

不同種類動物糞便分離大腸菌對於化學療法劑之感受性及其R因子之傳達

陳 清 林再春 林榮培 林地發

(臺灣省家畜衛生試驗所)

林 明 豐

(高雄醫學院藥學系)

摘 要

由不同種類健康動物糞便分離大腸菌51株(包括 Recipient一株)，實施化學療法劑感受性試驗之結果，以康徽素及 Nalidixic acid 為最高，(惟 Recipient strain 對 NA resistance)，氯徽素次之，而青徽素及磺胺劑為低。(詳如圖 1 或表 1)。又其對藥劑抵抗之類型，單劑者以 BP 為最多有44株(佔86.2%)。而多劑者以BP, SA者為最多有20株(佔39.2%)，其次為SM, BP, OTC, SA有13株(佔25.5%) (詳如表 1 及 2)，而各劑抵抗因子之傳達試驗，亦以BP為最高，在44株中有36株(佔81.6%)，其次為SA在19株中有13株(佔68.4%) (詳如表 3)。

至於R因子之傳達試驗，在所分離耐性菌47株中有40株佔35.1%，而佔供試51株之79.8%。以動物別而言，耐性大腸菌株之出現以豬較多，而抵抗因子之傳達數目亦以豬隻來源者較大。

緒 言

抗生物質及其他化學療法劑廣被用為家畜家禽飼料添加劑以來，約有二十年之歷史，雖然在疾病之預防及促進發育方面幫助很大，但由於長期連續投與之結果，而引起耐性菌之增加。另一方面耐性細菌增加之結果，在家畜家禽疾病之預防與治療上則降低藥效，且由於抗菌物質用量增加，畜產品肉、蛋、乳中藥劑之殘留，遂成為公共衛生上之嚴重問題⁽⁵⁾。

近年來有關細菌對於藥劑感受性方面之研究頗為重視，如 Tanaka 等⁽¹⁴⁾ (1969) 曾由分離 Shigella 菌5,875株中，發現5,429株具有一至數種藥劑之抵抗性，且帶有50%之R-factor。Odakura 等⁽¹⁰⁾ (1972) 自病材中分離出40菌株之 Protus rettgeri 具有對 Chloramphenicol等七種藥物之抵抗類型。並發現92%之 R⁺ P. rettgeri 具有 Hetero R State。又寺門等⁽²⁾ (1972) 由一般家畜及人糞便中分離出937株大腸菌，在試管內實施感受性試驗，發現由豬及健康人糞便分離之耐性菌其R因子之檢出率約為40%，牛由來菌者為60%。又 Jarolmen and Kemp⁽⁷⁾ (1969) 及 Terakado 等^(11,12) (1972) 曾以 Gnotobiotic Pigs 作活體腸管內 R-factor 之檢查亦獲得證實。

筆者等曾由本所飼養供試之牛、馬、綿羊、山羊、豬、家兔及同仁眷屬糞便檢體中，分離出大腸菌51株(含對照1株)。為明瞭其於試管內對化學療法劑之感受性及其藥劑抵抗性因子之傳達問題，乃加以研究探討，所得成績報告如下：

材 料 與 方 法

(一) 試驗材料：

1. 檢體糞便材料來源：由豬14頭，牛2頭，馬4頭，山羊2頭，綿羊1頭，家兔8頭及工作同仁眷屬7人之糞便材料為檢體。
2. 供試大腸菌株：係由上述糞便材料檢體，在 MacConkey agar plate 上分離培養，並經生物學性狀之觀察，同定確認為大腸菌者。
3. Recipient 菌株：係筆者（陳）於1973年赴日研習 SPF 豬生產推廣技術時由 Dr. Terakado 分讓携回之 E. Coli ML 1410 (NA—resistance, methonine—requiring, F—derivative of K—12) 及 Secondary recipient W3630 各一株。
4. 供試藥劑：對於藥劑感受性試驗及 R—factor 檢查用材料，除選擇性及同定所需特殊培養基外，其餘感受性試驗用藥劑則以目前常用之康徽素 (Kanamycin Sulfate 簡稱 KM, Meiji)，氯徽素 (Chloramphenicol 簡稱 CP, Yuen Foog)，四環徽素 (Tetracycline HCl 簡稱 TC, Chiphar)，土徽素 (Oxytetracycline 簡稱 OTC, Pfizer)，二氫鏈徽素 (Dihydrostreptomycin sulfate 簡稱 SM, Meiji) 青徽素 (Benzyl Penicillin 簡稱 BP, Glaxo lab.) 等6種抗生素及 Nalidixic acid (簡稱 N. A, Sigma, U. S. A) Sulfamonomethoxine—Na (簡稱 SA, Daiichi, Japan,) 等二種化學療法劑為供試材料。

