

王礼伟,周 刚,柏传茂,等. 苏淮仔猪腹泻细菌性病原的分离鉴定与耐药性分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(11):127-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.11.023

苏淮仔猪腹泻细菌性病原的分离鉴定与耐药性分析

王礼伟¹, 周 刚¹, 柏传茂², 杨生明², 郭永久², 唐 炎², 汪国莲¹

(1. 江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所, 江苏淮安 223001; 2. 江苏省金湖县吕良中心畜牧兽医站, 江苏金湖 211600)

摘要: 为了解淮安地区苏淮仔猪出现细菌性腹泻的病因并提供治疗方案, 采集腹泻仔猪的肛拭子样品共 95 份, 对采集的样品进行细菌分离与鉴定、动物致病性鉴定及耐药性分析。结果显示, 本次试验共分离鉴定到 78 株大肠杆菌, 92 株沙门氏菌; 动物致病性试验显示, 大肠杆菌致小鼠死亡率为 65.38%, 沙门氏菌致小鼠死亡率为 95.84%; 药敏试验结果显示, 大肠杆菌耐药率高于沙门氏菌, 且均对青霉素类和林可霉素类高度耐药, 对氟喹诺酮类耐药率最低。多重耐药结果显示, 所有分离菌株均为多重耐药菌株, 大肠杆菌主要表现 8~10 耐, 沙门氏菌主要表现在 6~8 耐。

关键词: 仔猪; 腹泻; 大肠杆菌; 沙门氏菌; 耐药性

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)11-0127-05

仔猪腹泻伴有不同程度的腹泻、脱水、自身免疫力下降, 是仔猪死亡和继发其他疾病的重要原因, 影响养猪生产效率和盈利情况, 给养猪业带来严重的经济损失, 主要体现在发病率高、降低日增质量、延长出栏时间、饲料转化率下降、饲料成本增加等^[1-2]。仔猪腹泻是病原体、肠道环境和管理之间相互作用的结果, 其中病原体的感染是导致仔猪发生腹泻的主要原因, 根据病原体的不同, 细菌引发的可分为埃希氏大肠杆菌、沙门氏菌、产气荚膜梭菌等; 病毒引发的如流行性腹泻病毒、传染性胃肠炎病毒、非洲猪瘟病毒等; 寄生虫引发的如刚地弓形虫、艾美耳球虫等^[3]。鉴于细菌性腹泻在规模化养猪场患病中的普遍性和重要性, 为进一步了解淮安地区苏淮仔猪腹泻细菌性病原流行病学和抗生素耐药情况, 本试验采集腹泻仔猪的肛拭子样本

进行了细菌的分离鉴定、致病力试验及耐药性分析, 旨在为疾病防控、减抗禁抗、食品安全提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 2020 年 1 月至 4 月采集来自淮安地区 3 个苏淮猪养殖场出现腹泻症状的仔猪肛拭子 95 份。发病仔猪主要表现为精神不振、食欲不振、被毛耸乱、拉黄白色稀软或水样粪便等。以灭菌棉拭子采集发病仔猪肛拭样品置于灭菌 EP 中, 保存于 -20 ℃ 冰箱待用。

1.1.2 试验材料 麦康凯琼脂培养基、SS 琼脂培养基、MH 琼脂培养基、MH 液体培养基均购自青岛海博生物技术有限公司; 无菌脱纤维兔血琼脂培养基的制备参考文献^[4]; 兽医临床常用药敏纸片均购自杭州微生物试剂有限公司, 包括红霉素、阿奇霉素、克林霉素、林可霉素、链霉素、庆大霉素、多西环素、四环素、头孢唑啉、青霉素、利福平、氧氟沙星。

1.2 方法

1.2.1 细菌的富集、分离与纯化 将采集的肛拭子接种于 5 mL MH 液体培养基中, 37 ℃ 恒温培养 12 h。然后用接种环按照常规细菌分离方法分别接

收稿日期: 2020-09-08

基金项目: 苏北科技专项科技帮扶项目(编号: SZ-HA2019032); 淮安市农科院科技发展基金项目(编号: HNY202025)。

作者简介: 王礼伟(1989—), 男, 江苏淮安人, 硕士, 助理研究员, 主要从事动物传染病防控及农业科技服务。E-mail: wlw58@sian.cn。
通信作者: 汪国莲, 硕士, 研究员, 主要从事农业科技服务。E-mail: 2567327519@qq.com。

[12] 兰德松, 刘 贺, 王海丰, 等. 辽宁省一起小反刍兽疫疫情的紧急流行病学调查[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(10): 1-6.

