

鸡源致病性大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验

任丽¹, 徐睿^{1,2*}, 唐强¹, 何欣怡¹

(1. 西昌学院动物科学学院, 四川 西昌 6150013;

2. 攀西动物疫病检测与防控高校重点实验室, 四川 西昌 615013)

摘要: 为了解鸡源致病性大肠杆菌的生物学特性和耐药性, 试验通过采集病料、细菌分离培养、16S rRNA 基因鉴定、致病性试验、药敏试验等方法。结果表明: 分离出的 20 株细菌的培养特征、镜检特征均符合大肠杆菌特征; 16S rRNA 基因序列经 BLAST 比对与大肠杆菌同源性达 99.9%~100%, 确定 20 株分离菌为鸡源大肠杆菌; 20 株大肠杆菌的致病力为 40%~100%; 10 株鸡源致病性大肠杆菌对 15 种抗菌药物均呈现多重耐药, 耐药率为 33.3%~93.3%, 耐药情况较严重和复杂。

关键词: 鸡源大肠杆菌; 分离鉴定; 致病性; 药敏试验

中图分类号: S852.61² **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1891(2019)01-0022-06

A Study on Isolation Identification and Drug Sensitivity Test of Chicken-derived Pathogenic Escherichia Coli

REN Li¹, XU Rui^{1,2*}, TANG Qiang¹, HE Xinyi¹

(1. School of Animal Science, Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China; 2. Panxi Regional Key Laboratory of Animal Disease Detection and Prevention, Xichang, Sichuan 615013, China)

Abstract: To understand the biological traits and drug resistance of pathogenic Escherichia coli from chicken, we conducted the study by collecting disease materials, bacterial isolation and culture, 16S rRNA gene identification, pathogenicity test, drug sensitivity test and other tests. The results show that the culture and microscopic traits of the 20 isolates are consistent with the traits of E. coli; the 16S rRNA gene sequence was 99.9%–100% homologous to E. coli by BLAST, and 20 isolates were identified as chicken-derived Escherichia coli; 20 strains of Escherichia coli have a pathogenicity of 40% to 100%; 10 strains of chicken-derived pathogenic Escherichia coli have multi-drug resistance to 15 antimicrobial agents, and the resistance rate is 33.3%–93.3%. The drug-resistant situation is serious and complicated.

Keywords: chicken-derived Escherichia coli; isolation and identification; pathogenicity; drug sensitivity test

鸡大肠杆菌病是由致病性大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 引起的以肝周炎、纤维素性气囊炎、腹膜炎、心包炎、败血症为主要特征的传染病。不同品种不同日龄的鸡都可发生, 但以肉仔鸡最易感。1885 年发现该菌, 主要栖息于人和恒温动物的肠道内, 一直被认为是正常肠道菌群的组成成分, 无致病性; 直到 20 世纪 40 年代才发现一些特殊血清型大肠杆菌对人和动物具有致病性^[1]。鸡大肠杆菌血清型众多且复杂, 具有时间和地域变化而不同的特点^[2-3]。因此用疫苗防治该病有一定难度, 药物治疗仍是主要手段。致病性大肠杆菌引起的禽疾病发病率和死亡率较高, 而大肠杆菌耐药菌株引起

的感染不但有增多趋势, 而且其耐药性不断发生变迁^[4]。因为临床上大量滥用抗菌药物, 导致不断出现耐药菌株, 扩大耐药谱^[9]。不仅给养殖业带来巨大的经济损失, 也会加剧食品卫生安全的发展。传统鉴定方法繁杂且准确性较差^[5], 因细菌中 16SrRNA 具有高度保守性和特异性以及该基因序列足够长(包含 50 个功能域), 应用 16SrRNA 基因检测技术可以实现对病原菌进行快速、微量、准确、简便地分类鉴定和检测。鸡大肠杆菌病是严重危害养鸡业一种常见的细菌性传染病, 本次试验为了解鸡源致病性大肠杆菌的生物学特性和耐药情况, 从而更好掌握该病的传播流行以及耐药状况, 为该

