

规模化鸡场空气致病性大肠杆菌的分离 鉴定及耐药性观察

石玉祥^{1,2}, 王绥华¹, 张永英¹, 栾英范³, 玄家洁¹, 甄 龙¹

(1. 河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056038; 2. 河北省蛋业体系, 河北 邯郸 057450;

3. 河北省邱县农牧局, 河北 邯郸 056450)

摘要: 为研究致病性大肠杆菌对河北省南都规模化鸡舍空气的污染情况及其耐药性, 根据细菌分离培养和形态学特性、生化试验、动物试验、玻板凝集试验分离鉴定致病性大肠杆菌, 并应用 K-B 纸片法测定其对 12 种抗菌药的耐药性。结果显示, 共分离鉴定出 26 株致病性大肠杆菌, 其中从 1 个试验鸡舍最多能分离到 5 株致病性大肠杆菌; 共分离出 7 个血清型, O78 占所分离致病菌株的比例最高; 致病性大肠杆菌对抗菌药的敏感性不同, 对头孢类药物的敏感性高, 对氟哌酸、多西环素、卡那霉素的敏感性低。表明鸡舍空气受大肠杆菌的污染程度不同, 不同鸡舍分离大肠杆菌的耐药性和血清型差异较大。

关键词: 大肠杆菌; 耐药性; 空气; 鸡舍

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)02-0126-03

Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria and Observation of Resistance to Drug in Chicken House Air of Hebei Province

SHI Yu-xiang¹, WANG Sui-hua¹, ZHANG Yong-ying¹,

LUAN Ying-fan², XUAN Jia-jie¹, ZHEN Long¹

(1. Hebei University of Engineering, Handan 056038, China;

2. Hebei Technical System of Layer Industry, Handan 057450, China;

3. Qiuxian Agriculture and Animal Husbandry Bureau of Hebei Province, Qiuxian 056450, China)

Abstract: In order to research the contamination state of pathogenic *E. coli* in chicken house air of Hebei province and observe its resistance to antibiotics. Pathogenic *E. coli* was isolated and identified by the characteristics of bacteria cultivation, morphology, biochemistry experiment, animal experiment and glass board agglutinate experiment. The resistance to 12 antibiotics was detected with K-B method. The results showed that 26 pathogenic *E. coli* were isolated, 5 strains were isolated from the same chicken house; 7 serotype were identified, and O78 took up the highest proportion. The sensitivity to the antibiotics were different. The highly sensitive antibiotics was cephalosporin drugs. The low sensitive antibiotics was norfloxacin, doxycycline and kanamycin. The results indicated that the contamination state of pathogenic *E. coli*, the resistance to antibiotics and the serotype of separated pathogenic *E. coli* were different.

Key words: *Escherichia coli*; resistance; air; chicken house

致病性大肠杆菌是一种条件性致病菌, 当鸡舍环境恶劣、环境卫生较差、鸡体抗病力下降时, 将会感染大肠杆菌、并发或继发大肠杆菌病, 严重影响集

约化养鸡业的经济效益。因此, 大肠杆菌成为衡量鸡舍生态环境质量的标准之一^[1-3]。鉴于此, 本研究对河北省鸡舍空气中致病性大肠杆菌进行分离, 并

收稿日期: 2013-07-23

基金项目: 河北省人力资源和社会保障厅资助项目(2012-26)

作者简介: 石玉祥(1972-), 男, 山东阳谷人, 教授, 硕士, 主要从事中药防治禽病研究。E-mail: hbyxshi@126.com

检测了其血清型及耐药性,以期为指导集约化养鸡生产、开展鸡舍空气中致病性大肠杆菌的消除和鸡舍生态环境质量的调控技术研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试动物

兔,购于邯郸市种兔场;小白鼠,购于河北医科大学。

1.2 主要试剂

氟苯尼考、阿米卡星、头孢噻肟钠、头孢噻吩、阿莫西林、羧苄青霉素、多西环素、环丙沙星、恩诺沙星、氟哌酸、替米考星、卡那霉素均购于邯郸市医药公司,对应的药敏纸片由河北工程大学微生物实验室自制;肉汤培养基、营养琼脂培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司;麦康凯培养基购自上海抚生生物科技有限公司;伊红美蓝培养基购自杭州博宁生物科技有限责任公司;三糖铁培养基购自北京奥博星生物科技有限责任公司;80种大肠杆菌标准抗O血清购自中国兽医药品监察所;细菌微量生化反应管购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.3 鸡舍空气细菌的分离培养

