

李娜,张保平,王文彬,等. 湖南省常德地区鸡致病性大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):226-228.

# 湖南省常德地区鸡致病性大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验

李娜<sup>1</sup>, 张保平<sup>2</sup>, 王文彬<sup>1</sup>, 王兴平<sup>1</sup>, 罗仍卓玛<sup>1</sup>

(1. 湖南文理学院生命科学学院/动物学湖南省高校重点实验室, 湖南常德 415000;

2. 常德职业技术学院生物工程系, 湖南常德 415000)

**摘要:**从湖南省常德地区的 3 个不同鸡场采集 105 份病料,通过细菌分离和生化鉴定共分离得到 75 株鸡源性大肠杆菌,其中 60 株为致病性大肠杆菌。对分离得到的 75 株鸡大肠杆菌进行 30 种抗生素的敏感性试验表明,分离菌株对 30 种抗菌药物均有不同程度的耐药性,且多重耐药现象普遍;在 30 种受试药物中,高敏的药物分别为头孢曲松、头孢哌酮、头孢他啶、头孢唑啉、头孢噻肟、丁胺卡那霉素等 6 种。

**关键词:**鸡;致病性大肠杆菌;耐药性

**中图分类号:** S852.61<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0226-03

大肠杆菌为临床上常见的病原菌,在腹泻畜禽的粪便中及各种原因引起的败血症畜禽中都能分离到致病性大肠杆菌。该病的主要特征包括心包炎、肝周炎、脐炎、气囊炎、败血症、眼炎、滑膜炎、卵黄性腹膜炎等,多继发新城疫、传染性喉气管炎等疾病,导致鸡群高死亡率,对养鸡生产的危害极大<sup>[1]</sup>。国内已有很多关于鸡大肠杆菌病流行病学的研究报道,主要针对我国的主要省(市),而对较小的市、县的研究报道并不多。由于大肠杆菌血清型多、抗原复杂,在小区域间也存在较大差异;同时随着抗生素的广泛应用,大肠杆菌的耐药性越来越强。为了能准确防治鸡大肠杆菌病,应在尽可能小的区域内对其进行病原血清型调查,并合理用药。目前,国内尚无对湖南省常德地区鸡场大肠杆菌耐药性监测的调查研究报道。为此,笔者从 2006 年 10 月至 2012 年 12 月对湖南省常德地区范围内的鸡大肠杆菌病流行情况和耐药情况进行了调查和监测,以了解湖南省常德地区的主要流行菌株的耐药规律,为兽医临床用药提供指导性参考意见。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 病料采集 在 2006 年 10 月至 2012 年 12 月期间,选取 105 份湖南省常德地区饲养的疑似大肠杆菌病鸡的脏器。

1.1.2 培养基及试剂 普通琼脂平板培养基、三糖铁(TSI)琼脂培养基、伊红美兰(EMB)琼脂培养基、麦康凯(MAC)琼脂培养基,购自北京奥博星生物技术责任有限公司;生化试验微量发酵管,购自杭州微生物试剂有限公司;普通营养肉汤,

自制。

1.1.3 试验动物 18~25 g/只的小白鼠,购自湖南农业大学小动物室。

1.1.4 药敏纸片 试验用药敏纸片共 30 种,包括阿莫西林、哌拉西林、氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、氨苄青霉素、苯唑青霉素、妥布霉素、庆大霉素、丁胺卡那霉素、链霉素、头孢哌酮、头孢他啶、头孢唑啉、头孢噻肟、头孢曲松、头孢氨苄、四环素、氯霉素、红霉素、新霉素、壮观霉素、强力霉素、林可霉素、乙酰螺旋霉素、氯洁霉素、呋喃妥因、氨曲南、复方新诺明、利福平等,购于杭州天和微生物试剂有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 细菌形态与分离培养 将采集的新鲜病料分别划线接种于普通培养基、MAC、EMB 培养基上,同时分别穿刺 TSI 琼脂管,置于 37℃ 恒温箱培养 18~24 h 后观察;挑取疑似的单个菌落进行革兰氏染色镜检,将培养特性及形态、染色反应、排列均符合大肠杆菌特征的菌株划线接种于普通营养琼脂平板上进行细菌的数次纯化,然后将纯化的细菌接种于普通斜面培养基上,4℃ 保存备用。

