

山西地区仔兔腹泻源大肠杆菌的分离·鉴定及耐药性分析

王国艳¹, 孙乐天², 张国权¹, 张晋强¹, 冯国亮¹, 曹亮¹, 任克良^{1*}

(1. 山西省农业科学院畜牧兽医研究所, 山西太原 030032; 2. 太原动物园, 山西太原 030009)

摘要 [目的] 调查山西地区仔兔腹泻源致病性大肠杆菌的耐药性。[方法] 从山西地区不同兔养殖场采集 110 份因腹泻死亡的仔兔肠道内容物, 进行病原分离, 并通过菌落形态观察和生化试验对其进行鉴定。开展动物致病性试验, 最后采用 K-B 纸片法用 14 种抗生素对分离菌株进行药物敏感性测定。[结果] 共分离出 60 株细菌, 通过菌落形态观察和生化试验均鉴定为大肠杆菌。药敏试验结果表明, 分离的 60 株大肠杆菌对阿米卡星的耐药率为 0, 而对庆大霉素、链霉素、多粘菌素 B、卡那霉素、氧氟沙星、诺氟沙星、痢特灵、头孢克罗、阿莫西林、头孢曲松、头孢吡酮、氯霉素、磷霉素 13 种常见药物均表现出不同程度的耐药性, 其中对头孢曲松、磷霉素、多粘菌素 B、阿莫西林、痢特灵、氯霉素、头孢吡酮的耐药率均在 80% 以上; 分离菌株对卡那霉素的耐药率最低, 为 3.3%。[结论] 山西地区仔兔腹泻源致病性大肠杆菌对 13 种抗生素产生了普遍的耐药性, 建议进一步扩大药物的筛选范围, 为大肠杆菌病的防制和临床用药的风险评估提供科学依据。

关键词 仔兔; 腹泻; 大肠杆菌; 耐药性

中图分类号 S855 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)22-0069-02

Separation, Identification and Drug Resistance Analysis of *Escherichia coli* from Baby Rabbits with Diarrhea in Shanxi AreaWANG Guo-yan¹, SUN Le-tian², ZHANG Guo-quan¹ et al (1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030032; 2. Taiyuan Zoo, Taiyuan, Shanxi 030009)

Abstract [Objective] To investigate the drug resistance of pathogenic *Escherichia coli* derived from baby rabbits with diarrhea in Shanxi area. [Method] 110 samples of intestine contents of diarrhea-infected rabbits were collected from different rabbit farms of Shanxi to separate pathogen. And the pathogen was identified by colony characteristics observation and biochemical test. The animal pathogenicity test was made and the drug sensitivity of isolated bacteria to 14 kinds of antibiotics were determined by using K-B disk diffusion method. [Result] 60 strains of pathogen were isolated and identified as *E. coli* by colony characteristics observation and biochemical test. The results of drug sensitivity test showed that the drug resistance rate of isolated strains to amikacin was 0, and isolated strains showed different drug resistance to 13 kinds of antibiotics (gentamicin, streptomycin, polymyxin B, kanamycin, ofloxacin, norfloxacin, furazolidone, cefaclor, amoxicillin, ceftriaxone, cefoperazone, chloramphenicol and fosfomicin). The drug resistance rate of isolated strains to ceftriaxone, fosfomicin, polymyxin B, amoxicillin, furazolidone, chloramphenicol and cefoperazone were all above 80%. The drug resistance rate of isolated strains to kanamycin was the lowest, being 3.3%. [Conclusion] The pathogenic *E. coli* derived from baby rabbits with diarrhea in Shanxi area had common drug resistance to 13 kinds of antibiotics, therefore it was suggested that the screening scope of drugs should be further expanded, so as to provide scientific basis for the prevention and control of rabbit colibacillosis and clinical drug's risk assessment.

Key words Baby rabbit; Diarrhea; *Escherichia coli*; Drug resistance

仔兔腹泻是兔养殖过程中常见的疾病。该病发病率高, 病因复杂且难以治愈, 死亡率高, 严重制约着兔养殖业的发展。引起仔兔腹泻的诱因十分复杂, 既有病原微生物因素, 也有非病原微生物因素^[1-2]。病原微生物以大肠杆菌、沙门氏菌、螺形梭菌、魏氏梭菌、轮状病毒、球虫、粗毛细纹线虫等为主^[3]。

大肠杆菌广泛存在于环境中, 发病率相对较高, 无明显季节性。当仔兔感染大肠杆菌时, 往往会出现急性腹泻, 造成仔兔短期内大量死亡。由于饮水是仔兔感染大肠杆菌的一个重要途径, 因此, 一旦发生容易造成流行^[4-5]。

