

吴道义, 马金萍, 王明进, 等. 腹泻奶牛源大肠杆菌的分离鉴定及中药的体外抑菌效果 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (2): 116-123.

WU D Y, MA J P, WANG M J, et al. Identification of *Escherichia coli* from dairy cattle and the antibacterial effect of Chinese medicines *in vitro* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (2): 116-123.

腹泻奶牛源大肠杆菌的分离鉴定及中药的体外抑菌效果

吴道义¹, 马金萍^{1*}, 王明进¹, 王霞¹, 曾继晶¹, 周礼扬¹, 罗耀¹, 李坤²

(1. 毕节市畜牧兽医科学研究所, 贵州 毕节 551799;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了研究贵州毕节某奶牛场荷斯坦奶牛发生腹泻的原因, 从该奶牛场采集 50 份新鲜粪便样本, 通过平板划线法对大肠杆菌进行分离纯化和 PCR 鉴定, 采用 K-B 纸片法进行药物敏感试验, 并对多种耐药基因进行 PCR 检测。针对多重耐药菌, 选取虎耳草和杜鹃花 2 种中草药进行体外抑菌效果研究。结果显示: 从腹泻奶牛粪便中分离出 31 株细菌, 其菌落形态和生化特性与大肠杆菌相符; 16S rRNA 基因测序比对发现该牛场分离的菌株与 NCBI 数据库中大肠杆菌参考菌株的同源性达到 99.65%~99.86%, 确定该奶牛场的腹泻病原为大肠杆菌; 药敏试验发现该牛场来源的大肠杆菌对多种抗生素(强力霉素、红霉素、青霉素 G 和四环素)耐药, 而对磺胺异恶唑、头孢曲松、环丙沙星、庆大霉素、多黏菌素 B、磷霉素等 10 种抗生素敏感; PCR 扩增相关耐药基因发现, 导致该牛场腹泻的大肠杆菌携带 2 种 β -内酰胺类 (bla_{CTX-M} 、 bla_{TEM}), 4 种四环素类 ($TetD$ 、 $TetB$ 、 $TetK$ 、 $TetA$), 2 种氨基糖苷类 ($ant(3'')-Ia$ 、 $rmtB$) 和 3 种喹诺酮类 ($qnrS$ 、 $qepA$ 、 $oqxA$) 耐药基因。体外抑菌研究发现, 杜鹃花 (3.125 mg/mL) 的水提物有显著的抑菌效果。试验结果可为该奶牛场防治大肠杆菌性腹泻提供用药指导, 同时为开发替代中草药产品提供了依据。

关键词: 腹泻; 大肠杆菌; 分离鉴定; 耐药性; 耐药基因

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)02-0116-08

Identification of *Escherichia coli* from dairy cattle and the antibacterial effect of two Chinese medicines *in vitro*

WU Daoyi¹, MA Jinping^{1*}, WANG Mingjin¹, WANG Xia¹, ZENG Jijing¹, ZHOU Liyang¹, LUO Yao¹, LI Kun²

(1. Bijie Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Bijie 551799, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to identify the cause of diarrhea of Holstein cows in a dairy farm in Guizhou Province, this study collected fresh fecal samples ($n=50$) from the dairy farm, and the samples were separated and purified by plate scribing and PCR identification. Next, drug sensitivity test was conducted using the K-B paper method, and multiple drug resistance genes were detected by PCR. Finally, two Chinese herbs of rhododendron and Saxifraga stolonifera were used to determine the bacteriostatic effect against multiple resistant bacteria *in vitro*. The results showed that 31 strains of bacteria were isolated from the feces of the dairy cows suffering from diarrhea, the colony morphology and biochemical characteristics of the strains were consistent with those of *Escherichia coli*. Sequences alignment showed that the isolates from the dairy farm (16S rRNA gene) had 99.65%~99.86% homology with the reference *Escherichia coli* strains in the NCBI database, which confirmed that the diarrhea pathogen on the dairy farm was *Escherichia coli*. The results of drug sensitivity test showed that the isolated strains from this dairy farm were resistant to several antibiotic including doxycycline, erythromycin, penicillin G and tetracycline, but sensitive to sulfamethoxazole, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamycin, polymyxin B, fosfomycin, etc. PCR amplification of related drug-resistant genes found that the *E. coli* strains causing diarrhea in the cattle farm carried drug-resistant genes of two β -Lactam resistance genes of bla_{CTX-M} and bla_{TEM} , four tetracycline resistance genes of $TetD$, $TetB$, $TetK$, $TetD$ and $TetA$, two aminoglycoside resistance genes of $ant(3'')-Ia$