[13] 王治维, 图门巴雅尔, 胡明明, 等. 2017—2019 年山西省小反刍兽疫血清学和病原学监测[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(8): 1-4.

[14] Mao L, Yang L, Li W, et al. Epidemiological investigation and

phylogenetic analysis of caprine parainfluenza virus type 3 in sheep of China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(3): 1411-1416.

[15] 霍晓丽, 李文良, 毛 立, 等. 绵羊肺炎支原体和小反刍兽疫病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(19): 185-189.

种(“Z”字形)于麦康凯琼脂培养基、SS 琼脂培养基,37℃恒温培养18~24 h。挑取典型单个菌落接种于5 mL MH 液体培养基中,37℃恒温培养12 h,划线接种到无菌脱纤维兔血琼脂培养基中,37℃恒温培养18~24 h,观察菌株溶血情况,同时接种到MH 液体培养基中备用。

1.2.2 革兰氏染色镜检 将无菌脱纤维兔血琼脂培养基中单个菌落进行涂片、革兰氏染色、显微镜油镜下观察菌体的形状及染色特性。

1.2.3 细菌生化鉴定试验 将待检菌落按照伯杰氏生化鉴定手册进行生化鉴定。

1.2.4 动物致病性试验 将小鼠分成A、B、C 3组。A、B组小鼠分别依据体质量按0.02 mL/g 腹腔注射经鉴定纯化的大肠埃希氏菌和沙门氏菌菌液,每种菌注射2只,C组小鼠分别依据体质量按0.02 mL/g 腹腔注射无菌生理盐水。接种后观察并剖检发病和死亡的小鼠,统计致病率。

1.2.5 药敏试验 吸取致死小鼠菌液100 μ L 置于MH 琼脂培养基上,涂布涂匀,3~5 min 后,待菌液干燥后,均匀贴上4片不同的药敏纸片($d=6$ mm),参照文献[4]的方法,放置恒温箱培养18~24 h 后测量抑菌环的直径,根据抑菌圈的大小,根据《抗微生物药物敏感性试验执行标准》^[5]判定结果。

2 结果与分析

2.1 细菌分离鉴定结果

对腹泻仔猪肛拭子样本进行选择分离鉴定,由图1~图6可知,疑似大肠杆菌在麦康凯琼脂培养基上长出粉红色、光滑、湿润、边缘整齐、直径1.0~2.5 mm 的菌落,其中12株在血琼脂培养基上生成透明溶血环;挑取典型单个菌落进行革兰氏染色、镜检,疑似大肠杆菌为两端钝圆、散在或成对、红色、革兰氏阴性短杆菌。疑似沙门氏菌在SS 琼脂上长出乳白色、圆形、边缘整齐、光滑、表面有隆起、中间有针状黑点的小菌落,其中12株在血琼脂培养基上生成透明溶血环;挑取典型单个菌落进行革兰氏染色、镜检,疑似沙门氏菌为无荚膜、无芽孢、散在的革兰氏阴性直杆菌。

2.2 细菌生化鉴定结果

分离的疑似大肠杆菌最终有78株能够发酵乳糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和甘露醇,吲哚反应阳性,MR 反应阳性,V. P. 反应阴性,柠檬酸盐反应阴性,三糖铁斜面产碱、底部产酸及产气产硫化氢,符合沙门氏菌的生化特性。最终,分离鉴定得到78株大肠杆菌,分离率为82.10%(78/95);分离到92株沙门氏菌,分离率为96.84%(92/95)。



