

江苏省大丰地区鸡大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验

谭菊¹, 匡存林¹, 刘子豪², 刘明生^{1*}, 高韩倩¹, 田传龙¹, 黎晨¹

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江西省永新县畜牧兽医局, 江西永新 343400)

摘要 [目的]探讨江苏省大丰地区鸡大肠杆菌病的流行情况及耐药情况。[方法]对来自江苏省大丰区不同鸡场疑似大肠杆菌病的237只病鸡,通过病理剖检、细菌分离培养、革兰氏染色、镜检和生化试验等对致病菌进行分离与鉴定,然后对鉴定的大肠杆菌进行血清型定型,并对定型的大肠杆菌进行药敏试验。[结果]共分离到218株大肠杆菌;通过血清学鉴定,获得11个血清型,其中52株为O₈₈,44株为O₁₈,32株为O₁,21株为O₂,12株为O₃₅,9株为O₈₁,8株为O₁₁₅,5株为O₇₈,O₁₁、O₂₆、O₁₁₄各1株,另有32株没有定型。对定型的186株大肠杆菌进行药敏试验,结果发现其对大多数抗菌药物耐药,但硫酸黏菌素、头孢噻唑、头孢噻肟、卡那霉素、氧氟沙星和新霉素高度敏感。[结论]研究结果可为制备大肠杆菌自家疫苗奠定基础。

关键词 鸡;大肠杆菌;血清型鉴定;药敏试验

中图分类号 S858.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)20-0117-02

Separation, Identification and Drug Sensitivity Test of Chicken *Escherichia coli* from Dafeng Region of Jiangsu Province

TAN Ju¹, KUANG Cun-lin¹, LIU Zi-hao², LIU Ming-sheng^{1*} et al (1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou, Jiangsu 225300; 2. Yongxin Animal Husbandry and Veterinary Bureau of Jiangxi Province, Yongxin, Jiangxi 343400)

Abstract [Objective] To investigate the epidemic situations and drug resistance of chicken colibacillosis in Dafeng Region of Jiangsu Province. [Method] 237 diseased chicken suspected to be infected with *Escherichia coli* from different chicken farms in Dafeng Region of Jiangsu Province were taken to make pathological autopsy, bacterial isolation and culture, Gram staining microscopy and biochemical tests. The pathogen were isolated and identified. And the serotype identification was made on the identified strains of *E. coli* and the drug sensitivity test was made. [Result] 218 strains of *E. coli* were isolated. Through serotype identification, 11 serotypes were obtained, including O₈₈ (52 strains), O₁₈ (44 strains), O₁ (32 strains), O₂ (21 strains), O₃₅ (12 strains), O₈₁ (9 strains), O₁₁₅ (8 strains), O₇₈ (5 strains), O₁₁ (1 strain), O₂₆ (1 strain), O₁₁₄ (1 strain). Other 32 strains were not serotyped. Drug sensitivity test was made on 186 serotyped strains of *E. coli*, the results showed that they were resistant to most of antibacterial drugs, but they were highly sensitive to colistin sulfate, ceftiofur, cefotaxime, kanamycin, ofloxacin and neomycin. [Conclusion] The research results can lay the foundation for preparing self-made vaccine for *E. coli*.

Key words Chicken; *Escherichia coli*; Serotype identification; Drug sensitivity test

鸡大肠杆菌病是由致病性大肠埃希杆菌引起鸡的一种常见多发病,在国内中小规模养殖场普遍存在,发病率较高,如果与其他病原混合感染,如新城疫、球虫、支原体等,病死率可达25%。鸡大肠杆菌常见的病理变化包括心包炎、肝周炎、腹膜炎、输卵管炎、关节炎、眼炎和气囊炎等,根据临床症状和病理变化,可以做出初步诊断,而进一步确诊则需进行细菌分离与鉴定。

目前,大肠杆菌的防治主要是通过加强饲养管理,做好生物安全措施,并使用抗菌药物来治疗。但是,随着抗菌药物在临床上的不合理使用,疗效越来越差,导致大肠杆菌耐药菌的产生,造成可食性组织中药物残留,从而危害人类健康。为了更好地控制鸡大肠杆菌病,笔者对江苏省大丰地区禽源大肠杆菌进行了分离与鉴定,并通过药敏试验筛选出防治大肠杆菌病的有效药物,旨在为制备大肠杆菌自家疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源。病死鸡来源于大丰区不同规模的养殖场,共237只,均疑似大肠杆菌病,剖检有典型的卵黄性腹膜炎、输卵管炎、心包炎和肝周炎等。

