

巴马小型猪大肠埃希菌的分离鉴定及耐药性试验

陈克研¹, 张 贺¹, 陈振文², 王 洋¹, 王承利¹

(1. 沈阳军区总医院实验动物科, 沈阳 110840; 2. 首都医科大学基础医学院实验动物学系, 北京 100069)

【摘要】 目的 分离鉴定引起巴马小型猪腹泻的细菌并筛选出对其敏感的特效药物。**方法** 通过常规细菌学检测、分子生物学鉴定、生化试验等方法对疑似细菌感染的巴马小型猪进行分析,同时选用呋喃妥因、美满霉素、庆大霉素等 25 种药物对分离的细菌进行药敏实验。**结果** 通过以上实验判定巴马小型猪为大肠埃希菌感染引起的腹泻,血清型为 O138;药敏试验分析结果表明,该菌株仅对青霉素、链霉素、头孢曲松和呋喃妥因 4 种药物敏感,对磷霉素、磺胺脒、左氧沙星等高度耐药。**结论** 大肠埃希菌广泛存在耐药性,该研究结果为防治相关实验动物大肠埃希菌感染提供理论依据。

【关键词】 巴马小型猪; 大肠埃希菌; 分离鉴定; 耐药性

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)07-0040-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2012. 007. 011

Isolation, Identification and Resistance of Colibacillus of Bama Minipigs

CHEN Ke-yan¹, CHEN Zhen-wen², ZHANG He¹, WANG Yang¹, WANG Cheng-li¹

(1. Department of Laboratory Animal, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110840, China;

2. Department of Laboratory Animal Science, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To isolated and identify a bacterium from Bama minipigs of diarrhea and the patent medicine were screened by drug susceptibility test. **Methods** A bacterium isolated from Bama minipigs was identified by morphological, germiculture, staining, Molecular biology and biochemical characteristics. The resistance test were used to selected the sensitive medicine by 25 drugs. **Results** The Colibacillus of Bama Minipigs were success isolated and identified as serotype O138. The result of resistance test to 25 drugs showed that the bacterium was sensitive to Penicillin、Streptomycin、Rocephin and Nitrofurantoin, but highly resistant to another drugs that were used. **Conclusion** The animal regression test showed that the bacterium have high pathogenicity. The result of this paper would provide the theory basis for prevention and control Colibacillus Infections of related experimental animal.

【Key words】 Bama minipigs; Colibacillus; Isolation and identification; Resistance

巴马小型猪源于广西巴马瑶族自治县^[1],由于其体型小、遗传性状稳定且在解剖学和生理生化等方面与人有较大的相似性,目前广泛应用于心脑血管疾病、皮肤病及消化系统疾病的外科手术及模型制作中^[2,3],而实验动物的质量是实验成功的前提。

大肠埃希菌是近年来严重危害小型猪饲养的主要疾病之一^[4],由于其血清型较多,且对多数抗生素存在耐药性,给该病的防治带来一定的困难。本研究对疑似细菌感染的巴马小型猪进行检测,确诊为猪大肠埃希菌感染。此外,本实验对分离的菌株耐

【作者简介】共同第一作者:陈克研(1983-),男,博士,研究方向:实验动物病理学。E-mail:chenkeyan888@163.com;张贺(1981-),男,硕士,主治医师,研究方向:实验动物模型制作。E-mail:alwayszh@yahoo.com.cn。

【通讯作者】王承利(1953-),副主任医师,研究方向:实验动物学。E-mail:qingsong1953@yahoo.com.cn;王洋(1970-),主管技师,研究方向:实验动物学。E-mail:wangyang-0418@sina.com。

药性进行分析,筛选出治疗用特效药物,为小型猪大肠埃希菌病的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源:沈阳军区总医院实验动物科于 2012 年 3 月先后从异地购进巴马小型猪 20 头,在例行常规检验时发现 3 头猪临床表现异常,并伴随腹泻症状,立即用无菌棉拭子从这三头猪的直肠处采集样本,做进一步分析。

1.1.2 主要试剂:美蓝染液、革兰染液、麦康凯琼脂培养基、普通肉汤培养基、葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、乳糖、蔗糖、枸橼酸盐等试剂购自沈阳博洋生物技术有限公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker DL-2000 均为 TaKaRa 公司产品;大肠埃希氏菌 O 型抗血清购自中国兽药监察所。

1.1.3 实验动物:清洁级雌性昆明小鼠 20 只,体重 12~25 g,由沈阳军区总医院实验动物科提供(生产许可证号:SCXK(军)2007-001;使用许可证号:SYXK(军)2007-001)。