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 四川省凉山州农业科技创新项目(15NYCX0040); 四川省科技厅支撑计划项目(13ZC1796); 四川省教育厅攀西动物疫病防控与检测高校重点实验室(纵 341B)。

作者简介: 任丽(1996—), 女, 四川大邑人, 本科, 研究方向: 基础兽医教学及研究工作。*为通信作者。

病的防治提供一定的参考依据。

1 试验材料

1.1 试验试剂

革兰氏染液(杭州微生物试剂有限公司)、香柏油、擦镜液、核酸染料、DL2000、TBE溶液、2×Taq PCR Master Mix、ddH₂O、细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)、普通琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司、麦康凯琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司)、伊红美蓝琼脂培养基(杭州微生物试剂有限公司)、营养肉汤(青岛高科园海博生物技术有限公司)等。

1.2 标准菌株

大肠杆菌标准菌株 ATCC25922 购自广东环凯微生物科技有限公司

1.3 仪器设备

摇床(无锡成霖科技有限公司)、PCR仪(珠海黑马医学仪器有限公司)、核酸蛋白分析仪(苏州净化设备有限公司)、舒适恒温混匀仪(Eppendorf公司)、超净工作台(苏州净化设备公司)、恒温恒湿培养箱(上海乔跃电子有限公司)、SDS-PAGE凝胶成像系统、DYY-6C型电泳仪电源(北京市六一仪器厂)、高速离心机(Eppendorf公司)、电子天平(上海菁海仪器有限公司)等。

1.4 试验动物

选择3 d龄雏鸡130只,隔离饲养48 h后,随机选择110只进行动物致病性试验。

1.5 抗菌药物

氨苄西林、羧苄西林、哌拉西林、卡那霉素、头孢唑林、四环素、环丙沙星、复方新诺明、庆大霉素、头孢哌酮、头孢他啶、头孢噻肟、氧氟沙星、诺氟沙星米诺环素,以上15种药敏纸片均购自杭州微生物试剂有限公司。

2 试验方法

2.1 病料来源

无菌条件下采集凉山多个养殖场疑似鸡大肠杆菌病病死鸡的典型病变器官心脏、肝脏、脾脏等,置于采样袋中密封,带回实验室置于4℃冰吧保存备用。

2.2 细菌的分离与纯化

无菌环境下,用镊子夹住病变组织中部,用灭菌的剪刀剪取一小块,将新鲜切面分别触压于普通营养琼脂培养基,置于恒温恒湿培养箱中37℃,培

养18~24 h,观察细菌的生长情况及形态特征,做好记录;挑取典型单个菌落抹片,革兰氏染色,在光学显微镜下观察细菌的染色特征。

挑取典型单个菌落划线于麦康凯培养基和伊红美蓝琼脂培养基上,置于恒温恒湿培养箱中37℃,培养18~24 h,挑选典型菌落进行镜检,纯化后进行保种。

2.3 16S rRNA基因鉴定

2.3.1 引物设计

根据Genbank中细菌的16S rRNA基因序列,进行引物设计,送往上海杰李有限公司进行合成。引物序列见表1。

表1 16S rRNA通用引物

引物名称	引物序列
B-27F	5' > AGAGTTTGATCCTGGCTCAG < 3'
B-1492R	5' > TACGGYTACCTTGTTACGACTT < 3'

2.3.2 DNA的提取

将分离的20株菌株接种至营养肉汤,置于摇床37℃,180 r/min,培养过夜。

取细菌培养液1~5 mL,10 000 r/min(~11 500 g)离心1 min,尽量吸净上清。

向菌体沉淀加入200 uL缓冲液GA,震荡至菌体彻底悬浮。

向管中加入20 uL Proteinase K溶液,混匀。

加入220 uL缓冲液GB,震荡15 s,70℃放置10 min,溶液应变清亮,简短离心以除去管盖内壁的水珠。

将上一部所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱CB3中12 000 r/min(~13 400 g)离心30 s,倒掉废液,将吸附柱CB3放入收集管中。

