

河南地区猪源性大肠杆菌血清型鉴定与耐药性调查

王克领,张青娴,徐引弟,郎利敏,张立宪,李海利,
朱文豪,游 一,郑万录

(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所,河南 郑州 450002)

摘要: 为了解河南省规模化猪场大肠杆菌的流行概况,无菌采集疑似大肠杆菌感染的病死猪病料 185 份,经常规细菌培养、生化试验及致病性试验,分离到 86 株大肠杆菌;对分离菌株进行血清型鉴定,确定了 67 株大肠杆菌血清型,分属 15 个血清型,主要以 O8、O9、O161、O107 为主。测定了已鉴定血清型的 67 株大肠杆菌对 15 种常用抗菌药物的耐药性,结果显示,对阿米卡星、黏菌素、头孢曲松钠、头孢噻唑敏感率高的菌株较多;对环丙沙星、多西环素、阿莫西林、四环素、磺胺甲恶唑耐药的菌株达 80% 以上,对四环素和磺胺甲恶唑耐药的菌株比例最高,分别为 88.1%、89.6%;67 株菌株均表现不同程度的多重耐药,每种菌株至少对 3 种受试药物耐药,53.7% 的菌株对 9 种以上药物耐药。表明河南地区的猪源大肠杆菌耐药现象严重,耐药谱广。

关键词: 河南地区;猪大肠杆菌;血清型;耐药性

中图分类号: S855.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)09-0164-04

Serotype Identification and Drug Resistance Investigation of Swine *Escherichia coli* in Henan Area

WANG Ke-ling, ZHANG Qing-xian, XU Yin-di, LANG Li-min, ZHANG Li-xian,
LI Hai-li, ZHU Wen-hao, YOU Yi, ZHENG Wan-lu

(Institute for Animal Husbandry and Veterinary Research, Henan Academy of Agricultural Sciences,
Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to understand the *Escherichia coli* epidemiological situation in scale pig farms of Henan province, 185 strains were collected from sick and death swine which were suspected *Escherichia coli* infection. Eighty-six strains of *Escherichia coli* were isolated from those samples after conventional bacterial culture, serotype identification and lethal test, and serotype of 67 strains were identified. The identified bacteria belonged to 15 kinds of serotype distributed, which were mainly O8, O9, O161, O107. The 67 identified strains drug sensitivity were tested to 15 kinds of drugs. The results showed that most of the identified bacteria were sensitive to Amikacin, Colistin, Ceftriaxone, Ceftiofur. Eighty percent of identified bacteria was resistant to Ciprofloxacin, doxycycline, amoxicillin, tetracycline, sulfamethoxazole. These identified strains showed the highest resistant to tetracycline and sulfamethoxazole, which were 88.1% and 89.6%, respectively. The 67 identified strains were all multi-drug resistant in some degree. Isolated strains could resist at least 3 kinds of commonly used antibiotics. Fifty-three point seven percent strains were resistant to 9 kinds of drug. This study showed that the *Escherichia coli* resistant situation was serious and the resistance showed a broad spectrum in Henan province.

Key words: Henan area; *Escherichia coli*; serotype; drug resistance

收稿日期: 2014-05-10

基金项目: 河南省农业科学院科研发展专项资金项目(20137917)

作者简介: 王克领(1964-), 男, 河南柘城人, 副研究员, 本科, 主要从事兽医传染病防控研究工作。E-mail: ybzdzx@tom.com

猪大肠杆菌病是养猪生产中常见的一种细菌性传染病,是由致病性大肠杆菌引起的一类疾病的总称,临床上主要表现为仔猪黄痢、仔猪白痢和猪水肿病,具有较高的发病率和死亡率^[1]。仔猪黄痢常发生于仔猪出生后1周以内,以0~4日龄最常见,仔猪发病率90%以上,死亡率很高,甚至全窝死亡。仔猪白痢发生于10~30日龄仔猪,以2~3周龄较多见,发病率约50%。仔猪黄白痢是四季常发传染病,夏季发病率更高。

大肠杆菌的血清型众多,目前,已有173个O抗原、80个K抗原、56个H抗原及20多个F抗原被正式鉴定。由于大肠杆菌血清型极其复杂,抗原具有多样性,以及不同血清型间缺乏有效的交叉免疫保护,目前尚缺乏有效的疫苗防治该病,临床上主要使用抗生素类药物防治。长期使用或滥用抗菌药物可导致大肠杆菌在抗生素压力下发生变异和进化以适应环境,其抗药性日益增强,多重耐药性问题日益突出,导致抗菌药物治疗往往无效,在一定程度上促使本病的流行和发病率逐年上升,给养猪业造成了巨大的经济损失,而且大量的药物残留对食品安全及人类健康造成了极大的威胁。

