

無添加抗菌劑飼料育成初代 SPF 小豬， 其糞便中大腸菌對化學療法劑之感受性及其R⁻因子之研究

陳清、張永富、林地發、傅和美、李永林、王雅娟、邱朝齊

(臺灣省家畜衛生試驗所)

摘 要

1. 供試492 E. coli 菌株對藥劑感受性試驗結果，對NA (Nalidixic acid)感受性最高，Kanamycin sulfate 次之，而以磺胺劑最低。
2. 從一週齡到九週齡所分離之 E. coli 菌株，對藥劑抵抗力並不隨週齡增加而增加。
3. 供試菌株感受性試驗結果，有17種藥物抵抗類型，以四種藥劑類型 (AM. SM. TC. SU) 最多。單獨 (SU) 次之。
4. R⁻因子傳遞試驗結果，能傳遞 R⁻子共88株，以磺胺劑最多，康徽素最低，僅3株。

緒 言

禽畜飼料中之添加劑，尤其抗生素及其他化學藥劑的廣泛應用，已是舉世皆知的事實。這在畜牧生產方面，尤其是疾病的防治及換肉率來講，有其不可磨滅的貢獻。但不幸的是隨着此等藥劑之使用，使健康動物腸道細菌對藥物抵抗菌株之增加。而且傳遞 R⁻因子 (resistance—factor) 佔有相當高的比例，這對於疾病防治及公共衛生方面^(5,6)，將造成很嚴重的問題。

自1959年開始，美、英、日等國^(1,2)相繼發現細菌細胞內含有一基因之素 (genetic element) 一胞漿體 (plasmid)，此種基因之素不附着於染色體上，只散佈於細胞核及細胞質內。故細菌結合 (conjugation) 時，此種胞漿體 (plasmid) 可以由一個細菌進入另一個細菌而引起後者之抗藥性 (drug—fast)。這種胞漿體 (plasmid) 便叫做抗藥性傳遞因子 (resistance transfer factor, RIF)，而RIF僅存於格蘭氏陰性菌。因此從動物分離之腸內細菌科多數能傳遞 R⁻因子。

爲了瞭解從本所 SPF 小豬分離之E. coli在試管內 (in vitro) 對化學療法劑之感受性及R⁻因子之分佈等問題，筆者等從SPF小豬分離E. coli 492株進行本試驗。

材 料 與 方 法

(一) 試驗材料

1. 供試菌株：從一週齡至九週齡，共 49 頭 SPF 小豬，每週用滅菌棉棒從肛門採取糞便，接種於

- MacConkey agar，將類似 *E. coli* 之菌落鈎取，再經 IMVIC 系統及其他生物學性狀同定之。
2. 接受者 (recipient) 菌株，即 NA——抵抗性，抗生素敏感性之 ML1410 菌株，(NA—resistance, methionine requiring, F⁻ derivative of K—12)。
 3. 供試藥劑：供試藥劑為一般常用之抗生素即 Kanamycin sulfate (KM, Meiji, Japan), Dihydrostreptomycin (SM, Meiji Japan), Tetracycline (TC, Chiphar, Japan), Ampicillin (AM, Bristol Taiwan), Chloramphenicol (CP, New York Taiwan) 及磺胺劑 Sulfamonomethoxine—Na (SU, Daiichi Japan) 和 Nalidixic (Sigma, U. S. A) 等

二、試驗方法

1. 藥劑感受性試驗

藥劑感受性試驗以瓊脂稀釋法 (agar dilution method) 進行之，以一個白金耳的培養以生理食鹽水稀釋之，即約 100 倍之稀釋，(約含 10^{6-7} /ml colony forming unit)，然後再以滅菌棉棒塗擦於含有不同藥劑稀釋濃度之瓊脂平板上，培養 18—20 小時以後，觀察平板上有無菌落發育。至於藥物抵抗性之標準，則依日本化學療法會標準法之最小發育阻止濃度 (MIC, minimum inhibitory concentration) 測定之。即前述抗生素 (25ug/ml)，磺胺劑 (800ug/ml)，Nalidixic acid 50ug/ml 以上還發育，即算有抵抗性菌株。