1.2.2 生化特性鉴定 将分离的 60 个致病菌株接种于普通肉汤中,37℃ 恒温箱培养 24~48 h 后适量接种于葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、棉子糖、尿素、H<sub>2</sub>S、靛基质、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、MR、VP 微量发酵管中,置于 37℃ 恒温箱培养 24 h 后观察生化反应结果。靛基质发酵管中滴加 1 滴靛基质试剂、MR 发酵管中滴加 1 滴 MR 试剂即可观察结果;VP 发酵管中滴加 2 滴 VP 甲液、1 滴 VP 乙液,置于 37℃ 培养 2 h 即可观察结果。

1.2.3 大肠杆菌致病性试验 取已鉴定的、生化反应符合大肠杆菌的各个菌株于 37℃ 恒温箱培养 18 h 的普通肉汤培养物(菌液浓度为 3.0×10<sup>9</sup> CFU/mL),经纯粹检验合格后分别腹腔接种 18~25 g 小白鼠,按 0.2 mL/只的剂量接种,每个菌株接种 6 只;对照组按相同的途径接种 0.2 mL 普通肉汤培养液,共接种 6 只。接种后饲养观察 120 h 小白鼠的存活情况,记录小白鼠的死亡时间并对死亡小白鼠进行剖检取肝脏、心

收稿日期:2013-10-10

基金项目:湖南省“十二五”重点建设学科(动物学)项目(编号:湘教发[2011]76号);湖南省高校科技创新团队项目(编号:2008244);湖南省动物学重点实验室项目(编号:200824632);湖南文理学院青年专项基金(编号:QNYX0811)。

作者简介:李娜(1977—),女,吉林长春人,硕士,讲师,研究方向为预防兽医学。E-mail:vetlina@163.com。

脏,用 EMB 平板进行接种菌回收试验以分离致病菌。

1.2.4 分离菌药物敏感性试验 采用 WHO 推荐的 Kriby – Bauer (K – B) 法<sup>[2]</sup>对分离鉴定的 75 株大肠杆菌进行耐药性监测,判断标准参照美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)颁布的 M100 – S15 药敏试验纸片扩散法法规<sup>[2]</sup>和相关文献<sup>[3–4]</sup>,以高敏、中敏、低敏或耐药 3 种形式对抑菌圈大小作出判定。先将菌株接种到普通营养琼脂斜面培养基上,37 ℃ 恒温箱培养 18 h,用生理盐水洗下菌苔;将菌悬液稀释到麦氏比浊管中,相当于终浓度  $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  CFU/mL;将普通营养琼脂倾注于直径为 10 cm 的平皿上,制成厚 4 mm 的营养琼脂平板,15 min 内用灭菌棉拭子蘸取上述浓度的菌悬液,在管内壁挤去多余菌液后在琼脂平板表面涂布接种 3 次,每次旋转 70°,最后沿平板内缘涂抹 1 周;室温干燥 3 ~ 5 min 后,用无菌镊子将药敏纸片紧贴于营养琼脂平板表面,各纸片中心的距离应大于 24 mm,纸片距平板内缘的距离应大于 15 mm;37 ℃ 恒温箱培养 16 ~ 18 h 后观察结果,记录各纸片的抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 细菌形态及生长情况

由细菌培养结果可知,在普通营养琼脂平板上的菌落生长良好、湿润,呈现半透明状态与灰白色,边缘光滑;在 EMB 琼脂培养基平板上的细菌形成中等大小、边缘整齐、表面光滑、黑紫色带金属光泽的菌落;在 MAC 琼脂培养基平板上的细菌长出圆形粉红色、表面光滑圆形中等大小的菌落;TSI 管底及斜面培养的细菌均变黄色,产气而不产硫化氢;经过革兰氏染色镜检后,镜下均可见大量散在的红色、中等大小、两端钝圆的无芽孢 G<sup>-</sup> 短小直杆菌。

