

黄东璋,陈琳,魏冬霞,等.猪腹泻大肠埃希菌的分离鉴定及耐药性分析[J].江苏农业科学,2013,41(10):176-180.

猪腹泻大肠埃希菌的分离鉴定及耐药性分析

黄东璋,陈琳,魏冬霞,刘俊栋,朱丽佳,陶进亚

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 22530)

摘要:采集腹泻猪直肠拭子分离鉴定大肠埃希菌,采用微量稀释法测定分离菌对卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、头孢曲松钠、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素 8 种药物的敏感性,为兽医临床用药提供依据。结果表明,共分离并鉴定出 33 株猪腹泻大肠埃希菌,其中 29 株经鉴定为产 H_2S 大肠埃希菌,33 株菌对卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、头孢曲松钠、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素的 MIC_{50} 分别为 >256 、 256 、 >256 、 16 、 >0.125 、 >256 、 >512 、 $32 \mu g/mL$,耐药率依次为 100%、97%、100%、88%、21%、85%、100%、85%。33 株菌均为多重耐药菌株,最少可耐 4 种药物,最多可耐 8 种药物,其中耐 8 种药物的菌株占 6.1% (2/33),耐 7 种药物的菌株占 69.7% (23/33),耐 6 种药物的菌株占 18.2% (6/33),耐 5 种药物的菌株占 3.0% (1/33),耐 4 种药物的菌株占 3.0% (1/33)。33 株猪腹泻大肠埃希菌对 8 种常用抗菌药物的耐药谱广,耐药率高,兽医临床应根据试验结果调整用药方案。

关键词:猪腹泻大肠埃希菌;产 H_2S 大肠埃希菌;分离鉴定;耐药性

中图分类号:S859.7;S855.1⁺2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)10-0176-05

大肠埃希氏菌,别称大肠杆菌,由德国医师 Escherich 于 1885 年首次从婴儿粪便标本中分离得到,是一类包含致病性及共生性菌株的细菌种属。该菌属主要栖息于人和恒温动物的肠道内,一直被认为是正常肠道菌群的组成部分,无致病性。直到 20 世纪 40 年代以后,人们才发现一些特殊血清型大肠埃希菌对人和动物具有致病性^[1-2]。猪大肠埃希菌病是对规模化猪场生产危害较严重的细菌性传染病之一,常具有较高的发病率,造成新生仔猪大批死亡和发育不良,给养猪业带来重大经济损失。猪大肠埃希菌病是由致病性大肠埃希菌引起的,根据其临床症状、病理剖检及流行病学特征,可分为仔猪黄痢、仔猪白痢和仔猪水肿病。其中,仔猪黄痢以拉黄色稀粪、高发病率、高死亡率为主要特征;仔猪白痢拉白色稀粪,发病率高,死亡率低,严重影响患病猪的生长发育;而猪水肿病则以部分组织器官水肿、神经症状、低发病率、高死亡率为主要特征^[3]。据报道,美国哺乳仔猪下痢中有 21% 是由大肠埃希菌引起的^[4]。在我国,大肠埃希菌病是猪的最主要的细菌性疫病之一。2007 年,高睿等对黑龙江省规模化养猪场发生的 6 次猪大肠埃希菌病进行了临床、病理学和实验室诊断调查,发现其中仔猪黄痢发生了 4 次,仔猪白痢发生了 2 次;总发病猪 4 135 头,病死 760 头,发病率为 34.22%,病死率为 18.11%^[5]。

有研究显示,猪大肠埃希菌血清型众多而复杂,且有随时间和地域变化而变化的特点,难以用疫苗预防,药物防治仍是其主要防治手段^[5-6]。抗菌药物的广泛使用,尤其是药物长期添加于饲料中及长期不合理滥用,导致大肠埃希菌对抗菌

药物的耐药性越来越普遍,耐药率不断升高,耐药谱越来越广^[6-7],增加了治疗成本,缩短了新药的应用周期,同时耐药性可通过畜产品及环境等途径传播,导致交叉耐药性的产生,进一步威胁人类公共卫生。因此,对大肠埃希菌耐药性进行检测,掌握其耐药趋势,研究其耐药机理,对控制耐药菌株的蔓延、减少因耐药性引起的对动物及人类健康的威胁具有重要意义。本研究从猪腹泻直肠拭子分离鉴定大肠埃希菌,并以分离的大肠埃希菌为受试菌株,分析其对兽医临床常用抗菌药物的耐药性,为临床合理应用抗菌药物提供理论依据,同时为进一步开展耐药机制及耐药性传播机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