2. 抵抗因子傳遞之檢出

將在藥劑感受性試驗中之藥劑抵抗菌株供為贈與者 (donor) 菌株。而以 ML1410 菌株當作接受者 (recipient) 菌株。將二者各自培養於 Trypticase soy broth (BBL)，然後各以 0.2ml 加入 3ml broth 內培養 18—20 小時，再培養於含有 NA (100ug/ml) 及各種抗生素 (25ug/ml) 之瓊脂平板內，在 37°C 培養 18 小時，並再分離及純粹培養以檢查贈予者 (donor) 菌株之抵抗因子之傳遞情形。

結 果

1. 供試菌株對於化學療法劑之感受性：

由 SPF 小豬所分離之 492 菌株中，依最小發育阻止濃度試驗結果，所有菌株對 Nalidixic acid 有最高的感受性，Kanamycin sulfate 次之，其他則依 Chloramphenicol, ampicillin, dihydrostreptomycin, tetracycline 再次之。而以 Sulfamonomethoxine—Na 感受性最低。(表 I)

(所分離 *E. coli* 菌株對各種化學療法劑之感受性)

Table I Sensitivity of isolated *E. coli* to various chemotherapeutic agents

No. of strain drugs	Conc.	MIC										
		3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1,600	3,200
ampicillin	30	177	10	25	68	64	106	—	—	—	—	—
kanamycin	152	195	57	6	19	4	49	—	—	—	—	—
chloramphenicol	41	59	249	45	18	74	0	—	—	—	—	—
tetracycline	178	8	3	31	38	44	37	—	—	—	—	—
streptomycin	23	175	8	13	10	41	208	—	—	—	—	—
Nalidixic acid	221	138	69	38	2	0	0	—	—	—	—	—
sulfamonomethoxine	—	—	—	—	—	22	13	12	36	36	359	—

2. 不同週齡分離之 E. coli 對化學療法劑抵抗性菌株數之比較。

由不同週齡之 SPF 小豬所分離 E. coli 對於化學療法劑之感受性試驗結果，不同週齡所分離之 E. coli 對化學療法劑之抵抗性並無顯着不同。可能由於供試 SPF 小豬非全部從一週齡養到九週齡。有些小豬未至九週齡即供其他試驗而未繼續採取糞便分離 E. coli 供試驗，故各週齡之 E. coli 菌株數並不相同。(表 II)。

從不同週齡的 SPF 豬所分離之 E. coli 的藥物抵抗菌株之比較

Table II Comparison of drugs resistant strains of E. coli isolated from different weekly age of SPF piglets

No. of resistance strains to tested strains	Weekly age								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
drugs									
ampicillin	12/27	54/87	88/99	58/117	15/21	21/47	0/9	36/66	6/9
kanamycin	0/27	2/87	4/99	19/117	2/21	6/47	5/9	29/66	5/9
chloramphenicol	3/27	15/87	15/99	17/117	3/21	9/47	5/9	26/66	5/9
tetracycline	3/27	28/87	44/99	75/117	19/21	43/47	6/9	50/66	8/9
streptomycin	12/27	27/87	33/99	72/117	20/21	39/47	4/9	46/66	8/9
Nalidixic acid	0/27	0/87	4/99	5/117	0/21	0/47	0/9	0/66	0/9
sulfamonomethoxin-Na	18/27	74/87	70/99	91/117	47/47	47/47	6/9	52/66	9/9

- 3 供試菌株對於化學療法劑之抵抗類型 (drug—resistance patterns of E. coli strains isolated) 供試 492 株經化學療法劑感受性試驗結果，對化學療法劑有 17 種抵抗類型 (drug—resistance patterns)，其中對四種藥劑 (AM. SM. TC. SU) 最多。單獨者 (Single) SU 次之。而 492 株中有 48 株對所有供試化學療法劑都具有敏感性 (表 3)