1.2 方法

1.2.1 镜检:将棉拭子采集的直肠样本直接涂抹到无菌盖玻片上,按常规染色技术分别对其进行美蓝和革兰染色,显微镜下油镜观察。

1.2.2 细菌分离培养:将棉拭子样本用无菌 PBS (0.01 mol/L pH 7.4)处理后按 1% 的浓度接种普通肉汤培养基;37℃ 培养 24 h 后,用接种环粘取培养物,分别在麦康凯培养基和伊红美蓝培养基中进行划线培养;37℃ 培养 24 h 后,挑取单个菌落,进行革兰染色,显微镜下油镜观察。

1.2.3 PCR 鉴定:依据猪大肠埃希菌的毒力因子基因序列设计大肠埃希菌通用引物:上游 5'-TCCTCAGCTATAGGCTGC-3',下游 5'-ATCGAAAC AAGGCCAGTT-3';和大肠埃希菌特异性引物:上游 5'-CAGGTGCTGCTGCTGCTAAA-3',下游 5'-TCA GCGTGTTGGATCAACCT-3',由华大基因公司合成;以分离的细菌为模板进行 PCR 鉴定^[5]。

1.2.4 生化试验:将分离的菌株分别接种葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、枸橼酸盐等微量糖发酵管,37℃ 培养 24 h 后,观察结果。

1.2.5 血清型鉴定:将 16 种大肠埃希菌标准 O 型血清用石炭酸生理盐水分别作 4 倍稀释,吸取 20 μL 于无菌载玻片上,然后粘取加热处理后的大肠埃

希菌“O”抗原于血清中混匀;若有凝集颗粒出现判为阳性,若 5 min 内不出现凝集颗粒则为阴性。

1.2.6 致病性实验:取清洁级昆明小鼠 20 只,随机分为 4 组,每组 5 只,腹腔注射分离的细菌,0.2 mL/只(约 2×10^8 CFU),第 5 组腹腔注射普通肉汤,做阴性对照;隔离饲养,逐日观察。

1.2.7 病毒检测:将采集的棉拭子样本用无菌 PBS (0.01 mol/L pH 7.4)制成乳悬液;用 2% 磷钨酸负染,电镜观察是否有病毒粒子。

1.2.8 药敏试验:将分离鉴定后的菌株接种普通肉汤培养基,37℃ 培养 24 h 后,将培养液均匀涂布于普通琼脂培养基中;分别将头孢他叮等 25 种抗生素纸片贴于平皿中;37℃ 培养 24 h 后观察抑菌环大小。以上使用的 25 种药物分别为:青霉素、链霉素、红霉素、磷霉素、四环素、磺胺脒、利福平、庆大霉素、克拉霉素、呋喃妥因、新生霉素、美满霉素、头孢呋新、复方新诺明、氨苄青霉素、妥布霉素、左氟沙星、丁胺卡那霉素、头孢他叮、乙基西梭霉素、先锋必/舒巴坦、丙氟哌酸、磺胺嘧啶、菌必治、头孢氨噻肟。

2 结果

2.1 镜检

采集直肠棉拭子样本触片后经美蓝染色,可在镜下见到明显的短杆菌;革兰染色后可见两端钝圆且显红色的革兰阴性菌。

2.2 分离培养特性

采集的棉拭子经无菌 PBS 处理后,接种普通肉汤培养基,培养 24 h 后可见试管混浊且在底部存在不易分散的黏稠沉淀物;进一步接种麦康凯培养基,有单一的砖红色光滑菌落出现;伊红美蓝琼脂培养基上则出现紫黑色带金属光泽的菌落;分别挑取上述单个菌落进行革兰染色,镜下油镜观察,均为革兰阴性的短杆菌。

2.3 PCR 鉴定结果

应用 PCR 对 3 个样本进行鉴定,结果如图 1 所示,3 个菌株分别经大肠埃希菌通用引物及大肠埃希菌特异性引物 PCR 扩增后,均可扩增出 1797 bp 和 750 bp 的目的片段,初步判定为同一株大肠埃希菌。

2.4 生化试验结果

取 3 株分离菌的典型菌落进行生化试验,结果如表 1 所示,3 株细菌的生化鉴定结果一致,均能

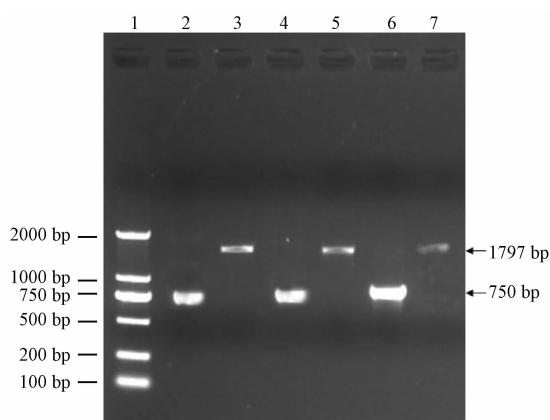


图 1 PCR 鉴定结果

Fig. 1 The identification results by PCR

注: 1. DNA Marker DL 2000; 2 ~ 3、4 ~ 5 和 6 ~ 7 分别为菌株 1、2、3 使用大肠埃希菌通用引物及大肠埃希菌特异性引物的扩增结果。