图1 大肠杆菌在麦康凯培养基上菌落形态

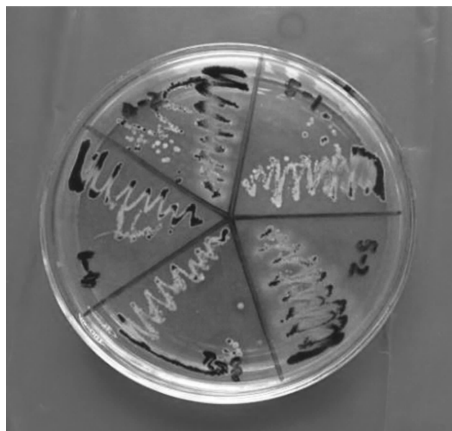


图2 沙门氏菌在SS琼脂上菌落形态

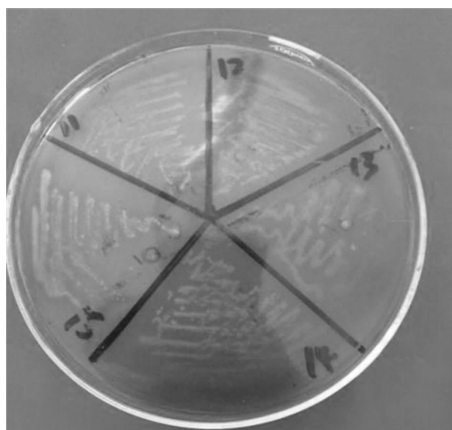


图3 大肠杆菌在兔血琼脂培养基上菌落形态

大肠杆菌的生化特性;分离的疑似沙门氏菌最终有92株发酵葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和甘露醇,吲哚反应阴性,MR 反应阳性,V. P. 反应阴性,柠檬酸盐反应阳性,三糖铁斜面产碱、底部产酸及产气产硫化氢,符合沙门氏菌的生化特性。最终,分离鉴定得到78株大肠杆菌,分离率为82.10%(78/95);分离到92株沙门氏菌,分离率为96.84%(92/95)。

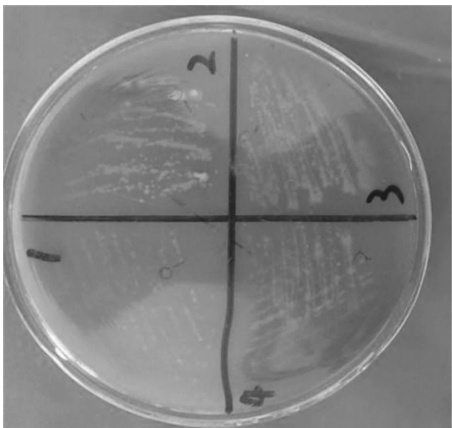


图4 沙门氏菌在兔血琼脂培养基上菌落形态

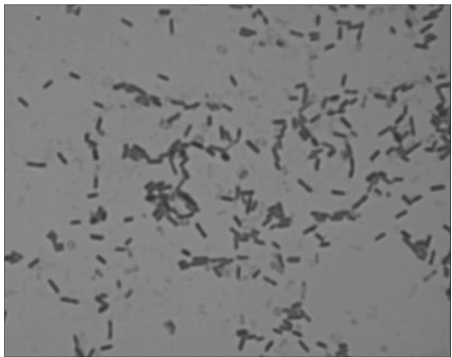


图5 大肠杆菌革兰氏染色镜检图(1 000×)

2.3 细菌致病性试验结果

将分离鉴定的 78 株大肠杆菌菌液腹腔注射小鼠 24 h 后,小鼠被毛粗乱、喜卧少动、精神沉郁、厌食、排松软粪便等症状;48 h 后开始死亡,剖检发现腹腔充满黏性黄色渗出物,肝脏、肾脏、脾脏肿大,肠道膨胀充气,划线培养后均能分离鉴定到大肠杆

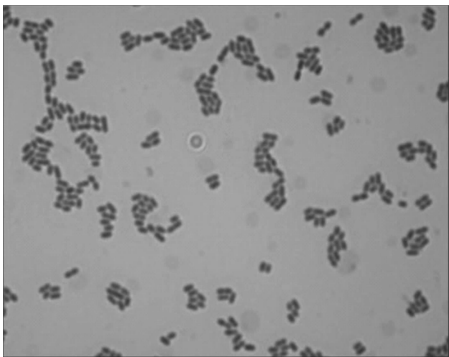


图6 沙门氏菌革兰氏染色镜检图(1 000×)

菌,大肠杆菌致小鼠死亡率为 65. 38% (51/78,溶血性菌株注射小鼠全部死亡)。将分离鉴定的 92 株沙门氏菌菌液腹腔注射小鼠 24 h 后,小鼠精神萎靡、战栗、被毛蓬松,少数出现便血、水样粪便等症状;48 h 后开始死亡,剖检发现小鼠肠道充血、腹腔积水、肝脏和脾脏均有坏死点,划线培养后均能分离到沙门氏菌,沙门氏菌致小鼠死亡率为 94. 57% (87/92,溶血性菌株注射小鼠全部死亡);对照组小鼠均正常。