所分離之 E. coli 菌株在試管內之藥物抵抗類型之傳遞

Table III In vitro transfer of drug—resistance patterns of isolated E. coli strains

resistance pattern	No of strains	resistance patterns transferred to recipient	No of strains
AM. SM. CP. KM. TC. SU.	50	AM. SM. KM. CP. SU.	1
AM. SM. CP. KM. SU.	3	AM. SM. SU.	1
AM. SM. CP. TC. SU.	18	AM. TC. SU.	1
SM. CP. KM. TC. SU.	4	SM. TC. SU.	5
AM. SM. KM. TC. SU.	4	AM. SU.	6
AM. SM. CP. SU.	19	TC. SM.	1
AM. SM. TC. SU.	74	TC. CP.	1
SM. KM. TC. SU.	5	SM. SU.	2
AM. TC. SU.	7	AM.	9

(100)

AM. SM. TC.	6	SM.	5
SM. TC. SU.	59	KM.	1
AM. SM. SU.	12	CP.	2
AM. SU.	56	SU.	53
TC. SU.	46		
SM. SU.	8		
SU.	62		
SM.	3		
sensitivity	48		

4 R⁻因子之傳遞試驗

由感受性試驗，對化學療法劑具有抵抗性之444株，當做贈與者 (donor) 以，ML1410。為接受者 (recipient) 進行R⁻因子傳遞試驗，其結果以suefamonomethoxine 能傳遞R⁻因子者69株，ampicillin 18株，其他詳如表IV。

所分離 E. coli 菌株對各種化學療法劑之抵抗及傳遞因子之結果

Table IV The results of resistance & transferred R-factor strain of isolated E. coli to each chemotherapeutic agents

distinguish kind of agents	tested strains	resistant strain	resistance factor transferred to recipient strain
streptomycin	492	259(52.6%)	14(5.4%)
ampicillin	492	238(48%)	18(7.5%)
kanamycin	492	72(14.6%)	3(4.1%)
chloramphenicol	492	92(18.6%)	4(4.3%)
tetracycline	492	273(55.4%)	13(4.7%)
sulfamonomethoxine	492	405(82.3%)	69(17%)

Remarks :

- (1) The antibiotics resistance strain were more than 25ug/ml by MIC method.
- (2) Thl suefamonomethoxine—Na resistance strain were more than 800 ug/ml by MIC method.

討 論

本試驗為瞭解飼料無添加抗菌劑育成初代 SPF 小豬糞便所分離 E. coli 之藥物感受性及 R⁻因子的傳遞情形，其結果亦證明所分離之 E. coli 菌株對於化學療法劑之抗藥性相當高，而且呈現多種抗藥類型。對磺胺劑之抗藥性之高，居所試各藥劑之首，這可能是磺胺劑已長期及普遍的使用，且磺胺劑本身是抑菌作用 (bacteriostatic) 而非殺菌作用。至於 R⁻因子之傳遞亦很高，這種結果可能是藥物長期應用的後果。

腸內細菌科 (Enterobacteriaceae) 之革蘭氏陰性菌已被證實能在試管內⁽⁹⁾ (in vitro) 及體內 (in vivo)⁽⁹⁾ 傳遞R⁻因子。H. Jarolmen和 G. Kemp⁽⁸⁾ (1969)以對NA 感受性及抵抗性之 Salm

onella Choleraesuis var Kunzendorf 即 RC221及RC221NA混合給離乳小豬口服，並在試管內證明可從正常腸菌叢 (normal intestine flora) 得到R⁻因子。Tokumitsu Tanana⁽¹⁵⁾ 等由1965到1967年在日本分離之 Shigella 菌株50%以上對 TC 或CP有抵抗性菌能傳遞R⁻因子。其他研究者，如寺門誠致⁽⁴⁾ (1969) 從肥育仔牛分離之 Salmonella typhimurium 65株中61株對TC, SM. 和磺胺劑有抵抗性，而這61株中之41株 (63%) 能傳遞R⁻因子。Yoshihiso Odakura⁽¹¹⁾ (1972) 由所分離之 Proteus rettgeri, 寺門誠致⁽⁹⁾ 1972由健康動物牛、豬及人所分離之 E. coli, Kashiwazak⁽¹⁰⁾ (1971) 由 SPF小豬分離E. coli, No Bu Yuki Terakado⁽¹⁴⁾ (1973) 由豬分離 Bordetella bronchiseptica在試管內 (in vitro) 及, Nobuyuki Terakado⁽¹²⁾ (1972) 在無菌豬 (gnotobiotic pig) 之體內 (in vivo) 都證實對某些化學療法劑有抵抗性並且檢出能傳遞R⁻因子之抵抗菌株。

