

戴建华, 吴 植, 刘俊栋, 等. 禽源性沙门氏菌分离鉴定及耐药表型分析[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 159-161.

禽源性沙门氏菌分离鉴定及耐药表型分析

戴建华, 吴 植, 刘俊栋, 蔡丙严

(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要:采用常规方法,从江苏南通、泰州、扬州等地规模化养禽场疑似感染沙门氏菌病料中分离出 22 株沙门氏菌并进行血清学分型,同时采用 K-B 法测定分离菌的耐药表型。结果表明,22 株分离菌属于 4 个血清群,优势血清群为 D 群,占 59.10% (13/22),优势血清型为 9:g,m:-,占 50.00%;所有菌株对甲氧胺嘧啶、阿米卡星、庆大霉素、萘啶酮酸、诺氟沙星的耐药率在 72.73%~100% 之间;存在着 5 种耐药表型,每个耐药表型均在 4 重或 4 重以上,耐药最多菌株可耐受 10 种药物。

关键词:禽;沙门氏菌;分离鉴定;耐药表型

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0159-02

沙门氏菌(*Salmonella*)为肠杆菌科沙门氏菌属成员,绝大多数沙门氏菌对人和动物都有致病性,是一种重要的人畜共患病原^[1]。禽沙门氏菌病是由沙门氏菌引起的禽类急性或慢性疾病的总称,主要有鸡白痢、禽伤寒、禽副伤寒 3 种,可导致禽群生产性能降低,种蛋孵化率下降,影响雏禽的存活率,对养禽业造成了巨大的经济损失,更重要的是成为人类感染沙门氏菌的潜在来源,直接危害人类健康^[2]。长期以来,由于抗菌药物的滥用,沙门氏菌的耐药菌株不断产生,特别是多重耐药菌株的出现,严重影响了临床抗感染治疗效果。为了解江苏苏中地区禽群沙门氏菌的流行情况,对南通、泰州、扬州等地区 12 个规模化养鸡(鸭、鹅)场进行了病原的分离鉴定及耐药表型分析,旨在为防治沙门氏菌病提供依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 质控菌株雏鸡沙门氏菌 NCTC5776 购自中国兽药药品监督所;22 株禽源性沙门氏菌来自苏中地区 12 个规模化养鸡(鸭、鹅)场送检的病料。

1.1.2 培养基与试剂 营养琼脂培养基、SS 琼脂培养基、MH 琼脂培养基、MM 琼脂培养基,均购于北京奥博星生物技术有限公司;麦康凯琼脂培养基、伊红美蓝琼脂培养基、三糖铁琼脂培养基,均购于广东环凯微生物科技有限公司;细菌生化微量鉴定管购于杭州天和微生物试剂有限公司;沙门氏菌属诊断血清(60 种)购于宁波天润生物药业有限公司;Wizard DNA Clean-up System 购于美国 Promega 公司。

1.1.3 药敏纸片 12 种药敏纸片包括阿米卡星(AMI)、新霉素(NEO)、卡那霉素(KAN)、庆大霉素(GEN)、四环素(TET)、强力霉素(DC)、甲氧胺嘧啶(TMP)、复方新诺明(SXT)、环丙沙星(CIP)、萘啶酮酸(NAL)、氧氟沙星(OFL)、诺氟沙星(NOR)等,均购于杭州天和微生物试剂有限公司,生产批号 20001102。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养 取具有典型病理变化的病(死)禽肝脏和心血,接种于 MM 增菌液,42℃ 培养 24 h。取增菌液分别接种于麦康凯培养基、SS 琼脂培养基、伊红美蓝琼脂培养基平板上,37℃ 培养 24 h,观察细菌生长情况及菌落特征,挑取可疑菌落涂片,革兰氏染色,并进行显微镜观察。

1.2.2 生化试验 将初步鉴定出的沙门氏菌接种于常用三糖铁琼脂培养基及微量发酵管,置于 37℃ 培养 2~3 d,每天观察并记录反应情况。

1.2.3 血清学分型 将沙门氏菌接种营养琼脂平板,37℃ 培养 24 h 后,按照沙门氏菌诊断血清说明书,将分离菌株做血清学分型,以生理盐水作为阴性对照,出现凝集反应者判定为阳性,根据检测结果,判定临床分离株的血清型。

