

# 陕西关中地区猪大肠杆菌的分离鉴定与耐药性检测

魏 恒<sup>1</sup>, 王伟华<sup>1</sup>, 李娟娟<sup>1</sup>, 赵 毅<sup>2</sup>

(1. 渭南职业技术学院, 陕西 渭南 714026;

2. 陕西省动物疫病预防控制中心, 陕西 西安 710016)

**摘 要:**为了解陕西关中地区猪大肠杆菌的耐药情况, 无菌采集养猪场疑似大肠杆菌病病料样品 178 份, 经细菌分离培养、生化试验和致病性试验, 共分离鉴定出 78 株致病性大肠杆菌。将分离鉴定的大肠杆菌对 16 种常用抗菌药物进行耐药性检测, 结果显示分离菌株对美罗培南和头孢他啶较为敏感, 分别占分离菌株的 83.3% 和 66.7%; 对氨苄西林、四环素、磺胺异恶唑、复方新诺明、氟苯尼考、大观霉素和氧氟沙星等药物的耐药性较强, 且耐药菌株数量均达 65% 以上。表明关中地区猪大肠杆菌耐药性强, 耐药谱广。

**关键词:**关中地区; 猪大肠杆菌; 分离鉴定; 耐药性

猪大肠杆菌病是由病原性大肠杆菌的某些血清型引起的, 以初生至断奶阶段仔猪为主的肠道感染性传染病。根据仔猪临床特征可分为仔猪黄痢、仔猪白痢和仔猪水肿病, 其中仔猪黄痢常发生于生后 7 日龄以内的仔猪, 以生后 1~3 日龄最为多见; 仔猪白痢主要见于生后 10~30 d 的仔猪, 以 10~20 日龄居多; 仔猪水肿病主要见于断奶仔猪, 尤以生长快、体况健壮, 体重在 10~40 kg 的仔猪最为多见。目前, 该病广泛存在于世界各地, 其中仔猪黄痢和仔猪白痢在临床上最常发生, 其发病率和死亡率在仔猪疾病之中占据首位<sup>[1-2]</sup>。由于病原性大肠杆菌血清型多、且抗原多样, 仔猪发病时还常易与其他细菌和病毒混合感染, 给养猪业的健康发展造成了严重影响<sup>[3]</sup>。近年来, 在畜牧养殖过程中由于滥用和不合理应用抗菌药物, 致使大肠杆菌的耐药性和多重耐药现象时常发生, 耐药率也呈上升趋势。目前, 兽医临床上抗生素的疗效不明显, 各养殖场的仔猪经常反复发病, 给猪大肠杆菌病的防控造成了很大困难。研究主要是从陕西关中地区养殖场采集疑似猪大肠杆菌病病料样品 178 份, 对采集样品进行大肠杆菌的分离培养、生化试验、致病性试验和耐药性检测, 为陕西关中地区猪大肠杆菌病的防控提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

(1) 病料来源从陕西关中地区养猪场疑似病猪或病死仔猪中, 无菌采集直肠内粪便、肠内容物

或肠系膜淋巴结, 共采集病料 178 份。

(2) 试剂麦康凯培养基、营养肉汤、MH 琼脂培养基和伊红美蓝培养基均购于广东环凯微生物科技有限公司。细菌微量生化反应管和细菌药敏纸片购于杭州滨和微生物试剂有限公司。大肠杆菌质控菌株 ATCC 25922, 购于中国兽医药品监察所。

(3) 实验动物试验用小白鼠 18~22 g, 购于空军军医大学实验动物中心。

### 1.2 方 法

(1) 细菌分离及纯化将采集的病料样品接种于麦康凯培养基上, 37℃ 培养 18~24 h 后, 将红色疑似菌落在伊红美蓝培养基上于 37℃ 再培养 18~24 h, 然后选取紫黑色带金属光泽的疑似大肠杆菌菌落用革兰氏染色法进行染色和镜检。根据观察结果, 将疑似大肠杆菌进行纯化培养, 4℃ 冷藏备用。

