

开封地区鸡大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析

钱明珠, 王申锋, 李 冉

(河南农业职业学院 动物科学系, 河南 郑州 451450)

摘要: 为掌握开封地区鸡大肠杆菌的耐药性情况, 对来自开封地区疑似鸡大肠杆菌病的 12 份病料进行病原菌的分离鉴定、形态学观察、生化试验, 并对分离株进行了动物接种试验和耐药性分析, 结果鉴定出 6 株鸡大肠杆菌。动物攻毒试验结果显示, 6 株细菌对雏鸡的发病率均为 100%, 致死率各不相同。其中 KF 株对雏鸡的致死率最低, 为 50% (10/20); LK 株对雏鸡的致死率最高, 为 90% (18/20)。耐药性检测结果表明, 分离的 6 株细菌对链霉素、新霉素、阿莫西林、磺胺二甲嘧啶、环丙沙星、氧氟沙星等均产生了耐药性, 并且表现为对 5 种以上抗生素耐药。敏感药物为头孢噻肟、阿奇霉素、胺卡那霉素、氟甲砜霉素等。

关键词: 鸡; 大肠杆菌; 分离鉴定; 动物试验; 耐药性

中图分类号: S858.31 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)10-0137-04

Identification and Analysis of Drug Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chicken in Kaifeng Area

QIAN Ming zhu, WANG Shen feng, LI Ran

(Department of Animal Science, Henan Vocational College of Agriculture, Zhengzhou 451450, China)

Abstract: In order to investigate the drug tolerance of chicken *Escherichia coli* (*E. coli*) in Kaifeng area, identification, morphology observation, biochemical test, animal experiments and the drug tolerance analysis of the isolates from 12 suspected chicken colibacillosis specimens were performed. Finally, a total of 6 isolates were characterized as *E. coli* and all showed 100% morbidity but different fatality to chicken, among which KF strain showed the lowest fatality (50%) while LK strain showed the highest fatality (90%). These strains had the drug resistance to streptomycin, amoxicillin, sulfadimidine, ciprofloxacin, and ofloxacin. They could resist more than 5 kinds of drugs at the same time. These new strains were susceptible to the drugs such as cefotaxime, azithromycin, amikacin and ceftriaxone.

Key words: Chicken; *Escherichia coli*; Identification; Animal experiment; Drug resistance

鸡大肠杆菌病是由埃希氏大肠杆菌的某些血清型(常见的有 O2、O78、O1、O35 和 O36)引起的鸡的不同类型疾病的总称。各个日龄、各个品种的鸡均易感。临床上表现为败血症、心包炎、气囊炎、肝周炎和腹膜炎。常继发于禽流感、新城疫、支原体病等感染性疾病, 增加了鸡群发病率和死亡率。鸡肠道中的大肠杆菌有 10%~15% 的血清型有一定的致病力^[1], 且由于各地流行菌株不同, 往往给该病的免

疫预防带来许多困难。此外, 滥用抗菌药物造成耐药菌株不断产生, 致使该病时有发生, 往往与其他病原混合感染, 给养鸡业造成了严重的经济损失。因此, 在临床中对鸡大肠杆菌的耐药情况进行调查意义重大。针对上述情况, 对来自开封地区(包括开封、尉氏、通许、兰考、杞县等)养鸡场的疑似大肠杆菌病料进行了大肠杆菌的耐药性监测和分析, 以指导临床用药。

收稿日期: 2011-04-02

作者简介: 钱明珠(1977), 女, 河南信阳人, 讲师, 硕士, 主要从事动物微生物和动物药理方面的教学、研究工作。

E-mail: xymingzhu@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源 12 份病料来自开封地区开封、尉氏、兰考、通许、杞县的不同规模的肉鸡场。对症状比较明显典型的疑似大肠杆菌病病鸡进行剖检, 无菌采集病鸡的心、肝、脾脏和十二指肠及内容物等, 用一次性塑料自封袋包装, 贴上标签, 标明鸡只品种、日龄、地点及采集时间, 及时送检或冷冻保存后尽快送检, 并对该病死鸡所在养殖场进行详细调查和记录。

