肠杆菌并对小鼠有致病性。

2.2 血清分型试验结果

血清分型显示, 149 株猪肠外致病性大肠杆菌中, 27 株 O11, 22 株 O161, 21 株 O8, 19 株 O138, 16 株 O9, 15 株 O101, 12 株 O26, 3 株 O45, 2 株 O139, 2 株 O157, 2 株 O141, 2 株 O140, 2 株 O78, 1 株 O60, 1 株 O147, 1 株 O147, 1 株 O64。分型试验表明, 猪肠外致病性大肠杆菌以 O11、O161、O8、O138、O9、O101、O26 最为流行。这些流行血清型在河南省不同区域均能分离到, 区域性不明显。

2.3 药物敏感试验结果

从药物敏感试验结果看, 绝大部分猪肠外致病性大肠杆菌对头孢噻肟、头孢他啶、头孢哌酮、阿米卡星、头孢唑啉高度敏感。部分猪肠外致病性大肠杆菌对环丙沙星、氯霉素、强力霉素、氨苄西林敏感。大部分猪肠外致病性大肠杆菌对万古霉素、新霉素、阿莫西林、克林霉素、庆大霉素、复方新诺明、痢特灵、四环素、链霉素等耐药(表 1)。

表 1 18 种抗菌素对 149 株猪肠外致病性大肠杆菌的抗药谱

				株			
药物	高敏	中敏	耐药	药物	高敏	中敏	耐药
头孢噻肟	147	2	0	万古霉素	30	30	89
头孢他啶	145	4	0	新霉素	28	23	98
头孢哌酮	140	8	1	阿莫西林	25	22	102
阿米卡星	130	15	4	克林霉素	17	17	115
头孢唑啉	108	15	26	庆大霉素	17	16	116
环丙沙星	82	33	34	复方新诺明	15	8	127
氯霉素	72	35	42	痢特灵	15	6	128
强力霉素	63	40	46	四环素	14	6	129
氨苄西林	58	42	49	链霉素	12	6	131

3 讨论

本试验从河南省发生高热综合征的 168 家猪场共采集的 456 份病料中, 分离到肠外致病性大肠杆菌 149 株, 大部分猪场能分离到 ExPEC, ExPEC 在高热综合征的细菌性病原中占绝大部分, 同一家猪场的同一头猪的不同部位(肺、心、淋巴结、脾等)能同时分离出 ExPEC, 猪场长年都能分离到这种病菌, 从大小、品种不同的猪体内都能分离到不同血清型的 ExPEC。可见猪 ExPEC 流行广, 病原复杂。另外, 以 1 例有神经症状的病猪脑中分离出猪 ExPEC, 说明猪 ExPEC 可引起神经症状。同时在分离过程中发现, ExPEC 几乎没有单独感染, 以与链球

菌、副猪嗜血杆菌、巴氏杆菌、波氏杆菌、沙门氏菌等其他细菌混合感染为主, 这与国内的几篇报道一致^[13-15]。

传统意义上大肠杆菌主要引起猪特别是小猪肠道的病变, 主要包括仔猪的黄白痢和水肿病, 但是在本研究中的病例主要是高热、呼吸困难、发绀等症状, 从非肠道的脏器如肺、心血、脾、淋巴结, 甚至脑中分离到大量的大肠杆菌, 这些大肠杆菌对小鼠都有很强的致病性。由于未对猪做攻毒试验, 所以这些肠外致病性大肠杆菌对猪的致病性及在高热综合征中所起的作用尚不能确定。但宁宜宝等指出, 大肠杆菌在高热综合征的发病过程中只起协同诱发作用^[8]。本试验分离的 ExPEC 除毒力与传统的大肠

杆菌有差异外,形态、培养特征等也有较大差异,大部分为革兰氏阴性直杆菌,大小 $(0.4\sim 0.7)\mu\text{m}\times(2\sim 3)\mu\text{m}$,散在或成对存在,但有部分呈粗长的长链状,有的呈短粗球杆状,也有近似大的球状。分离自脑的大肠杆菌在麦康凯上生长较差,呈个体极小、颜色极浅的淡红色针尖状小菌落,菌体近似球状,经生化及 PCR 鉴定均为大肠杆菌。由于只进行了小鼠的致死试验,而没有测定每一株细菌的半数致死量,因此每株细菌的毒力差异及与血清型关系无法确定。

猪 ExPEC 在高热综合征中分离比例极高,毒力比传统大肠杆菌更强,肠道致病型大肠杆菌的血清型在猪 ExPEC 中也广泛存在,O8、O11、O101、O161 在人、牛肠外感染的血清型中也是优势血清型^[16]。细菌耐药性试验结果表明,猪 ExPEC 耐药性明显高于其他菌群,大多属多重耐药菌株,许多已演化成超级细菌,较难选择有效抗生素对该类菌群引起的疾病进行防控,耐药试验结果与文献[14]报道的近似。

参考文献:

- [1] Antao E M, Wieler L H, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* [J]. Gut Pathog, 2009, 10(1): 1-12.
- [2] Martinez Medina M, Mora A, Blanco M, et al. Similarity and divergence among adherent/invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 3968-3979.
- [3] Dobrindt U, Hacker J. Targeting virulence traits: potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections [J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(5): 409-413.
- [4] Schierack P, Walk N, Ewers C, et al. ExPEC typical virulence associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group [J]. Environ Microbiol, 2008, 10(7): 1742-1751.
- [5] Smith J L, Fratamico P M, Gunther N W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* [J]. Foodborne Pathog Dis, 2007, 4(2): 134-163.
- [6] Johnson J R, Russo T A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: the other bad *E. coli* [J]. J Lab Clin Med, 2002, 139(3): 155-162.
- [7] 杨汉春. 猪高热综合征的发生与流行概况 [J]. 猪业科学, 2007(1): 78-80.
- [8] 宁宜宝, 郑杰, 张纯萍, 等. 我国南方猪高热病的研究 (I)——大肠杆菌的分离、鉴定和致病性测定 [J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(12): 1-4.
- [9] 宁宜宝, 郑杰, 张纯萍, 等. 我国南方猪高热病的研究 (II)——猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒的分离、鉴定和致病性测定 [J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(1): 14-18.
- [10] Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. PLoS ONE, 2007, 13(6): 526-539.
- [11] Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(9): 1434-1436.
- [12] Bej A K, McCarty S C, Atlas R M. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(8): 2429-2432.
- [13] 喻正军, 何启盖, 吴斌. 浅谈 2009 年“高热病” [J]. 北方牧业, 2009(10): 16.
- [14] 张璇, 汤细彪, 吴斌, 等. 肠外致病性大肠埃希菌多重耐药性及氨基糖苷类耐药基因分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(8): 498-504.
- [15] 赵战勤, 裴洁, 薛云, 等. 猪源支气管败血波氏杆菌的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 4209-4217.
- [16] Girardeau J P, Lalioui L, Said A M, et al. Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa8* operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1): 218-226.