收稿日期: 2023-04-07; 修回日期: 2023-12-12

基金项目: 威宁黄牛营养调控及粗饲料高效利用关键技术研究及示范贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2021]一般153); 喀斯特山区粮改饲技术集成示范与产业化(黔科合服企[2021]12-03号); 农业农村部国家肉牛牦牛产业技术体系毕节试验站(CARC-37); 贵州省威宁县威宁黄牛繁育基地贵州省第六批人才基地项目(黔人领发[2018]3号)

第一作者: 吴道义, 男, 硕士, 高级畜牧师

*通信作者: 马金萍, 高级兽医师, 主要研究方向为基础兽医学, E-mail: 499583220@qq.com.

and *rmuB*, and three quinolone resistance genes of *qnrS*, *qepA* and *oqxA*. *In vitro* bacteriostatic study showed that water extract of rhododendron (3.125 mg/mL) had significant bacteriostatic effect. These results provided guidance for the dairy farm in prevention and treatment of coliform diarrhea, and might serve as the basis for development of anti-bacterium Chinese herbal medicine products.

Keywords: *Escherichia coli*; isolation and identification; drug resistance; drug resistant gene; herb

机会性致病菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是畜牧生产上一种十分重要的人畜共患病原微生物, 可通过自然界中的土壤和水体等多种媒介进行传播, 对人类食品安全和公共卫生产生较大威胁^[1]。目前抗生素和抗菌药物被广泛用于治疗大肠杆菌感染, 以降低畜禽的发病率和死亡率, 但抗菌药物的大量使用产生诸多危害, 一方面可通过动物的粪便和尿液进入土壤和水环境, 影响微生态平衡, 产生耐药微生物, 通过食物链引发公共卫生问题^[2-3]; 另一方面, 可导致大肠杆菌耐药性问题加剧, 交叉耐药和多重耐药也愈发严重, 临床治疗难度加大, 给养殖场造成了重大的经济损失^[4]。因此, 通过病原菌的分离鉴定和耐药性研究, 掌握牛场的主要致病菌及其耐性情况, 可以指导临床科学, 准确地用药, 对于奶牛腹泻病的预防和控制有着极其重要的临床意义^[5]。随着耐药性问题的日益严峻, 开发新的抗菌药物和产品已迫在眉睫。中药在防治人和家畜疾病中发挥着重要作用, 其安全、耐药性低, 已成为替抗产品研究的热点^[6]。

本研究通过对贵州毕节某奶牛场腹泻奶牛的新鲜粪便进行病原菌分离纯化、生化鉴定、序列比对确定病原种类, 并进行致奶牛腹泻病原菌对常见抗生素敏感性的测定和相关耐药基因的 PCR 扩增分析, 旨在为畜牧养殖中大肠杆菌性腹泻病的防控及耐药菌的研究奠定基础 and 提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

50 份腹泻奶牛粪便采自贵州省某荷斯坦奶牛场, 用无菌棉签拨开粪便, 再用新的无菌棉签从粪便内部采集少许, 收集于 50 mL 无菌离心管中, 迅速置于液氮中运回实验室。

1.2 试验试剂

大肠杆菌分离鉴定培养基, 包括麦康凯、LB (肉汤/琼脂) 和伊红美蓝培养基购自青岛海博生物技术有限公司; 细菌微量生化鉴定管和药敏纸片购于杭州滨和微生物试剂有限公司; 革兰染色试剂盒和细菌基因组提取试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司; 试验所用扩增引物均由生工生物 (上海) 股份有限公司合成。虎耳草和杜鹃花购自同仁堂。

1.3 细菌的分离与鉴定

称取约 1 g 粪便样品于 10 mL 无菌离心管中, 再

加入约 5 倍体积的 LB 肉汤, 充分振荡混匀, 37 °C 摇床振荡培养 2 h。接种环蘸取微量菌液, 在 LB 固体培养基上划线, 置于 37 °C 温箱中培养 18~20 h。挑取优势菌落采用三区划线法依次接种于麦康凯和伊红美蓝培养基上, 培养 18~20 h, 连续传代纯化, 挑取菌体典型的单菌落进行革兰染色和显微镜检查细菌形态。