因此，細菌對藥物之抵抗性之產生，以及 R⁻ 因子之傳遞，造成相當嚴重問題，這在疾病防治及公共衛生上，有待進一步研究解決。

參 考 文 獻

1. 王南歷譯 (1973) : 醫用微生物學P. 67—73.
2. 洪玉霖、陳逸光 (1972) : 基礎藥理學, P. 186—187.
3. 寺門誠致, 畦地速見, 前田博之, 森永修正 (1972) : 家畜おむび健康。人由來大腸菌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25 P. 295—301.
4. 寺門誠致, 畦地速見, 小山敬之, 二宮幾代治, 佐藤儀平 (1972) : 肥育仔牛から分離を水た Salmonella typhimurium 藥劑感受性とR⁻因子について動物醫藥品検査所年報, 第9號。
5. 清水健 (1974) : 耐性菌問題の背景, 藥劑耐性菌に関するシンポジウム 記録 (1) : 獸醫畜産新報, No. 623. P. 32—36.
6. 二宮幾代治 (1974) : 畜産における抗生物質の現況藥劑耐性菌に関するシンポジウム 記録 (2) 獸醫畜産新報, No. 623. P. 32—36.
7. 高橋勇 (1974) : 家畜における耐性菌の現況, 藥劑耐性菌に関するシンポジウム 記録 (3) , 獸醫畜産新報, No. 624. P. 15—18.
8. Jarolmen, H. and Kemp, G (1969) : R-factor transmission In vivo : Journal of Bacteriology Vol. 99. No. 2. P. 487—490.
9. Jarolmen, H., Hewel, D and Kain, E. (1970) : Activity of Minocycline against R-factor—carring Enterobacteriaceae infection and Immunity Vol. No. 4.
10. Kashinazaki, M, Namioka, S and Terakado (1971) : Distribution of transferable drug—resistance factor in fecal Escherichia coli from healthy pigs, Nat Inst. Anim. Hlth Quart Vol. 12. P. 17—22.
11. Odakura, Y., Tanaka, T., Yamoto, M., Inafuku, Z. and Mitsuhasni, S. (1973) : Properties of R⁻factor isolated from multiple resistance proteus rettgeri, Japan J. Microbiol. Vol. 17 (1) , P. 21—28.
12. Terakado, N., Azechi, H., Kayama, 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.
13. Terakado, N., Fukuyasu, T. and Shimizu, T. (1972) : some characteristics of high macarbomycin—resistance mutants of Escherichia coli isolated from gnotobiotic pigs. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart Vol. 12. P. 207—212.

14. 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.
15. Tanaka, T., Nagai, Y., Hashimoto, H. and Mitsuhashi, S. (1969) : Distribution of R⁻factor among *Shigella*. strains isolated in Japan. Japan J. Microbio, Vol. 13 (2) P. 187—191.
16. Watanabe, T. (1964) : Selected methods of genetic study of Episome—mediated drug resistance, methods of medical Research Vol. 10. P. 202—220.

Studies on drug sensitivity and distribution of transferable drug-resistance factors

C. Chen, Y. F. Chang, H. M. Fu, D. F. Lin, Y. L. Lee, YJ. Wang, T. C. Chiu
(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Summary

In the study of drug sensitivity and distribution of transferable drug—resistance factors in fecal *E. coli* from primary SPF piglets. A total of 492 *E. coli* strains were isolated from 49 SPF piglets one to nine of weekly age at SPF center in this institute, The experimental results were summarized as follows :

1. All the isolated strains were examined for sensitivity to 5 kinds antibiotics, Nalidixic acid and sulfamonomethoxine, using the agar plate dilution method. It was more sensitive to NA and less sensitive to sulfamonomethoxine.
2. They showed 17 kinds drug—resistance patterns, strains of quadruple (AM. SM. TC. SU) were observed most frequently.
3. The isolated drug—resistance strains were also examined for the transferability of the drug—resistance, of them, 89 strains were found to have transferred part or all of their resistance patterns.