

研究报告

白羽鸡致病性大肠杆菌、沙门氏菌的分离鉴定及
抗生素耐受性分析

赵泰霞^{1,2}, 周圆圆², 田雯欣², 罗忠宝³, 黄宝钦³, 胥海霞², 华咏诗²,
郑谦波², 陈兰明^{*1}, 范俐^{*2}

1 上海海洋大学食品学院, 上海 201499

2 武夷学院茶与食品学院, 福建 武夷山 354300

3 福建圣农发展股份有限公司, 福建 光泽 354100

赵泰霞, 周圆圆, 田雯欣, 罗忠宝, 黄宝钦, 胥海霞, 华咏诗, 郑谦波, 陈兰明, 范俐. 白羽鸡致病性大肠杆菌、沙门氏菌的分离鉴定及抗生素耐受性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2563-2575.

ZHAO Taixia, ZHOU Yuanyuan, TIAN Wenxin, LUO Zhongbao, HUANG Baoqin, XU Haixia, HUA Yongshi, ZHENG Qianbo, CHEN Lanming, FAN Li. Isolation, identification and antibiotic resistance analysis of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* from white feather broiler[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2563-2575.

摘要:【背景】大肠杆菌、沙门氏菌是肉鸡养殖中的主要致病菌, 可造成巨大的经济损失, 其耐药情况不容忽视。【目的】从病死鸡体内分离致病性大肠杆菌、沙门氏菌并对其进行鉴定, 分析其耐药特性。【方法】常规方法分离纯化目标菌株, 结合生化试验、16S rRNA 基因序列分析、生长曲线验证进行鉴定, 采用纸片扩散法进行药敏试验, 分析其耐药率及多重耐药性。【结果】共分离得到 10 株大肠杆菌和 10 株沙门氏菌(包括 4 株肠道亚种、1 株亚利桑那亚种和 5 株邦戈尔沙门氏菌种); 大肠杆菌仅对碳青霉烯类药物敏感, 对其他类药物耐药性较强; 沙门氏菌对碳青霉烯类药物敏感, 对其他类药物则呈现不同程度的耐药性; 所有分离菌均为多重耐药菌。【结论】分离得到了病原菌并确定了其耐药特性, 为白羽鸡养殖中大肠杆菌、沙门氏菌的防治提供了参考。

关键词: 白羽鸡; 鸡源致病性大肠杆菌; 鸡源致病性沙门氏菌; 分离鉴定; 耐药性

资助项目: 福建省科技厅引导性项目(2021N0034); 南平市资源化学产业科技创新联合资助项目(N2022Z002)

This work was supported by the Guiding Project of the Department of Science and Technology of Fujian Province (2021N0034), and the Nanping Resource Chemical Industry Science and Technology Innovation Joint Funding Project (N2022Z002).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Lanming, lmchen@shou.edu.cn; FAN Li, fanli70@163.com

Received: 2023-11-02; Accepted: 2023-11-24; Published online: 2024-03-28

Isolation, identification and antibiotic resistance analysis of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* from white feather broiler

ZHAO Taixia^{1,2}, ZHOU Yuanyuan², TIAN Wenxin², LUO Zhongbao³, HUANG Baoqin³, XU Haixia², HUA Yongshi², ZHENG Qianbo², CHEN Lanming^{*1}, FAN Li^{*2}

1 College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201499, China

2 College of Tea and Food Science, Wuyi University, Wuyishan 354300, Fujian, China

3 Fujian Sunner Development Company Limited, Guangze 354100, Fujian, China

Abstract: [Background] *Escherichia coli* and *Salmonella* are the main pathogens in broiler breeding, which can cause huge economic losses, and their antibiotic resistance shouldn't be ignored. [Objective] To isolate and identify pathogens from dead chickens, and analyze their antibiotic resistance characteristics. [Methods] The target strains were isolated and purified by conventional method. Biochemical tests, 16S rRNA gene sequence analysis and growth curve verification were used for identification. The drug susceptibility test was carried out by disk diffusion method, and the drug resistance rate and multiple drug resistance were analyzed. [Results] A total of 10 strains of *E. coli* and 10 strains of *Salmonella* were isolated, including 4 *enterica* subspecies, 1 *arizonae* subspecies and 5 *Salmonella bongori*. *E. coli* isolates were only sensitive to carbapenems and resistant to other antibiotics. While *Salmonella* isolates were sensitive to carbapenems and showed different degree of resistance to other antibiotics. All the isolates were multi-drug resistant. [Conclusion] The pathogens were isolated and their antibiotic resistance were determined, which provided reference for the prevention and cure of *E. coli* and *Salmonella* in white feather broiler breeding.

Keywords: white feather broiler; avian pathogenic *Escherichia coli*; avian pathogenic *Salmonella*; isolation and identification; antibiotic resistance

目前,我国肉鸡养殖业的发展趋向于规模化、集约化,且已趋于成熟^[1]。规模化、集约化养殖设备先进、管理高效、料肉比高,然而也存在着饲养密度大、疫病防控难度大等问题^[2-4]。在疫病方面,病毒病依靠良好的疫苗和完善的免疫程序基本得到控制,而细菌病则日趋严重,难以防制^[5],而其中,大肠杆菌病和沙门氏菌病最为常见^[6-7]。

目前,治疗细菌性疾病的主要方式依然是用抗生素类药物,且在畜禽养殖中普遍存在抗生素用量过度的情况,造成细菌耐药性增强,

多重耐药现象日益严重,致使畜禽成为耐药菌的主要储存库^[8],治疗难度增大,对公共卫生安全带来极大压力^[9]。

本研究从福建闽北地区白羽鸡养殖场中分离鉴定致病性大肠杆菌、沙门氏菌,并对其进行抗生素耐受性分析,以期为该类疾病的防治和科学用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品

病料(病死鸡或死胚)于2022年10月份采集

于福建闽北地区白羽鸡种鸡和肉鸡养殖场,临床症状为精神萎靡、羽毛蓬松、下痢,剖检后发现包心包肝、肝脏有白色坏死点、气囊混浊和肠黏膜附有黄色干酪样分泌物;标准菌株 ATCC 25922 和 ATCC 14028 购自青岛海博生物技术有限公司。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

麦康凯、伊红美蓝、SS、LB、MH 培养基和微量生化反应管等,青岛海博生物技术有限公司;PCR 相关试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司;药敏纸片,温州市康泰生物科技有限公司。

恒温培养箱,天宏实验仪器厂;PCR 仪,莫纳生物科技有限公司;电泳仪,上海嘉鹏科技有限公司;Bioscreen 全自动生长曲线分析仪,Oy Growth Curves Ab 公司。