Note: 1. DNA Marker DL2000; 2 ~ 3、4 ~ 5 and 6 ~ 7: The amplified results of strain 1, 2 and 3 were used *E. coli* consensus primer and specificity primer, respectively.

分解葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇及蔗糖, 产酸产气。

表 1 生化鉴定结果

Tab. 1 Result of biochemistry identify

项目 Item	结果 Result		
	1	2	3
葡萄糖 Glucose	⊕	⊕	⊕
乳糖 Lactose	⊕	⊕	⊕
麦芽糖 Maltose	⊕	⊕	⊕
甘露醇 Manicol	⊕	⊕	⊕
蔗糖 Sucrose	⊕	⊕	⊕
靛基质 Indigo	+	+	+
枸橼酸盐 Citrate	-	-	-
尿素酶 Urease	-	-	-

注: “+”为产酸或阳性;“-”为阴性;“⊕”为产酸产气

Note: “+” means positive or acid; “-” means negative; “⊕” means acid and aerosis

2.5 血清型鉴定结果

使用猪大肠埃希菌 O 型抗血清对分离的 3 个菌株鉴定, 结果 3 个菌株的血清型均为 O138。

2.6 致病性试验结果

试验组小鼠在接种后 12 h, 表现畏光拱背; 小鼠 24 h 后出现死亡, 72 h 后, 小鼠全部发病, 死亡率达 60%; 剖检死亡小鼠可见脾脏肿大并伴有充血; 无菌取心脏、肝脏和脾脏进行触片, 染色镜检, 同时进行细菌分离培养, 结果分离的细菌与巴马小型猪病料中分离的一致, 提示该菌株有一定的致病性。

2.7 病毒分离试验结果

病料经电镜观察未发现病毒样粒子。

2.8 药敏试验结果

以抑菌环直径大小作为对药物敏感性的判定标准, 结果如表 2 所示, 该菌株仅对青霉素、链霉素、头孢曲松和呋喃妥因 4 种药物敏感, 对磷霉素、磺胺脒、左氟沙星等高度耐药。

3 讨论

大肠埃希菌是严重危害小型猪饲养的主要疾病之一, 本文对 10 日龄左右的巴马小型猪进行检查时发现 3 头猪表现异常, 并伴有腹泻。科室人员立即采集直肠样本进行检验, 通过常规的美蓝及革兰染色, 镜下观察确定其为革兰阴性的短杆菌; 将其接种麦康凯和伊红美蓝培养基, 其生长特征与大肠埃希菌一致的; 进一步通过 PCR 验证, 初步判断分离的细菌为大肠埃希菌。此外, 由于病毒性疾病也容易伴发腹泻症状, 本文将采集的病料处理后通过电镜观察, 未发现病毒粒子, 从而排除病毒性疾病的可能。在临床诊断时遇到异常症状, 应详细收集临床资料, 了解病程综合分析, 查阅文献后进行鉴定。

目前, 细菌性疾病大多应用抗生素进行治疗, 但由于细菌本身血清型较多, 再加上临床存在滥用抗生素的现象^[7], 导致大多数菌株存在耐药现象。李云龙^[8]等对 5 种血清型大肠埃希菌进行耐药分析时发现各类型菌株的耐药率最高达到 96.8%。姜中其等^[9]采用 Kirby-Bauer 法检测 60 株大肠埃希菌, 结果有 57 株呈耐药谱型。本研究应用 25 种抗菌药物对分离的大肠埃希菌进行药敏试验, 结果仅青霉素、链霉素、头孢曲松和呋喃妥因对其敏感。由此可见, 大肠埃希菌的耐药性在临床中普遍存在, 在临床用药时应先进行药敏试验, 筛选出高效敏感的药物进行治疗。

目前, 国外用于生命科学和生物医学研究用的小型猪大多在 SPF 级水平^[10], 我国虽具有独特的小型猪资源, 但还未见成型的质量标准, 在某种层面上影响了比较医学资料的形成。因此, 如何排除小型猪的病原体, 保证小型猪相关研究的质量, 便显得尤为重要。本研究通过细菌学检测技术及分子生物学技术分离鉴定出引起巴马小型猪腹泻的菌株为大肠埃希菌; 进一步通过药敏实验筛选出对其敏感的特效药物, 一方面为小型猪疾病的发生和防