了解猪场大肠杆菌的流行状况、主要血清型及耐药情况是防治该病的前提。鉴于此,2011—2013年从河南省各地规模化猪场采集疑似大肠杆菌病仔猪病料185份,进行了大肠杆菌的分离鉴定,并对分离到的菌株进行鉴定和耐药性检测,以期对河南省猪大肠杆菌病的综合防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试动物

体质量18~22 g小鼠,雌雄各半,购自郑州大学医学院。

1.2 主要试剂及材料

葡萄糖、乳糖等生化反应管和抗生素药敏片购自杭州天和微生物试剂有限公司;O抗原购自中国兽医药品检验所;麦康凯、伊红美兰琼脂培养基购自郑州华硕公司;细菌生化微量发酵管购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2011—2013年从河南省规模化养殖场疑似大肠杆菌病死猪中无菌采集直肠拭子或剖检猪的胃内容物样品185份。

1.3 细菌分离及纯培养

将无菌采集的185份疑似病猪直肠拭子或者胃内容物样品分别接种于麦康凯琼脂培养基上,置恒

温箱中37℃培养24 h,挑取玫红色、光滑半透明、中等大小的菌落涂片进行革兰氏染色,镜检。将疑似为大肠杆菌的革兰氏阴性杆菌进行纯化培养,分别接种于麦康凯琼脂培养基和伊红美兰琼脂培养基,培养16~18 h,观察其菌落形态和培养基颜色的变化。

1.4 细菌鉴定

1.4.1 生化试验 将纯化培养的疑似大肠杆菌菌株接种至生化微量发酵管中,37℃培养2~3 d,观察其变化^[2-3]。

1.4.2 致病性试验 各菌株分别接种营养肉汤,37℃培养16~18 h,取纯培养物0.2~0.4 mL,腹腔注射接种小白鼠,每株大肠杆菌接种3只小白鼠,同时用无菌营养肉汤接种3只小白鼠作为对照组。注射后24~48 h,对照组不发病、试验组死亡的菌株即为致病菌株。

1.5 细菌血清型鉴定

参考宋立等^[4]的O抗原鉴定方法,对分离到的大肠杆菌进行血清型鉴定,调查所有菌株在与大肠杆菌病相关的23个O血清型中的分布。

1.6 细菌耐药性试验

测定分离菌株对常用的15种抗菌药物(阿米卡星、诺氟沙星、环丙沙星、氨苄西林、庆大霉素、卡那霉素、多西环素、黏菌素、阿莫西林、四环素、新霉素、链霉素、磺胺甲恶唑、头孢噻唑、头孢曲松钠)的耐药性。取活化培养后的分离菌株接种于2 mL营养肉汤中,37℃恒温摇床培养约6 h,将菌液用灭菌生理盐水稀释至 10^8 cfu/mL,用无菌棉拭子均匀涂布于琼脂平皿,室温放置20 min后,无菌条件下将药敏片紧贴于平板上,37℃培养16~18 h,观察结果并用游标卡尺测量抑菌圈直径大小,判定菌株对每种抗菌药物的敏感性。

2 结果与分析

2.1 细菌培养特性

将纯化培养后的待检大肠杆菌菌株分别接种于麦康凯琼脂培养基和伊红美兰琼脂培养基上培养16~18 h,在麦康凯培养基上出现玫红色、圆形、光滑、湿润且稍微凸起的菌落,且在伊红美兰培养基上出现黑色带金属闪光的菌落,即可判定为大肠杆菌。

2.2 细菌鉴定结果

2.2.1 生化试验结果 对分离到的86株病原菌进行生化试验,结果表明,分离菌株均能发酵葡萄糖、乳糖和蔗糖,三糖铁试验的结果显示底层产酸变黄,

能使甘露醇、麦芽糖产酸产气,不能发酵肌糖、木糖,明胶液化试验、氧化酶试验、尿素酶试验均呈阴性,过氧化氢酶试验阳性。以上生化特性均符合肠杆菌科细菌的特征,表明分离的菌株为大肠杆菌。

2.2.2 致病性试验结果 将分离的 86 株大肠杆菌经腹腔注射小白鼠后,48 h 内均死亡。对照组小白鼠均存活。剖检死亡小白鼠可见肝脏肿大、质地脆硬、心包膜增厚。取肝脏涂片镜检,可见到典型的大肠杆菌存在,表明分离的 86 株大肠杆菌均为致病菌株。