1.1.2 主要试剂 伊红美兰琼脂培养基(EMB)、三糖铁琼脂培养基、营养肉汤培养基、普通营养培养基、细菌微量生化反应管(葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、肌醇、山梨醇、阿拉伯糖)、尿素分解管、蛋白胨水、硝酸盐还原管、葡萄糖磷酸盐胨水、枸橼酸盐利用试验管均购自杭州天和生物试剂有限公司, 用法按产品说明进行。麦康凯琼脂培养基、普通琼脂培养基、蛋白胨购自北京奥博星生物技术有限责任公司。革兰氏染色液由河南农业职业学院动物微生物实验室按参考文献[1]配制。明胶、葡萄糖、氯化钠、磷酸氢二钾由河南农业职业学院动物微生物实验室提供。MR 试验、VP 试验、吲哚试验试剂依据参考文献[2]配制。大肠杆菌标准菌株(ATCC 25922)购自中国兽医药品监察所。

1.1.3 供试动物 1 日龄海兰蛋雏公鸡购自郑州牧业工程高等专科学校孵化场, 鸡只健康正常, 在河南农业职业学院隔离饲养至 5 日龄后, 选健康鸡只备用。

1.1.4 供试药物 新霉素、阿奇霉素、氧氟沙星、丁胺卡那霉素、环丙沙星、磺胺二甲基嘧啶、阿莫西林、阿米卡星、头孢噻肟、链霉素、庆大霉素、强力霉素等 12 种药敏纸片购自杭州天和生物试剂有限公司。氟甲砜霉素、头孢噻肟药敏纸片自制, 药液以原粉按使用剂量 10 倍稀释, 装小瓶中备用。药敏试纸选用新华 1 号定性滤纸, 用打孔器打成直径 6 mm 的圆片, 经 121℃ 15 min 高压灭菌后, 于 60℃下烘干备用。将滤纸片浸泡于配好的药液中, 2 h 后取出, 烘干, 于 4℃冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离培养 病料用 1% 的葡萄糖肉汤培养基增菌培养, 并分别在 EMB、麦康凯琼脂培养基、普通琼脂培养基上划线分离。置 37℃条件下培养 24 h 后观察结果。然后从 EMB、麦康凯琼脂培养基、普通琼脂培养基上挑取可疑菌落, 用 1%

葡萄糖肉汤培养基进行纯培养。

1.2.2 染色 镜检 将上述培养基上划线培养所得的可疑菌落进行涂片, 革兰氏染色、镜检, 观察细菌的形态及染色特性。镜检符合大肠杆菌形态特征的进行下一步生化试验, 否则弃去。

1.2.3 生化试验 按文献[3]的方法挑取适量细菌纯培养物, 进行糖微量发酵试验(葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇)、MR 试验、VP 试验、吲哚试验、明胶液化试验、三糖铁(TSI)试验、枸橼酸盐利用试验, 观察并记录结果。

1.2.4 致病性试验

1.2.4.1 动物饲养 雏公鸡饲养 5 d, 第 6 天早晨挑取健康鸡 160 只, 随机分为 6 个攻毒试验组(6 个不同菌株根据分离地点不同, 分别命名为 KF、WS、LK、TX1、TX2、QX)、1 个肉汤对照组和 1 个空白对照组共 8 组, 每组 20 只。

1.2.4.2 菌液制备 挑取麦康凯琼脂培养基上待检菌株的单个菌落, 接种于营养肉汤中, 37℃下培养 24 h, 放于 4℃冰箱保存待用。

1.2.4.3 动物接种试验 攻毒试验组每只鸡颈部皮下注射营养肉汤培养菌液 0.5 mL (10^8 个/mL), 注射前菌种应充分混匀; 并设 2 个对照组, 肉汤对照组以同样方法接种 0.5 mL 葡萄糖肉汤, 空白对照不接种。各组雏鸡均按正常饲养标准进行隔离饲养。正常供应饲料及饮水, 连续观察 1 周, 观察每组的发病和死亡情况, 并做记录。

1.2.4.4 细菌回收检查 对死亡鸡只尽快在无菌条件下取其肝脏、心血、气囊等病料, 在麦康凯培养基上进行划线培养。7 d 后对依然存活的鸡只进行剖杀, 无菌采取其肝脏、心血、气囊等病料划线培养于麦康凯平板。37℃下培养 24 h, 观察大肠杆菌分离情况。

1.2.4.5 结果判定 根据鸡的死亡数和病变程度确定分离株的致病性: 高致病株: 50% 以上的接种鸡死亡或产生严重病变(心包炎、肝周炎、气囊炎、肝坏死等); 中度致病株: 接种鸡不死亡, 不产生严重病变; 低致病株: 接种鸡不死亡, 仅在气囊上偶尔产生病变。