1.2.4 16S RNA 基因序列扩增及分析 根据 GenBank 中登录的 16S RNA 基因序列及相关文献,分别设计正向引物 F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 和反向引物 R: 5'-GGTTACCTTCTAACGACTT-3' 用于扩增 16S RNA。参考《分子克隆实验指南》^[3],利用煮沸法提取细菌基因组 DNA 用作 PCR 模板。PCR 反应体系:5 μL 模板 DNA,5 μL 正反向引物,4 μL dNTP Mix,5 μL 10×buffer,1 μL(5 U)Ex Taq,25 μL ddH₂O。PCR 程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 50 s,55℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 1 min,30 次循环。扩增产物的回收按照凝胶回收试剂盒说明书进行,将回收产物送至宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定,将所获序列与标准株 16S RNA 基因序列作同源性分析。

1.2.5 耐药表型测定 根据 WHO 推荐的 K-B 法进行,将 1.5 亿 CFU/mL 分离菌株液均匀涂布于 MH 营养琼脂表面,均匀放置药敏纸片,置 37℃ 培养 16~18 h,参照美国临床实验室标准委员会(NCCLS,2010)公布的标准,以敏感(S)、中介(I)和耐药(R)对抑菌圈直径进行判定,以雏鸡沙门氏菌 NCTC5776 作为质控标准菌株,根据药敏试验判定耐药表型。

2 结果与分析

2.1 细菌分离与形态观察

从送检病料中共分离出 22 株细菌,其中扬州 5 株

收稿日期:2013-03-06

作者简介:戴建华(1980—),男,江苏泰兴人,硕士,讲师,从事动物疫病防控研究。Tel:(0523)86158005;E-mail:djh0018@126.com。

(YZ1 至 YZ5)、泰州 7 株(TZ1 至 TZ7)、南通 10 株(NT1 至 NT10),来源于鸡场 13 株、鸭场 6 株、鹅场 3 株。在麦康凯平板可见无色透明、圆形的小菌落;在 SS 琼脂平板可见黑色或中间有黑色小点、边缘整齐、光滑的菌落;在伊红美蓝平板可见表面光滑、边缘整齐、淡蓝色的小菌落。革兰氏染色之后,可以发现大量短小、两端钝圆、多数单个存在的革兰氏阴

性菌。
2.2 生化鉴定
所有分离株在三糖铁琼脂培养基斜面上生长时底层由黄变黑,斜面变红,琼脂底层出现气泡或断裂,其他生化反应结果见表 1。通过试验鉴定,初步确定 22 株分离菌为沙门氏菌。

表 1 分离菌株生化鉴定结果

菌株数	乳糖	甘露醇	卫矛醇	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	枸橼酸盐	靛基质	尿素	赖氨酸	甲基红	MR
8	-	⊕	+	⊕	⊕	-	+	-	-	⊕	+	+
5	-	⊕	+	⊕	-	-	-	-	-	+	+	+
5	-	⊕	-	⊕	⊕	-	+	-	+	⊕	+	+
3	-	⊕	-	⊕	⊕	-	+	-	-	-	+	-
1	-	⊕	-	+	⊕	-	-	-	-	+	+	+

注:⊕表示产酸产气,+表示阳性,-表示阴性。

2.3 血清学分型

根据血清学分型鉴定结果,22 株分离菌属于 4 个血清群,即 B 群 4 株、C1 群 2 株、D 群 13 株、E1 群 3 株,分别占 18.18% (4/22)、9.09% (2/22)、59.10% (13/22)、13.63% (3/22)。22 株分离菌抗原结构类型主要有 8 种类型,即 9:g,m;- 共 11 株、4,12:-:e,n,x 共 2 株、4,5,12:e,h;1,2 共 2 株、6,7;b:1,5 共 2 株、3:e,h;1,6 共 2 株、3:l,v;1,6 共 1 株、9,12;d:- 共 1 株、9,12:-:- 共 1 株。根据《伯杰氏手册》关于沙门氏菌抗原式规定和血清分型结果发现,22 株分离株中肠炎沙门氏菌 11 株、马流产沙门氏菌 2 株、圣保罗沙门氏菌 2 株、爱丁堡沙门氏菌 2 株、鸭沙门氏菌 2 株、伦敦沙门氏菌 1 株、鸡-雏沙门氏菌 1 株、伤寒沙门氏菌 1 株。