向吸附柱CB3中加入500 uL缓冲液GD,12 000 r/min(~13 400 g)离心30 s,倒掉废液,将吸附柱CB3放入收集管中。

向吸附柱CB3中加入600 uL漂洗液PW,12 000 r/min(~13 400 g)离心30 s,倒掉废液,将吸附柱CB3放入收集管中。

重复前一步操作。

将吸附柱CB3转入一个干净的离心管中,12 000 r/min(~13 400 g)离心2 min,倒掉废液,将吸附柱CB3室温放置5 min,以彻底晾干吸附柱材料中残余的漂洗液。

将吸附柱CB3转入一个干净的离心管中。向吸附膜的中间部位悬空滴加60 uL洗脱缓冲液TE,室温放置5 min,12 000 r/min(~13 400 g)离心2 min,将溶液收集到离心管中。

2.4 目的片段的扩增及测序

2.4.1 PCR反应体系

试验建立 25 uL 反应体系,组成见表2。

表2 PCR 25 uL 体系

体系类别	体积/uL
上游引物 B-27F	1.0
下游引物 B-1492R	1.0
Mix	12.5
ddH ₂ O	8.5
DNA	2.0

2.4.2 反应程序

94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 56 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 次循环; 72 °C 延伸 5 min; 15 °C 保温 30 min。

抽取 PCR 产物 10 uL 经 1.5%(1×TBE) 琼脂糖凝胶电泳, 电压 105 V, 电流 85 mA, 观察并成像, 切胶送至上海杰李有限公司测序。测序结果, 运用 NCBI 数据库中 BLAST 程序进行比对分析。

2.5 致病力试验

2.5.1 大肠杆菌悬液的制备

将分离出的 20 株大肠杆菌接种于营养肉汤培养基, 37 °C, 180 r/min, 于摇床中震荡培养 18 ~ 24 h。按照麦氏比浊法将菌液稀释至 1.0 麦氏单位(菌落数为 3×10⁸ cfu/mL) 悬液, 备用。

2.5.2 致病力试验分组

将 3 日龄健康非免疫雏鸡 110 只, 随机分为 22 组。每组 5 只, 1 组到 20 组为试验组, 腹腔注射大肠

杆菌悬液 1 ml/只; 第 21 组为试验对照组, 腹腔注射无菌肉汤 1 ml/只; 第 22 组为空白对照组, 不做任何处理。

注射后每 6 h 观察试验鸡的精神状况, 采食量, 饮水量, 排泄物做好记录, 连续观察 72 h, 对发病和死亡雏鸡进行病理解剖观察, 取其病变器官进行细菌的分离鉴定回收菌种。

2.6 药敏试验

根据细菌来源、致病力情况, 从不同养殖场中选取 10 株鸡致病性大肠杆菌进行药敏试验, 按照 WHO 推荐的纸片扩散法 Kirby-Barer 氏法进行, 测定其对选取的 15 种抗菌药物的敏感性。药敏结果判断标准参照 NCCLS 手册 2005 版, 详见表 3。

3 结果

3.1 病原菌的分离培养结果

分离出 20 株大肠杆菌。在营养肉汤中呈均匀浑浊, 试管底部有絮状沉淀; 普通营养琼脂上形成圆形, 边缘整齐, 小凸起, 表面光滑, 湿润, 半透明, 中等大小菌落; 麦康凯培养基上形成粉红色菌落; 伊红美蓝培养基形成中等大小, 周围透明, 带有绿色金属光泽的菌落; 镜检可见到革兰氏阴性杆菌, 两端钝圆的短小杆菌, 多以单个存在, 无芽孢。结果见图 1—4。

表3 NCCLS-药敏试验标准

抗菌药物	药量/ug	抑菌环直径/mm			
		R	I	S	
头孢烯类	头孢唑啉	30	≤14	15-17	≥18
	头孢他啶	30	≤14	15-17	≥18
	头孢哌酮	75	≤15	16-20	≥21
	头孢噻肟	30	≤14	15-22	≥23
青霉素	羧苄西林	100	≤19	20-22	≥23
	氨苄西林	10	≤13	14-16	≥17
	哌拉西林	100	≤17	18-20	≥21
氨基糖苷类	卡那霉素	30	≤13	14-17	≥18
	庆大霉素	10	≤12	13-14	≥15
氟喹诺酮类	氧氟沙星	5	≤12	13-15	≥16
	诺氟沙星	10	≤12	13-16	≥17
	环丙沙星	5	≤15	16-20	≥21
磺胺类	复方新诺明	25	≤12	13-16	≥17
	米诺环素	30	≤14	15-18	≥19
四环素类	四环素	30	≤14	15-18	≥19