2.2 分离菌的生化特性

分别对分离出的 60 株致病细菌进行生化试验,结果均符合大肠杆菌的生化特性,详见表 1。

表 1 鸡大肠杆菌地方分离株的生化试验结果

| 测试项目 | 结果 | 测试项目 | 结果 | 测试项目             | 结果 |
|------|----|------|----|------------------|----|
| MR   | +  | 麦芽糖  | +  | 胨基质              | +  |
| VP   | -  | 棉籽糖  | -  | H <sub>2</sub> S | +  |
| 乳糖   | +  | 甘露醇  | +  | 赖氨酸              | +  |
| 蔗糖   | -  | 尿素   | -  | 鸟氨酸              | +  |
| 葡萄糖  | +  |      |    |                  |    |

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

2.3 大肠杆菌致病性试验

小白鼠在接种分离菌 12 h 后,均表现出精神不振,18 h 后开始出现死亡,48 h 后全部死亡;而对照组小白鼠健康活泼。剖检死亡的小白鼠可见肝脏肿大瘀血,表面散在针尖大小的出血点,心包膜、腹膜、肺、肾、脾脏均有不同程度的出血。从死亡小白鼠的肝脏、心脏中均可分离到分离菌。综合试验结果可知,分离菌株的培养特性、形态、染色反应均符合大肠杆菌特性,确定为致病性大肠杆菌。

2.4 分离菌药物敏感性试验结果

以抑菌圈直径大小作为判定药物敏感性高低的标准,抑菌圈直径越大表明细菌对该药的敏感性越高。抑菌圈直径 ≥

21 mm 为高度敏感;在 15.1 ~ 20.0 mm 范围内为中度敏感;≤14 mm 为低敏或耐药。抑菌圈直径的测定结果见表 2。研究表明,虽然常德地区 3 个不同养鸡场的大肠杆菌菌株对 30 种药物的敏感性存在一定差异,但是同一养鸡场的大肠杆菌菌株对抗生素的敏感性几乎一致。

表 2 75 株大肠杆菌对 30 种药物的药敏试验结果

| 抗生素    | 抑菌直径(mm)     |              |              |
|--------|--------------|--------------|--------------|
|        | 鸡场 1<br>分离菌株 | 鸡场 2<br>分离菌株 | 鸡场 3<br>分离菌株 |
| 阿莫西林   | 19.1         | 18.0         | 17.6         |
| 哌拉西林   | 12.3         | 11.1         | 8.9          |
| 氧氟沙星   | 18.5         | 18.3         | 7.6          |
| 环丙沙星   | 16.3         | 18.1         | 20.2         |
| 诺氟沙星   | 17.2         | 19.2         | 18.1         |
| 氨苄青霉素  | 14.3         | 11.9         | 13.6         |
| 苯唑青霉素  | 6.0          | 6.0          | 6.2          |
| 妥布霉素   | 17.8         | 18.9         | 20.0         |
| 庆大霉素   | 16.2         | 16.0         | 15.2         |
| 丁胺卡那霉素 | 23.3         | 31.0         | 26.7         |
| 链霉素    | 17.0         | 16.6         | 16.9         |
| 头孢哌酮   | 21.1         | 22.3         | 22.4         |
| 头孢他啶   | 20.6         | 22.0         | 20.1         |
| 头孢唑啉   | 22.0         | 24.0         | 22.3         |
| 头孢噻肟   | 22.3         | 21.5         | 22.0         |
| 头孢曲松   | 24.2         | 32.0         | 26.1         |
| 头孢氨苄   | 18.2         | 18.0         | 19.2         |
| 四环素    | 7.6          | 6.0          | 10.3         |
| 氯霉素    | 11.0         | 8.5          | 9.0          |
| 红霉素    | 9.7          | 6.3          | 13.0         |
| 新霉素    | 18.8         | 17.7         | 19.0         |
| 壮观霉素   | 19.3         | 18.0         | 20.0         |
| 强力霉素   | 10.2         | 10.0         | 11.3         |
| 林可霉素   | 9.7          | 13.0         | 6.3          |
| 乙酰螺旋霉素 | 6.1          | 6.0          | 6.0          |
| 氯洁霉素   | 6.0          | 6.0          | 6.0          |
| 呋喃妥因   | 17.2         | 16.0         | 17.2         |
| 氨基曲南   | 12.2         | 11.0         | 10.8         |
| 复方新诺明  | 13.0         | 11.5         | 10.0         |
| 利福平    | 6.0          | 6.4          | 6.0          |