2.4 细菌耐药性试验结果

对致死小鼠的 51 株大肠杆菌和 87 株沙门氏菌进行药敏试验,由表 1 可知,分离鉴定的 51 株大肠杆菌对林可霉素(100. 00%)、青霉素(98. 04%)、克林霉素(96. 08%)、红霉素(94. 12%)、阿奇霉素(90. 20%)高度耐药,其余抗菌药物的耐药率分别为:利福平(84. 31%)、链霉素(82. 35%)、头孢唑啉(74. 51%)等;分离鉴定的 87 株沙门氏菌对青霉素(94. 25%)、林可霉素(90. 80%)、克林霉素(87. 36%)、

表 1 大肠埃希氏菌和沙门氏菌分离株对 12 种抗菌药物耐药率

抗菌药物	大肠杆菌 (n = 51)		沙门氏菌 (n = 87)		总计 (n = 138)	
	耐药菌株数(株)	耐药率(%)	耐药菌株数(株)	耐药率(%)	耐药菌株数(株)	耐药率(%)
红霉素	48	94. 12	52	59. 77	100	73. 46
阿奇霉素	46	90. 20	48	55. 17	94	68. 12
克林霉素	49	96. 08	76	87. 36	125	90. 58
林可霉素	51	100. 00	79	90. 80	130	94. 20
链霉素	42	82. 35	16	18. 39	58	42. 03
庆大霉素	16	31. 37	6	6. 90	22	15. 94
多西环素	26	50. 98	72	82. 76	98	71. 01
四环素	30	58. 82	37	42. 53	67	48. 55
头孢唑啉	38	74. 51	44	50. 57	82	59. 42
青霉素	50	98. 04	82	94. 25	132	95. 65
利福平	43	84. 31	33	37. 93	76	55. 07
氧氟沙星	5	9. 80	3	3. 45	8	5. 80

多西环素(82.76%)高度耐药,其余抗菌药物的耐药率分别为:红霉素(59.77%)、阿奇霉素(55.17%)等。

2.5 细菌多重耐药结果

由图 7 可知,分离菌株多重耐药结果,51 株大肠杆菌中分离株中 8~10 重耐药的占比最大,累计比例为 72.55% (37/51),其中,最高为 9 重,耐药比例为 29.41% (15/51),1~4 重耐药菌株数为 0% (0/51)。87 株沙门氏菌分离株中 6~8 重耐药的占比最大,累计比例为 68.96% (60/87),其中,最高为 7 重,耐药比例为 28.74% (25/87),1~3 重和 11~12 重耐药的菌株数为 0% (0/87)。

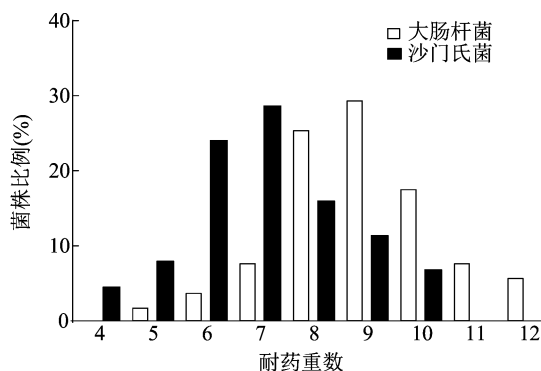


图7 分离菌株多重耐药性分析

3 讨论

根据国家统计局发布数据,受非洲猪瘟疫情的影响,2019 年我国生猪存栏 31 041 万头,同比下跌 27.5%;生猪出栏 54 419 万头,同比下跌 21.6%,而仔猪作为育肥猪的种苗,提高仔猪存活率至关重要^[6]。腹泻是猪场常见传染病之一,然而腹泻的流行病学原因却十分复杂,自身生理因素、饲料营养缺乏、环境应激和饲养管理不当及其他病原体感染等因素,均可能会导致仔猪肠道生态内环境改变,使得变形菌门中的大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌等条件致病菌在内的多种菌群失调,最终导致仔猪细菌性腹泻等症状^[7-8]。Hermann - Bank 等发现,肠杆菌属、肠球菌属增加了新生仔猪腹泻的风险且与肠道微生物变异密切相关,且使用疫苗接种或抗生素治疗效果有限^[9]。本试验对当地苏淮猪仔猪腹泻的细菌性病原进行分离培养鉴定,95 份样本共分离出 170 株病菌,大肠杆菌阳性率 82.10% (78/95),沙门氏菌阳性率 96.84% (92/95),混合感染率为 73.68% (70/95)。黄美州等对甘肃地区新生仔猪腹泻细菌性病原调查后发现大肠杆菌与沙门氏菌混合感染最终导致仔猪严重腹泻^[10];李晨等从贵