炎、输卵管炎、心包炎和肝周炎等。

1.1.2 试剂与培养基。麦康凯琼脂粉、营养琼脂粉、牛肉膏粉、蛋白胨等,均购自杭州天和微生物试剂有限公司;麦康凯培养基、普通琼脂培养基、营养肉汤培养基,均按照常规方法配制^[1]。

1.1.3 药敏试纸。硫酸黏菌素、头孢噻唑、头孢噻肟、卡那霉素、氧氟沙星、环丙沙星、新霉素、强力霉素、氟苯尼考、恩诺沙星、庆大霉素、氨苄青霉素、四环素、万古霉素、红霉素、复方新诺明、林可霉素、链霉素18种药敏纸片,均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.4 大肠杆菌标准抗血清。大肠杆菌单价和多价标准抗O血清,均购自中国兽药监察所。

1.1.5 试验动物。30日龄健康雏鸡,由江苏省大丰区仁雨种鸡场提供。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离与培养。通过无菌操作采集病死鸡的心脏、肝、腹水、输卵管分泌物等,划线接种于营养琼脂及麦康凯琼脂平板培养基上,37℃恒温培养18~24h。然后,再挑取培养基上生长良好、菌落占优势的单个菌落转接至普通营养琼脂平板、麦康凯琼脂平板,置于37℃条件下继续培养18~24h,观察菌落生长情况。最后,将分离到的单个菌落制片,进行革兰氏染色并镜检。

1.2.2 生化鉴定。取纯培养后的细菌进行常规生化试验。

1.2.3 血清型鉴定。参照文献[2]的方法进行血清型鉴定。

1.2.3.1 O抗原制备。将纯培养的被检菌置于营养琼脂培

基金项目 江苏农牧科技职业学院自然科学基金项目(NSF201605);江苏省大学生创新创业训练项目(201612806026H)。

作者简介 谭菊(1978—),女,江苏句容人,讲师,硕士,从事畜禽疫病综合防控技术研究。*通讯作者,副教授,博士,从事畜禽疫病防控技术研究。

收稿日期 2017-05-15

培养基上密集划线,37℃下培养 18~24 h。用适量的 0.5% 石碳酸生理盐水冲洗菌苔,采用平板计数法,配成浓菌悬液($2\times 10^9\sim 3\times 10^9$ 个/mL)。菌悬液经 121℃高温处理 2 h,破坏 K 抗原,即为 O 抗原,置于 4℃冰箱中保存,备用。

1.2.3.2 玻板凝集试验。先将标准抗 O 血清滴于玻板上,然后再吸取供试细菌悬液数滴,混匀,同时设置阴性对照,一边摇晃玻板一边观察反应结果。若 3 min 内出现均匀的凝集小颗粒,即为阳性,表明有该种抗原的存在,否则判为阴性;然后,再用其他抗血清按照上述方法进行鉴定。

1.2.3.3 试管凝集试验。用 0.5% 石炭酸生理盐水将玻板凝集呈阳性反应的单价 O 血清进行 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍……5 120 倍稀释,然后每管加入分离菌株的 O 抗原 0.5 mL,37℃过夜后判断。

1.2.4 动物试验。另将营养琼脂斜面上纯化后的菌落用生理盐水冲洗,采用倾注平板培养法计算活菌数后,调整细菌浓度为 3×10^8 个/mL,背部皮下接种 30 日龄小鸡 20 羽,每羽 0.5 mL,另选 20 羽作为对照,分别注射生理盐水 0.5 mL。接种后隔离饲养,分别记录发病、死亡情况。此后,无菌操作取病死鸡的心脏、肝,划线接种于麦康凯琼脂平板上,置于 37℃温箱中培养 24 h 后观察。