试验菌株来源于 2008—2012 年从重庆市、江苏省养猪场采集的腹泻直肠拭子,共 33 份样品。质控菌 *E. coli* ATCC[®] 25922,购自中国药品生物制品检定所。

1.2 培养基

伊红美蓝琼脂 (EMB agar)、麦康凯琼脂 (MacConkey agar)、普通营养肉汤、普通营养琼脂、水解酪蛋白肉汤 (MH broth)、水解酪蛋白琼脂等,均购自江苏省杭州天和微生物试剂有限公司。

1.3 细菌生化鉴定材料

肠杆菌科细菌生化编码微量鉴定管 (11 种 \times 15 支)、葡萄糖蛋白胨水、氧化酶试剂、侧金盏花醇、黏液酸盐、蛋白胨生化鉴定管均购自江苏省杭州天和微生物试剂有限公司。

1.4 供试药物

供试药物有 8 种:卡那霉素 (效价 760 U/mg),购自辽宁省本溪海大制药有限公司;氟苯尼考 (含量 99.3%),购自浙江海翔药业股份有限公司;氨苄西林 (含量 95%),购自浙江杭州天和微生物试剂有限公司;乳酸环丙沙星 (含量 98.8%),购自山东金太阳制药有限公司;头孢曲松钠 (含量 98%),购自华北制药集团;硫酸庆大霉素 (效价 592 U/mg),

收稿日期:2013-05-06

基金项目:江苏省自然科学基金 (编号: BK2008587);江苏农牧科技职业学院重点项目 (编号: ZD1202)。

作者简介:黄东璋 (1981—),男,江苏射阳人,硕士,讲师,主要从事兽医临床教学及科研工作。E-mail: zhuang@tom.com。

通信作者:陈琳,博士,副教授,主要从事抗菌药物耐药机制及兽药安全性评价工作。E-mail: chenlin20086666@126.com。

购自河南省安阳路德药业有限责任公司;磺胺嘧啶钠(含量 99%),购自上海三维制药有限公司;强力霉素(含量 88%),购自河北省邯郸久鹏精细化工有限公司。

1.5 细菌的分离和鉴定

1.5.1 细菌分离 无菌采集猪直肠拭子,置于灭菌的营养肉汤中 37 ℃ 培养 16 ~ 18 h,用接种环挑取菌液划线接种于伊红美蓝琼脂或麦康凯琼脂平板中,37 ℃ 培养 24 h,挑取典型菌落进行纯培养和鉴定。

1.5.2 细菌的鉴定 (1)革兰氏染色镜检。将纯化后的待检大肠埃希菌接种于 MH 肉汤中,37 ℃ 培养 12 ~ 24 h,取 1 接种环菌液进行固定、革兰氏染色和镜检。(2)培养特性观察。将纯化后的待检大肠埃希菌分别接种于麦康凯和伊红美蓝琼脂中,37 ℃ 培养 12 ~ 24 h,观察其菌落形态和培养基颜色的变化。(3)动力测试。取灭菌接种针沾取待检细菌,自正中央刺入斜面半固体培养基(距管底约 0.5 cm),原路退出,37 ℃ 培养 8 ~ 12 h,观察细菌生长特征。(4)氧化酶试验。取氧化酶试纸,沾取待检菌落少许,加入氧化酶试剂 1 滴,观察试纸颜色变化。(5)生化试验。取待检大肠埃希菌的肉汤纯培养物 5 ~ 10 μL ,接种于肠杆菌科细菌生化编码微量鉴定管中,37 ℃ 培养 24 h 后,记录菌株的生化反应结果,按照肠杆菌科细菌生化鉴定编码册检索编码值并判定结果,对不确定菌株进一步补充生化反应予以判断。

1.6 药物敏感性测试

1.6.1 受试药液的制备及稀释 选取受试药物,按照 CLSI 的指导原则选取溶剂进行配制和稀释。配制的药液用质控菌株(大肠埃希菌 ATCC[®] 25922)进行测定,在 MIC 质控范围内合格后分装,于 -20 ℃ 或 -70 ℃ 冷冻保存备用。