1.3 病原菌的分离纯化

无菌采取病死鸡肝脏、脾脏或鸡胚等病料组织,划线接种于麦康凯、伊红美蓝和 SS 琼脂平板上^[10],37 °C 培养 24 h 后观察菌落特征,挑取疑似菌落于 LB 琼脂平板纯化培养,并进行保种、革兰氏染色后镜检。

1.4 分离菌株的生化鉴定

将待检菌株接种至微量生化反应管中,按说明书进行培养、观察结果,依据《常见细菌系统鉴定手册》^[11]对待检菌株进行鉴定。

1.5 分离菌株 16S rRNA 基因鉴定及系统发育树构建

细菌 DNA 提取试剂盒提取分离株基因组 DNA,以此为模板,用通用引物 27F (5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGG CTACCTTGTTACGACTT-3')进行扩增。PCR 反应体系(20 μL): 2×Taq Master Mix 10 μL, ddH₂O 8 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C

30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

测序结果提交到 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 登录时间: 2023 年 4 月 24 日)进行 BLAST 比对分析,获得各分离株的序列号,以 MEGA X 软件的邻接法(neighbor joining method)构建系统发育树,自举数集 1 000 次^[12]。

1.6 分离菌株生长曲线的测定

将待测菌株接种于 LB 肉汤中,37 °C、180 r/min 培养 12 h,借助酶标仪将菌液 OD₆₀₀ 调至 1.0,菌液和 LB 培养基按照体积比 1:99 吹打混匀,加至 96 孔板中,用 Bioscreen 全自动生长曲线分析仪测定各菌株的生长曲线,温度设置为 37 °C。三次平行重复。

1.7 分离菌株的药物敏感性检测

将待测菌株接种于 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养,传代 3 次,培养至 OD₆₀₀ 为 0.6,置于 4 °C 保存,备用。

采用纸片扩散法(K-B 法)进行药敏试验^[13]。配制 MH 琼脂平板,凝固后,取 100 μL 待测菌悬液均匀涂布,待表面稍干后,将药敏试纸片(6 mm)贴于培养基表面,以大肠杆菌 ATCC 25922 为质控菌株,37 °C 培养 24 h,3 次平行。12 类 21 种抗生素及对大肠杆菌科细菌药敏折点见表 1。结果判定参照美国临床与实验室标准研究所 CLSI-M100-S22 标准^[14-16],分为敏感、中介及耐药。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离结果

本研究从福建闽北地区白羽鸡种鸡和肉鸡养殖场 20 个病料样本中分离到 14 株疑似菌株,分别命名为 R1-R14;从种鸡养殖场 7 个病料样本中分离到 6 株疑似菌株,分别命名为 Z1-Z6。

表 1 药敏试验所用药品及折点标准

Table 1 Drugs used in antimicrobial susceptibility testing and breakpoint standard

药物类别 Drug category	抗菌药物 Antibacterial drug	纸片含药量 Disk content ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	抑菌圈直径折点 Diameter breakpoints of inhibition zone (mm)		
			耐药 Resistant	中介 Intermediary	敏感 Sensitive
青霉素类 Penicillins	氨苄西林 AMP	10	≤ 13	14–16	≥ 17
β -内酰胺类 Beta-lactamines	阿西莫林/棒酸 AMC	20/10	≤ 13	14–17	≥ 18
	氨曲南 ATM	30	≤ 17	18–20	≥ 21
头孢类 Cephalosporins	头孢噻肟 CTX	30	≤ 22	23–25	≥ 26
	头孢吡肟 FEP	30	≤ 14	15–17	≥ 18
	头孢噻吩 FUR	30	≤ 17	18–20	≥ 21
	头孢洛林 CPT	30	< 19	20–22	≥ 23
碳青霉烯类 Carbapenems	美罗培南 MEM	10	≤ 19	20–22	≥ 23
	厄他培南 ETP	10	≤ 18	19–21	≥ 22
氨基糖苷类 Aminoglycosides	庆大霉素 GEN	10	≤ 12	13–14	≥ 15
	丁胺卡那 AMK	30	≤ 14	15–16	≥ 17
四环素类 Tetracyclines	多西环素 DOX	30	≤ 10	11–13	≥ 14
喹诺酮类 Quinolones	左氧氟沙星 LVX	5	≤ 13	14–16	≥ 17
	恩诺沙星 ENR	5	≤ 16	17–22	≥ 23
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 SXT	25	≤ 10	11–15	≥ 16
	磺胺异恶唑 SF	300	≤ 12	13–16	≥ 17
大环内酯类 Macrolides	阿奇霉素 AZM	15	≤ 12	–	≥ 13
	替米考星 TIL	15	≤ 10	11–15	≥ 16
氯霉素类 Chloramphenicols	氯霉素 CHL	30	≤ 12	13–17	≥ 18
酰胺醇类 Amphenicols	氟苯尼考 FFL	30	≤ 14	15–18	≥ 19
多肽类 Polypeptides	多黏菌素 ECS	10	≤ 10	–	≥ 12

–: 无相应判断标准

–: No corresponding criterion.

其中菌株 R1–R5、Z1–Z5 在麦康凯琼脂上呈现典型粉红色、光滑湿润、圆形菌落，直径约为 1.5 mm；在伊红美蓝琼脂上呈现紫黑色，有金属光泽，圆形菌落，直径约为 1 mm；革兰氏染色镜检呈两端钝圆、散在、无芽孢的阴性短杆菌，疑似为大肠杆菌。菌株 R6–R14、Z6 在麦康凯琼脂上呈现灰白色、半透明、圆形菌落，直径约为 1.5 mm；在 SS 琼脂上呈现白色、有或无黑色中心点、半透明、圆形菌落，直径约为 2 mm；革兰氏染色为阴性短杆菌、中等大小、两端钝圆，疑似为沙门氏菌。部分分离菌株的菌落形态及染色结果如图 1 所示。

因此，共从 27 个病料样本中，分离得到 10 株大肠杆菌疑似菌，10 株沙门氏菌疑似菌。

2.2 生化鉴定结果

生化试验结果显示，10 株疑似大肠杆菌葡萄糖、乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、MR 试验、硫化氢、赖氨酸脱羧酶、硝酸盐还原试验均为阳性；枸橼酸、VP 试验、尿素酶试验均为阴性；靛基质试验除 R1、Z5 为阴性外，其他为阳性。