1.3.1 鸡舍空气细菌的采集 按周德庆^[4]介绍的自然沉降法在河北邢台、邯郸、石家庄地区的12个鸡舍中采集细菌。

1.3.2 细菌培养 将接种12个鸡舍细菌的培养基置于37℃培养箱中培养24h,挑取形态、色泽、大小疑似致病性大肠杆菌的菌落,进行革兰氏染色、镜检及形态学观察。

1.3.3 细菌分离、纯化培养 将疑似致病性大肠杆菌的细菌分别接种于麦康凯培养基、伊红美蓝培养基,37℃培养24h;挑取选择培养基上特征性的疑似致病性大肠杆菌菌落进行镜检,如细菌培养物不纯,再次进行纯化培养,直至得到纯培养物。

1.4 鸡舍空气分离细菌的鉴定

1.4.1 生化试验 将纯化的疑似致病性大肠杆菌培养物分别接种至葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、乳糖、尿素、三糖铁培养基、枸橼酸盐培养基、甲基红试验和

吲哚试验的生化常规微量发酵管中及糖蛋白胨水溶液后,置于37℃培养箱中培养2~3d,观察其变化。

1.4.2 大肠杆菌的致病性测定 按兰罗勋等^[5]介绍的方法检测所分离大肠杆菌是否具有致病性。

1.4.3 血清学试验 按大肠杆菌标准抗O血清使用说明书鉴定大肠杆菌血清型。

1.5 细菌耐药性测定

按K-B纸片法测定细菌对12种抗菌药的敏感性,并按下列标准判定细菌对抗菌药的敏感性,抑菌圈直径在20mm以上,为极敏;抑菌圈直径在15~20mm,为高敏;抑菌圈直径在10~14mm,为低敏;抑菌圈直径在10mm以下,为耐药。

2 结果与分析

2.1 细菌培养结果

培养24h后,按自然沉降法接种的普通营养琼脂平板培养基上生长出不同颜色和形态的菌落。经镜检细菌主要是球菌、杆菌,其中球菌比例大于杆菌,革兰氏阳性菌比例大于革兰氏阴性菌。

2.2 致病性大肠杆菌的培养特性和形态

据观察,致病性大肠杆菌的菌落无色,低而隆凸,表面湿润,光滑,大小为1~3mm,边缘整齐,有颗粒状结构,在麦康凯琼脂平板培养基上呈红色,在伊红美蓝琼脂平板培养基上则为紫黑色、带有金属闪光。镜检是无芽孢、染色均一、两端钝圆的革兰氏阴性杆菌。

2.3 致病性大肠杆菌的生化特性

试验表明,26株疑似致病性大肠杆菌能分解葡萄糖、麦芽糖、甘露糖,产酸产气,4株菌株不发酵或缓慢发酵乳糖;甲基红试验、吲哚试验均为阳性;在三糖铁培养基上不产生硫化氢,不水解尿素,在枸橼酸盐培养基上不生长。

2.4 致病性大肠杆菌的分离株数及血清型

由表1可以看出,从12个试验鸡舍中的9个鸡舍分离出致病性大肠杆菌,1个鸡舍最多能分离到5株致病性大肠杆菌;共分离出7个血清型,其中O78、O26菌株的比例较高。

表1 致病性大肠杆菌的分离数及血清型

| 项目 | 鸡舍编号 | | | | | | | | | | | |
|-------|------|-----------------|----------------------------|---|-----|--------|-----|--------|--------------------|----------------------------|----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 菌株数/株 | 0 | 3 | 5 | 0 | 1 | 3 | 1 | 2 | 4 | 5 | 0 | 2 |
| 血清型 | — | O15、O26、 O78 | O2、O45 (2株)、O78、 O26 | — | 未定型 | O2、O26 | O78 | O2、O35 | O1、O78、 O26、O35 | O2、O78 (2株)、O26、 O35 | — | 未定型 |

2.5 大肠杆菌的致病性

将 26 株致病性大肠杆菌肉汤培养物分别注入小白鼠腹腔,小白鼠均死亡,其他菌株则未引起小鼠死亡。

2.6 致病性大肠杆菌的耐药性

由表 2 可知,分离鉴定的 26 株致病性大肠杆菌

中,对头孢噻肟钠高度敏感菌株占分离菌株的比例最高,为 73.08%;对羧苄青霉素低敏菌株占分离菌株的比例高达 100%。对头孢噻肟钠、头孢噻唑、阿莫西林头孢类药物的敏感性较高,对氟哌酸、多西环素、卡那霉素的敏感性较低。