1.6.2 菌液制备 在水解酪蛋白(MH)琼脂平板上挑取单个菌落接种于 2 mL 水解酪蛋白(MH)肉汤管中,37 ℃ 振荡培养 4 ~ 8 h,用调节过钙镁离子浓度的 MH 肉汤稀释菌液,使稀释菌液浊度达到 0.5 麦氏比浊管,再按 1 : 100 稀释菌液至含菌量约为 1×10^6 CFU/mL,备用。

1.6.3 菌株 MICs 测定 首先向 96 孔微量细胞培养板各试验孔中加入稀释好的菌液肉汤(1×10^6 CFU/mL)100 μL ,再向第 1 排孔中加入稀释好的药液 100 μL ,混合均匀。取第 1 排的混合液 100 μL 至第 2 排,混合均匀后依次稀释至最后 1 排试验孔,弃去最后的 100 μL 。稀释菌液于 15min 内接种完毕,37 ℃ 孵育 16 ~ 18 h,每次做 3 个重复,同时设置质控菌组(大肠埃希菌 ATCC[®] 25922)、只加菌液不加药物对照组、不加药液和菌液对照组。

1.6.4 结果判定标准 当只加菌液不加药物对照组的细菌明显生长、不加药液和菌液对照组无细菌生长时,试验组小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度即为 MIC 值。当出现单一跳孔时,记录抑制细菌生长的最高药物浓度,如多次出现跳孔现象,则不记录结果,须重新试验;按照 CLSI 规定的敏感(susceptible,S)、中介(intermediate,I)、耐药(resistance,R)折点值判断试验结果(表 1)。

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养及鉴定结果

2.1.1 细菌分离培养结果 34 份猪直肠拭子样品经营养肉

表 1 猪腹泻大肠埃希菌药敏试验判断标准

药物	MIC 值($\mu\text{g/mL}$)			MIC 质控参数 ATCC [®] 25922
	敏感(S)	中介(I)	耐药(R)	
卡那霉素	≤ 16	32	≥ 64	1 ~ 4
氟苯尼考	≤ 8	16	≥ 32	2 ~ 8
氨苄西林	≤ 8	16	≥ 32	2 ~ 8
乳酸环丙沙星	≤ 1	2	≥ 4	0.004 ~ 0.015
头孢曲松钠	≤ 1	2	≥ 4	0.03 ~ 0.12
硫酸庆大霉素	≤ 4	8	≥ 16	0.25 ~ 1
磺胺嘧啶钠	≤ 256	—	≥ 512	8 ~ 32
强力霉素	≤ 4	8	≥ 16	0.5 ~ 2

注:“—”表示无中介判定值。

汤培养后,均在伊红美蓝琼脂上长出紫黑色、带金属光泽、光滑、湿润的菌落,在麦康凯平板上长出红色、圆形、扁平、表面光滑、湿润不透明的菌落。挑取典型菌落进行革兰氏染色、镜检,结果该细菌为两端钝圆、红色、粗短的小杆菌。

2.1.2 动力测试 33 株分离菌的动力试验结果均为阳性(部分穿刺线模糊,部分增粗,部分呈根须状)。

2.1.3 氧化酶试验结果 33 株分离菌的氧化酶试验结果均未变色,呈阴性。

2.1.4 生化鉴定结果 33 株分离菌对葡萄糖、乳糖、硫化氢、靛基质、卫矛醇、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱羧酶、尿素酶、西蒙氏枸橼酸盐及部分菌株的生化鉴定试验结果见表 2。根据以上测试结果可以判断,33 株分离菌株均为大肠埃希菌,除 BX9、MY17、MY18、MYB14 外,其余菌株均为产 H_2S 的大肠埃希菌。

2.2 药物敏感性试验结果

2.2.1 抗菌药物对 33 株猪大肠埃希菌的 MICs 及耐药率 从表 3 可以看出,33 株大肠埃希菌对 8 种抗菌药物呈现不同程度的耐药。其中,对卡那霉素、氨苄西林、磺胺嘧啶钠的耐药率最高,达 100%;对氟苯尼考的耐药率为 97%;对乳酸环丙沙星的耐药率为 88%;对硫酸庆大霉素、强力霉素的耐药率均为 85%;对头孢曲松钠的耐药率为 21%,耐药率最低。