1.2.5 药敏试验。采用 K-B 纸片扩散法将被检分离株细菌无菌涂布接种于营养琼脂培养基上,间隔一定距离贴上 18 种药敏试纸片,于 37℃条件下培养 24 h。判定标准如下:抑菌圈直径 ≤ 10 mm 为不敏感(R), $10\text{ mm}<$ 抑菌圈直径 ≤ 15 mm 为中度敏感(I),抑菌圈直径 > 15 mm 为高度敏感(S)^[3]。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离与鉴定 试验病鸡及病死鸡病例数为 237 个,共分离到 218 株大肠杆菌,在麦康凯培养基上生长良好,菌落特征如下:菌落呈粉红色,直径 1 mm 左右,边缘整齐、湿润光滑。分别挑取不同琼脂平板上单个菌落进行革兰氏染色并镜检,可见革兰氏阴性、染色均一、不形成芽孢的杆菌,符合大肠杆菌的菌落特征。

2.2 生化鉴定 对分离到的细菌进行生化试验,结果发现其均能发酵葡萄糖、蔗糖、乳糖,能使麦芽糖、甘露醇产酸产气,不能发酵肌糖、木糖;不能利用枸橼酸,M.R 试验呈阳性,V-P 试验呈阴性;靛基质试验呈阳性,不产生硫化氢。

2.3 血清型鉴定 对 218 株大肠杆菌进行血清学鉴定,除 32 株未能定型外,鉴定出 186 株分离菌株,其中 52 株为 O₈₈,占 27.96%;44 株为 O₁₈,占 23.66%;35 株为 O₁,占 18.81%;21 株为 O₂,占 11.29%;另有 12 株 O₃₅、9 株 O₈₁、8 株 O₁₁₅、5 株 O₇₈、1 株 O₁₁、1 株 O₂₆、1 株 O₁₁₄。

2.4 动物致病性试验 鸡接种分离株培养液后,试验组主要表现为精神沉郁、垂翅、竖毛、缩颈;食欲下降或废绝、呼吸困难、喘气;腹泻,排黄白色稀粪。高致病性分离株接种 1~2 d 后鸡出现死亡高峰。对照组鸡饮食正常,精神良好,无死亡现象。对病死鸡进行解剖,可见心包炎、心外膜水肿、心包囊混浊、囊内充满淡黄色的纤维性渗出物。取病死鸡的心、

肝划线接种于麦康凯琼脂平板上,置于 37℃恒温培养箱中培养 18~24 h,在麦康凯琼脂平板上生长为边缘整齐、湿润光滑的粉红色菌落。

2.5 药敏试验结果 对分离的大肠杆菌用 18 种常用药物进行药敏试验,结果发现大多数对硫酸黏菌素(102/186, 54.84%)、头孢噻唑(125/186,67.20%)、头孢噻肟(156/186, 83.87%)、卡那霉素(136/186,73.12%)、氧氟沙星(125/186, 67.20%)、新霉素(148/186,79.57%)高度敏感;对环丙沙星(144/186,77.41%)、强力霉素(156/186,83.87%)、氟苯尼考(89/186,47.85%)、恩诺沙星(83/186,44.62%)、庆大霉素(91/186, 48.92%)中度敏感;对氨苄青霉素(176/186, 94.6%)、四环素(163/186,87.6%)、万古霉素(120/186, 64.5%)、红霉素(142/186,76.3%)、复方新诺明(162/186, 87.1%)、林可霉素(147/186,79.0%)、链霉素(139/186, 74.7%)产生了较强的耐药性(表 1)。

表 1 分离大肠杆菌对 18 种常用抗菌药物的药敏试验结果
Table 1 The drug sensitivity test results of isolated strains of *E. coli* to 18 kinds of common antibacterial drugs

序号 No.	抗菌药物 Antibacterial drugs	数量 Number//株			耐药率 Drug resistant rate//%
		S	I	R	
1	氨苄青霉素	0	10	176	94.6
2	硫酸黏菌素	102	84	0	0
3	四环素	0	23	163	87.6
4	万古霉素	11	55	120	64.5
5	卡那霉素	136	50	0	0
6	头孢噻唑	125	26	35	18.8
7	头孢噻肟	156	30	0	0
8	新霉素	148	38	0	0
9	庆大霉素	63	91	32	17.2
10	环丙沙星	36	144	6	0.3
11	红霉素	0	44	142	76.3
12	强力霉素	0	156	30	16.1
13	复方新诺明	0	24	162	87.1
14	氧氟沙星	125	34	27	14.5
15	林可霉素	2	39	147	79.0
16	链霉素	21	28	139	74.7
17	氟苯尼考	38	89	61	32.8
18	恩诺沙星	12	83	91	48.9