(2) 生化试验用接种针将纯化培养的疑似大肠杆菌菌株分别接种于微量生化反应管中, 37℃ 培养 18~24 h 观察并记录结果。

(3) 致病性试验将生化试验鉴定后的大肠杆菌菌株分别接种于营养肉汤, 37℃ 培养 18 h, 取 0.2 mL 纯培养后的营养肉汤采用腹腔注射方法接种小白鼠, 试验组每个菌株培养物分别接种 3 只小白鼠, 用无菌营养肉汤作为对照组。接种后观察试验组小白鼠的发病和死亡情况, 并将死亡的小白鼠进行剖检, 采集脏器, 进行细菌的分离纯化和生化试验, 鉴定结果与大肠杆菌特征一致的菌株即为致病性大肠杆菌。

收稿日期: 2018-10-08 修回日期: 2018-10-23

基金项目: 陕西省重点研发计划一般项目—农业领域(2018NY-098)。

第一作者简介: 魏 恒(1982-), 男, 河南漯河人, 执业兽医师, 讲师, 硕士, 主要从事动物疾病防治和畜牧兽医专业相关教学与科研工作。

(4)药敏试验采用纸片琼脂扩散法(K-B法)对分离菌株进行16种常用抗菌药物的耐药性进行检测,用大肠杆菌标准菌株 ATCC25922 进行质控。将分离菌株分别接种于营养肉汤,37℃培养18 h,用生理盐水调节菌液浓度至0.5麦氏浊度(含菌量约 $1 \times 10^8$  cfu · mL<sup>-1</sup>),然后用无菌棉签蘸取菌液适量,在MH琼脂培养基均匀涂抹,待干后,在培养基上分别将药敏纸片均匀粘贴,37℃培养16~18 h,判定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离纯化结果

从病料中共分离出81株疑似大肠杆菌菌落,在麦康凯培养基上为表面光滑、湿润、边缘波状或整齐、微凸起的红色菌落;伊红美蓝培养基上为紫黑色带金属光泽圆形菌落。革兰氏染色呈阴性,其形态为杆状,两头钝圆,成对或散在分布。其结果与大肠杆菌的菌落特征、革兰氏染色和形态相吻合。

### 2.2 生化试验结果

81株分离菌株均能分解葡萄糖、麦芽糖、甘露醇和乳糖产酸产气,靛基质试验和MR试验呈

阳性,尿素酶试验、V-P试验、明胶液化试验和枸橼酸盐利用试验均呈阴性,试验结果与大肠杆菌生化特性一致,为大肠杆菌。

### 2.3 致病性试验结果

结果表明48 h内有78个试验组小白鼠发病且死亡,其余3个试验组和对照组的小白鼠均健康存活。死亡小白鼠剖检均见肠管膨胀,肠腔内有水样稀便,肝脏肿大,心包淤血增厚。经脏器划线接种培养基培养,进行杆菌的分离鉴定,结果与接种细菌相同。表明经分离纯化和生化鉴定的81株分离菌株中有78株为致病性大肠杆菌。

### 2.4 药敏试验结果

由表1可知,对78株致病性大肠杆菌进行的耐药性检测结果表明,对美罗培南和头孢他啶敏感的菌株较多,分别占分离菌株的83.3%和66.7%;对氨苄西林、四环素、磺胺异恶唑、复方新诺明、氟苯尼考、大观霉素和氧氟沙星等耐药的菌株较多,均达65%以上,其中对氨苄西林、四环素、磺胺异恶唑和复方新诺明的耐药菌株最多,分别达96.2%、96.2%、94.9%和93.6%。结果显示,关中地区猪大肠杆菌对多种抗生素产生了耐药性,且耐药性强,耐药谱广。