注: R 表示耐药, I 表示中度敏感, S 表示敏感



图1 普通营养琼脂平板



图2 麦康凯平板

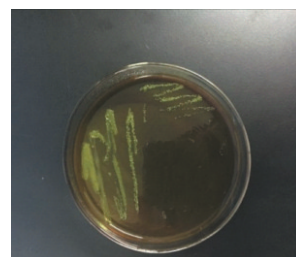


图3 伊红美蓝平板

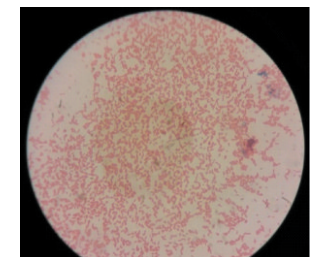
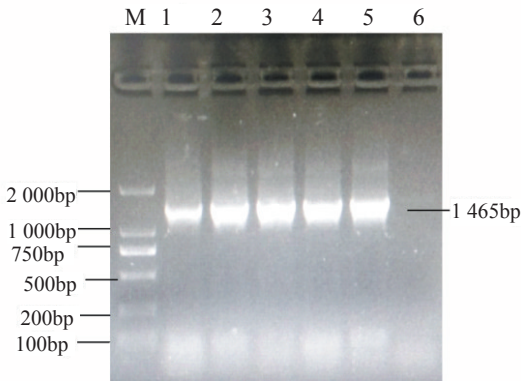


图4 染色特征

3.2 16S rRNA 基因鉴定

从图 5 可见, PCR 扩增出与预期条带大小(1 465 bp) 一致的特异性片段。将测序结果进行 BLAST 序列比对, 与 GenBank 中公布的大肠杆菌基因序列的同源性为 99.9% ~ 100%。



M:D2 000; 1:DGCP3; 2:DKH1; 3:DC16-1; 4:QLW-4; 5: DC; 6:阴性对照

图5 PCR结果

3.3 致病力试验

腹腔感染雏鸡 6 h 后,部分雏鸡开始出现精神沉郁,食欲下降,羽毛粗乱,腹泻,排黄绿色稀便,偶有鸡只出现脱肛,24 h 后神经症状主要表现为头颈震颤,角弓反张,开始死亡;病理解剖可见明显的肝周炎、心包积液、腺胃乳头出血等病理改变。各试验组死亡率为 40% ~ 100%,其中 ML1Q 溶和 LG4 肝的死亡率最高,达 100%,见表 4。

表 4 致病力试验结果

序号	菌株	试验鸡/只	致死鸡/只	死亡率/%
1	DGCP3	5	3	60
2	DGCG1	5	2	40
3	DKH1	5	3	60
4	DKH3	5	4	80
5	DC16-1	5	3	60
6	DC1-15-1	5	3	60
7	QLW-4	5	4	80
8	QLW-5	5	4	80
9	ML2Q 溶	5	4	80
10	ML1Q 溶	5	5	100
11	WSM19-12	5	3	60
12	WSM7-1	5	3	60
13	LG4 肝	5	5	100
14	LG5 脾	5	2	40
15	WSM19-12	5	3	60
16	WSM7-1	5	3	60
17	BJ1-C-3-1	5	4	80
18	BJ1-P-2-1	5	4	80
19	TH8G2-5-2	5	4	80
20	TH8G3-4	5	4	80