3 讨论与结论

大肠杆菌血清型众多,各血清型之间无交叉保护作用。吴华俊等^[4]对扬州市 142 个禽源性大肠杆菌进行分离与鉴定,结果发现 128 个分离株的血清型,其血清型种类多达 10 个,但以 O₇₈、O₂、O₁₂₇、O₁₈、O₁ 为主(共 109 株),占定型菌株的 85.16%,其中 O₇₈ 有 40 个分离株,占定型菌株的 31.25%。因此,在此次调查中 O₇₈、O₂、O₁₂₇、O₁₈、O₁ 等 5 个血清型为优势血清型。该试验中 O 因子血清鉴定结果表明,在大丰地区主要有 4 个优势的血清型,为 O₈₈、O₁₈、O₁、O₂,共分离菌株 149 株,占分离菌株总数(186 株)的 80.11%。刘明生等^[2]从海安分离到 226 株大肠杆菌,除 28 株未能定型外, (下转第 125 页)

表 3 ICP – MS 测定金线莲中微量元素含量

Table 3 Trace elements content from *A. roxburghii* by ICP – MS

mg/kg

样品 Sample	Pb	As	Hg	Cr	Mn	Ca	Mg	Fe	Zn	Ni
Y ₁	10.540 0	0.331 7	19.520 0	1.647 0	213.40	2 046.0	1 390.0	271.20	59.520	1.504 0
Y ₂	0.738 3	0.224 7	2.518 0	0.358 1	151.00	1 685.0	993.1	71.91	23.030	0.303 6
Y ₃	0.490 6	0.256 3	2.544 0	1.086 0	175.40	2 405.0	1 293.0	61.24	61.210	0.350 9
Y ₄	0.633 6	0.444 1	1.207 0	1.617 0	207.30	3 055.0	1 339.0	147.90	42.520	0.590 7
Y ₅	0.331 9	0.082 6	2.309 0	1.703 0	79.07	1 156.0	1 118.0	118.40	8.179	0.161 6
Y ₆	3.048 0	0.155 0	4.011 0	3.327 0	32.24	958.5	1 104.8	577.10	48.910	0.295 0
Y ₇	0.173 2	0.127 2	1.442 7	0.427 2	128.35	1 476.6	1 945.6	94.47	47.596	0.143 2
Y ₈	1.055 0	0.213 5	2.897 0	0.348 4	226.30	1 053.0	2 770.0	156.70	36.110	0.361 5

样品 Sample	V	Be	Li	Se	Sr	Cs	Ga	Co	总量 Total amount
Y ₁	0.688 6	0.059 2	0.416 9	0.402 4	14.200	0.344 5	1.425 0	0.392 0	4 031.9
Y ₂	0.099 0	0.001 3	0.355 5	0.080 9	11.910	0.026 8	0.343 9	0.100 8	2 941.1
Y ₃	0.079 0	0.008 7	0.351 0	0.066 7	14.380	0.027 9	0.400 1	0.111 1	4 016.0
Y ₄	0.199 4	0.017 7	0.398 6	0.106 5	21.220	0.038 3	0.645 6	0.142 9	4 820.1
Y ₅	0.052 8	0.008 5	0.109 3	0.022 0	5.894	0.024 1	0.214 9	0.088 3	2 489.5
Y ₆	2.457 0	0.022 9	0.419 5	0.026 2	7.517	0.120 1	0.302 8	0.079 8	2 743.3
Y ₇	0.025 3	0.008 5	0.126 9	0.006 6	4.641	0.049 0	0.270 9	0.042 2	3 700.1
Y ₈	0.280 9	0.012 4	0.354 3	0.105 7	17.740	0.227 0	0.986 6	0.209 4	4 267.0

参考文献

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物:第十三卷[M]. 青岛:青岛出版社,2002.

[2] 吴水华,程伟青. 不同栽培方式对金线莲中多糖含量的影响[J]. 现代中药研究与实践,2016,30(6):8 – 11.

[3] 许兰淑,周金池. 原子吸收光谱法测定环境及食品样品中痕量元素的样品前处理方法的研究进展[J]. 理化检验 – 化学分册,2016,52(2):244 – 248.