表1 致病性大肠杆菌对16种抗菌药物的耐药性检测结果

抗菌药物	高度敏感菌株		中度敏感菌株		耐药菌株	
	数量/株	百分比/%	数量/株	百分比/%	数量/株	百分比/%
氨苄西林	2	2.6	1	1.3	75	96.2
美罗培南	65	83.3	12	15.4	1	1.3
头孢噻唑	28	35.9	10	12.8	40	51.3
头孢他啶	52	66.7	11	14.1	15	19.2
大观霉素	7	9.0	14	18.0	57	73.1
阿莫西林/克拉维酸	19	24.2	29	37.2	30	38.5
复方新诺明	3	3.8	2	2.6	73	93.6
多西环素	2	2.6	35	44.9	41	52.6
庆大霉素	22	28.2	13	16.7	43	55.1
氟苯尼考	8	10.3	11	14.1	59	75.6
恩诺沙星	23	29.5	16	20.5	39	50.0
氧氟沙星	11	14.1	16	20.5	51	65.4
乙酰甲喹	6	7.7	30	38.5	42	53.8
四环素	0	0	3	3.8	75	96.2
磺胺异恶唑	2	2.6	2	2.6	74	94.9
黏菌素	18	23.1	35	44.9	25	32.1

## 3 讨论

近年来,由于养猪场滥用或不合理使用抗生素,使大肠杆菌对抗生素的敏感性不断下降,原因主要是由于其耐药性经耐药质粒的转移而扩散<sup>[4]</sup>。笔者试验对分离鉴定的78株致病性大肠杆菌进行16种抗菌药物的敏感性试验,结果表明分离菌株对美罗培南和头孢他啶等抗菌药物较敏

感,对氨苄西林、四环素、磺胺异恶唑、复方新诺明、氟苯尼考、大观霉素和氧氟沙星等药物产生了较强耐药性。且分离菌株对不同抗生素均具有多重耐药性,表明关中地区猪大肠杆菌的耐药性强、耐药谱广,这可能与本地区猪场长期将抗生素作为饲料添加或盲目采用抗生素治疗腹泻有关。

与国内其他地区大肠杆菌的耐药性相比,冯世文等对广西省不同地区猪场分离的猪大肠杆菌

进行体外药敏试验,结果显示分离菌株对头孢西丁、阿米卡星和壮观霉素敏感率较高<sup>[5]</sup>。曾博等在我国西南地区 61 个不同规模化猪场中分离的大肠杆菌菌株进行 18 种药物的药敏试验,结果显示分离菌株对头孢噻吩、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/棒酸相对敏感<sup>[6]</sup>。郭潇木等对广东地区 264 株大肠杆菌菌株进行 18 种抗菌药物敏感性的测定,结果显示分离菌株对黏菌素、头孢他啶和阿米卡星较敏感<sup>[7]</sup>。王红宝等对山西省 80 多个养猪场(户)分离的 97 株大肠杆菌菌株进行 26 种抗生素敏感性试验,结果表明分离菌株对头孢唑辛钠、头孢哌酮、头孢噻肟和磷霉素 4 种抗生素高度敏感<sup>[8]</sup>。曹敏等对贵州省 4 个地区规模养殖场分离的 164 株大肠杆菌菌株进行药物敏感性试验,结果显示分离菌株对金霉素和氟苯尼考较敏感<sup>[9]</sup>。综上所述,不同地区猪大肠杆菌对相关抗菌药物的敏感性有很大不同,这可能与当地常用抗生素不同有关。

总之,大肠杆菌作为动物肠道存在的正常菌群,在环境条件改变或其他病原微生物感染后易继发仔猪发生大肠杆菌病,由于其抗原复杂、血清型多、易产生耐药性,且不同地区还可能存在的耐药谱,给临床防控本病带来了很大的困难。因此,本病应根据当地致病性大肠杆菌的血清型研制针对性的疫苗进行预防,还应根据当地致病性大肠杆菌的药物敏感性结果和耐药谱,选取合适抗菌药物进行防治,同时注意要交替和规范使用抗菌药物,以达到更好地防控本病发生,减少经济损失,并降低因滥用或不合理使用抗生素对人类健康造成的危害。