(二) 試驗方法：

1. 藥劑感受性試驗：將分離並經同定之大腸菌培養於 Heart infusion broth 18—20小時，然後以滅菌生理食鹽水100倍稀釋（約含有 10^6 /ml colony forming unit）再以滅菌棉棒沾取塗擦於含有不同濃度抗菌物質之 agar plate 上，培養18~20小時後，依照日本化學療法學會標準法之最小發育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration) 測定法⁽¹⁾測定之。
2. 藥劑耐性傳達因子 (R—factor) 之檢出：將前述最小發育阻止濃度超過 25mcg/ml agar plate 者為耐性菌株，而 Sulfamonomethoxine—Na 則以超過 800mcg/ml Agarplate 者為耐性菌株，供為 donor 菌株。再以 E. Coli ML1410 菌株作為 Recipient 菌株（必要時復以 W3630 菌株作 Secondary recipient 試驗），於 Heart infusion broth 內實施 Conjugation 並培養18~20小時後，再移植培養於含有定量 50mcg/ml NA 及各抗菌物質之 agar plate 實施 reisolation 及 Purification 試驗，以檢查供試 donor 菌株中 R—factor 傳達之有無。

結 果

一、供試菌株對於化學療法之感受性：

由不同種類健康動物糞便分離所得大腸菌 51株（包括 Recipient strain ML 1410株），依最小發育阻止濃度測定法測定結果，在所有供試菌株中，除 Recipient strain 之 ML 1410株對 Nalidixic acid 有很高之抵抗性外，其餘各株對康徽素及 Nalidixic acid 之敏感性均甚高，未發現有抵抗菌株。氯徽素之敏感性亦很高。反之青徽素、鏈徽素、土徽素、四環素及 Sulfamonomethoxine—Na 對於供試菌株之感受性則甚低（詳如圖 1 或表 1）。

二、供試菌株對化學療法劑之抵抗類型：

由感受性試驗結果發現供試菌株對於青徽素等化學療法劑具有 7 種抵抗類型 (Drugs resistance Pattern)，其中以 BP. SA 者為最多，有 20株（佔39.2%）。其次為 SM. BP. OTC. TC. SA 有 13株（佔25.5%），而在 51株中除 47株具有耐性菌株外，其餘 4 株（7.8%）對於供

Table 1. Sensitivity of Isolated *E. coli* to Various Chemotherapeutic Agents分離 *E. coli* 對各種化學療法劑之感受性

Distinguish Kind of agent	Examined strain	Resistance strain	Minimum inhibitory concentration (MIC) mcg/ml											
			1.53	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	>200	400	800	>800
Dihydrostreptomycin	51	24	—	8	18	1	—	1	4	4	15	—	—	—
Benzyl penicillin	51	44	—	—	—	—	7	30	6	2	6	—	—	—
Kanamycin sulfate	51	0	1	—	45	5	—	—	—	—	—	—	—	—
Chloramphenicol	51	5	—	—	34	11	1	—	—	3	2	—	—	—
Oxytetracycline	51	23	—	—	1	17	10	—	1	—	22	—	—	—
Tetracycline	51	23	—	—	1	13	14	1	2	6	14	—	—	—
Nalidixic acid	51	1	—	30	16	4	—	—	—	—	1*	—	—	—
Sulfamonomethoxine— Na	51	19	—	—	—	—	—	—	—	—	51	11	21	19

Remark : 1. *N. A. resistance strain (ML 1410) was supplied by Dr. Terakado Nat. Vet. Assay Lab. Japan.