另外，10 株疑似沙门氏菌葡萄糖、甘露醇、ONPG、MR 试验、硫化氢、赖氨酸脱羧酶、硝酸盐还原试验均为阳性；蔗糖、水杨苷、VP 试

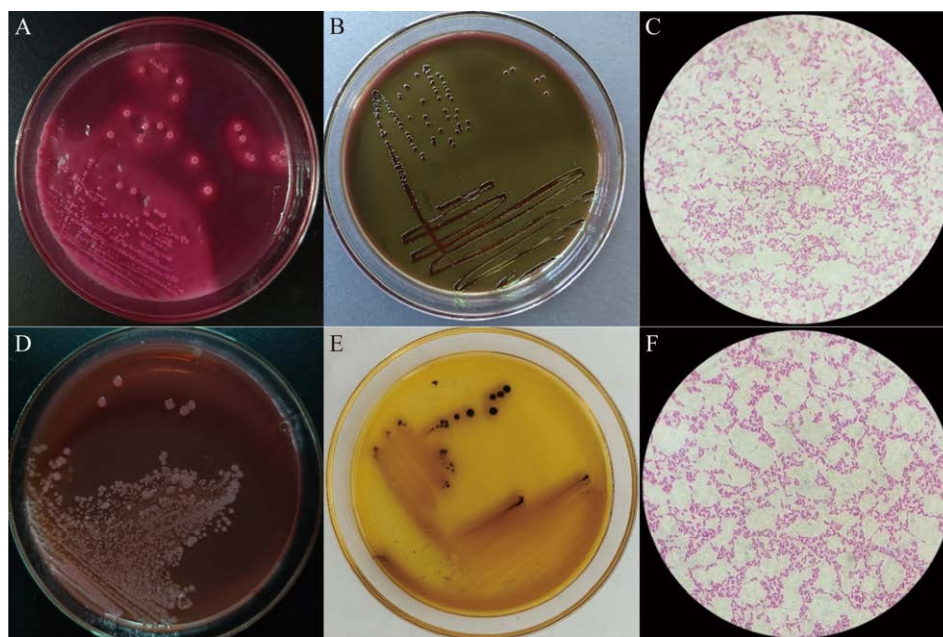


图 1 分离菌在不同琼脂平板上的菌落形态及染色结果 A、D: 麦康凯琼脂平板. B: 伊红美蓝琼脂平板. E: SS 琼脂平板. C、F: 革兰氏染色(1 000×)

Figure 1 Colony morphology and staining results of isolated bacteria in different agar plates. A, D: MacConkey agar. B: EMB agar. E: SS agar. C, F: Gram staining (1 000×).

验、靛基质、尿素酶、氰化钾试验均为阴性;乳糖试验除 R7 为阳性外,其他为阴性;山梨醇试验除 Z6 为阴性外,其他为阳性;丙二酸盐试验除 R6、R13、R14 为阳性外,其他为阴性。

2.3 16S rRNA 基因鉴定结果及系统发育树分析

对分离到的 20 株细菌进行 PCR 鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。扩增条带清晰,大小约为 1 500 bp,与预期目的片段相符,说明所得 PCR 产物纯度可以满足测序要求。

将 20 株菌的 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI,寻找与其相似性最高的菌株,并申请获得各菌株的登录号,结果见表 2。

用 MEGA X 软件中的邻接法对 10 株大肠杆菌和 10 株沙门氏菌分别构建系统发育树,如图 3 所示。

20 株待测菌的 16S rRNA 基因序列同 GenBank

中该属内菌株的 16S rRNA 基因已知序列做比对,确定菌株 R1–R5、Z1–Z5 为大肠杆菌(*Escherichia coli*);菌株 R6–R14、Z6 为沙门氏菌(*Salmonella*),其中菌株 R6、R13、R14、Z6 为肠道沙门氏菌亚种(*Salmonella enterica* subspecies),菌株 R7 为亚利桑那沙门氏菌亚种(*Salmonella arizonae* subspecies),菌株 R8–R12 为邦戈尔沙门氏菌种(*Salmonella bongori*)。

2.4 生长曲线结果

分离菌株的生长曲线如图 4 所示。10 株大肠杆菌与标准株大肠杆菌 ATCC 25922 生长曲线走势一致,差异不显著;0–1 h 为迟缓期,1–9 h 代谢旺盛,为对数期,9 h 后细胞增殖数量与死亡数量趋于平衡,为稳定期。10 株沙门氏菌与标准株沙门氏菌 ATCC 14028 生长曲线走势一致,差异不显著;0–2 h 为迟缓期,2–9 h 为对数期,9 h 后进入稳定期。

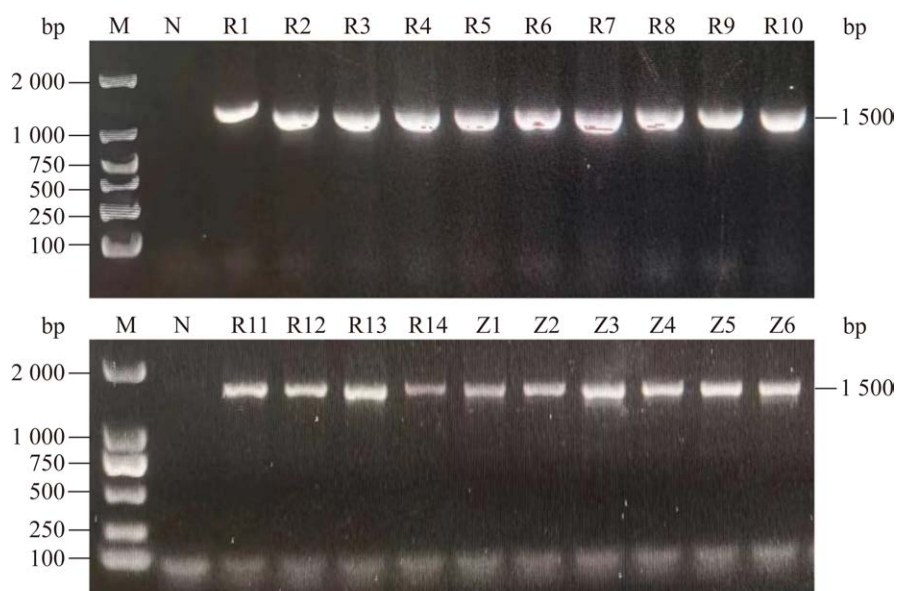


图2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增结果 M: DNA Marker DL2000; N: 阴性对照

Figure 2 Results of 16S rRNA gene amplification. M: DNA Marker DL2000; N: Negative control.