(上接第 20 页)

- [6] 毕春红. 高浓度黑啤发酵工艺综述[J]. 黑龙江科技信息, 2013(24):71-71.
- [7] 贺昇. 高浓干啤如何提高发酵度[J]. 啤酒科技, 2010(05):51-52.
- [8] 杨红, 李康, 陈飞飞, 张洁, 孔瑞. 黑啤中浑浊和泡沫蛋白性质初探[J]. 合肥学院学报(自然科学版), 2016(01):100-104.
- [9] 王艳丹, 蔡勇, 吕慧威. 不同酿酒酵母对啤酒酿造过程中反-2-壬烯醛的影响[J]. 中国酿造, 2017(01):88-92.
- [10] 林利彬, 张昱, 陆英, 李习峰, 游淞麟. 液体灌装机的精度灌装定量方法[J]. 包装与食品机械, 2017(04):48-50.
- [11] 陈爽, 周芸芸, 林智平, Junhong Yu. LOX-less 大麦麦芽对麦汁和啤酒风味稳定性的影响[J]. 中外酒业·啤酒科技, 2015(08):63-66.
- [12] 左永泉. 黑啤酒酿制方法的改进[J]. 食品科学, 2002, 23(03):89-91.

## 参 考 文 献:

- [1] ANDERHUBER N, FLADISCHER P, GRUBERKHADJAWI M, et al. High-level biosynthesis of norleucine in *E. coli* for the economic labeling of proteins[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016(235):100-111.
- [2] BEHESHTI M K, SOLEIMANI D A, SALMAN-IZADEH S. Isolation and identification of two novel *Escherichia coli* bacteriophages and their application in wastewater treatment and coliform's phage therapy[J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2015, 8(03):1-6.
- [3] 矫薇薇, 徐国锋, 王宏, 等. 江西地区猪源致病性大肠杆菌的耐药性试验[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(10):77-79.
- [4] Schaechter M. Desk Encyclopedia of Microbiology [M]. Salt Lake City, 2009; Academic Press.
- [5] 冯世文, 李军, 潘艳, 等. 广西猪源致病性大肠杆菌对抗菌药物的耐药性变化分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(02):350-356.
- [6] 曾博, 王红宁, 邹立扣, 等. 西南地区猪肠外大肠杆菌毒力基因检测及耐药性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(02):126-129.
- [7] 郭潇木, 杨铜, 贺丹丹, 等. 广东地区猪源大肠杆菌耐药性及其系统发育群的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(01):182-186.
- [8] 王红宝, 李红丽, 郭雪丽, 等. 山西省致病性猪大肠杆菌毒力基因测定及药敏试验[J]. 养猪, 2015(02):100-103.
- [9] 曹敏, 谭艾娟, 吕世明, 等. 贵州部分地区猪源大肠杆菌耐药性分析及 ESBLs 基因型检测[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(04):1 098-1 104.
- [13] 常宗明. 提高干啤发酵度的探讨[J]. 啤酒科技, 2003(02):22-23.
- [14] 王秀丽, 王家林. 不同糖化工艺对大麦啤酒的麦汁质量的影响[J]. 食品研究与开发, 2012(10):153-155.
- [15] 吴东雷, 章丽丽, 许亮, 卞汪洋, 卫荣. PET 阻隔容器氧气透过性能测试及在啤酒包装领域的应用[J]. 包装与食品机械, 2017(03):62-64.
- [16] 牟宏. 使用上面发酵菌种生产小麦啤酒的应用研究[D]. 济南: 山东大学, 2003.
- [17] 张强. 小麦酿造黑啤酒工艺研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
- [18] 周永河. 麦芽质量及对啤酒酿造的影响[J]. 啤酒科技, 2013(10):49-50.
- [19] 王志坚. 啤酒中有机酸及其对啤酒风味的影响[J]. 酿酒科技, 2006(09):121-122.