不同动物源大肠杆菌的血清型比较复杂, 目前兔源大肠杆菌病尚无理想的疫苗来预防, 临床上治疗兔源大肠杆菌感染的主要措施仍是使用各类抗生素, 但由于抗生素的超剂量和频繁使用以及以亚治疗剂量添加于饲料中作为促生长剂及药物的不规范使用, 使其耐药谱不断扩大, 产生的多重耐药情况越来越普遍, 常使得临床治疗面临无药可用的困

境^[6-9]。大肠杆菌可通过菌毛将耐药质粒传递给其他大肠杆菌^[6], 因而给大肠杆菌病的防治带来了较大的挑战。笔者从山西地区不同兔养殖场采集 110 份因腹泻死亡的仔兔肠道内容物, 分离出致病菌, 并通过菌落形态观察和生化试验对其进行鉴定, 采用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验, 以期兔大肠杆菌病的防制和临床用药的风险评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源 选取山西地区不同兔养殖场因腹泻病死亡的仔兔, 通过无菌操作, 采集其肠内容物 110 份。

1.2 培养基与试剂 LB 琼脂平板、LB 肉汤以及麦康凯琼脂培养基、伊红美蓝培养基, 均购自青岛日水生物技术有限公司; ID32E 肠道菌鉴定试剂条, 购自法国梅里埃公司; 药敏纸片, 购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.3 试验器材 超净无菌工作台、高压灭菌锅、恒温培养箱、数显水浴恒温振荡器、ATB 1525 EXPRESSION 微生物鉴定和药敏分析仪、显微镜。

1.4 病原的分离与菌落形态观察 用接种环无菌挑取各肠道内容物病料, 分别加入 5 mL 的肉汤培养液中, 于 37 °C 温箱培养 18~24 h, 观察肉汤浊度; 再用接种环蘸取菌液划线接种于普通琼脂平板, 37 °C 下培养 18~24 h, 观察菌落颜色和形态; 挑取疑似大肠杆菌的优势菌落再次划线接种于麦康凯琼脂平板,

基金项目 国家兔产业技术体系专项 (CARS-43-B-3); 山西省农业科学特色农业技术攻关项目 (YGG17092)。**作者简介** 王国艳 (1982—), 女, 山西稷山人, 助理研究员, 从事动物疫病防治、细菌耐药性及微生态制剂开发研究。* 通讯作者, 研究员, 从事家兔营养、育种及生产研究。**收稿日期** 2018-04-25

37℃下培养18~24 h,观察菌落颜色;挑取典型的优势菌落接种到伊红美蓝平板上培养,进行革兰氏染色并镜检。

1.5 生化试验 按照ID32E肠道菌鉴定试剂条说明书对纯化培养的分离菌株进行生化试验。

1.6 动物致病性试验 20只健康小鼠(平均体质量30 g),购自山西医科大学实验动物中心。

挑取纯培养物的单个菌落,接种于LB液体培养基,37℃摇菌18~24 h。将所得菌液分别接种10只健康小鼠,腹腔注射菌悬液0.2 mL/只。选用10只健康小鼠,腹腔注射0.2 mL LB液体培养基,作为阴性对照。观察病变,采集病料并进行细菌分离与培养。

1.7 药敏试验 采用K-B纸片扩散法对头孢克罗、阿米卡星、链霉素、氧氟沙星、氯霉素、磷霉素、头孢曲松、庆大霉素、诺氟沙星、多粘菌素B、头孢哌酮、痢特灵、卡那霉素、阿莫西林14种抗生素进行药敏试验,37℃下培养18~24 h后测定抑菌圈直径。耐药性结果根据美国临床实验室国家标准化委员会(NCCLS)制定的标准判定。依据美国临床实验室标准委员会(NCCLS)制定的标准判断,即抑菌圈直径 ≥ 20 mm,为高度敏感;16 mm<抑菌圈直径<20 mm,为中度敏感;抑菌圈直径 ≤ 16 mm,为耐药。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离与菌落形态观察 普通肉汤中呈现明显混浊,有沉淀物,且在管壁形成菌环。普通琼脂平板上生长的菌落呈圆形、湿润、不透明、边缘整齐、表面隆起的光滑菌落,颜色呈乳白色;将琼脂平板上的优势菌落接种在麦康凯琼脂平板后,有粉红色、圆形、湿润、不透明、边缘整齐、表面隆起的光滑菌落生长;在伊红美蓝平板上长出深紫黑色、带金属光泽的圆形菌落。革兰氏染色镜检可见两端钝圆杆状菌,与大肠杆菌的培养特性相一致,初步共分离出60株。