州地区 7 个养殖场 128 份仔猪肠道样本中分离到大肠杆菌的阳性率为 60.94% (78/128),沙门氏菌的阳性率为 16.41% (21/128)^[11];李淑红等在湘西北地区猪场检测到沙门氏菌分离率为 55.56% (10/18),大肠杆菌分离率为 44.44% (8/18)^[12];曲歌等在吉林地区 21 家规模化猪场 117 份仔猪腹泻粪便样本中进行 PCR 检测,分离出大肠杆菌 104 份,其中 49 份具有致病性,占样本总数的 42.88%;分离出沙门氏菌 19 份,其中 15 份具有致病性,占样本总数的 12.82%^[13],这进一步说明大肠杆菌在感染仔猪的普遍性,而沙门氏菌分离率差异性可能是由于地域差异、动物健康程度及养猪场用药情况不同所致。

另动物感染试验结果显示,大肠杆菌和沙门氏菌的致死率分别为 65.38% (51/78) 和 94.56% (87/92),其中,溶血性菌株的致死率为 100%,表明淮安地区分离菌株具有较强的毒力因子,与福建泉州地区大肠杆菌高致死率 71.43% (30/42)^[14]具有一致性。徐引弟等通过对致病性大肠杆菌开展药敏纸片试验并对 24 个耐药基因进行扩增分析,发现细菌耐药决定区基因发生变异是引起细菌耐药性的主要原因,进而从分子手段揭示了耐药细菌株的基因型和表型具有一定关联性,细菌产生多重耐药性的机制具有较高的复杂性^[15]。因此,对于苏淮猪可以参考从抗腹泻基因 *MUC13*、*FUT1* 进行定向选育,利用分子育种方案从源头上进行腹泻的防控^[16]。

近年来,养殖业已经大力开始提倡减抗禁抗行动,但在疾病的预防治疗、自配饲料的使用上,依然存在抗生素的滥用问题,致使细菌耐药性问题日趋严重^[17-18]。本研究对分离获得的致死小鼠大肠杆菌和沙门氏菌进行了 12 种抗菌药的耐药性分析,结果表明,大肠杆菌和沙门氏菌对林可霉素类和青霉素类高度耐药,耐药率均超过 90%,除喹诺酮类外,其他抗菌药均呈现不同程度的耐药率。张青娴等对分离的 1 株猪源产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌同样对青霉素类、头孢类、四环素类、喹诺酮类抗生素耐药,而对氨基糖苷类抗生素敏感,并通过 4 种常见的 ESBLs 耐药基因扩增分析,提出加强产酶耐药菌的监测及保守地使用现有抗生素的观点^[19]。而李佳瑞等从 25 株耐药大肠杆菌携带的主动外排基因进行研究,*acrA*、*acrB* 这 2 种主动外排基因和调控基因 *marA* 和 *soxS* 的相对表达量和多重耐药的耐

药谱数呈正相关,调控基因 *acrR* 的相对表达量和多重耐药的耐药谱数呈负相关^[20]。Xu 等对我国北京等 10 个省份的动物、人的非典型致病性大肠杆菌(aEPEC)进行药敏纸片试验,结果显示,267 株菌株中,128 株(47.9%)检出多重耐药,40 株耐药菌株对 10 种以上抗菌药物耐药,有 47 株(17.6%)菌株被鉴定为产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL),而从多重耐药情况看,致死小鼠大肠杆菌和沙门氏菌多重耐药情况严重,4 耐及 4 耐以上菌株高达 100%^[21],这一结果与 Li 等^[22]、田瑞^[23]研究基本一致,其中, Li 等研究发现高达 71.25% (57/80) 的沙门氏菌菌株呈现多种药物耐药,对头孢菌素类及氨基糖苷类抗生素敏感^[22];田瑞等研究的大肠杆菌分离率为 86.31% (580/672),累计产生 23 种多重耐药型^[23]。

4 结论

本研究从细菌性病原的角度对致苏淮仔猪腹泻的病因进行初步分析,发现大肠杆菌、沙门氏菌是主要致病菌,药敏纸片试验显示 2 种致病菌均呈现 4 重及以上多重耐药性,均对喹诺酮类药物高度敏感,试验结果可为苏淮猪细菌性腹泻症的病因和临床治疗提供参考依据。