1.2.5 药敏试验 采用世界卫生组织(WHO)推荐的 Kirby Bauer 菌液涂布法。按参考文献[4]所述方法进行。无菌条件下将各分离鉴定菌株肉汤纯培养物, 均匀涂布于普通琼脂平板表面上。用无菌眼科镊子将 14 种药敏纸片置于上述已涂布细菌的平皿上, 每个平皿贴 5 种药敏纸片, 各纸片中心距离不得小于 24 mm。在纸片贴好后 15 min 内, 将平皿

倒置于 37℃温箱中培养, 18 h 后取出观察结果。

结果判定: 测量抑菌圈直径(包括纸片直径), 按照表 1 标准判定敏感、中度敏感和耐药情况。

抗菌药物	抑菌圈直径 /mm		
	R (耐药)	M (中敏)	S(敏感)
阿莫西林	≤13	14~16	≥17
头孢噻吩	≤14	15~16	≥23
头孢噻肟	≤14	15~16	≥23
磺胺二甲嘧啶	≤11	12~16	≥15
庆大霉素	≤12	13~16	≥15
阿奇霉素	≤12	13~16	≥15
环丙沙星	≤15	16~16	≥21
强力霉素	≤12	13~16	≥18
阿米卡星	≤14	15~16	≥17
链霉素	≤11	12~16	≥15
新霉素	≤12	13~16	≥17
氟甲砜霉素	≤12	13~16	≥18
氧氟沙星	≤12	13~16	≥16
丁胺卡那霉素	≤13	14~16	≥18

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养特性

在不同地区共分离到 6 个菌株。观察 EMB、麦康凯琼脂培养基和普通琼脂培养基上的细菌分离培养特性。分离菌株在 EMB 培养基上, 菌落均呈圆形, 湿润, 中等大小, 紫黑色并具有金属光泽; 在麦康

凯琼脂培养基上均为红色菌落; 在普通琼脂培养基上均呈圆形、湿润, 无色、中等大小菌落。

2.2 细菌形态及染色特性

6 株分离菌染色镜检结果表明, 细菌均为两端钝圆, 中等大小, 散在排列的革兰氏阴性杆菌。

2.3 生化试验结果

生化鉴定结果: 6 株分离菌株均能发酵葡萄糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇, 产酸产气或产酸不产气。多数菌株不利用蔗糖, 少数为迟缓发酵, 所有菌株均不产生 H₂S。VP 试验和枸橼酸盐利用试验均为阴性, MR 试验、吲哚试验为阳性, 明胶液化阳性。以上试验证明所分离的细菌是大肠杆菌。

2.4 致病性试验结果

鸡只在攻毒后 3 h 开始发病, 主要表现为个别鸡出现精神沉郁、呼吸急促、缩颈垂翅等症状, 6 h 开始死亡, 18~22 h 死亡达到高峰。60 h 之内, 雏鸡死亡情况见表 2。对照组鸡只均正常。对全部病鸡、死鸡进行解剖观察, 其病理变化主要为可见纤维素性心包炎、肝周炎, 气囊上可见多量干酪样渗出物, 病程愈长, 病变愈明显。对照组鸡只剖检时未见任何肉眼可见的病变, 心、肝等处也未分离出任何细菌。

由表 2 可以看出, 分离到的 6 株大肠杆菌均为高致病性菌株, 以 LK 株的致死率最高, 达 90%, 其次为 TX2 株, 为 80%, KF 株的致死率最低, 为 50%。

组别	攻毒后不同时间雏鸡死亡数量/只										死亡总数/只	死亡率/%
	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h	54 h	60 h		
KF	0	1	1	4	3	0	1	0	0	0	10	50
WS	0	1	4	5	2	1	0	1	0	0	14	70
LK	1	3	5	3	2	0	2	0	1	1	18	90
TX1	0	1	4	3	2	1	1	1	1	0	14	70
TX2	1	1	5	2	2	2	2	1	0	0	16	80
QX	0	1	3	3	2	0	2	1	1	1	14	70
肉汤对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
空白对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.5 药敏试验结果

由表 3 可知: 鸡大肠杆菌 KF 株对头孢噻吩、头孢噻肟、阿奇霉素、阿米卡星、氟甲砜霉素、丁胺卡那霉素 6 种药物敏感, 对庆大霉素、强力霉素中度敏感, 而对磺胺二甲嘧啶、链霉素、新霉素、氧氟沙星、环丙沙星、阿莫西林等 6 种药物耐药。鸡大肠杆菌 WS 株仅对头孢噻肟、阿奇霉素、氟甲砜霉素 3 种药物敏感, 而对阿莫西林、环丙沙星、磺胺二甲嘧啶、庆大霉素、强力霉素、氧氟沙星、新霉素和链霉素等 8