2.2 生化试验结果 生化试验结果表明,60株分离株的V-P试验结果均呈阴性,吲哚试验结果均呈阳性,均产酸不产气,不分解尿素,能发酵甘露醇、葡萄糖、海藻糖、麦芽糖、阿拉伯糖、鼠李糖等,鉴定均为大肠杆菌,与《伯杰细菌鉴定手册》中大肠杆菌的生化特性相一致。

2.3 动物致病性试验 动物致病性试验结果表明,对照组小鼠的腹泻率为0,试验组小鼠的腹泻率为90%。剖检腹泻小鼠并采集肝脏及肠道内容物,进行细菌分离培养,能够得到与原分离菌株一致的原病菌。

2.4 药敏试验结果 利用14种抗生素分别对60株兔源大肠杆菌进行药敏试验,耐药性结果见表1。由表1可知,分离的60株兔源大肠杆菌对阿米卡星敏感,而对头孢曲松、头孢哌酮、卡那霉素、多粘菌素B、链霉素、磷霉素、痢特灵、阿莫西林均呈现出不同程度的耐药性。其中,分离菌株对头孢曲松的耐药性最高,达100%;分离菌株对卡那霉素的耐药率最低,为3.3%;分离菌株对其余12种抗生素的耐药性为5.0%~98.3%。

3 结论与讨论

该试验通过细菌的分离培养、染色镜检、生化试验等方

法对110份内脏组织及肠内容物中的大肠杆菌进行了分离与鉴定。结合菌落在平板上的乳白色菌落、染色镜检呈阴性杆菌、生化试验结果,共分离出60株大肠杆菌,通过动物致病性试验,推测其是引起该兔场仔兔腹泻的优势菌株。

表1 60株兔腹泻源大肠杆菌对14种抗生素的耐药性

Table 1 The drug resistance of 60 strains of *E.coli* derived from baby rabbits with diarrhea to 14 kinds of antibiotics

序号 No.	抗生素 Antibiotic	耐药性分布 Drug resistance distribution			耐药性 Drug resistance rate//%
		高度敏感 Highly- sensitive	中度敏感 Moderately sensitive	耐药 Resistant	
1	庆大霉素	54	3	3	5.0
2	阿莫西林	0	7	53	88.3
3	氧氟沙星	29	26	5	8.3
4	卡那霉素	53	5	2	3.3
5	阿米卡星	51	9	0	0
6	磷霉素	0	6	54	90.0
7	头孢曲松	0	0	60	100
8	诺氟沙星	40	12	8	13.3
9	头孢哌酮	3	9	48	80.0
10	氯霉素	4	7	49	81.7
11	痢特灵	0	8	52	86.7
12	头孢克罗	8	12	40	66.7
13	链霉素	9	40	11	18.3
14	多粘菌素 B	0	1	59	98.3

药敏结果表明,分离的60株大肠杆菌除对阿米卡星的耐药率为0外,对卡那霉素、庆大霉素、氧氟沙星、头孢曲松、多粘菌素B、磷霉素、阿莫西林、痢特灵、氯霉素、头孢哌酮、头孢克罗、链霉素、诺氟沙星均表现出不同程度的耐药性。其中,头孢曲松的耐药率最高(100%),这与李守现^[10]报道的山东省部分规模化兔场分离的大肠杆菌对头孢曲松的耐药率为17.98%结论不同,与张炳亮等^[11]报道的洛阳地区规模化猪场大肠杆菌对头孢曲松的耐药率(17.6%)有所差异。这说明不同地区、不同动物源大肠杆菌的耐药性不同。该试验结果表明分离的大肠杆菌对诺氟沙星的耐药率为13.3%,与坤清芳等^[12]报道的四川省兔源大肠杆菌对诺氟沙星的耐药率(46.39%)不同。该试验结果表明分离的大肠杆菌对庆大霉素的耐药率为5%,与坤清芳等^[13]报道的四川地区兔源大肠杆菌对庆大霉素的耐药率(56.52%)不同。该试验结果表明分离的大肠杆菌对氯霉素的耐药率为81.7%,与叶超群等^[14]报道的泰安宁阳地区兔源大肠杆菌对氯霉素的耐药率(25%)有所不同。这表明不同地区相同动物源大肠杆菌的耐药性也不同。该研究结果与石彬等^[15]报道的四川凉山州建昌鸭源大肠杆菌对阿米卡星的耐药率(0)相同,说明不同地区不同动物源大肠杆菌的耐药性有可能相同。该研究结果与王志宇等^[16]报道的山西地区鸡源大肠杆菌对阿米卡星的耐药率(53.33%)不同,表明同一地区不同动物源大肠杆菌耐药性不同。