1.4 生化鉴定

将纯化培养的菌落接种于大肠杆菌微量生化反应管中, 37 °C 培养 18~24 h, 观察并记录结果。

1.5 16S rRNA 基因序列测定

挑取纯化的典型单菌落在 LB 肉汤中摇菌过夜, 取 2 mL 过夜培养的菌液在 4 °C、12 000 r/min 的条件下, 离心 5 min, 然后弃掉上清液以获得沉淀的菌体, 通过 DNA (细菌) 提取试剂盒提取菌体 DNA, 作为 PCR 反应的模板底物。扩增引物为 16S rDNA 通用引物 (27F/1492R, F: 5' - AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG - 3', R: 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'), 目的基因片段长度为 1 465 bp。25 μL 的 PCR 反应体系包括 12.5 μL 的 2×Taq PCR Master Mix, 1 μL 的 DNA 模板, 上/下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, 9.5 μL 的 ddH₂O。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 25 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。反应结束后吸取 10 μL 的 PCR 产物取用于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 阳性扩增产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司南京分公司进行基因序列测序。将菌体的测序序列与 NCBI 数据库中收藏的细菌 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 比对分析并构建系统进化树。本试验选择的参考基因序列为: 大肠杆菌 (KP789331.1、KP789332.1、OP355282.1、OP355452.1、P051137.1、LC428294.1、KT260801.1、CP104371.1、KX349997.1、MN208163.1、KJ477001.1、OL823013.1、MK561310.1)、金黄色葡萄球菌 (L37597.1) 和变异链球菌 (OQ608657.1)。

1.6 药敏试验

针对致奶牛腹泻的大肠杆菌, 本试验共检测了其 16 种常见抗生素的耐药情况。判断依据为 CLSI 公布的大肠杆菌对抗生素药敏纸片敏感范围的最新标准, 根据细菌对抗生素的敏感程度, 将试验结果分为 3 种, 即耐药 (R)、中介 (I) 和敏感 (S)。

1.7 耐药基因 PCR 检测

参考之前报道的相关耐药基因的引物^[7-12]，进行腹泻奶牛源大肠杆菌的相关耐药基因 PCR 检测。反应使用的 PCR 反应体系和程序与 1.5 相同，不同基

因 PCR 反应中的退火温度和预期产品大小详见表 1。然后通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 扩增产物检测，使用凝胶成像系统进行扩增条带分析。

表 1 耐药基因序列

药物类别	耐药基因	引物序列 (5'→3')	大小/bp	退火温度/°C
β-内酰胺类	<i>bla_{SHV}</i>	F: ATGCGTATATTCGCCTGTG R: CCTCATTGAGTTCCGTTTCC	502	52
	<i>bla_{CTX-M}</i>	F: CGCGCTACAGTACAGCGATA R: CCTTAGGTTGAGGCTGGGTG	434	58
	<i>bla_{TEM}</i>	F: TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA R: ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	445	60
大环内酯类	<i>ermA</i>	F: GTTCAAGAACAATCAATACAGAG R: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC		51
	<i>ermB</i>	F: CGAGTGA AAAAGTACTCAACC R: GCCGTGTTTCATGCTTGATG	557	60
	<i>ermC</i>	F: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC R: GGCTCAGGAAAAGGGCATTTTAC		56
四环素类	<i>TetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	56
	<i>TetB</i>	F: TTGTTAGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCAATAACACCG	659	53
	<i>TetC</i>	F: CTTGAGAGCCTTCAACCCAG R: ATGGTCGTCATCTACCTGCC	418	56
	<i>TetD</i>	F: AAACCATTACGGCATTCTGC R: GACCGGATACACCATCCATC	787	54
	<i>TetM</i>	F: GAGGTCCGTCTGAACCTTGCG R: AGAAAGGATTGGCGGCACT	594	58
	<i>TetK</i>	F: ATAAATTGTTTGGGCTCGGTAAT R: AACCAGCCAACTAATGACAATGAT	1 159	53
氨基糖苷类	<i>ant (3'') -Ia</i>	F: ATCTGGCTATCTTGCTGAC R: TATGACGGGCTGATACTGG	284	53
	<i>aac (6') -Ib</i>	F: ATGACCTTGGATGCTCTAGA R: CGAATGCCTGGCGTGTIT	717	56
	<i>rmtB</i>	F: ATGAACATCAACGATGCCCTC R: TTATCCATTCTTTTTATCAAGTATAT	756	53
喹诺酮类	<i>qnrS</i>	F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCCG	428	56
	<i>qepA</i>	F: CTTGCACTTAGTTAAGCGCC R: GAGGTTTTGATAGTGGAGGTAGG	866	54
	<i>oqxA</i>	F: GACAGCGTCCACAGAATG R: GGAGACGAGGTTGGTATGGA	339	56

1.8 大肠杆菌对小鼠的致病性研究

24只4周龄ICR小鼠(购自青龙山动物繁殖中心),雌雄各半,平均体重(18.0±1.5)g。小鼠适应3d后,随机分成4组,即对照组,生理盐水;攻毒组I,低剂量(3×10⁷CFU/mL);攻毒组II,中剂量(3×10⁸CFU/mL);攻毒组III,高剂量(3×10⁹CFU/mL)。对照组小鼠分别进行腹腔注射0.2mL生理盐水,攻毒组小鼠进行腹腔注射组0.2mL的菌液,观察小鼠的精神、腹泻、饮食和死亡情况。