参考文献:

- [1] Ho W S, Tan L K, Ooi P T, et al. Prevalence and characterization of verotoxigenic - *Escherichia coli* isolates from pigs in Malaysia [J]. BMC Veterinary Research, 2013, 9: 109.
- [2] Toledo A, Gómez D, Cruz C, et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico [J]. Journal of Medical Microbiology, 2012, 61(1): 148 - 156.
- [3] Barbara E S, Jeffrey J Z, Sylvie D A, et al. Swine diseases [M]. 9th ed. Beijing: China Agricultural University Press, 2008: 158 - 159.
- [4] 姚火春. 兽医微生物学实验指导 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 43 - 45.
- [5] 孙长贵, 译. 抗微生物药物敏感性试验执行标准 [S]. 第 20 版信息增刊, 2010: 25 - 30.
- [6] 张海峰. 2019 年生猪市场主要特征及 2020 年趋势 [J]. 中国猪业, 2020, 15(2): 13 - 19, 25.
- [7] Ruiz V L, Bersano J G, Carvalho A F, et al. Case - control study of pathogens involved in piglet diarrhea [J]. BMC Research Notes, 2016, 9(1): 22.
- [8] 汪群, 闫鹤. 腹泻仔猪与健康仔猪粪便菌群多样性的比较 [J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(8): 106 - 110.
- [9] Hermann - Bank M L, Skovgaard K, Stockmarr A, et al. Characterization of the bacterial gut microbiota of piglets suffering from new neonatal porcine diarrhoea [J]. BMC Veterinary Research, 2015, 11: 139.
- [10] 黄美州, 刘永明, 王慧, 等. 甘肃地区新生仔猪腹泻细菌性病原的分离鉴定及其耐药性分析 [J]. 西北农业学报, 2015, 24(12): 35 - 39.
- [11] 李晨, 张双翔, 周碧君, 等. 腹泻仔猪肠道致病性大肠埃希氏菌和沙门氏菌的分离鉴定与耐药性研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(12): 3625 - 3633.
- [12] 李淑红, 张华清, 王京仁, 等. 湘西北某规模化猪场临床病猪沙门氏菌及大肠杆菌混合感染的病原分离鉴定及耐药性分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 526(10): 100 - 102.
- [13] 曲歌, 沙万里, 高雪, 等. 吉林地区规模化猪场大肠杆菌和沙门氏菌仔猪腹泻流行情况调查 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(3): 89 - 90, 100.
- [14] 吴秋玉. 泉州地区猪源致病性大肠杆菌的分离鉴定血清型检测与耐药性分析 [J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(5): 97 - 99.
- [15] 徐引弟, 张青娟, 王治方, 等. 河南省规模化猪场猪肠外致病性大肠杆菌的耐药性分析 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39(8): 1526 - 1532.
- [16] 方宇瑜, 吴艳, 高硕, 等. 苏淮猪群体抗腹泻基因 *MUC13* 和 *FUT1* 多态性分析及其抗腹泻选育方案研究 [J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(12): 12 - 17.
- [17] Seitz M, Valentin - Weigand P, Willenborg J. Use of antibiotics and antimicrobial resistance in veterinary medicine as exemplified by the swine pathogen streptococcus suis [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2016, 398: 103 - 121.
- [18] 刘伟杰, 贺小娜, 韩珊珊, 等. 禽畜粪便中抗生素耐药菌的分离与分子鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(1): 291 - 293.
- [19] 张青娟, 徐引弟, 王治方, 等. 一株猪源产超广谱 β -内酰胺酶大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析 [J]. 养猪, 2019(3): 101 - 104.
- [20] 李佳瑞, 杨雨齐, 李思鸿, 等. AcrAB - TolC 主动外排系统与猪源耐药大肠杆菌多重耐药的相关性 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40(3): 595 - 601.
- [21] Xu Y M, Sun H, Bai X N, et al. Occurrence of multidrug - resistant and ESBL - producing atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in China [J]. Gut Pathogens, 2018, 10(1): 8.
- [22] Li Q, Yin J, Li Z, et al. Serotype distribution, antimicrobial susceptibility, antimicrobial resistance genes and virulence genes of *Salmonella* isolated from a pig slaughterhouse in Yangzhou, China [J]. AMB Express, 2019, 9(1): 210.
- [23] 田瑞. 河北省猪源 *E. coli* 分离鉴定及耐药性研究 [D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2018: 26 - 30.