- The antibiotics resistance strains were more than 25mcg/ml by MIC method.
- The sulfamonomethoxine—Na resistant strains were more than 800 mcg/ml by MIC method.

Table 2. In Vitro Transfer of Drug—resistance Patterns of *E. coli* Strains在試管內 *E. coli* 菌株的藥物抵抗類型之傳遞

Strain used as donor and resistance pattern	No. of strains examined	Strain used as recipient	Resistance patterns transferred to recipient	No. of strain
SM. BP. CP. OTC. TC. SA.	6(11.8%)	ML 1410	SM. BP. OTC. TC.	2
SM. BP. OTC. TC. SA.	13(25.5%)		SM. BP. SA.	4
BP. OTC. TC. SA.	3(5.9%)		OTC. TC. SA.	1
SM. BP. SA.	3(5.9%)		BP. SA.	27
OTC. TC. SA.	1(2.0%)		BP.	2
BP. SA.	20(39.2%)		SA.	3
SM. SA.	1(2.0%)		CP.	1
Sensitivity	4(7.8%)			
Total	51			40

*The strains used as donor are the same as shown in Table 1.

Table 3. The result of Resistance & Transferred R-factor Strain of Isolated E. coli to each Chemotherapeutic Agents

對於每一化學療法劑之抵抗性及傳遞 R 因子的株數

Distinguish Kind of agents	Tested strain	Resistant strain*	Resistance factor transferred to recipient strain
SM	51	24(47.0%)	6(27.3%)
BP	51	44(86.2%)	36(81.8%)
KM	51	0(0)	0(0)
CP	51	5(9.8%)	0(0)
OTC	51	23(43.1%)	3(13.6%)
TC	51	23(43.1%)	3(13.6%)
SA	51	※19(37.3%)	13(68.4%)

Remark : *The antibiotics resistance strain were more than 25 mcg/ml by MIC method.

※*The sulfamonomethoxine—Na resistance strain were more than 800 mcg/ml by MIC method.

Table 4. Comparison of Drugs Resistant Strains & R-factor Transferred Strains of E. coli Isolated from Different Healthy Animal's Feces

從不同健康動物糞便分離 E. coli 之藥物抵抗株及 R- 因子傳遞株之比較

Kinds of tested drugs	Resistant strains								R-factor transferred strains							
	P	R	H	C	G	S	Hu	Cont.	P	R	H	C	G	S	Hu	
	(14)	(8)	(5)	(2)	(2)	(1)	(18)	(1)								
SM	8	3	1	2	1	0	8	0	5	0	0	0	1	0	0	
BP	13	7	5	2	2	0	15	0	4	0	0	1	2	0	3	
KM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CP	0	0	0		0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
OTC	9	3	1	1	1	0	7	0	2	0	0	0	1	0	0	
TC	9	3	1	1	1	0	7	0	2	0	0	0	1	0	0	
SA	7	1	2	2	1	1	6	0	6	1	1	0	0	0	4	
NA	0	0	0	0	0	0	0	1								

Remarks :

1. The tested strains are all sensitivity to N. A. below 25 mcg/ml.
2. ML 1410 strains was resistant to N. A. more than 200 mcg/ml and sensitivity to antibiotics below 25 mcg/ml mentioned above for recipient strains.
3. The number strain in the parentheses were used for sensitivity test.
4. P : Pigs, R : Rabbit, H : Horse, C : Cattle, G : Goat, S : Sheep, Hu : Human, Cont : Control.