表 2 药敏试验结果
Tab. 2 Result of resistance test

序号	抗菌药 Antibacterial agent	每片含药量 (ug)	抑菌环直径 (mm)	抑菌圈直径毫米整数		
				R	I	S
1	青霉素 Penicillin	10	33	≤21	22 ~ 29	≥30
2	链霉素 Streptomycin	10	25	≤11	12 ~ 14	≥15
3	红霉素 erythromycin	15	10	≤13	14 ~ 22	≥23
4	磷霉素 Fosfomycin	200	5	≤12	13 ~ 15	≥16
5	四环素 Achromycin	30	13	≤14	15 ~ 18	≥19
6	磺胺脒 Sulfamidine	250	4	≤12	13 ~ 16	≥17
7	利福平 Rifampicin	120	4	≤11	12 ~ 15	≥16
8	庆大霉素 Gentamicin	10	8	≤12	13 ~ 14	≥15
9	克拉霉素 Clarithromycin	250	5	≤13	14 ~ 22	≥23
10	呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	25	≤14	15 ~ 16	≥17
11	新生霉素 Novobiocin	250	8	≤16	-	-
12	美满霉素 Minocin	20	0	≤1	2 ~ 14	≥15
13	头孢呋辛 Cefuroxime	30	10	≤14	15 ~ 22	≥23
14	复方新诺明 selectrin	23. 75	7	≤10	11 ~ 15	≥16
15	氨苄青霉素 Ampicillin	10	5	≤13	14 ~ 16	≥17
16	妥布霉素 Tobramycin	10	13	≤12	13 ~ 14	≥15
17	左氟沙星 Levofloxacin	5	5	≤13	14 ~ 16	≥17
18	丁胺卡那霉素 Amikacin sulphate	30	15	≤13	14 ~ 17	≥18
19	头孢他叮 Cefotaxime	30	8	≤15	16 ~ 19	≥20
20	乙基西梭霉素 Netilmicin	10	13	≤12	13 ~ 14	≥15
21	先锋必/舒巴坦 Cefobid/Sulbactam	10	10	≤11	12 ~ 14	≥15
22	丙氟哌酸 Ciprofloxacin	5	7	≤15	16 ~ 20	≥21
23	磺胺嘧啶 SulfadiazineStandard	300	14	≤12	13 ~ 16	≥17
24	头孢曲松 Rocephin	30	29	≤13	14 ~ 20	≥21
25	头孢氨噻肟 Cefotaxime	30	2	≤14	15 ~ 22	≥23

注：“R”代表耐药，“S”代表敏感
Note:“R”means resistance,“S”means sensitive

治提供理论依据,另一方面为小型猪的生物进化和种群建立奠定基础。

参考文献:

[1] 王爱德. 广西巴马小型猪的选育研究[J]. 中国比较医学杂志,2004,14(03):160.
[2] Silva GV, Fernandes MR, Madonna R, et al. Comparative healing response after sirolimus-and paclitaxel-eluting stent implantation in a pig model of restenosis [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2009, 73(6):801-808.
[3] Lee L, Alloosh M, Saxena R, et al. Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine[J]. Hepatology, 2009, 50(1): 56-67.
[4] 高丰,贺文琦,陈克研,等. 动物疾病病理诊断学[M]. 北京: 中国农业出版社,2010:111-114.
[5] 郑华英,曾莹春,吕均. 疑似 O157:H7 大肠埃希菌 PCR 鉴定研究[J]. 中国医学检验杂志, 2010,11(5):226-228.

[6] BE 斯特劳. 猪病学[M]. 第九版,赵德明,张仲秋,主译. 北京:中国农业大学出版社,2000,348-354.
[7] Zhang W, Bielaszewska M, Kucius T, et al. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stxl C) in Escherichia coli strains isolated from humans[J]. J Clin Microbiol, 2002,40:1441-1446.
[8] 李云龙,李继伟,任家琰. 仔猪大肠埃希菌的分离鉴定及耐药试验[J]. 甘肃畜牧兽医, 2009,2(205):4-7.
[9] 姜中其,陈晓红,方维焕,等. 规模化猪场仔猪断奶腹泻大肠埃希菌耐药性监测[J]. 浙江大学学报农业与生命科学版,2004,30(5):567-571.
[10] Pieri F, Locarelli E, Corinaldesi G, et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2009, 67(2):265-272.

[修回日期]2012-07-05