表2 分离菌株的 16S rRNA 基因序列相似性分析

Table 2 16S rRNA gene identity analysis

菌株编号 Strain No.	序列长度 Sequence size (bp)	登录号 Accession number	同源性菌株 Homologous strain	相似性 Identity (%)
R1	1 430	OQ891220	<i>Escherichia coli</i> strain 85-b	99.65
R2	1 412	OQ919470	<i>Escherichia coli</i> strain Gol11	100.00
R3	1 441	OQ891222	<i>Escherichia coli</i> strain N13-2	99.86
R4	1 435	OQ891223	<i>Escherichia coli</i> strain SCU-175	99.90
R5	1 439	OQ891224	<i>Escherichia coli</i> 118-a	99.86
R6	1 434	OQ915457	<i>Salmonella</i> sp. strain <i>Enteritidis</i> _S84_04536	99.72
R7	1 436	OQ915458	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> strain DSM 9386	99.72
R8	1 443	OQ915459	<i>Salmonella bongori</i> strain DSM 13772	100.00
R9	1 451	OQ915460	<i>Salmonella bongori</i> strain VGM7	100.00
R10	1 491	OQ916428	<i>Salmonella bongori</i> strain NCTC	100.00
R11	1 429	OQ916429	<i>Salmonella bongori</i> serovar 66:z41:- str. SA19983605	100.00
R12	1 427	OQ916430	<i>Salmonella bongori</i> strain VGM7	100.00
R13	1 444	OQ915464	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain AD19	100.00
R14	1 443	OQ915465	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> strain ATCC 13076	99.72
Z1	1 430	OQ891225	<i>Escherichia coli</i> strain SCU-102	99.86
Z2	1 388	OQ919469	<i>Escherichia coli</i> strain	100.00
Z3	1 424	OQ891227	<i>Escherichia coli</i> strain CCFM8336	99.93
Z4	1 427	OQ891228	<i>Escherichia coli</i> O78:H4 strain APEC E12049	99.93
Z5	1 400	OQ891229	<i>Escherichia coli</i> strain PNUSAE145743	99.93
Z6	1 430	OQ915456	<i>Salmonella</i> sp. strain <i>Enteritidis</i> _S85_04530	100.00

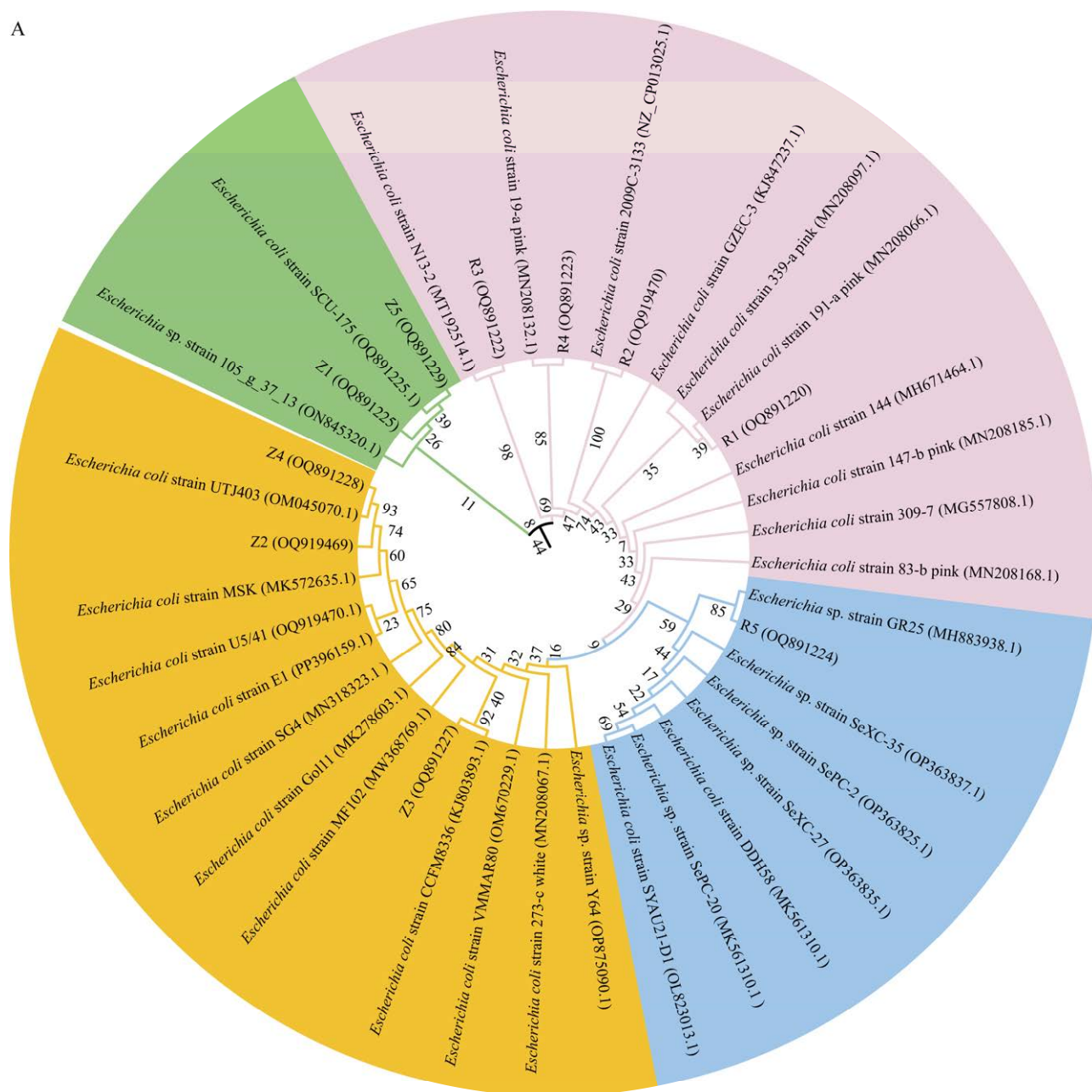
2.5 分离株耐药性结果

图 5 所示为 20 株分离菌对 12 类 21 种常见抗生素的耐药情况。

有 10 株大肠杆菌对青霉素类、头孢类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类、氯霉素类、酰胺醇类、多肽类药物耐药性较强，

其中对 CPT、TIL 耐药率高达 100%，对 DOX、SF、AZM、CHL、CS 耐药率高达 90%，对 AMP、CTX、FUR、SXT 耐药率达 80%，对 ENR、FFC 耐药率达 70%，对 FEP、LVX 耐药率达 60%；对 β -内酰胺类两种药物呈现不同的耐药特性，其中对 AMC 耐药率仅为 20%，而对 ATM 耐药