討 論

畜牧生產原以利用廣大自然草地為飼養環境，根本談不上衛生管理，亦無飼料添加劑之使用，惟由於世界人口之增加至為迅速，土地利用幾達飽和狀態，因此以往粗放之畜牧生產漸漸步入集約經營⁽¹²⁾。

由於多頭數飼養之結果，必然引起三種情況，即環境衛生之惡化，發育遲滯以及疾病之多發。為消除前述各項困擾，近二十年來以抗生物質及其他抗菌劑作為家畜家禽感染性疾病之預防及促進發育之目的而添加於飼料之廣被應用，雖然解決了上述部份困擾，也就是增進畜牧生產有所貢獻。但在另一方面却也帶來了新的困擾，就是藥劑耐性菌出現之增加。對於家畜家禽疾病之預防與治療無形中增加很多的麻煩，同時由於抵抗因子之傳達在公共衛生上乃成為嚴重之問題。

數位研究者^(8,9,13,15)早已報告由家畜、禽等分離之大腸菌、*Bordetella bronchiseptica*及沙式桿菌等對於化學療法劑具有單劑耐性及多劑耐性之報告。高橋⁽⁶⁾ (1973)亦曾報告 *Salmonella* 具有各型藥劑耐性43株中，可傳達 R 因子者有26株，高達60.4%。寺門等 (1972)亦曾報告由豬分離 385株中約有50%對TC及SM具有耐性株。同時SA, KM, FM及Furatolisine約有20%其他對CP, Aminobenzyl Penicillin及Cerfadolizine各約為1%。

由牛而來之細菌對於TC之耐性菌約有8%，健康人由來對於TC, SM及SA之耐性菌約為20%。至於R因子之檢出率由健康豬及健康人耐性菌而來者約有40%，牛者約有60%。1972年寺門等⁽²⁾由肥育仔牛分離出 *Salmonella typhimurium* 65株對於Gentamicin, Colistin, Polymyxin, Chloramphenicol, Aminobenzyl Penicillin, Cephaloridine, Kanamycin, Fradiomycin, Nalidixic acid, Nitrofrans, Oxolinic acid及Carbadox等有很高之感受性，但對Fravophepolipol及Macarbomycin則很低，另外對TC, SM及SA表現很高的抵抗力。而65株中有61株(94%)具有耐性，此61株中41株(63%)可檢出傳達R因子。

在本研究中，筆者等由各種不同種類動物糞便分離出之大腸菌，對於藥劑感受性試驗之結果觀之，其感受性以Kanamycin, Nalidixic acid為最好，氯黴素次之，而青黴素及磺胺劑則較差，此與Dr. Terakado et. al.,之報告頗為接近。又本試驗除磺胺劑之感受性試驗全例均超過200mcg/ml以外，其餘在供試51個菌株中BP為44株最多，而SM 24株 OTC及TC各為23株次之，而KM則全例均有感受性。此與飼料中大量抗生物質之添加不無關係。又本試驗供試donor菌株不多，動物別方面之比較為困難，但由所得結果不難看出分離菌之藥劑抵抗類型，耐性菌之出現情況，以及耐性菌株R-factor傳達之一斑。今後應如何適當有效經濟地使用抗生物質，避免藥劑之殘留與耐性菌株之增加而為害人畜公共衛生，乃為我畜牧獸醫界同仁及醫學界先生們共同努力之目標。

誌 謝

本試驗承日本農林省家畜衛生試驗場細菌第一研究室長波岡茂郎博士、柏崎守博士之指導，日本農林省動物醫藥品檢查所寺門誠致博士贈送 Recipient Strains，於此併誌萬分謝忱。

參 考 文 獻

- 1 石山俊次、上田泰、桑原章吾、小酒井望、古屋曉一、紺野昌俊、藤井良知 (1968) : Chemotherapy, 16, 98—99.
- 2 寺門誠致、睦地速見、前田博之、森永修正 (1972) : 家畜 よおび 健康人由來大腸菌の in vitro における化學療法劑感受性でR因子について。日獸會誌25P, 295—301.
- 3 寺門誠致、睦地速見、小山敬之、二宮幾代治、佑藤儀平 (1972) : 肥育子牛から分離された Sal-