表 5 药敏试验结果

抗菌药物	菌株抑菌环										
	DGCP3	DKH3	WSM19-12	LG4G 乳	YS1-2X-1	ML2Q 溶	TH8G-2-1	BJ1C-3-1	DC4-1	QLW-5	
头孢类	头孢唑啉	23	0	15	17	0	12	0	10	0	9
	头孢他啶	14	0	10	15	14	12	17	13	15	17
	头孢哌酮	15	0	20	21	0	16	14	13	12	18
	头孢噻肟	10	0	13	21	10	12	13	17	16	23
青霉素	羧苄西林	0	0	13	12	0	0	0	0	0	17
	氨苄西林	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
	哌拉西林	14	14	17	16	0	10	11	0	10	20
氨基糖苷类	卡那霉素	0	0	0	12	0	0	0	11	0	14
	庆大霉素	0	14	9	0	0	0	16	16	0	17
氟喹诺酮类	氧氟沙星	22	10	22	24	11	0	13	17	10	9
	诺氟沙星	16	0	23	15	17	0	11	16	0	9
	环丙沙星	15	0	23	20	8	0	12	19	8	10
磺胺类	复方新诺明	0	0	16	20	17	12	0	0	0	9
四环素类	米诺环素	19	0	19	20	17	9	14	17	16	9
	四环素	0	0	16	16	0	0	0	0	0	0

3.4 药敏试验

从表 5、表 6、表 7 可以看出,10 株鸡源大肠杆菌均呈现多重耐药性,耐药率为 33.3% ~ 93.3%。其中耐药能力最强的为 ML2Q 溶和 DKH3,耐 14 种药,耐药率达 93.3%;耐药能力最弱为 LG4G 乳,但也对 5 种药物耐药,耐药率为 33.3%。

4 讨论与分析

本次试验从多个养鸡场采集病料,分离得到 20 株分离菌,菌株在麦康凯培养基上长出中等大小的粉红色光滑菌落,伊红美蓝培养基上长出带绿色金属光泽的菌落,染色镜检可见两端钝圆,短小的杆

表6 药敏试验结果

抗菌药物	10株大肠杆菌药敏试验统计结果										
	DGCP3	DKH3	WSM19-12	LG4G乳	YS1-2X-1	ML2Q溶	TH8G-2-1	BJ1C-3-1	DC4-1	QLW-5	
头孢类	头孢唑啉	S	R	I	I	R	R	R	R	R	R
	头孢他啶	R	R	R	I	R	R	I	R	I	I
	头孢哌酮	R	R	I	S	R	I	R	R	R	I
	头孢噻肟	R	R	R	S	R	R	R	I	I	S
青霉素	羧苄西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	氨苄西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	哌拉西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
氨基糖苷类	卡那霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
	庆大霉素	R	I	R	R	R	R	S	S	R	S
氟喹诺酮类	氧氟沙星	S	R	S	S	R	R	I	S	R	R
	诺氟沙星	I	R	S	I	S	R	R	I	R	R
	环丙沙星	R	R	S	I	R	R	R	I	R	R
磺胺类	复方新诺明	R	R	I	S	S	R	R	R	R	R
四环素类	米诺环素	S	R	S	S	I	R	R	I	I	R
	四环素	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R

表7 10株鸡源大肠杆菌耐药率统计结果

序号	菌株	试验药物/种	耐药药物/种	耐药率/%
1	DGCP3	15	11	73.30
2	DKH3	15	14	93.30
3	YS1-2X-1	15	12	80.00
4	QLW-5	15	9	60.00
5	ML2Q溶	15	14	93.30
6	WSM19-12	15	7	46.70
7	LG4乳	15	5	33.30
8	DC4-1	15	12	80.00
9	BJ1-C-3-1	15	9	60.00
10	TH8G-2-1	15	12	80.00

菌,均符合大肠杆菌的形态特征。

传统鉴定方法繁杂且耗时较长。16S rRNA 基因检测技术可以实现对病原菌进行快速、高通量、准确简便地鉴定和检测。本试验分离得到的20株鸡源大肠杆菌的16S rRNA 基因序列经比对,与大肠杆菌同源性达99.9%~100%,可确定本次试验分离的20株菌为大肠杆菌。

致病力试验结果显示本次试验的鸡源大肠杆菌致病力强弱存在差异,死亡率为40%~100%。其主要原因是大肠杆菌为条件性致病菌,当动物机体抵抗力下降时,特别是应激情况下,大肠杆菌与宿主的生态平衡被打破,形成生态失调,细菌的致病性可表现出来,使感染的鸡发病^[9]。造成致病的条件主要为寄居部位的改变,机体免疫功能低下,菌群失调。因此在养殖过程中应做到加强饲养管理,