2.3 血清型鉴定

由表 1 可知,对分离鉴定的 86 株大肠杆菌进行血清型鉴定,共鉴定出 67 株分离株的血清型,分别属于 15 个不同的血清型:O4、O8、O9、O20、O45、O64、O73、O101、O107、O138、O139、O141、O147、O149、O161,其中 O8、O9、O161 和 O107 为主要的血清型。

表 1 河南地区猪源性大肠杆菌分离株血清型鉴定

血清型	菌株数/株	比例/%
O4	3	3.5
O8	8	9.3
O9	7	8.1
O20	4	4.7
O45	5	5.8
O64	4	4.7
O73	2	2.3
O101	3	3.5
O107	6	7.0
O138	3	3.5
O139	5	5.8
O141	3	3.5
O147	4	4.7
O149	3	3.5
O161	7	8.1
未定型	19	22.1

2.4 耐药性的检测结果

由表 2 可知,本试验分离鉴定出血清型的 67 株菌株中,对阿米卡星、黏菌素、头孢曲松钠、头孢噻唑

表 2 抗菌药物对分离的 67 株大肠杆菌耐药性试验

抗菌药物	高度敏感		中度敏感		耐药	
	菌株数/株	占分离菌株比例/%	菌株数/株	占分离菌株比例/%	菌株数/株	占分离菌株比例/%
阿米卡星	57	85.1	4	6.0	6	9.0
诺氟沙星	12	17.9	6	9.0	49	73.1
环丙沙星	11	16.4	2	3.0	54	80.6
氨苄西林	8	11.9	9	13.4	50	74.6
庆大霉素	18	26.9	2	3.0	47	70.1
卡那霉素	33	49.3	16	23.9	18	26.9
多西环素	7	10.4	4	6.0	56	83.6
黏菌素	61	91.0	3	4.5	3	4.5
阿莫西林	8	11.9	4	6.0	55	82.1
四环素	2	3.0	6	9.0	59	88.1
新霉素	14	20.9	17	25.4	36	53.7
链霉素	9	13.4	5	7.5	53	79.1
磺胺甲恶唑	6	9.0	1	1.5	60	89.6
头孢噻唑	58	86.6	5	7.5	4	6.0
头孢曲松钠	57	85.1	4	6.0	6	9.0

敏感率高的菌株较多,高度敏感菌株比例分别为 85.1%、91.0%、85.1%、86.6%;对诺氟沙星、环丙沙星、氨苄西林、庆大霉素、多西环素、阿莫西林、四环素、链霉素、磺胺甲恶唑耐药的菌株均达 70% 以上,其中对环丙沙星、多西环素、阿莫西林、四环素、磺胺甲恶唑耐药的菌株达 80% 以上,对四环素和磺胺甲恶唑耐药的菌株最多,耐药菌株比例分别为 88.1%、89.6%;对氟喹诺酮类抗菌药物耐药的菌株也较多,其中对环丙沙星、诺氟沙星耐药的菌株比例

分别为 80.6% 和 73.1%。

67 株菌株均表现不同程度的多重耐药(图 1)。每种菌株至少对 3 种受试药物耐药,53.731% 的菌株对 9 种以上药物耐药,最高可耐受 12 种药物。这与国内大多数猪场大肠杆菌的耐药性结果基本一致^[5-9],并且耐药菌株的比例更高,呈现耐药性逐渐增强的现象。部分分离株对大肠杆菌常用敏感药庆大霉素、氨苄西林耐药,说明分离株的耐药谱有所扩大,这也是猪源大肠杆菌近年来出现的新变化,值得重视。

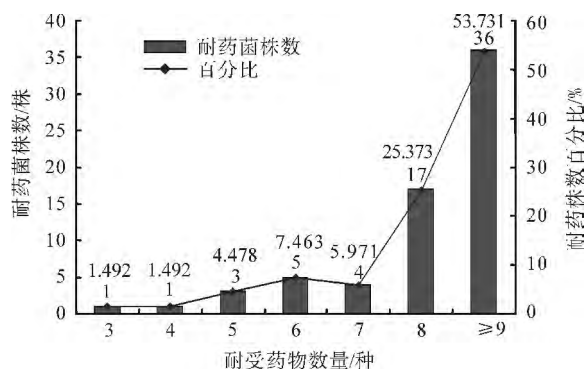


图1 河南省规模化猪场大肠杆菌的多重耐药性

3 结论与讨论

3.1 河南地区规模化猪场猪大肠杆菌血清型特点

研究表明,不同地区流行的大肠杆菌的血清型有一定的差异,如华东地区大肠杆菌血清型以O107、O101、O20、O93、O11、O6、O99、O15、O18等血清型为主,湖北分离株以O107、O101、O93、O9、O139、O141、O157等为主,重庆分离株以O1、O2、O8、O9、O141、O149等血清型为主^[4,10-13,14-15]。本试验结果显示,河南地区规模化猪场大肠杆菌的优势血清型为O8、O9、O161和O107,这与国内多数地区猪源性大肠杆菌的血清型存在着一定的差异。