2.2.2 猪腹泻大肠埃希菌的耐药谱及统计结果 由表 4 及图 1 可以看出,33 株菌均为多重耐药菌株(对 3 种及 3 种以上药物耐药),最少对 4 种药物耐药,最多可对 8 种药物耐药。其中,耐 8 种药物的菌株占总数的 6.1% (2/33),耐 7 种药物的菌株占 69.7% (23/33),耐 6 种药物的菌株占 18.2% (6/33),耐 5 种药物的菌株占 3.0% (1/33),耐 4 种药物的菌株占 3.0% (1/33)。

3 结论与讨论

本研究按照微生物检验程序,分离鉴定了 33 株猪腹泻大肠埃希菌,均具有典型的大肠埃希菌形态特征、培养特征和生化特征。同时,本研究首次从猪肠道直肠拭子中检测鉴定出 29 株产 H_2S 大肠埃希菌,29 株菌对卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素、头孢曲松钠呈现不同程度的耐药性。产 H_2S 大肠埃希菌的报道最初来源于 20 世纪 70 年代。1971 年,Lautrop 等报道了 14 株产 H_2S 的大肠埃希菌,其中的 1 株菌能将产 H_2S 能力传递给普通大肠埃希菌^[8]。1973 年,Ørskov 等进一步确认了

表 2 33 株猪肠道分离菌生化鉴定结果

菌株名称	1 组		2 组			3 组			4 组			编码总值	补充试验			鉴定结果
	葡		赖	鸟	硫	靛	乳	卫	苯	尿	枸		ADO	MUC	VP	
	A	G	4	2	1	4	2	1	4	2	1					
BX10 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BX11 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	AG673	—	/	/	大肠埃希氏菌
BX12 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BX13 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BX14 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BX15 [*]	A	G	4	2	1	4	2	1	0	2	1	AG773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BX16 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BX17 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BX8 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BX9	A	—	4	2	0	4	2	1	0	2	1	A673	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ10 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ11 [*]	A	—	0	2	1	4	2	1	0	2	0	A372	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ13 [*]	A	G	4	2	1	4	2	1	0	2	1	AG773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ3 [*]	A	—	4	2	1	4	2	0	0	2	0	A762	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ4 [*]	A	G	4	0	1	4	2	0	0	0	0	AG560	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ5 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ6 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	0	A772	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ7 [*]	A	—	4	2	1	4	2	0	0	2	0	A762	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ8 [*]	A	—	4	2	1	4	2	1	0	2	1	A773	/	/	/	大肠埃希氏菌
BZ9 [*]	A	G	4	2	1	4	2	1	0	2	1	AG773	/	/	/	大肠埃希氏菌
MB1 [*]	A	—	4	2	1	0	2	0	0	2	1	A723	/	/	/	大肠埃希氏菌
MB8 [*]	A	—	4	2	1	0	2	0	0	2	1	A723	/	/	/	大肠埃希氏菌
MY15 [*]	A	G	4	2	1	4	2	1	0	0	0	AG760	/	/	/	大肠埃希氏菌
MY17	A	—	4	2	0	4	2	1	0	0	0	A670	/	/	/	大肠埃希氏菌
MY18	A	—	4	2	0	4	2	1	0	1	0	A671	/	/	/	大肠埃希氏菌
MY19 [*]	A	G	4	0	1	4	2	1	0	2	0	AG572	/	/	/	大肠埃希氏菌
MY31 [*]	A	—	4	0	1	4	2	1	0	2	1	A572	/	/	/	大肠埃希氏菌
MY33 [*]	A	G	4	2	1	4	2	1	0	2	0	AG772	/	/	/	大肠埃希氏菌
MYB14	A	G	4	2	0	0	2	0	0	2	0	AG622	/	/	/	大肠埃希氏菌
MYB16 [*]	A	—	4	2	1	4	2	0	0	0	0	A760	/	/	/	大肠埃希氏菌
Z9 [*]	A	—	4	2	1	4	2	0	0	2	1	A763	/	/	/	大肠埃希氏菌
ZB6 [*]	A	G	4	2	1	4	2	0	0	2	1	AG763	/	/	/	大肠埃希氏菌
ZR10 [*]	A	—	4	2	1	4	2	0	4	2	1	A767	/	/	/	大肠埃希氏菌