1.9 中草药的体外抑菌研究

虎耳草和杜鹃花经过水煮、旋蒸浓缩,制备冻干粉。在3mL的LB液体培养基中加入不同浓度的虎耳草(1.5、3和6mg/mL)和杜鹃花(3.125、6.25和12.5mg/mL)水提物,然后挑单菌落,在培养基中混匀。设置时间梯度(0、2、3、3.5、4、4.5、5、5.5、7和9h),每个组设置3个重复,通过紫外分光光度法测OD值。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离与鉴定

从50份荷斯坦奶牛腹泻粪便中分离到31份(62.0%)疑似大肠杆菌的菌株,这些菌株在麦康凯培养基上的菌落特征为表面光滑和边缘整齐的粉红色圆形或扁平的菌落;而在伊红美蓝培养基上的菌落特征为金属光泽的紫黑色菌落。在显微镜下,致奶牛腹泻病原菌的染色镜检结果为革兰阴性、短杆状且两端钝圆的散在或成对出现的细菌(图1)。

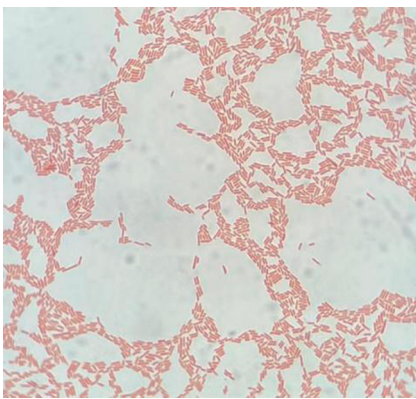


图1 革兰染色镜检结果(1000×)

2.2 生化鉴定

致毕节某农场奶牛腹泻病原菌的生化试验结果详见表2,其中除蔗糖为阴性外,其他的糖和醇类反应均为阳性,靛基质和MR试验为阳性,枸橼酸盐利用试验和VP试验为阴性。

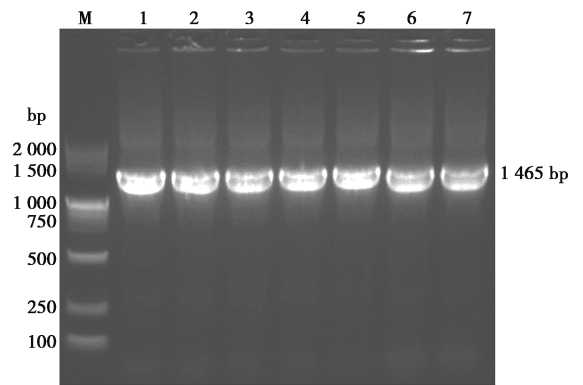
表2 大肠杆菌生化试验结果

项目	结果
甘露醇	+
葡萄糖	+
麦芽糖	+
乳糖	+
蔗糖	-
靛基质	+
枸橼酸盐	-
MR 试验	+
VP 试验	-

注: +表示生化反应为阳性, -表示生化反应为阴性。

2.3 16S rRNA 基因序列测定及系统进化树分析

致奶牛腹泻病原菌的16S rRNA基因扩增条带均在1500bp左右,见图2,条带大小符合目的条带长度。PCR测序结果呈现单一峰值,表明测序数据结果可靠,分离菌株扩增序列与GenBank中大肠杆菌参考株基因序列的同源性达到99.65%~99.86%,通过与NCBI数据库中的相关参考序列比对和构建进化树分析,发现分离菌株与KJ47700.1和MN561310.1参考株被划为一支,说明其与该2菌株的同源性较高(图3)。



M. DNA Marker DL2000; 1~7. 部分菌株。

图2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物电泳

2.4 药敏试验

致奶牛腹泻病原菌对常见抗生素的耐药性分析结果详见表3,这些分离株对四环素、青霉素G、强力霉素、红霉素、环丙沙星、磺胺异恶唑和恩诺沙星呈现严重的耐药现象,且存在多重耐药性,耐药率为38.71%~100%(图4),而对其他9种抗生素相对敏感。