猪大肠杆菌的致病性主要与O抗原、K抗原和产生的毒素有关,它们均能通过质粒转移,流行的血清型可能会随着地域和时间的变化而改变。因此,猪场在防治大肠杆菌病时,应了解本场、本地区的主要血清型,据此采取相应的措施。本次调查中河南地区规模化猪场有19株未定型菌株,可能是大肠杆菌发生新的变化而出现的新血清型,对于这些未定型菌株的毒力特征、致病性等应引起重视,并开展相应的研究工作。

3.2 河南地区猪大肠杆菌耐药性

细菌耐药性的产生是细菌在抗菌药物选择压力下产生的,长期、低剂量使用或按疗程过量使用抗菌药物等不合理用药方案可以促进细菌产生耐药性,并促进耐药菌得以选择性发展。大肠杆菌多种耐药机制的产生是通过染色体的改变或质粒、转座子、整合子介导转移而获得,一旦获得对某种抗菌药物的耐药机制,就会在遗传物质上稳定下来,并可在水平和垂直方向上迅速转移和传播。同时,各种耐药机制会彼此协同或产生叠加作用,从而提高耐药水平,耐受抗菌药物的范围更广,从而严重影响了临床治疗的效果。

本次试验分离的67株血清分型的猪源性大肠

杆菌分别表现出对常用药物不同程度的耐受性,最低可耐受3种抗菌药物,53.731%的菌株可耐受9种以上药物,最高可耐受12种药物,表明河南地区规模化猪场大肠杆菌的耐药谱宽。

目前,畜牧业生产中存在着严重的抗生素滥用和不规范使用的现象,对以大肠杆菌为代表的病原菌形成持续的药物选择压力,为细菌自发突变和耐药性的传播和扩散提供了便利条件,造成严重耐药。而且,不同猪场可能存在不同的耐药谱,为临床防治带来了极大的困难。因此,养殖企业应根据本地区、本场流行的病原菌的药敏特征和耐药谱,正确选用敏感的防治药物,并在生产中交替使用和规范使用,以更好地防控猪大肠杆菌病,并减少因抗生素使用不当对环境和人类健康造成的危害。

参考文献:

- [1] 李红丽,詹丽娥,王彩先,等. 山西省猪致病性大肠杆菌血清型调查及耐药性监测[J]. 山西农业科学, 2012, 40(11): 1226-1330.
- [2] 王冠玉,谭艾娟,吕世明,等. 贵州鸡源大肠杆菌的分离鉴定及耐药性测定[J]. 天津农业科学, 2013, 19(2): 26-28.
- [3] 陈雅君,胡慧,段志刚,等. 动物源大肠杆菌O157:H7多重PCR检测方法的初步研究[J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 87-91.
- [4] 宋立,宁宜宝,张秀英,等. 中国不同地区家禽大肠杆菌血清型分布和耐药性比较研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1466-1473.
- [5] 施奉英,郭鑫,杨汉春,等. 猪源大肠杆菌对20种抗生素的敏感试验[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(8): 8-11.
- [6] 于洋,刘彦,李敬双,等. 猪源性水肿病大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(7): 37-38.
- [7] 段玉平,徐兴然,曾忠良,等. 猪源大肠杆菌整合子与耐药性的相关性研究[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(5): 24-26.
- [8] 马全朝,顾欣,程增青,等. 上海市猪源大肠杆菌耐药性监测[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(4): 54-56.
- [9] 徐引弟,宋念华,胡智斌,等. 新生仔猪致病性大肠埃希菌的分离鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(1): 45-48.
- [10] 张铁,王春光,王谦,等. 猪源大肠杆菌的分离、鉴定及耐药性监测[J]. 中国农学通报, 2005, 21(12): 23-25.
- [11] 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, 32(7): 90-91.
- [12] 刘书亮,陶勇,王红宁,等. 规模化猪场致病性大肠杆菌血清型鉴定[J]. 西南农业学报, 2000, 13(S1): 74-77.
- [13] 姜卫东,黄引贤. 广东省仔猪腹泻大肠杆菌血清型鉴定[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(1): 64-66.
- [14] 刘梦元,吴斌,刘建杰等. 规模化猪场大肠杆菌的耐药性检测及血清型流行病学调查[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 16-18.
- [15] 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.