综上所述,大肠杆菌的耐药性比较复杂,而山西省兔源

(下转第77页)

在罗非鱼精巢组织 SSH 反向文库中,核糖体蛋白 L22 表达下调。李红艳^[24]发现在果蝇胚胎、幼虫 S2 细胞中敲除 L22 对细胞周期产生影响。孙凯等^[25]发现 L22 表达沉默时细胞周期蛋白 D1 显著降低,相应的细胞增殖受到显著抑制。这说明核糖体蛋白 L22 与细胞增殖周期有密切联系。因此,在灭多威胁迫诱导糖体蛋白 L22 表达下调,可能对精巢组织细胞增殖周期造成影响。另外,还有磷脂酶 A2 差异表达基因下调。磷脂酶 A2 主要水解甘油磷脂,参与磷脂代谢。磷脂酶 A2 表达下调,可能影响精巢组织的磷脂代谢过程。

4 结论

采用抑制消减杂交(SSH)技术,构建了罗非鱼精巢组织在雌激素类农药灭多威胁迫下的正反向 SSH 文库,并获得 8 条功能确定基因序列。对部分重要的差异表达基因的鉴定和分析表明,在环境雌激素灭多威胁迫下,罗非鱼精巢组织脂蛋白代谢或类固醇激素分泌受到干扰,引起机体防御机制,诱导低密度脂蛋白受体相关蛋白、17 α -羟化酶/17,20-裂解酶表达量上调;诱导整合素 β 1 表达量上调,以维持精巢组织内部结构的稳定;丝/苏氨酸蛋白激酶 pim-3 表达下调,可能限制凋亡蛋白 Bad 磷酸化。Ca²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase、核糖体蛋白 L22 表达下调,细胞膜上离子平衡以及精巢组织细胞增殖可能受到影响。

参考文献

- [1] 郭新彪.环境健康学[M].北京:北京大学医学出版社,2006.
- [2] SUN L,LEE H K.Stability studies of propoxur herbicide in environmental water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry[J].Journal of chromatography,2003,1014(1/2):153-163.
- [3] 何瑞玲,齐景凯,张玉芬,等.通辽地区大米农药残留量调查[J].中国公共卫生管理,2007,23(5):464-466.
- [4] MENG S L, QIU L P, HU G D, et al. Effects of methomyl on steroidogenic gene transcription of the hypothalamic-pituitary-gonad-liver axis in male tilapia[J].Chemosphere,2016,165:152-162.
- [5] MENG S L, QIU L P, HU G D, et al. Responses and recovery pattern of sex steroid hormones in testis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of methomyl[J].Ecotoxicology,2016,25(10):1805-1811.
- [6] MENG S L, QIU L P, HU G D, et al. Effect of methomyl on sex steroid hormone and vitellogenin levels in serum of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) and recovery pattern[J].Environmental toxicology,2017,32(7):1869-