注:(1)药敏纸片的直径为 6 mm;(2)表中的数值分别是各个鸡场药敏试验结果的平均值。

选择 30 种抗菌药物,按 NCCLS 法规判定的药物敏感性试验对从常德地区 3 个不同鸡场分离获得的 75 株大肠杆菌进行检测,30 种抗菌药物中抑菌作用较强的为头孢曲松、头孢他啶、头孢噻肟、头孢唑啉、丁胺卡那霉素、头孢哌酮等 6 种药物,高敏感菌株比例达 90.67% ~ 100%;阿莫西林、氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、妥布霉素、庆大霉素、链霉素、头孢氨苄、壮观霉素、呋喃妥因、新霉素的抑菌作用次之,为中敏感菌株;哌拉西林、氨苄青霉素、氯霉素、复方新诺明、四环素、红霉素、氨基曲南、强力霉素、林可霉素的抑菌作用较低,敏感菌株比例均低于 40%。此外,75 株大肠杆菌中耐药性最高的为苯唑青霉素、乙酰螺旋霉素、氯洁霉素、利福平,低敏或耐药菌株比例均为 100%。具体结果见表 3。

表 3 75 株大肠杆菌药敏试验结果

| 抗生素名称  | 敏感菌株比例(%) |       |         |
|--------|-----------|-------|---------|
|        | 高敏菌株      | 中敏菌株  | 低敏或耐药菌株 |
| 阿莫西林   | 58.67     | 24.00 | 17.33   |
| 哌拉西林   | 32.00     | 21.33 | 46.67   |
| 氧氟沙星   | 50.67     | 22.67 | 26.67   |
| 环丙沙星   | 41.33     | 9.33  | 49.33   |
| 诺氟沙星   | 44.00     | 10.67 | 45.33   |
| 氨苄青霉素  | 22.67     | 12.00 | 65.33   |
| 苯唑青霉素  | 0         | 0     | 100.00  |
| 妥布霉素   | 86.67     | 6.67  | 6.67    |
| 庆大霉素   | 81.33     | 4.00  | 14.67   |
| 丁胺卡那霉素 | 92.00     | 2.67  | 5.33    |
| 链霉素    | 52.00     | 25.33 | 22.67   |
| 头孢哌酮   | 90.67     | 8.00  | 1.33    |
| 头孢他啶   | 97.33     | 0     | 2.67    |
| 头孢唑啉   | 92.00     | 1.33  | 6.67    |
| 头孢噻肟   | 94.67     | 5.33  | 0       |
| 头孢曲松   | 100.00    | 0     | 0       |
| 头孢氨苄   | 46.67     | 49.33 | 4.00    |
| 四环素    | 1.33      | 20.00 | 78.67   |
| 氯霉素    | 34.67     | 5.33  | 46.67   |
| 红霉素    | 5.33      | 53.33 | 41.33   |
| 新霉素    | 78.67     | 12.00 | 14.67   |
| 壮观霉素   | 80.00     | 9.33  | 10.67   |
| 强力霉素   | 12.00     | 4.00  | 84.00   |
| 林可霉素   | 9.33      | 12.00 | 78.67   |
| 乙酰螺旋霉素 | 0         | 0     | 100.00  |
| 氯洁霉素   | 0         | 0     | 100.00  |
| 呋喃妥因   | 74.67     | 12.00 | 13.33   |
| 氨曲南    | 6.67      | 26.67 | 66.67   |
| 复方新诺明  | 38.67     | 29.33 | 32.00   |
| 利福平    | 0         | 0     | 100.00  |

除对头孢曲松 100% 敏感外,75 株受试大肠杆菌对其余 29 种抗菌药物均有多重耐药性,表现对 4 种或 4 种以上药物耐药。由表 4 可见,8 耐菌株所占比例最大,为 14.67%;其次是 5 耐、9 耐,分别为 10.67%、9.33%。多重耐药现象严重,最少的为耐 4 种药物,最多的为耐 20 种药物。最普遍的多重耐药类型是环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、苯唑青霉素、氨苄青霉素、复方新诺明、四环素和氯霉素。