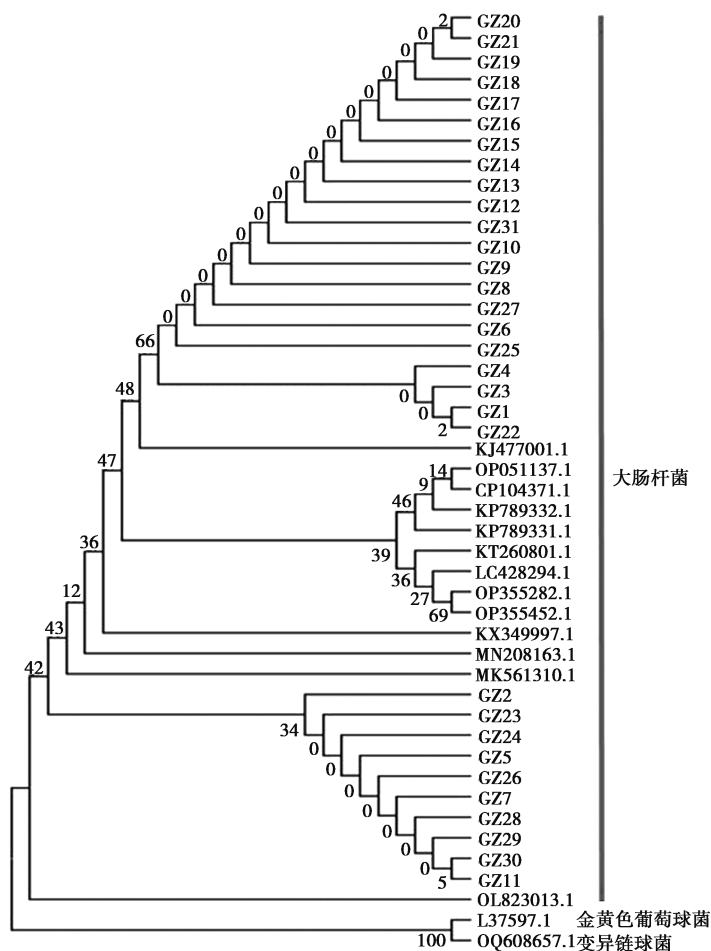


图 3 分离菌的 16S rRNA 基因序列系统发育树分析结果

表 3 药敏试验结果

抗生素类型	药物名称	耐药数	中介数	敏感数	抑菌圈直径/mm		
					R	I	S
β-内酰胺类	青霉素 G	31	0	0	≤14	11~14	≥15
	氨苄西林	0	4	27	≤13	14~16	≥17
大环内酯类	红霉素	29	2	0	≤13	14~22	≥23
四环素类	四环素	31	0	0	≤19	20~22	≥23
	强力霉素	21	10	0	≤12	13~15	≥16
头孢类	头孢曲松	0	0	31	≤13	14~20	≥21
	头孢唑林	0	0	31	≤14	15~17	≥18
多肽类	多黏菌素 B	0	2	29	≤8	9~11	≥12
多磷类	磷霉素	0	0	31	≤12	13~18	≥19
	磺胺类	磺胺异恶唑	17	10	1	≤12	13~16
氨基糖苷类	链霉素	0	0	31	≤11	12~14	≥15
	卡那霉素	3	20	8	≤13	14~17	≥18
	庆大霉素	0	11	20	≤12	13~14	≥15
	诺氟沙星	0	0	31	≤12	13~16	≥17
喹诺酮类	恩诺沙星	12	19	0	≤15	16~20	≥17
	环丙沙星	25	6	0	≤15	16~20	≥21

注：S 表示敏感，I 表示中度敏感，R 表示耐药。

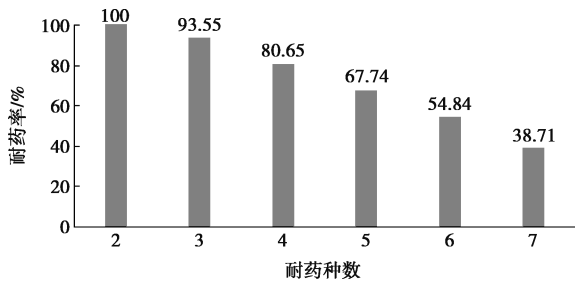
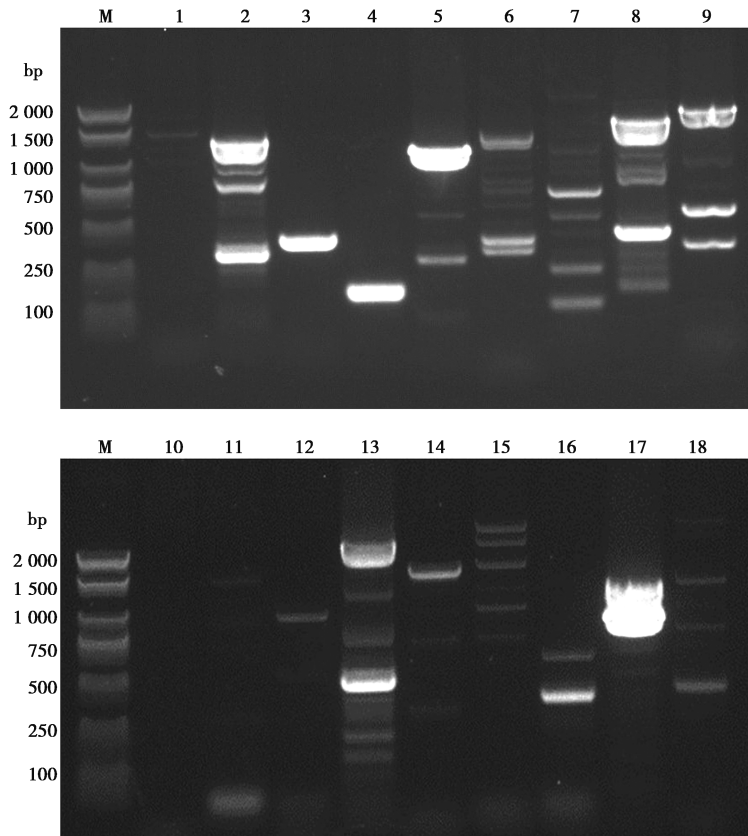