表 2 26 株大肠杆菌的药敏试验结果

| 兽药种类 | 类别 | 高度敏感菌株 | | 低度敏感菌株 | |
|-------|-------|--------|-----------|--------|-----------|
| | | 数量/株 | 占分离菌株比例/% | 数量/株 | 占分离菌株比例/% |
| 卡那霉素 | 氨基糖苷类 | 6 | 23.08 | 17 | 65.38 |
| 阿米卡星 | 氨基糖苷类 | 12 | 46.15 | 10 | 38.46 |
| 头孢噻肟钠 | 头孢类 | 19 | 73.08 | 4 | 15.38 |
| 头孢噻唑 | 头孢类 | 18 | 69.23 | 5 | 19.23 |
| 阿莫西林 | 头孢类 | 12 | 46.15 | 10 | 38.46 |
| 羧苄青霉素 | 青霉素类 | 0 | 0 | 26 | 100 |
| 多西环素 | 四环素类 | 5 | 19.23 | 18 | 69.23 |
| 环丙沙星 | 喹诺酮类 | 6 | 23.08 | 12 | 46.15 |
| 恩诺沙星 | 喹诺酮类 | 9 | 34.62 | 10 | 38.46 |
| 氟哌酸 | 喹诺酮类 | 5 | 19.23 | 14 | 53.85 |
| 替米考星 | 大环内酯类 | 12 | 46.15 | 9 | 34.62 |
| 氟苯尼考 | 氯霉素类 | 13 | 50.00 | 12 | 46.15 |

3 结论与讨论

动物生活环境与病原感染具有密切关系,空气作为疾病传播的媒介,尽管不适于任何病原微生物的生存,但病原微生物在一定时间内均可暂时存留在空气中,随时可以感染动物^[6-10]。从邯郸、邢台、石家庄地区 12 个鸡舍的空气中采样,9 个鸡舍空气中分离出致病性大肠杆菌,受致病菌污染的鸡舍比例达到 75%。表明邯郸、邢台、石家庄地区的鸡舍空气中存在致病性大肠杆菌的污染。

本研究发现,鸡舍空气中分离的致病性大肠杆菌有 7 个血清型,其中 O78 占所分离致病菌株的比例最高。致病性大肠杆菌对抗菌药的敏感性不同,其中对头孢类药物的敏感性较高,对氟哌酸、多西环素、卡那霉素的敏感性较低。这与报道的鸡源常见致病性大肠杆菌优势血清型和耐药性基本相符,说明鸡感染大肠杆菌病与空气污染有关,鸡大肠杆菌病的发生率与空气污染程度的相关性有待于进一步研究^[8-11]。

规模化鸡舍的空气已受到不同血清型致病性大肠杆菌污染,并且致病菌对抗菌药的耐药性不同。养鸡场预防鸡大肠杆菌病时,在注重抗生素种类和使用方法筛选的基础上,应及时消除进入鸡舍空气中的致病性大肠杆菌。

参考文献:

- [1] 石玉祥,王绥华,钟翠红,等. 鸡舍空气致病菌分离鉴定及其对消毒剂的敏感性观察[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(12):137-139.
- [2] 段会勇,柴同杰. 鸡舍内外环境中气载大肠杆菌同源性的分子鉴定[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(5):614-620.
- [3] 龚大春. 鸡源性致病菌和直肠常在菌对抗菌药物敏感性的比较研究[J]. 湖北畜牧兽医,2005(6):39-42.
- [4] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [5] 兰罗勋,陈红. 鸡大肠杆菌病原的分离及药敏试验[J]. 湖北畜牧兽医,2007(2):21-22.
- [6] 叶小梅,常志州,陈欣,等. 畜禽养殖场排放病原微生物危险性调查[J]. 生态与农村环境学报,2007,23(2):66-70.
- [7] 刘惠芹,胡柏林,张占朝. 浅谈鸡场中微生物的危害与控制[J]. 河南畜牧兽医,2007,28(5):36.
- [8] 陶勇,王红宁,刘书亮. 四川规模化鸡场鸡致病性 *E. coli* 血清型、耐药性和质粒图谱的研究[J]. 中国兽药杂志,2001(4):9-13.
- [9] 彭孝先. 某大型鸡场病原性大肠杆菌优势血清型及其在环境中的分布[D]. 扬州:扬州大学,2002.
- [10] 韩伟,张铁,王春光. 禽致病性大肠杆菌的分离鉴定与耐药性监测[J]. 中国兽医杂志,2007(7):41.
- [11] 杜向党,李新生,秦上尚,等. 鸡源大肠杆菌质粒介导的氟喹诺酮类药物耐药基因 *qnrA* 的分子检测[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(5):28-30.