2.4 分离株 16S RNA 基因扩增与同源性分析

凝胶电泳显示,22 株分离株和阳性对照 NCTC5776 均可扩增得到预期大小 1.5 kb 的片段,阴性对照无条带。将 22 株分离株的 16S RNA 基因序列与 GenBank 中登陆的序列进行对比,序列同源性均在 98.5% ~ 100%,其中 10 株与标准株同源性比较结果见表 2。

2.5 药敏实验

从表 3 可以看出,所有分离菌株对甲氧胺嘧啶耐药,对阿米卡星、庆大霉素、萘啶酮酸、诺氟沙星的耐药率分别高达 90.91%、86.36%、72.73%、72.73%,对强力霉素、复方新诺

表 2 10 株分离株 16S RNA 基因序列与标准株同源性比较

菌株	同源性(%)									
	YZ1	YZ3	TZ1	TZ2	TZ4	NT1	NT3	NT4	NT6	NT10
标准菌株	99.9	99.7	99.5	99.6	99.2	99.9	99.5	99.9	99.7	99.7
YZ1		99.8	99.5	99.7	99.3	100.0	99.5	100.0	99.8	99.7
YZ3			99.7	99.5	99.0	99.8	99.7	99.8	99.6	99.5
TZ1				99.3	98.8	99.5	100.0	99.5	99.3	99.3
TZ2					99.6	99.7	99.3	99.7	99.5	99.4
TZ4						99.3	98.8	99.3	99.0	99.0
NT1							99.5	100.0	99.8	99.7
NT3								99.5	99.3	99.3
NT4									99.8	99.7
NT6										99.5

注:质控标准菌株为 NCTC5776。

明的耐药率分别为 50.00%、45.45%,对四环素、环丙沙星和新霉素敏感。同时多重耐药现象非常严重,22 株沙门氏菌存在着 5 种耐药表型,每个耐药表型均在 4 重或 4 重以上,其中有 10 株为 4 重耐药(TMP-AMI-GEN-NAL),4 株为 5 重耐药(TMP-AMI-GEN-NAL-NOR),5 株为 7 重耐药(TMP-AMI-GEN-NAL-NOR-DC-SXT),2 株为 8 重耐药表型(TMP-AMI-GEN-NAL-NOR-DC-SXT-KAN),其中有 1 株(NT9)为 10 重耐药表型(TMP-AMI-GEN-NAL-NOR-DC-SXT-KAN-OFL-NEO)。

表 3 22 株沙门氏菌药敏试验结果

类别	名称	抑菌圈直径折点整数(mm)			耐药率(%)		
		R	I	S	R	I	S
氨基糖苷类	阿米卡星	≤14	15~16	≥17	90.91	0.00	9.09
	新霉素	≤14	15~18	≥19	9.09	4.55	86.36
	卡那霉素	≤13	14~17	≥18	27.27	0.00	72.73
	庆大霉素	≤12	13~14	≥15	86.36	0.00	13.64
四环素类	四环素	≤11	12~14	≥15	4.55	0.00	95.45
	强力霉素	≤10	11~13	≥14	50.00	27.27	22.73
磺胺类	甲氧胺嘧啶	≤10	11~15	≥16	100.00	0.00	0.00
	复方新诺明	≤12	15~16	≥17	45.45	4.55	50.00
喹诺酮类	环丙沙星	≤15	16~20	≥21	9.09	9.09	81.82
	萘啶酮酸	≤13	14~18	≥19	72.73	13.64	16.64
	氧氟沙星	≤12	13~15	≥16	68.18	13.64	18.18
	诺氟沙星	≤12	13~16	≥17	72.73	9.09	18.18

丁月云,孟 云,周晓明,等. 安庆六白猪血液生化指标的发育性变化及性别差异[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):161-163.

安庆六白猪血液生化指标的发育性变化及性别差异

丁月云¹, 孟 云¹, 周晓明², 查湖生³, 王林华³, 朱卫华¹, 薛玮玮¹, 张晓东¹, 殷宗俊¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院/安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 安徽合肥 230036;

2. 安徽省望江县现代良种有限公司, 安徽望江 246206; 3. 安徽省太湖县畜牧局, 安徽太湖 246400)

摘要:测定了 0、30、45、90、180 日龄安庆六白猪 11 项血清生化指标。结果显示:不同日龄安庆六白猪间血糖 (GLU)、血脂:总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、游离脂肪酸 (FFA)、血清中生物活性物质:脂联素 (ADP)、瘦素 (leptin)、血清免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 等指标变化趋势不同;相同日龄公、母猪群间血清生化指标存在差异。