图4 多重耐药性结果统计

2.5 耐药基因的检测

耐药基因 PCR 扩增发现, 分离株中存在的耐药基因有 β -内酰胺类的 bla_{CTX-M} 和 bla_{TEM} , 四环素类耐药基因 $TetK$ 、 $TetB$ 、 $TetC$ 、 $TetD$ 、 $TetA$, 氨基糖苷类耐药基因 $ant(3'')-Ia$ 、 $rmtB$, 喹诺酮类耐药基因 $qnrS$ 、 $qepA$ 、 $oqxA$, 其余耐药基因检测结果均为阴性(图5)。主要耐药基因的携带率为 6.45%~100.00%(图6)。



M. DNA Marker DL2000; 1. bla_{SHV} ; 2. bla_{CTX-M} ; 3. bla_{TEM} ; 4. $TetA$; 5. $TetB$; 6. $TetC$; 7. $TetD$; 8. $TetM$; 9. $TetK$; 10. $ermA$; 11. $ermB$; 12. $ermC$; 13. $ant(3'')-Ia$; 14. $aac(6')-Ib$; 15. $rmtB$; 16. $qnrS$; 17. $qepA$; 18. $oqxA$ 。

图5 耐药基因 PCR 检测结果

2.6 大肠杆菌对小鼠的致病性

腹腔注射 6 h 后, 中剂量和高剂量攻毒的 ICR 小鼠陆续出现表现不同程度的精神沉郁、昏睡、腹泻等临床症状。8 h 低剂量组小鼠出现精神沉郁、昏睡的症状, 但腹泻不明显, 高剂量小鼠全部死亡(100%)。12 h 中剂量组小鼠死亡 2 只(33.33%)。

18 h 低剂量组小鼠死亡 1 只(16.67%), 中剂量组小鼠全部死亡(100%)。剖检发现, 腹腔注射大肠杆菌后, 攻毒组小鼠肝脏和脾脏明显出血, 肠道形态改变, 肠壁变薄和鼓气, 有明显的出血, 且肠道内有大量黄色内容物。

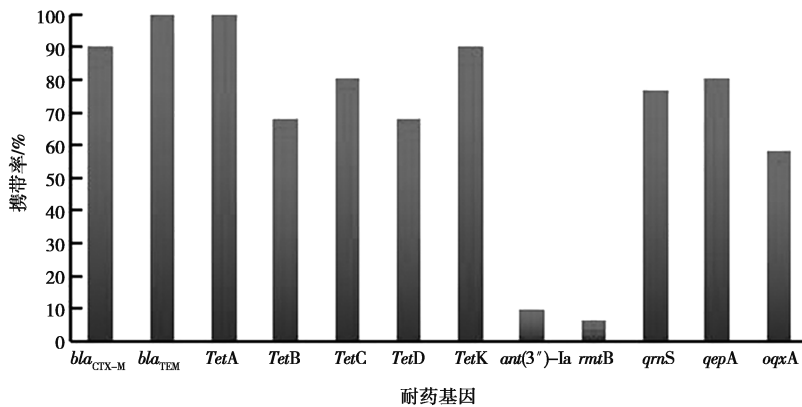
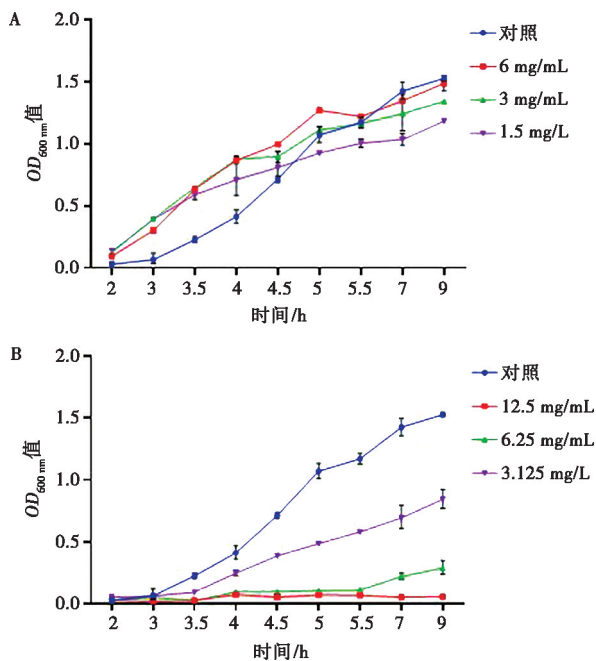