A



Tree scale: 0.01

B

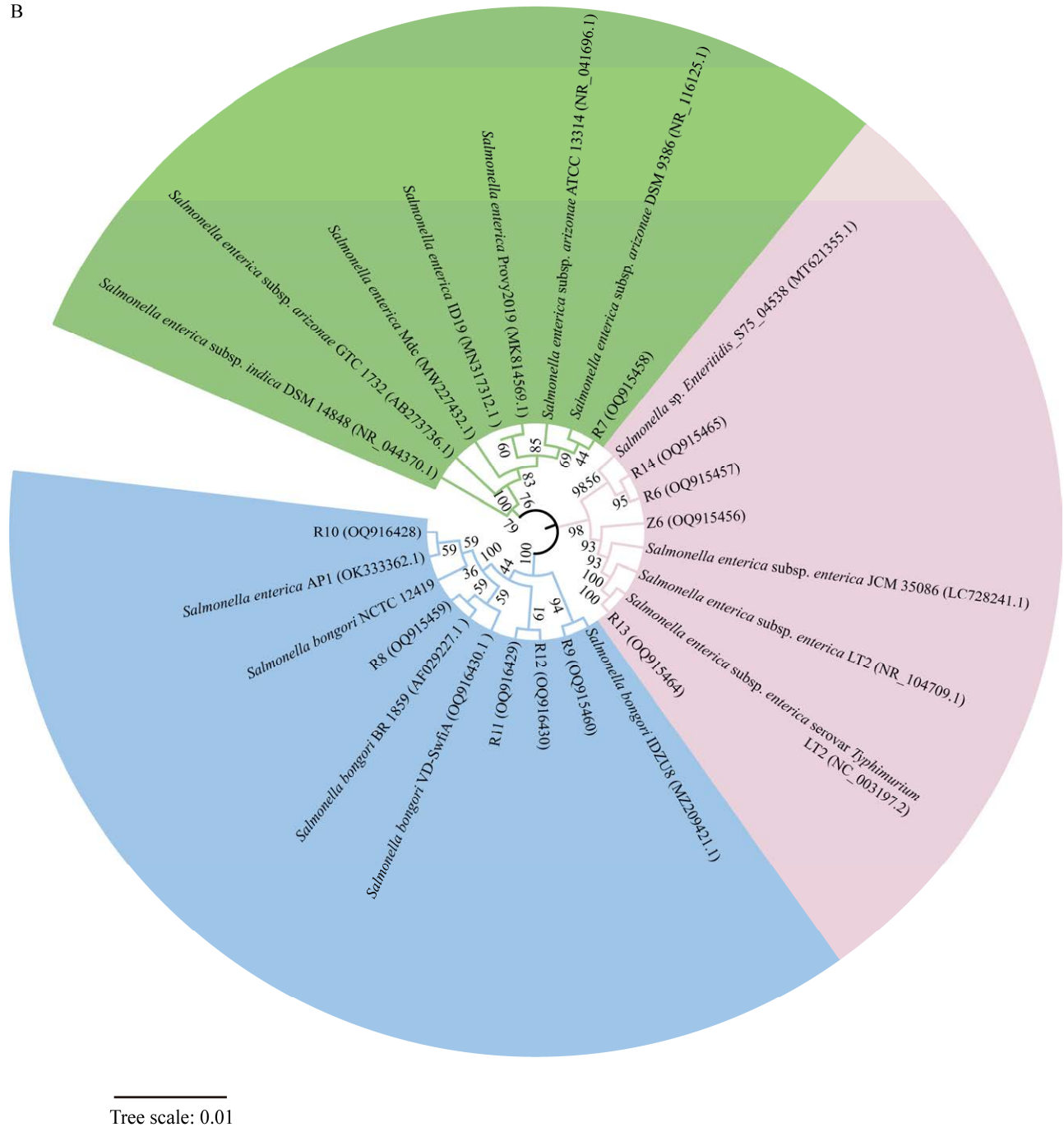


图 3 基于大肠杆菌(A)和沙门氏菌(B) 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号; 分支点数值为自展值; 比例尺表示遗传距离

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of *Escherichia coli* (A) and *Salmonella* (B). Sequences in parentheses are GenBank accession numbers. Numbers at the branch points indicate the bootstrap values. Tree scale represents the genetic distance.

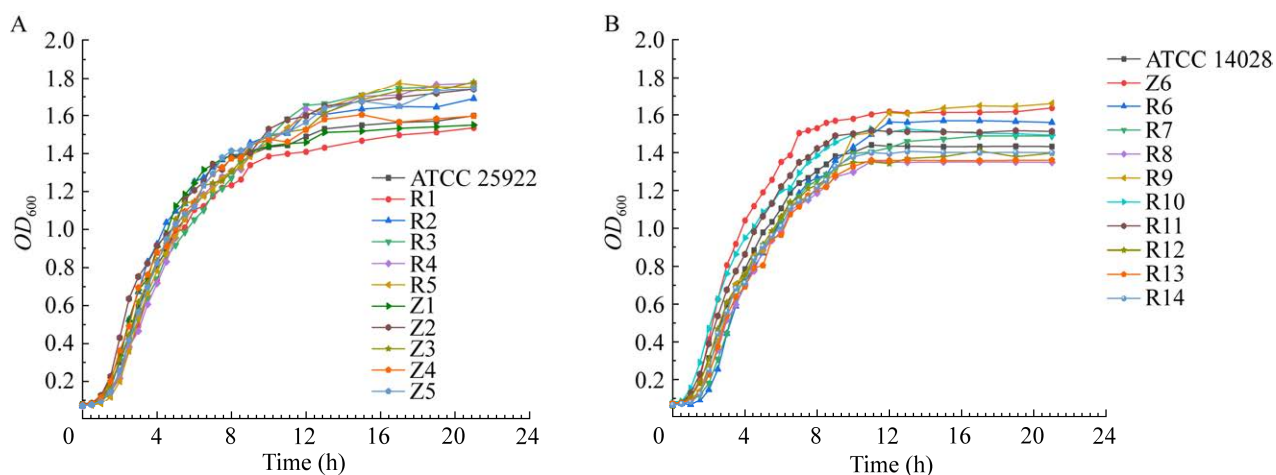


图4 分离出的大肠杆菌(A)和沙门氏菌(B)的生长曲线

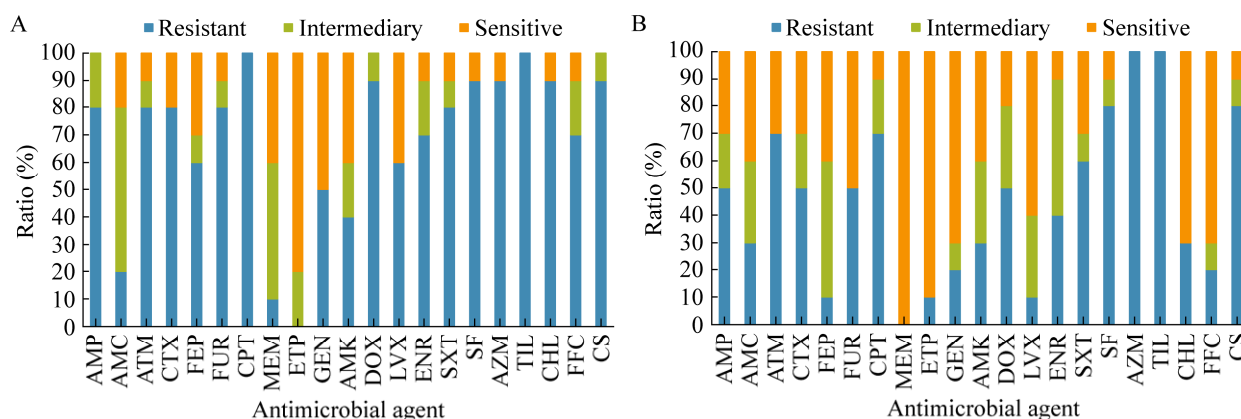
Figure 4 Growth curves of isolated *Escherichia coli* (A) and *Salmonella* (B).