注:A 表示产酸,G 表示产气;葡表示葡萄糖,赖表示赖氨酸脱羧酶,鸟表示鸟赖氨酸脱羧酶,硫表示硫化氢,靛表示靛基质,乳表示乳糖,卫表示卫矛醇,苯表示苯丙氨酸,尿表示尿素,枸表示西蒙氏枸橼酸盐;ADO 表示侧金盏花醇试验,MUC 表示黏液酸盐试验,VP 表示伏-普氏试验;“—”表示阴性结果,“/”表示无需进行补充试验,“+”表示阳性结果,“*”为产 H₂S 菌株。

表 3 33 株猪大肠埃希菌对 8 种抗菌药物的 MIC 值及耐药率

抗菌药物	MIC (μg/mL)			耐药转折点 (μg/mL)	耐药率 (%)
	MIC 范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
卡那霉素	64 ~ >256	>256	>256	≥64	100
氟苯尼考	4 ~ >256	256	256	≥32	97
氨苄西林	32 ~ >256	>256	>256	≥32	100
乳酸环丙沙星	0.25 ~ >256	16	>256	≥4	88
头孢曲松钠	<0.125 ~ 64	<0.125	32	≥4	21
硫酸庆大霉素	<0.125 ~ >256	>256	>256	≥16	85
磺胺嘧啶钠	>512	>512	>512	≥512	100
强力霉素	4 ~ 256	32	64	≥16	85

产 H₂S 大肠埃希菌的存在,同时也确认了 11 株菌具有传递产 H₂S 的能力^[9]。1974 年,Maker 等报道了 17 株生化特征、耐

药特征与典型大肠埃希菌几乎一致的产 H₂S 大肠埃希菌^[10]。同年,Darland 等研究了 200 多株产 H₂S 大肠埃希菌,发现这些菌株比典型大肠埃希菌对抗生素更耐药^[11]。1977 年,Magalhaes 等从 60 份健康猪盲肠和肠系膜淋巴结样品中分离到 32 株产 H₂S 大肠埃希菌,并对其进行了血清学分型,结果显示 32 株菌可分为 18 种血清型,同时发现,产 H₂S 决定因子与利福平或四环素耐药决定因子位于相同的质粒上,并能传递给受体菌 *E. coli* K12^[12]。1978 年,Jones 等详细分析了 1 株产 H₂S 大肠埃希菌的分子遗传特征,结果发现,该菌含有一大一小 2 个质粒,大质粒上有编码产 H₂S 及耐氨苄西林、四环素、链霉素的基因,这些基因能通过质粒接合传递给受体菌^[13]。国内,2003 年,陈建辉等首次在从业人员健康带菌者调查中检出 3 株产 H₂S 的大肠埃希氏菌^[14],同年丁叶荣等发现产 H₂S 的肠道致病性大肠埃希菌 O128 : K67^[15],之后相继

表 4 猪腹泻大肠埃希菌的耐药谱

菌株名称	耐药谱	耐 n 种药
BX10 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、头孢曲松钠、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	8
BX11 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、头孢曲松钠、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BX12 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、磺胺嘧啶钠、强力霉素	5
BX13 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠	6
BX14 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、头孢曲松钠、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	8
BX15 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BX16 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BX17 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BX8 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	6
BX9	卡那霉素、氨苄西林、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠	4
BZ10 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、磺胺嘧啶钠、强力霉素	6
BZ11 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BZ13 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BZ3 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BZ4 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BZ5 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BZ6 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BZ7 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BZ8 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
BZ9 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
MB1 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、磺胺嘧啶钠、强力霉素	6
MB8 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、头孢曲松钠、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
MY15 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
MY17	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
MY18	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、磺胺嘧啶钠、强力霉素	6
MY19 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
MY31 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、头孢曲松钠、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠	7
MY33 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
MYB14	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、头孢曲松钠、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠	7
MYB16 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
Z9 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
ZB6 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠、强力霉素	7
ZR10 *	卡那霉素、氟苯尼考、氨苄西林、乳酸环丙沙星、硫酸庆大霉素、磺胺嘧啶钠	6