- 1877.
- [7] DIATCHENKO L, LAU Y F C, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J].Pro Natl Acad Sci USA,1996,93(6):6025-6030.
- [8] 王静,刘铮铮,潘荷芳,等.浙江省市级饮用水源地氨基甲酸酯农药的分析、污染特征及健康风险研究[J].环境化学,2010,29(4):623-628.
- [9] VAN SCOY A R, YUE M, DENG X, et al. Environmental fate and toxicology of methomyl[J].Reviews of environmental contamination and toxicology,2013,222:93-109.
- [10] EL-SAEID M H, AL-TURKI A M, AL-WABLE M I, et al. Evaluation of pesticide residues in Saudi Arabia ground water[J].Research journal of environmental sciences,2011,5(2):171-178.
- [11] U.S.EPA.2012 edition of the drinking water standards and health advisories;EPA 822-S-12-001[S].Washington,DC:Office of Water U.S.Environmental Protection Agency,2012.
- [12] 张学健,程永红,李世荣.固相萃取/高效液相色谱法测定生活饮用水中氨基甲酸酯类农药[J].中国卫生检验杂志,2014,24(9):1243-1244,1247.
- [13] 张冰,傅晓钦,徐能斌,等.液相色谱-质谱法测定水中氨基甲酸酯类农药及其代谢物[J].化工环保,2010,30(4):364-367.
- [14] 王子梅,陆召麟,郭爱丽.肾上腺皮质类固醇激素合成过程的研究进展[J].国外医学(内分泌学分册),1997,17(4):167-173.
- [15] YU H S, CHENG H H, GUO Y Q, et al. Alternative splicing and differential expression of P450c17(CYP17) in gonads during sex transformation in the rice field eel[J].Biochemical and biophysical research communication,2003,307(1):165-171.
- [16] BORG B. Androgens in teleost fishes[J].Comparative biochemistry and physiology part C,1994,109(3):219-245.
- [17] 孟顺龙.环境雌激素灭多威对雄罗非鱼下丘脑-垂体-性腺轴和抗氧化防御系统的影响研究[D].南京:南京农业大学,2014.
- [18] CHENG C Y, MRUK D D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development[J].Physiol Rev,2002,82(4):825-874.
- [19] SALANOVA M, STEFANINI M, DE CURTIS I, et al. Integrin receptor α 6 β 1 is localized at specific sites of cell-to-cell contact in rat seminiferous epithelium[J].Biol Reprod,1995,52(1):79-87.
- [20] LEE N P, CHENG C Y. Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: Is this a potential target for male contraceptive development? [J].Hum Reprod Update,2004,10(4):349-369.
- [21] HÄCKER G, PASCHEN S A. The rapetuc targets in the mitochondrial apoptotic pathway[J].Expert Opin Ther Targets,2007,11(4):515-526.
- [22] ZHA J P, HARADA H, YANG E, et al. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X_L[J].Cell,1996,87(4):619-628.
- [23] YANG E, ZHA J P, JOCKEL J, et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death[J].Cell,1995,80(2):285-291.
- [24] 李红艳.核糖体蛋白 L22 对果蝇发育的影响及机制[J].河北大学学报(自然科学版),2014,34(1):64-69.
- [25] 孙凯,薛鸿,解卫平,等.核糖体蛋白 L22 表达沉默对细胞周期蛋白 D1 表达的影响[J].江苏医药,2015,41(23):2791-2793.

(上接第 70 页)

大肠杆菌的耐药性较为严重,已成为兽医临床用药中的一个严重问题,临床上应避免长期使用同一种药物;细菌的耐药性通过染色体或质粒介导在细菌间传播和扩散^[6-16]。该研究结果为进一步深入研究免源大肠杆菌耐药性机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 陆德源.医学微生物学[M].北京:人民卫生出版社,2001:139.
- [2] 翁巧琴,袁新强,翁邵国,等.獭兔腹泻病原的分离、鉴定与药敏试验[J].中国养兔,2008(5):32-34.
- [3] 周庆甫.家兔腹泻成因与防治措施探析[J].山东畜牧兽医,2017,38(5):25-26.
- [4] 马长旺,吴敏秋.引起兔腹泻的原因分析与防治对策[J].当代畜牧,2013(3):28-31.
- [5] 高文玉.幼兔腹泻主要病因分析与综合防治[J].黑龙江畜牧兽医,2012(7):108-110.
- [6] 贺丹丹,黄良宗,陈孝杰,等.不同动物源大肠杆菌的耐药性调查[J].中

- 国畜牧兽医,2013,40(10):211-215.
- [7] 韩勃.獭兔致病性大肠杆菌的分离鉴定及灭活苗的制备[D].长春:吉林农业大学,2014.
- [8] 李双双,贺志沛,罗俊娜,等.免源大肠杆菌的分离鉴定及药物敏感性检测研究[J].江西农业学报,2013,25(8):70-72.
- [9] 刘保光,李胜利,杨东东,等.河南省免源大肠杆菌氨基糖苷类、四环素类和磺胺类耐药基因检测[J].家畜生态学报,2016,37(7):60-63.
- [10] 李守现.免源大肠杆菌耐药性检测与分析[J].中兽医医药杂志,2017,36(4):47-49.
- [11] 张炳亮,王文文,杨国栋,等.洛阳地区规模化猪场大肠杆菌耐药基因检测及耐药性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2018(5):125-128.
- [12] 坤青芳,耿毅,余泽辉,等.免源大肠杆菌对喹诺酮药物耐药性及质粒介导的耐药基因检测[J].中国预防兽医学报,2016,38(12):944-948.
- [13] 坤青芳,耿毅,余泽辉,等.免源产 ESBLs 大肠杆菌耐药性与优势基因型研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2018,46(1):15-20,29.
- [14] 叶超群,王晓艺,常维山.泰安一兔养殖场大肠杆菌耐药性的检测[J].山东畜牧兽医,2017,38(6):4-6.
- [15] 石彬,孙艳,泽仁拥忠,等.凉山州不同动物源大肠杆菌耐药性调查[J].黑龙江畜牧兽医,2018(4):115-119.
- [16] 王志宇,王国艳,薛俊龙,等.山西省鸡源性大肠杆菌多重耐药性分析[J].山西农业科学,2018,46(2):272-275.