关键词: 安庆六白猪; 血液生化指标; 发育性变化; 性别差异

中图分类号: S852.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0161-03

安庆六白猪是我国优良地方猪种之一,主产区位于安徽省安庆市太湖县和望江县,在安庆市宿松县、怀宁县等地也有

收稿日期:2013-06-04

基金项目:国家自然科学基金 (编号:31171200); 国家农业科技成果转化资金 (编号:2011GB2C300017); 科技部星火计划重点项目 (编号:2010GA710001)。

作者简介:丁月云 (1981—),女,安徽蒙城人,博士,讲师,主要从事猪遗传育种研究。E-mail:dingyueyun@ahau.edu.cn。

通信作者:殷宗俊,博士,教授,主要从事猪遗传育种研究。E-mail:yinzongjun@ahau.edu.cn。

3 小结与讨论

根据分离菌的形态、染色、培养特性、生化试验初步鉴定出 22 株沙门氏菌;利用 60 种诊断血清鉴定出优势血清群为 D 群,占 59.10% (13/22),优势血清型为 9:g,m:-,占 50.00%,这与大多数国家分离到的优势血清型基本一致,如美国 2010 年从肉鸡中分离的沙门氏菌主要以肠炎和肯塔基血清型为主^[4],欧盟 2010 年分离的主要血清型为肠炎和鸭沙门氏菌^[5]。同时,本研究中也分离到爱丁堡沙门氏菌、伦敦沙门氏菌等,表明感染禽沙门氏菌的血清型有增加趋势,这与 Kim 等报道的相符^[6]。

耐药菌株产生的耐药性与抗菌药物的应用呈正相关^[7]。本研究利用 12 种抗菌药物对临床分离的 22 株沙门氏菌进行敏感性测定,发现对甲氧胺嘧啶、阿米卡星、庆大霉素等药物表现严重的耐药性,通过临床调查发现这几种药物在采样地区作为药物预防在饲料中常规添加,而四环素、环丙沙星和新霉素虽然在临床中有较高使用频率,但多为饮水给药的短期治疗,因此仍然保持较高的敏感性。

多重耐药性产生的主要原因是致病性沙门氏菌在药物的选择性压力下,耐药基因发生突变或各类抗菌药物在临床上大量交叉使用,致使沙门氏菌可通过质粒、转座子、整合子等可移动元件获得耐药性^[8]。本研究分离到禽源性沙门氏菌多重耐药现象比较严重,且每个菌株耐药表型均在 4 重或 4

分布^[1]。血液生化指标是动物机体生理功能及代谢过程的内在反映,也是评价动物健康状况的重要参数。目前,关于国内某些地方猪种的血液生化指标研究很多^[2-3],但未见安庆六白猪的相关报道。本研究对安庆六白猪不同生长阶段的血液部分生化指标进行测定和分析,阐明安庆六白猪生长发育与脂肪沉积的关系,旨在为其选育和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选择 0、30、45、90、180 日龄的安庆六白猪 (安徽省望江县

重以上,甚至有 10 重耐药,这与不同养殖场的用药史及用药习惯有关,提示临床用药应根据药敏试验结果选择治疗用抗菌药物。

参考文献:

- [1] 贺奋义. 沙门氏菌的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33 (11): 91-95.
- [2] 范俊娟. 禽沙门氏菌的分离鉴定与药物敏感性试验[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2012, 14(2): 4-5.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2000.
- [4] USDA. National antimicrobial resistance monitoring system - enteric bacteria[R]. NARMS animal arm annual report, GA U, 2012: 18.
- [5] Eurosurveillance Editorial Team. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010[J]. Euro Surveillance; Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles, 2012, 17(10): 71-94.
- [6] Kim S. Salmonella serovars from foodborne and waterborne diseases in Korea, 1998-2007: total isolates decreasing versus rare serovars emerging[J]. Journal of Korean Medical Science, 2010, 25(12): 1693-1699.
- [7] 潘志明, 焦新安, 刘文博, 等. 鸡白痢沙门氏菌耐药性的监测研究[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(4): 377-383.
- [8] 王明贵. 喹诺酮类抗菌药的耐药性及质粒介导耐药机制[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(9): 645-647.