图5 分离出的大肠杆菌(A)和沙门氏菌(B)对 21 种抗生素的耐药率

Figure 5 Resistance rates of isolated *Escherichia coli* (A) and *Salmonella* (B) to 21 antibiotics.

率则高达 80%；对氨基糖苷类药物中度耐药，其中对 GEN 耐药率为 50%，对 AMK 耐药率为 40%；对碳青霉烯类药物非常敏感，其中对 MEM 90%不耐药，对 ETP 则 100%不耐药。

有 10 株沙门氏菌对磺胺类、大环内酯类、多肽类药物耐药性较强，其中对大环内酯类两种药物 AZM 和 TIL 耐药率皆高达 100%，对 SF、CS 耐药率达 80%，对 SXT 耐药率达 60%；对 β -内酰胺类和头孢类药物呈现不同的耐药特性，其中

对 AMC 耐药率仅为 30%，而对 ATM 耐药率则高达 70%，对 FEP 耐药率仅为 10%，对 CTX、FUR 耐药率为 50%，而对 CPT 耐药率则高达 70%；对青霉素类、氨基糖苷类、四环素类、喹诺酮类、氯霉素类、酰胺醇类药物中度耐药，其中对 AMP、DOX 耐药率为 50%，对 ENR 耐药率为 40%，对 AMK、CHL 耐药率为 30%，对 GEN、FFC 耐药率为 20%；对碳青霉烯类药物非常敏感，其中对 ETP 90%不耐药，对 MEM 则 100%不耐药。

2.6 分离株多重耐药性分析

当一种细菌对 3 类及以上的抗菌药物表现出耐受时,被称为多重耐药(multi-drug resistance, MDR)菌^[17]。如表 3 所示,所有分离菌株均为多重耐药菌。

有 10 株大肠杆菌至少为 7 重耐药,而 10 重耐药菌有 2 株,11 重耐药菌则有 4 株,其中 R3 表现为对 21 种抗菌药物中的 18 种耐药,R1 则对 19 种抗菌药物耐药。

有 10 株沙门氏菌至少为 4 重耐药,而 9 重耐药菌有 1 株,10 重耐药菌则有 2 株,其中 R13、Z6 表现为对 21 种抗菌药物中的 13 种耐药,R10 则对 15 种抗菌药物耐药。

3 讨论与结论

禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 是一种典型的肠道外致病性大肠杆菌 (extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)^[18], 可导致禽类肠道外局部或全身性感染, 如气囊炎、肝周炎、心包炎、脑膜炎、关节炎等^[19]。该病发病率高, 病鸡死亡率高, 造成巨大的经济损失^[20]。沙门氏菌 (*Salmonella*) 引起禽类急性或慢性传染病, 可以同时进行水平传播和垂直传播, 其中肠炎沙门氏菌、伤寒沙门氏菌是人畜共患病原菌, 严重威胁人类健康^[21-22]。

表 3 分离菌株耐药谱

Table 3 The drug resistance spectrum of isolates

菌株 Strain	耐药谱 Drug resistance spectrum	耐药种数 Number of resistant species (species)	耐药重数 Number of multidrug resistance (multiples)
R1	AMP/AMC/ATM/CTX/FEP/FUR/CPT/GEN/AMK/DOX/LVX/ENR/SXT/SF/AZM/TIL/CHL/FFC/CS	19	11
R2	AMP/ATM/CTX/FEP/FUR/CPT/GEN/DOX/ENR/SXT/SF/AZM/TIL/CHL/FFC/CS	16	11
R3	AMP/ATM/CTX/FEP/FUR/CPT/GEN/AMK/DOX/LVX/ENR/SXT/SF/AZM/TIL/CHL/FFC/CS	18	11
R4	ATM/CTX/FEP/CPT/DOX/LVX/ENR/SXT/SF/AZM/TIL/CHL/CS	13	8
R5	AMP/ATM/CTX/FEP/FUR/CPT/GEN/SF/AZM/TIL/CHL/FFC/CS	13	9
Z1	AMP/AMC/CTX/FUR/CPT/DOX/SF/AZM/TIL/CS	10	7
Z2	AMP/ATM/CTX/FUR/CPT/AMK/DOX/LVX/SXT/SF/AZM/TIL/CHL/CS	14	10
Z3	AMP/CPT/DOX/ENR/SXT/SF/AZM/TIL/CHL/FFC	10	8
Z4	ATM/FUR/CPT/MEM/GEN/AMK/DOX/LVX/ENR/SXT/TIL/CHL/FFC/CS	14	11
Z5	AMP/ATM/CTX/FEP/FUR/CPT/DOX/LVX/ENR/SXT/SF/AZM/TIL/CHL/FFC/CS	16	10
R6	AMP/ATM/CTX/FUR/CPT/SXT/SF/AZM/TIL	9	5
R7	ATM/SF/AZM/TIL/CHL/CS	6	5
R8	ATM/SXT/SF/AZM/TIL/CS	6	4
R9	DOX/SF/AZM/TIL/CS	5	4
R10	AMP/CTX/FUR/CPT/GEN/AMK/DOX/ENR/SXT/SF/AZM/TIL/CHL/FFC/CS	15	10
R11	AMP/AMC/CPT/ENR/AZM/TIL	6	5
R12	ATM/CTX/FUR/CPT/DOX/ENR/SXT/SF/AZM/TIL/CS	11	7
R13	AMP/AMC/ATM/CPT/ETP/GEN/DOX/LVX/ENR/SF/AZM/TIL/CS	13	10
R14	AMP/AMC/ATM/CTX/FUR/CPT/AMK/SXT/SF/AZM/TIL/CS	12	7
Z6	ATM/CTX/FEP/FUR/CPT/AMK/DOX/SXT/AZM/TIL/CHL/FFC/CS	13	9