注：“*”为产 H_2S 菌株。

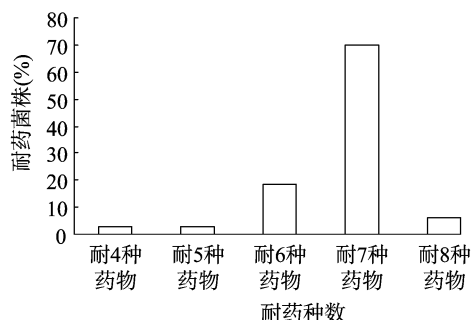


图1 33 株猪腹泻大肠埃希菌耐药谱统计结果

有几例产 H_2S 大肠埃希菌的报道^[16-17]。因此,到目前为止产 H_2S 大肠埃希菌的相关知识很少。这种菌是否为腹泻大肠埃希菌的变异株,什么原因引起变异,变异株的致病力、生物学特点、分子遗传学特点乃至其是否与典型大肠埃希菌一样在畜禽大肠埃希菌感染中扮演着重要的角色,是否和典型大肠埃希菌一样是耐药基因的重要贮库和传播媒介,从而给人类公共卫生带来威胁,均不得而知。因此,有必要进行进一步的

探索。

对 33 株猪腹泻大肠埃希菌耐药性的测试结果表明,33 株猪大肠埃希菌对氟苯尼考、卡那霉素、氨苄西林、硫酸庆大霉素、乳酸环丙沙星、强力霉素、磺胺嘧啶钠(除头孢曲松钠外)均有较高的耐药率。其中,对氨基糖苷类药物卡那霉素、硫酸庆大霉素的耐药率分别为 100%、85%,与张俊丰等报道的 92 株猪腹泻大肠埃希菌对卡那霉素、庆大霉素的耐药率(89%、80%)^[3]相当,但明显高于郑冲报道的 50 株猪大肠埃希菌对卡那霉素、庆大霉素的耐药率(75%、70%)^[18]。33 株菌对氨苄西林的耐药率为 100%,与郑冲报道的 50 株猪大肠埃希菌对氨苄西林的耐药率(100%)^[18]相同,也与李军等报道的广西猪源大肠埃希菌 O157:H7 分离株对氨苄西林的耐药率(100%)^[19]相同,但明显高于张俊丰等报道的猪腹泻大肠埃希菌对氨苄西林的耐药率(50%)^[3]。33 株菌对强力霉素的耐药率为 85%,明显高于江婷婷报道的 1999 年分离菌株对强力霉素的耐药率(53.3%),略高于 2003 年分离菌株对强力霉素的耐药率(83.3%),低于 2006 年分离菌株对强力霉素的耐药率(96.7%)^[20]。33 株菌对氟苯尼考的耐药率

为 97%, 高于江婷婷报道的 1999 年、2003 年、2006 年分离菌株对氟苯尼考的耐药率 (33.3%、56.7%、50.0%)^[20]。33 株菌对氟喹诺酮类药物乳酸环丙沙星的耐药率为 88%, 高于李运龙等报道的 43.7%^[21] 以及吴祥辉报道的 78.8%^[22]。头孢曲松是第 3 代头孢类抗菌药物, 在兽医临床较少使用, 是目前对多种兽医临床菌仍较敏感的药物之一。本研究也证实了这一点。33 株猪大肠埃希菌对头孢曲松钠的耐药率为 21%, 高于叶满玉等报道的 130 株猪鸡大肠埃希菌对头孢曲松的耐药率 (7.8%)^[23] 及张秀英等的报道^[24], 但显著低于郝智慧等报道的鸡大肠埃希菌对头孢曲松的耐药率 [45.8% (山东)、48.6% (辽宁) 及 78.5% (河北)]^[25]。本研究中, 33 株分离菌均为多重耐药菌株, 且以耐 7 种药物的百分比最高, 达 69.7%, 表明大肠埃希菌对常用抗菌药物的耐药性比较严重, 应引起兽医临床工作者的重视。有文献指出, 抗菌药物的使用过程实际上也是对耐药菌株的选择过程^[26]。养殖场广泛使用抗菌药物, 形成持续的选择压力, 为细菌自发突变、耐药性的传播和扩散提供了有利条件, 因此不同时间、不同地区甚至不同养殖场分离的细菌对相同的药物均可能存在不同的耐药率和耐药谱。这提示我们, 在用药过程中, 应遵循抗菌药物临床选用原则, 综合考虑各种因素对耐药性产生和传播的影响, 以增强临床防治效果, 减缓耐药性的产生和发展。

参考文献:

- [1] 朱子洁, 程丽华, 黄 阳. 鸡大肠杆菌病的病原菌生物学特性 [J]. 兽医导刊, 2009, 144 (8): 25–26.
- [2] Pupo G M, Karaolis D K, Lan R, et al. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies [J]. Infection and Immunity, 1997, 65 (7): 2685–2692.
- [3] 张俊丰, 陈 琳, 魏冬霞, 等. 92 株猪腹泻大肠杆菌的耐药性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37 (11): 153–156.
- [4] 刘 立. 猪致病性大肠杆菌耐药性调查复方抗菌制剂筛选及药效研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2008: 1–43.
- [5] 高 睿, 张永国, 杨丽丽. 规模化养猪场大肠杆菌病流行病学调查 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2007 (3): 32–33.
- [6] 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.
- [7] 陈 祥, 高 崧, 王 雷, 等. 华东地区致初生仔猪腹泻大肠杆菌的 O 血清型和毒力因子 [J]. 微生物学报, 2004, 44 (1): 96–100.
- [8] Lautrop H, Ørskov I, Gaarslev K. Hydrogen sulfide – producing variants of *Escherichia coli* [J]. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B: Microbiology and Immunology, 1971, 79 (5): 641–650.
- [9] Ørskov I, Ørskov F. Plasmid – determined H₂S character in *Escherichia coli* and its relation to plasmid – carried rafikose fermentation and tetracycline resistance characters [J]. Journal of General Microbiology, 1973, 77: 487–499.
- [10] Maker M D, Washington J A. Hydrogen sulfide – producing variants of *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology, 1974, 28 (2): 303–305.
- [11] Darland G, Davis B R. Biochemical and serological characterization of hydrogen sulfide – positive variants of *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology, 1974, 27 (1): 54–58.
- [12] Magalhaes M, Vance M. Hydrogen sulfide – positive strains of *Escherichia coli* from swine [J]. Journal of Medical Microbiology, 1978, 11 (2): 211–214.
- [13] Jones R T, Thai L P, Silver R P. Genetic and molecular characterization of an *Escherichia coli* plasmid coding for hydrogen sulfide production and drug resistance [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1978, 14 (5): 765–770.
- [14] 陈建辉, 谢一俊, 郭维植, 等. 从健康带菌者粪便中检出 3 株产 H₂S 大肠埃希氏菌的报道 [J]. 预防医学文献信息, 2003, 9 (3): 356–357.
- [15] 丁业荣, 杨 杰, 范玉珍, 等. 产 H₂S 肠道致病性大肠埃希菌 O (128): K (67) 的发现与研究 [J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2003 (5): 85–88.
- [16] 常宏伟, 赵 俊, 丁业荣, 等. 17 株产 H₂S 致泻大肠埃希菌的微生物学研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2009, 13 (3): 320–323.
- [17] 常 虹, 薛 镒. 粪便标本分离出 1 株产 H₂S 肠致病性大肠埃希菌 [J]. 预防医学情报杂志, 2004, 20 (2): 206–206.
- [18] 郑 冲. 浙江省猪源大肠杆菌新近分离株的耐药性与耐药质粒分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [19] 李 军, 谢宇舟, 冯世文, 等. 猪源大肠杆菌 O157: H7 耐药表型和消毒剂抗性调查 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39 (2): 203–206.
- [20] 江婷婷. 不同时期猪源大肠杆菌对抗生素耐药表型、耐药基因比较研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2008: 1–45.
- [21] 李运龙, 李继伟, 任家琰. 仔猪大肠杆菌的分离鉴定及耐药试验 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2009, 39 (2): 4–7.
- [22] 吴祥辉. 猪源致病性大肠杆菌 *gyrA* 基因喹诺酮耐药决定区的单链构象多态性分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2003: 31.
- [23] 叶满玉, 王红宁, 田国宝, 等. 猪鸡致病性大肠杆菌沙门菌对 β – 内酰胺类药物耐药表型和基因检测 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46 (3): 15–18.
- [24] 张秀英, 吴好庭, 赵 晖, 等. 部分鸡场大肠杆菌对抗菌药物的耐药性 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25 (4): 422–424.
- [25] 郝智慧, 肖希龙, 邱 梅, 等. 不同区域鸡大肠杆菌对抗菌药的耐药性比较 [J]. 中国兽医科学, 2009, 39 (1): 84–88.
- [26] Bonten M, Stobberingh E, Philips J, et al. High prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in faecal samples of students in the south – east of the Netherlands [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1990, 26 (4): 585–592.