表 4 75 株大肠杆菌的多重耐药情况

| 耐药数  | 菌株数 | 耐药数  | 菌株数 |
|------|-----|------|-----|
| 4 耐  | 2   | 13 耐 | 5   |
| 5 耐  | 8   | 14 耐 | 4   |
| 6 耐  | 4   | 15 耐 | 4   |
| 7 耐  | 4   | 16 耐 | 2   |
| 8 耐  | 11  | 17 耐 | 5   |
| 9 耐  | 7   | 18 耐 | 1   |
| 10 耐 | 3   | 19 耐 | 2   |
| 11 耐 | 6   | 20 耐 | 1   |
| 12 耐 | 6   |      |     |

3 结论

湖南省作为农业大省,养殖业发达,畜禽及经济动物产品出口也较多,因此应该重视包括大肠杆菌在内的各种病原菌的监测。本试验从常德地区 3 个不同养鸡场分离的 75 株细菌的革兰氏染色涂片的细菌形态皆与大肠杆菌的形态特征一致,且生化试验结果与大肠杆菌的生化特征一致,可初步断定这些菌株属于大肠杆菌。

分离到的 75 株大肠杆菌中有 60 株大肠杆菌具有不同程度的致病能力,能使小白鼠在 18 h 开始死亡,48 h 之内全部死亡,这说明分离的大肠杆菌为致病性的。

调查表明,常德地区 3 个不同养鸡场的大肠杆菌菌株对 30 种药物的敏感性存在一定差异,但是同一个养鸡场的大肠杆菌菌株对抗生素的敏感性几乎一致。由耐药性监测试验结果可以看出,对大肠杆菌敏感率达 90% 以上的常规药物有头孢曲松、头孢哌酮、头孢他啶、头孢唑啉、头孢噻肟及丁胺卡那霉素 6 种,特别是头孢曲松的敏感率可达 100%,因此对防治大肠杆菌病有一定的参考价值。不难看出,以上这些药物除丁胺卡那霉素外,全是头孢类药物,疗效虽然很好但是其价格也比较高,因而可能养殖户使用得较少,这也是其高敏的原因之一。丁胺卡那霉素的高度敏感率可达 92%,而且价格相对便宜,养殖户可参考选用,但其在碱性环境中抗菌强,而且内服吸收很少,应注意用药范围。此外,其余 24 种常规药物大多具有广谱抗菌、疗效好、价格低等优点,因而在兽医临床中被大量使用甚至滥用,致使现在临床效果欠佳。

养殖户把药物防治作为控制大肠杆菌的主要手段,但药敏试验普及率很低,用药盲目性非常大,且在实际生产中有时用药不合理,如低剂量长时间使用,随意加大剂量或根据个人经验感觉盲目添加等,均会造成大肠杆菌严重耐药,从而导致药效下降甚至无效,药物控制难度增大,耐药菌株增多。75 株受试大肠杆菌均对除头孢曲松外的 29 种抗菌药物有多重耐药性,表现为对 4 种或 4 种以上药物耐药,8 耐菌株所占比例最大,为 14.67%;其次是 5 耐、9 耐,分别占 10.67%、9.33%。因此在临床用药方面或作为饲料添加药物时,有条件的应该进行药敏试验,尽量选择高效敏感的药物,尽量避免长期大量使用同一种药物,也可以几种药物交替使用,要足量、按疗程给药,以免产生耐药性。

参考文献:

[1] 刘观忠,赵超,董修建.“痢得停”对蛋用雏鸡大肠杆菌病的治疗效果及作用机理研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2012(11): 145-147.

[2] Wayne P A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[M]. Pennsylvania:NCCLS,2001:1-23.

[3] 李刚,文英,铁生虎,等. 规模化猪场仔猪致病性大肠埃希菌的耐药性检测[J]. 动物医学进展,2010,31(8):117-121.

[4] Khan A, Das S C, Ramamurthy T, et al. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(6):2009-2015.