本研究从福建闽北地区白羽鸡肉鸡和种鸡养殖场共 27 个病料中分离到 20 株病原菌。分别对其进行形态学观察、生化鉴定及 16S rRNA 基因鉴定,确定 R1–R5、Z1–Z5 这 10 株菌为大肠杆菌;R6–R14、Z6 这 10 株菌为沙门氏菌,其中 R6、R13、R14、Z6 为肠道沙门氏菌亚种,R7 为亚利桑那沙门氏菌亚种,R8–R12 为邦戈尔沙门氏菌种。生长曲线进一步验证了各菌株与标准株生长曲线走势一致,符合大肠杆菌或沙门氏菌的生长规律。

沙门氏菌属分类比较复杂,分类也有不同意见。按照经典表面抗原和抗体可分为 2 600 多个血清型,后根据遗传相关性分为 7 个亚种(I、II、IIIa、IIIb、IV、V 和 VI),后通过 DNA 杂交和多位点酶电泳(multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)的进一步评估,将亚种 V 提升为一个独立的物种,即目前分类学支持该属中存在两个物种:肠道沙门氏菌种(*S. enterica*)和邦戈尔沙门氏菌种(*S. bongori*)。前者又包括 6 个亚种,分别是 I 型肠道亚种(*enterica*)、II 型萨拉姆亚种(*salamae*)、IIIa 型亚利桑那亚种(*arizonae*)、IIIb 型双相亚利桑那亚种(*diarizonae*)、VI 型英迪加亚种(*indica*)和 IV 型豪顿亚种(*houtenae*)^[23]。肠道沙门氏菌亚种和亚利桑那沙门氏菌亚种是禽类常见的致病性沙门氏菌,在全球范围内均常见暴发案例^[24–26];然而,由于特殊的进化关系,邦戈尔沙门氏菌种主要感染如蜥蜴、青蛙等冷血动物^[27–28],感染禽类、人等温血动物的情况比较少见,但是也有例外。例如, Foti 等^[29]从意大利南部地区分离出感染儿童及候鸟的邦戈尔沙门氏菌 48:z(35); Stevens 等^[30]则从一名患儿粪便中分离出一株致腹泻的邦戈尔沙门氏菌 N19-781。本课题组后续将进一步研究分离到的 5 株邦戈尔沙门氏菌,以探索其来源和致病机制。

本研究对分离到的病原菌进行药敏试验,发现大肠杆菌对大多数抗生素表现出较强的耐药性,仅对碳青霉烯类药物非常敏感,沙门氏菌的耐药情况稍好一点,对碳青霉烯类药物非常敏感,对其他类抗生素则呈现不同程度的耐药性。所有分离菌株都是多重耐药菌,沙门氏菌至少为 4 重耐药,而大肠杆菌则至少为 7 重耐药,更有甚者,有 2 株沙门氏菌为 10 重耐药,4 株大肠杆菌为 11 重耐药。这与白羽鸡养殖场抗生素过量使用有密切关系。

针对养殖业抗生素滥用的问题,欧盟、日本等全面禁止抗生素在畜禽饲料行业中的使用后效果显著^[31]; Oliveira 等^[32]研究葡萄牙 2009–2018 年肉鸡禽致病性大肠杆菌(APEC)耐药性的变化趋势,发现随着时间的推移, APEC 的耐药性显著性降低,多重耐药菌的比例也从 48%下降到 2%; Harada 等^[33]发现,在日本养殖动物中,大肠杆菌分离株的耐药率随抗生素的使用量呈比例增加;我国农业农村部发布“禁抗令”:自 2020 年 7 月 1 日起,饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂(中草药除外)的商品饲料。因此,减少抗生素的使用,探索开发“替抗”产品,是目前的重要研究方向。

REFERENCES

- [1] AG. 2022 我国肉鸡养殖行业现状、发展趋势及龙头股分析 [DB/OL]. 2022-08-30. <https://www.sgpjbg.com/info/39162.html>.
AG. Current situation, development trend and leading stock analysis of broiler breeding industry in China in 2022[DB/OL]. 2022-08-30. <https://www.sgpjbg.com/info/39162.html> (in Chinese).
- [2] 程浩, 张晓林, 徐全礼, 周锡中, 杨长芬. 公司型、专业户型及农户型养禽场的利弊分析[J]. 中国家禽, 2005, 27(17): 22–24.
CHENG H, ZHANG XL, XU QL, ZHOU XZ, YANG CF. Advantages and disadvantages analysis of company-type, professional-type and farmer-type poultry farms[J]. China Poultry, 2005, 27(17): 22–24 (in Chinese).