图6 耐药基因携带率统计结果

2.7 中草药的抑菌效果

体外抑菌研究发现,虎耳草水提物对腹泻奶牛源的多重耐药大肠杆菌没有明显抑菌作用,而不同浓度的杜鹃花水提物均可以显著的抑制该耐药性大肠杆菌的增殖,特别是中、高浓度的杜鹃花水提物作用下,大肠杆菌基本未增殖(图7)。



A. 添加虎耳草水; B. 添加杜鹃花水。

图7 2种中草药水提物对耐药大肠杆菌的抑菌结果

3 讨论

致病性大肠杆菌是全球牧场中腹泻犊牛、乳房炎和子宫内膜炎患病奶牛常被检出的主要病原微生物,该菌不仅危害动物的健康,更给养殖业带来了十分严重的经济损失,是奶牛产业发展和壮大必须面临和解

决的难题^[13]。2022年,贵州某奶牛场出现大量牛腹泻病例,通过对新鲜病料的病原菌分离鉴定发现,62.0%腹泻粪便中存在病原菌,经形态学、生化鉴定和PCR扩增及测序比对,确定这些病原菌为大肠杆菌,即腹泻病例中大肠杆菌的感染率高达62.0%。对小鼠致病性研究发现,中、高剂量的大肠杆菌对小鼠的致死性较强,且小鼠出现了明显的腹泻症状。对这些病原菌的耐药性分析发现,这些细菌对4种常见的抗生素(强力霉素、青霉素G、四环素和红霉素)耐药性严重,且均为严重的多重耐药,而对其他常见的抗生素相对敏感。这与从甘肃某规模化牧场腹泻犊牛粪便^[14]和新疆疑似大肠杆菌导致死亡的牛病料^[15]分离的大肠杆菌耐药性结果相近,但本研究分离的菌株多重耐药性相对较低。为进一步研究其耐药原因,本试验进行了致腹泻大肠杆菌分离菌株的耐药基因扩增,结果发现这些腹泻病原菌中存在的耐药基因有2种β-内酰胺类基因(*bla*_{CTX-M}和*bla*_{TEM}),5种四环素类基因(*TetK*、*TetD*、*TetB*、*TetA*和*TetC*),2种氨基糖苷类耐药基因(*ant*(3'')-Ia、*rmtB*),3种喹诺酮类耐药基因(*qnrS*、*qepA*、*oqxA*),这些耐药基因与之前研究报道的结果相近^[7,14-15]。分析发现这些致腹泻的菌株耐药表型与其对应的耐药基因型存在不一致的现象,推测可能存在耐药基因的变异或耐药基因相互协同作用或与其他基因协作,从而表现出耐药表型。

细菌耐药性及超级细菌问题,已受到越来越多研究者的重视。特别近些年来,在生产实践中多重耐药性大肠杆菌的报道及其相关耐药基因的揭示已普遍存在,研究发现这些耐药基因会在细菌间垂直传播^[16]。大肠杆菌是食品卫生和环境污染检测的重要指示菌,粪便中的大肠杆菌是污染的主要来源,经粪-口传播循环使病原菌永久存在和放大化,给牛大肠杆菌病的防治带来困难。抗生素的过度滥用,特别临床常用的

抗生素, 诸如喹诺酮类、 β -内酰胺类、氯霉素类、四环素类、氨基糖苷类和磺胺类^[17], 使得大肠杆菌已经产生较严重的耐药性。同时由于滥用抗生素迫使菌体不断更新耐药基因, 耐药性越来越严重, 这也是抗生素对其效果越来越差, 临床表现为治愈率低下的主要原因^[18]。杜鹃花不仅有行气活血、补虚的作用, 最新的研究发现该中药还能消炎杀菌、驱虫和止咳等^[19], 但关于其抗菌的研究相对较少。刘艳霞^[20]发现藏药杜鹃花对革兰阳性菌有一定的抑菌作用。本研究证实了杜鹃花对多重耐药性大肠杆菌有显著的抑菌功效, 可以进一步进行替抗药物或饲料添加剂的开发。