做好各个环节的卫生消毒,消除各种发病诱因。日常要提供全价优质饲料,并足量补充维生素和电解质,严格执行卫生防疫措施,创造一个良好的饲养环境,是防控鸡大肠杆菌病的主要手段。

药敏试验结果发现,本次试验在不同鸡场分离到的10株鸡源致病性大肠杆菌都呈现多重耐药性,从总体来看,耐药率从33.3%~93.3%,耐药情况严重而复杂。主要原因可能是:(1)目前,几个试验鸡场对鸡大肠杆菌病主要是通过抗菌药物来预防和控制,但小剂量长期盲目使用抗菌药,助长了耐药菌的产生,形成了对微生物的选择性压力,是病原菌多重耐药率的比例逐渐上升的主要原因;(2)本次试验中进行药敏试验的样本量较小,耐药率较高,仅对试验鸡场耐药情况和敏感药物筛选提供参考。要掌握该地区鸡源大肠杆菌总体耐药情况,则需在后续研究中进一步加大鸡源大肠杆菌样本的收集,进一步完善药敏试验数据。针对本次试验结果,建议养殖场实时动态监测大肠杆菌对药物的敏感性,针对不同养殖场的耐药情况根据药敏试验结果,筛选敏感药物针对性治疗。多种高敏抗菌药交替使用或联合使用,以防止长期使用单一抗菌药而进一步产生抗药性,造成不必要的经济损失。后续还可展开对该地区鸡源大肠杆菌耐药机制的研究,可建立大肠杆菌耐药基因的快速检测方法,对该地区耐药基因表达情况进行检测,进一步丰富该地区鸡源大肠杆菌耐药基因分子流行病学调查的研究。

参考文献:

- [1] 张俊丰,黄东璋.鸡肠道大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国畜牧兽医,2013,40(11):179-183.
- [2] 于阿芳.鸡致病性大肠杆菌的药敏试验、血清型鉴定及耐药基因的PCR检测[J].泰安:山东农业大学,2009.
- [3] 王宇,王永芬.鸡大肠杆菌病的流行病学研究[J].信阳师范学院学报,2007,20(3):317-340.
- [4] MURRAY B E.New aspects of antimicrobial resistance and resulting the therapeutic dilemmas[J].Infect Dis,1991,163:1185.
- [5] 严玉霖,雷华.鹅大肠杆菌的分离及药敏试验[M].中国畜牧兽医,2011,38(10):160-162.
- [6] 秦双双,张红.鸭源致病性大肠杆菌的分离鉴定及致病性观察[J].湖北农业科学,2011,50(1):119-121.
- [7] 冯方周,张晓冬.辽西地区致病性鸡大肠杆菌的分离鉴定及16SrRNA序列分析[J].黑龙江畜牧兽医,2017(15):191-195.
- [8] 张轶,王春光.猪源大肠杆菌的分离、鉴定及耐药性分析[J].中国农学通报,2005,21(12):23-30.
- [9] 刘玉涛,吴学敏.福建省鸡源大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[M].中国农学通报,2014,30(2):65-68.
- [10] 郝智慧,肖希龙.不同区域鸡大肠杆菌对抗菌药的耐药耐药性比较[J].中国收兽医科学,2009,39(1):84-88.
- [11] 常宏伟,赵俊.17株产H2S致泄大肠埃希菌的微生物学研究大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J].中华疾病控制杂志,2009,(3):320-323.
- [12] 刁有祥,李久芹.山东省鸡大肠杆菌的分离鉴定[J].中国预防兽医学报,2002,24(1):21-23.
- [13] 徐海花,牛仲相.鸡源致病性大肠杆菌地方株的分离与鉴定[J].山东家禽,2004:7-10.
- [14] 孙协军,陈琴琴.六安市鸡大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J].畜牧与饲料科学,2008,5:43-45.
- [15] 师福山,赵德明.禽大肠杆菌的分离与16SrRNA的鉴定[J].中国畜牧兽医,2009,36(2):111-113.

(责任编辑:曲继鹏)