- [3] 耿爱莲, 李保明, 赵芙蓉, 陈刚. 集约化养殖生产系统下肉种鸡健康与福利状况的调查研究[J]. 中国家禽, 2009, 31(9): 10-15.
GENG AL, LI BM, ZHAO FR, CHEN G. Investigation and study of broiler breeders' health and welfare under intensive production systems[J]. China Poultry, 2009, 31(9): 10-15 (in Chinese).
- [4] JEŽAK K, KOZAJDA A. Occurrence and spread of antibiotic-resistant bacteria on animal farms and in their vicinity in Poland and Ukraine: review[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 29(7): 9533-9559.
- [5] 王傲雪, 张凌云, 张桢潮, 李昆鹏, 张秀丽, 梁晚枫, 张林波. 肉鸡沙门氏菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(7): 167-171.
WANG AX, ZHANG LY, ZHANG AC, LI KP, ZHANG XL, LIANG WF, ZHANG LB. Isolation, identification and drug sensitive assay of *Salmonella* from broiler[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 40(7): 167-171 (in Chinese).
- [6] LUTFUL KABIR SM. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010, 7(1): 89-114.
- [7] TAN MF, LI HQ, YANG Q, ZHANG FF, TAN J, ZENG YB, WEI QP, HUANG JN, WU CC, LI N, KANG ZF. Prevalence and antimicrobial resistance profile of bacterial pathogens isolated from poultry in Jiangxi Province, China from 2020 to 2022[J]. Poultry Science, 2023, 102(8): 102830.
- [8] 姬书会, 郭世栋, 苏玉贤. 鸡源沙门菌的分离鉴定、血清分型和耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(6): 52-56, 61.
JI SH, GUO SD, SU YX. Isolation, identification, serotyping and drug resistance analysis of *Salmonella* from chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58(6): 52-56, 61 (in Chinese).
- [9] HUSSAIN HI, IQBAL Z, IQBAL M, KUANG XH, WANG YL, YANG LQ, IHSAN A, AQIB AI, KALEEM QM, GU YF, HAO HH. Coexistence of virulence and β -lactamase genes in avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 163: 105389.
- [10] GELETU US, USMAEL MA, IBRAHIM AM. Isolation, identification, and susceptibility profile of *E. coli*, *Salmonella*, and *S. aureus* in dairy farm and their public health implication in central Ethiopia[J]. Veterinary Medicine International, 2022, 2022: 1887977.
- [11] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
CAI MY, DONG XZ. Handbook for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [12] OBAID SALEH R, HUSSEIN RAHEEMA R, JAMEEL ZJ. Phylogenetic tree and submission of *Staphylococcus aureus* isolate from skin infection[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2018, 12(4): 2199-2204.
- [13] CLSI. Document M02-A11[S]. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard-eleventh edition.
- [14] CLSI. Document M100-S22[S]. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement.
- [15] 刘燕龙. 秦皇岛地区貉肠炎致病菌的流行情况调查及耐药性分析[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院硕士学位论文, 2021.
LIU YL. Epidemiological investigation and drug resistance analysis of pathogenic bacteria of raccoon dog enteritis in Qinhuangdao area[D]. Qinhuangdao: Master's Thesis of Hebei Normal University of Science & Technology, 2021 (in Chinese).
- [16] 孙起荣. 猪源 ExPEC 耐药性分析及耐药基因和I类整合子检测[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2022.
SUN QR. Analysis of drug resistance and detection of drug resistance gene and class I integron in porcine ExPEC[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [17] YASIN A, BEGUM MK, ESHIK MME, PUNOM NJ, AHMED S, RAHMAN MS. Molecular identification and antibiotic resistance patterns of diverse bacteria associated with shrimp PL nurseries of Bangladesh: suspecting *Acinetobacter venetianus* as future threat[J]. Peer J, 2022, 10: e12808.
- [18] da ROCHA DT, de OLIVEIRA SALLE F, BORGES KA, FURIAN TQ, DO NASCIMENTO VP, de SOUZA MORAES HL, SALLE CTP. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): characterization and comparison[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2021, 15(7): 962-971.
- [19] TANG ZH, TANG N, WANG XW, REN HY, ZHANG C, ZOU L, HAN L, GUO LZ, LIU WH. Characterization of a lytic *Escherichia coli* phage CE1 and its potential use in therapy against avian pathogenic *Escherichia coli* infections[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1091442.

- [20] USMAN M, RASOOL MH, KHURSHID M, ASLAM B, BALOCH Z. Co-occurrence of *mcr-1* and *carbapenem* resistance in avian pathogenic *E. coli* serogroup O78 ST95 from colibacillosis-infected broiler chickens[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(5): 812.
- [21] RAUT R, MAHARJAN P, FOULADKHAH AC. Practical preventive considerations for reducing the public health burden of poultry-related salmonellosis[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2023, 20(17): 6654.
- [22] 信素华, 陶程琳, 张耀东, 王瑶, 李妍, 易正飞, 田明星, 李涛, 祁晶晶, 丁铲, 高崧, 王少辉, 于圣青. 广西地区鸡胚中沙门菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2022, 30(3): 64-70.
- XIN SH, TAO CL, ZHANG YD, WANG Y, LI Y, YI ZF, TIAN MX, LI T, QI JJ, DING C, GAO S, WANG SH, YU SQ. Isolation, identification and drug resistance of *Salmonella* strains isolated from dead chicken embryos in Guangxi[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2022, 30(3): 64-70 (in Chinese).
- [23] COBO-SIMÓN M, HART R, OCHMAN H. Gene flow and species boundaries of the genus *Salmonella*[J]. *mSystems*, 2023, 8(4): e0029223.
- [24] 蔡葵蒸, 郭文瑞, 赵正峰, 王瑞, 梁小军, 郝成. 家鸽亚利桑那沙门氏菌病的诊断和防治[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(2): 55-56.
- CAI KZ, GUO WR, ZHAO ZF, WANG R, LIANG XJ, HAO C. Diagnosis and control of *Salmonella* Arizona in pigeons[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 43(2): 55-56 (in Chinese).
- [25] BENAHMED F, WANG H, BEAUBRUN JJG, GOPINATH GR, CHENG CM, HANES DE, HAMMACK TS, RASMUSSEN M, DAVIDSON MK. Detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Cubana from naturally contaminated chick feed[J]. *Journal of Food Protection*, 2017, 80(11): 1815-1820.
- [26] LAMAS A, FERNANDEZ-NO IC, MIRANDA JM, VÁZQUEZ B, CEPEDA A, FRANCO CM. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from northwestern Spanish broiler flocks (2011–2015)[J]. *Poultry Science*, 2016, 95(9): 2097-2105.
- [27] HERRERA-LEÓN S, SACO M, SILVESTRE AM, SILVEIRA L, ECHEITA A, USERA MA. Molecular characterization of a new serovar of *Salmonella bongori* 13, 22:z39:- isolated from a lizard[J]. *Research in Microbiology*, 2005, 156(4): 597-602.
- [28] FOOKES M, SCHROEDER GN, LANGRIDGE GC, BLONDEL CJ, MAMMINA C, CONNOR TR, SETH-SMITH H, VERNIKOS GS, ROBINSON KS, SANDERS M, PETTY NK, KINGSLEY RA, BÄUMLER AJ, NUCCIO SP, CONTRERAS I, SANTIVIAGO CA, MASKELL D, BARROW P, HUMPHREY T, NASTASI A, et al. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *Salmonellae*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(8): e1002191.
- [29] FOTI M, DAIDONE A, ALEO A, PIZZIMENTI A, GIACOPELLO C, MAMMINA C. *Salmonella bongori* 48:z35:- in migratory birds, Italy[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(3): 502-503.
- [30] STEVENS MJA, CERNELA N, MÜLLER A, STEPHAN R, BLOEMBERG G, STEWART FJ. Draft genome sequence of *Salmonella bongori* N19-781, a clinical strain from a patient with diarrhea[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(29): e00691-19.
- [31] 王蕾蕾, 许金新. 饲料“禁抗令”施行后养殖业面临的挑战及对策[J]. *中国动物保健*, 2021, 23(9): 3, 5.
- WANG LL, XU JX. Challenges and countermeasures faced by aquaculture after the implementation of feed “anti-resistance order”[J]. *China Animal Health*, 2021, 23(9): 3, 5 (in Chinese).
- [32] OLIVEIRA JM, CARDOSO MF, MOREIRA FA, MÜLLER A. Phenotypic antimicrobial resistance (AMR) of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler breeder flocks between 2009 and 2018[J]. *Avian Pathology*, 2022, 51(4): 388-394.
- [33] HARADA K, ASAI T. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan[J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 2010: 180682.