- monella typhimurium* の薬剤感受性でR因子について。動物醫藥品検査所年報，第9號。
- 4 清水 健 (1974) : 耐性菌問題の背景薬剤耐性菌に関するミニポジラム記録 (1)。獸醫畜産新報 No. 621 P. 21—24.
 - 5 二宮幾代治 (1974) : 畜産における抗生物質の現況薬剤耐性菌に関するミニポジラム記録 (2)。獸醫畜産新報No. 623 P. 32—36.
 - 6 高橋 勇 (1974) : 家畜における耐性菌之現況，薬剤耐性菌に関するミニポジラム記録 (3)。獸醫畜産新報No. 624 P. 15—18.
 7. Jarolmen, H. and Kemp, G. (1969) : R factor Transmission In Vivo. Journal of Bacteriology Vol. 99. No. 2P. 487—490.
 8. Jarolmen, H., Hewel, D. and Kain, E. (1970) : Activity of Minocycline against R-factor—carring Enterobacteriaceae. Infection and Immunity. Vol. 1. No. 4.
 9. Kashiwazaki, M., Namioka, S. and Terakado (1971) : Distribution of transferable drug—resistance factors in fecal *Escherichia coli* fom healthy pigs. Nat. Inst. Anim. Hlth Quakt. Vol. 12, P.17—22.
 10. Odakura, Y., Tanaka, T., Yumoto, M., Inafuku, Z. and Mitsunashi, S. (1973) : Properties of R—factors isolated from multiple resistance proteus rettgeri. Japan J. Microbiol. Vol. 17 (1) , P. 21—28.
 11. Terakado, N., Azechi, H., Koyama, N., Kashiwazaki, M. and Ninomiya, K. (1972) : Transfer of drug—resistance (R—factor) among of *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. Vol. 12. P. 23—28.
 12. Terakado, N., Fukuyasu, T. and Shimizu, T. (1972) : Some characteristics of high macarboymycin—resistant mutants of *Escherichia coli* isolated from gnotobiotic pigs. Nat Inst. Anim. Hlth Quart. Vol. 12. P. 207—212.
 13. Terakado, N., Azechi, H., Ninomiya, K. and Shimizu, T. (1973) : Demonstration of R—factors in *Bordetella bronchiseptica* isolated from pigs. American Society for Microbiology Vol. 3. No. 5.
 14. Tanaka, T., Nagai, Y., Hashimoto, H. and Mitsunashi, S. 1969 : Distribution of R-factor among shigella strains isolated in Japan. Japan J. Microbio. Vol.13 (2) p187—191.
 15. Watanabe, T. (1964) : Selected methods of genetic study of Episome—mediated drug resistance. Methods of Medical Research. Vol. 10. P. 202—220.

The Chemotherapeutic Agents Sensitivity and Transferable R-factor of *E. Coli* Isolated from Feces of Various Animals and Human Beings

*C. Chen, *T. C. Lin, *Y. P. Lin, *D. F. Lin and**M. F. Lin

Summary

Fifty—one strains of *E. coli* (including recipient strain) were isolated from feces of different healthy animals. The sensitivity test showed that Kanamycin and Nalidixic acid

were highly sensitive(except recipient strain which was resistant to NA), Chloramphenicol was next and Penicillin as well as Sulfa drug were somewhat sensitive. (Fig. 1 and Table 1) . As to resistant pattern, when single dose adopted, it found that 44 strains (86.2%) were resistant to BP ; when multidoses adopted, there were 20 strains (39.2%) showing resistant to BP and SA, and 13 strains (25.5%) to SM, BP, OTC, SA ((Table 1 and 2.) . As to the transfer of R—factor, it showed BP was the highest one with 36 positive in 44 strains (81.6%) , and SA was next with 13 in 19 strains (68.4%) (Table 3) .

Of 47 resistant strains, 40 showed transfer of R—factor. (85.1%, but only 79.8% in tested 51 strains) .

Resistant strains of E. coli from swine was more frequently found. The incidence of transfer of R—factor number was mostly found in swine, too. (See Table 4) .

*Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

**School of Pharmacy, Kaohsiung Medical College.