种药物耐药。鸡大肠杆菌 LK 株对头孢噻肟、氟甲砜霉素、丁胺卡那霉素敏感, 对阿奇霉素较敏感, 对 6 种药物耐药。TX1 株和 TX2 株都对头孢噻吩、头孢噻肟、氟甲砜霉素敏感, 对阿莫西林、磺胺二甲嘧啶、环丙沙星、庆大霉素、新霉素和链霉素耐药。QX 株对头孢噻肟、阿奇霉素、丁胺卡那霉素敏感, 对阿莫西林、磺胺二甲嘧啶、庆大霉素、环丙沙星、新霉素耐药。6 株分离菌均表现多重耐药性, 且均耐 5 种以上抗生素。

表 3 不同药物对鸡大肠杆菌的抑菌圈直径mm

抗菌药物	KF 株	WS 株	LK 株	TX1 株	TX2 株	QX 株
阿莫西林	9.5	8.5	7.5	9.0	9.5	8.5
头孢噻吩	23.5	21.5	20.5	24.5	23.0	22.5
头孢噻肟	25.5	26.5	24.5	25.0	26.5	23.0
磺胺二甲嘧啶	6.5	10.5	6.5	10.5	11.0	8.5
庆大霉素	13.5	8.5	14.5	11.5	10.5	9.5
阿奇霉素	20.5	25.5	18.5	16.0	18.5	19.0
环丙沙星	14.5	9.5	10.5	11.0	12.5	15.0
强力霉素	12.5	12.5	13.5	11.5	12.0	13.5
阿米卡星	19.5	16.5	15.5	14.5	13.0	14.5
链霉素	9.5	6.5	5.5	10.5	11.5	13.5
新霉素	8.5	6.5	9.5	10.5	11.5	8.5
氟甲砜霉素	19.5	21.5	22.0	22.0	25.5	18.0
氧氟沙星	10.5	11.0	8.5	9.5	18.0	16.5
丁胺卡那霉素	23.5	17.5	25.5	18.5	19.5	22.5

3 讨论

3.1 所分离大肠杆菌的致病力

从开封地区 12 份病料鉴定出 6 株鸡大肠杆菌，分离率 50%，与杨斌等^[5]报道的云南省鸡大肠杆菌分离率 66.98%(280/418)接近，说明临床上大肠杆菌的分离率比较高。试验雏鸡在攻毒后 6h 开始死亡，未死亡的雏鸡均出现明显症状，精神高度沉郁，食欲废绝，拉黄色稀粪；18~22 h 死亡达到高峰，耐过 60h 者可存活一周直至剖杀。通过动物接种试验，发现 6 株大肠杆菌均为高致病性菌株，与吕俊^[6]分离鉴定的聊城地区 21 株鸡大肠杆菌均为高致病性菌株的结果一致。

3.2 所分离大肠杆菌的耐药性

从药敏试验结果可以看出，分离株对头孢噻肟、氟甲砜霉素、阿奇霉素高度敏感，对头孢噻吩、丁胺卡那霉素、阿米卡星中度敏感，具有临床应用价值。这些药物均是兽医临床较少使用的药物。分离株对喹诺酮类药物(氧氟沙星、环丙沙星)全部耐药，对头孢噻吩中度敏感。6 株分离株均表现出了多重耐药

性，且均对 5 种以上抗生素耐药，这说明了在动物临床上滥用抗菌素的现象严重。因此，临床上用药治疗时，要充分考虑到病原的耐药性因素，建议不要长期固定使用某几种抗菌药物，应交替轮换用药；当一种药物无效需更换时，避免使用同类药物，以避免交叉耐药。

参考文献:

[1] 陆承平. 兽医微生物学[M] . 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.

[2] 河南农业大学. 动物微生物学[M] . 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.

[3] 曹澎泽, 郭玉璞, 董国雄, 等. 兽医微生物学及免疫学技术[M] . 北京: 北京农业大学出版社, 1992.

[4] 倪语星, 洪秀华. 细菌耐药性检测与抗感染治疗[M] . 北京: 人民军医出版社, 2002.

[5] 杨斌, 王传禹, 杨向东, 等. 云南省鸡致病性大肠杆菌的血清型鉴定及药敏试验[J] . 云南畜牧兽医, 2010(3): 2-4.

[6] 吕俊. 聊城地区鸡大肠杆菌的分离与鉴定[D] . 北京: 中国农业大学, 2010.