因此, 针对该奶牛场出现的多重耐药性大肠杆菌导致腹泻的问题, 治疗中应选用尚未出现耐药性的抗生素, 也可以一种或多种抗生素联合, 从而提高抗菌效果。优先考虑头孢曲松、磷霉素、卡那霉素、庆大霉素、环丙沙星等抗生素, 同时确定用药的最佳剂量, 减少耐药性的发生; 也可以考虑使用杜鹃花等具有抑菌作用的药物作为饲料添加剂作来预防大肠杆菌腹泻病, 或通过灌胃中药水提物进行治疗, 但需要进一步的临床试验。此外, 要注重环境卫生消毒工作, 加强奶牛饲养管理, 减少致病菌和病毒的滋生, 提高奶牛抵抗力。

参考文献:

- [1] PENG J J, BALASUBRAMANIAN B, MING Y Y, et al. Identification of antimicrobial resistance genes and drug resistance analysis of *Escherichia coli* in the animal farm environment [J]. *J Infect Public Health*, 2021, 14 (12): 1788-1795.
- [2] AMÉZQUITA-LÓPEZ B A, SOTO-BELTRÁN M, LEE B G, et al. Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2018, 51 (4): 425-434.
- [3] 江婉琳, 徐双军, 刘雨欣, 等. 新疆阿克苏地区奶牛粪源大肠杆菌分型与耐药性分析 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (12): 2434-2443.
- [4] 许淑芸, 何白雪, 俞杰, 等. 新疆石河子市牛源大肠杆菌分离鉴定及对 β -内酰胺类药物的耐药性分析 [J]. *中国动物检疫*, 2022, 39 (7): 49-54.
- [5] 刘少昆. 京津部分地区犊牛腹泻大肠杆菌分离鉴定及耐药性分析 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [6] 郎利敏, 李海利, 方剑玉, 等. 22味中药对犊牛腹泻大肠杆菌的体外抑菌试验 [J]. *中兽医医药杂志*, 2023, 42: 53-56.
- [7] 王国艳, 范建强, 党文庆, 等. 山西部分地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药基因分析 [J]. *安徽农业科学*, 2022, 50 (12): 79-81.
- [8] 崔羽茜, 丹雨晴, 武慧敏, 等. 7株羊源大肠埃希氏菌的分离鉴定及相关耐药基因的研究 [J]. *动物医学进展*, 2022, 43 (10): 27-34.
- [9] 冯世文, 李军, 李常挺, 等. 广西规模化猪场猪源大肠杆菌耐药表型和耐药基因检测及相关性分析 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 40 (6): 1170-1178.
- [10] 梁圆, 张丹丹, 程景, 等. 犊牛源大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58 (5): 52-57, 63.
- [11] 刘雪松, 张艳, 王爽, 等. 一株四环素耐药大肠杆菌耐药基因检测 [J]. *现代畜牧科技*, 2022, 89 (5): 28-30.
- [12] 张锦熙. 哈尔滨市猪源大肠杆菌耐药性和耐药基因的检测分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- [13] GAO R, WANG C, HAN A, et al. Emodin improves intestinal health and immunity through modulation of gut microbiota in mice infected by pathogenic *Escherichia coli* O₁ [J]. *Animals (Basel)*. 2021, 11 (11).
- [14] 郭永恒. 犊牛腹泻性大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验 [J]. *中国牛业科学*, 2020, 46 (6): 15-16.
- [15] 顾晓晓. 新疆部分地区牛、羊源肠外致病性大肠杆菌分离鉴定、分子分型及耐药性研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2020.
- [16] GELALCHA B D, ENSERMU D B, AGGA G E, et al. Prevalence of antimicrobial resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in dairy cattle farms in east tennessee [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2022, 19 (6): 408-416.
- [17] 李细牯. 兽医临床常用抗菌药物的特点及其联合用药 [J]. *江西畜牧兽医杂志*, 2009 (4): 32-36.
- [18] 尹业师, 陈华海, 曹林艳, 等. 细菌耐药性应对策略研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2018, 34 (8): 1346-1360.
- [19] 徐宝贵, 李松慧, 宋明霞, 等. 锦绣杜鹃花抗菌、抗炎活性及其有效部位研究 [J]. *聊城大学学报 (自然科学版)*, 2018, 31 (3): 86-92.
- [20] 刘艳霞. 20种常用藏药材抗菌活性筛选 [D]. 拉萨: 西藏大学, 2021.