[4] 薛福玲,蒯志铎,韩明,等. 三种中药材微量元素测定及其多糖抗氧化性研究[J]. 中药材,2010,33(2):293 – 296.

[5] 吴水华,程伟青,柯伙钊,等. 不同来源金线莲中水分灰分及微量元素的测定[J]. 时珍国医国药,2010,21(12):3185 – 3186.

[6] 钱保勇,蔡鹏,袁华峰. ICP – MS 法测定薄荷脑中的 5 种重金属元素[J]. 华西药杂志,2015,30(4):521 – 522.

[7] 杨雁芳,张友波,杨秀伟. 基于微波消解的 ICP – OES 和 ICP – MS 法测定中药独活中的 24 种微量元素[J]. 药物分析杂志,2016,6(11):2004 – 2008.

[8] 袁珂,薛月芹,桂仁意,等. 微波消解 – 原子吸收光谱法测定不同产地淡竹叶中微量元素的含量[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(3):804 – 808.

(上接第 118 页)

鉴定出 198 个血清型,其中以 O₇₈、O₁₈、O₂、O₈₈、O₁、O₁₁ 为主,共 119 株,占分离菌株总数的 60.1%,与该试验结果相一致。该试验结果也为今后大肠杆菌毒力检测与自家多价灭活苗的制备奠定基础。

禽大肠杆菌是一种条件性病原微生物,在饲养管理不当、环境卫生不良、生物安全措施不到位、应激和其他病原感染等情况下,容易诱发大肠杆菌病。因此,防治该病时,应加强饲养管理,增强机体抗病力,采取综合预防措施来控制。目前,各规模养殖场对该病的防治主要依赖抗生素或其他抗菌药物,但由于抗生素的滥用,大肠杆菌的耐药现象已相当严重,以前对大肠杆菌敏感的药物(如氟苯尼考、环丙沙星、阿莫西林等)现在可能变得不敏感或耐药。因此,在对禽大肠杆菌病进行防治时,应进行药敏试验,选择敏感的药物使用,而且最好能选用几种药物交替使用,并严格按疗程和剂量用药,以防止耐药菌株的出现。徐树强等^[5]对从扬州地区分离鉴定出 42 株鸡大肠杆菌,用 15 种药物进行敏感试验,结果表明所有分离菌株对丁胺卡那霉素、卡那霉素和新霉素均敏感,对复方新诺明、链霉素和四环素均耐药;刘明生等^[2]从海安地区分离并鉴定出 198 株鸡大肠杆菌,用 18 种药物对其进行药敏试验,结果表明分离的大肠杆菌多数对头孢噻

呋、头孢噻肟、阿米卡星、氧氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星高度敏感,对四环素、庆大霉素、链霉素、复方新诺明、头孢氨苄耐药。翟向和等^[6]检测了 38 株鸡源大肠杆菌对 24 种常用药物的敏感性,结果发现均有不同程度的耐药性,且大多为多重耐药,其中 36 株对 5 种或 5 种以上的药物产生了耐药性。在此次药敏试验使用的药物中,大肠杆菌对氨苄青霉素、四环素、万古霉素、红霉素、复方新诺明、林可霉素、链霉素等有很强的耐药性。大多数菌株对硫酸黏菌素、头孢噻呋、头孢噻肟、卡那霉素、氧氟沙星等敏感性较高,这为今后选择临床药物来防治大肠杆菌病提供了科学依据和参考。

参考文献

[1] 羊建平,张君胜. 动物病原体检测技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2013.

[2] 刘明生,甘辉群,徐小琴,等. 海安县鸡:大肠杆菌病病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2010(4):223 – 224.

[3] 丁红雷,王豪举,杨红军,等. 鸡大肠杆菌病病原的分离鉴定和部分生物学特性研究[J]. 微生物学杂志,2006,26(1):48 – 50.

[4] 吴华俊,任文,周梅霞,等. 扬州地区鸡病原性大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 现代农业科技,2009(15):306 – 308.

[5] 徐树强,杨安龙,吴兆林,等. 扬州地区鸡大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 江苏农业科学,2006(6):330 – 332.

[6] 翟向和,张铁,韩伟,等. 38 株鸡大肠杆菌的耐药谱分析[J]. 中国家禽,2008,30(8):50 – 52.