



研究报告

云南蛋鸡源肠炎沙门氏菌的分离鉴定及生物学特性

李廷翠^{Δ1,2} 严红亚^{Δ1} 常志顺¹ 李珂¹ 覃袖伟¹ 赵蓉¹ 信爱国^{*1}

1 云南省畜牧兽医科学院 云南 昆明 650224

2 云南农业大学动物医学院 云南 昆明 650201

摘要:【背景】肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)是一种重要的人畜共患病原菌,禽类的肉制品及蛋类是其重要的传播途径。【目的】确诊云南某蛋鸡场疑似沙门氏菌感染病原情况。【方法】无菌采集发病蛋鸡肝脏组织进行细菌分离培养鉴定,对获得的菌株进行耐药性分析、致病性实验及毒力基因的检测。【结果】鉴定该分离菌为肠炎沙门氏菌,其抗原结构式为:O 抗原 1(+),9(+),12(+),H 抗原 gm(+),[1,7](+),将其命名为 SSYN001 株。药敏实验表明,该菌株对青霉素、复方新诺明、强力霉素和四环素 4 种药物耐药,对阿莫西林、氨苄西林、庆大霉素、妥布霉素和头孢他啶等 8 种抗菌药物敏感;耐药基因检测发现,该菌株含有四环素类耐药基因 *tetA*;动物致病性试验显示,该菌对雏鸡、产蛋鸡及小鼠的致死率分别为 40%、80%和 100%;该菌检测出 *spvB*、*spiA*、*pagC*、*msgA*、*invA*、*sipB*、*prgH*、*spaN*、*tolC*、*iroN*、*sitC*、*lpfC*、*sifA*、*sopB* 和 *orgA* 这 15 种毒力基因。【结论】对云南蛋鸡源肠炎沙门氏菌的致病性和菌株提供了新的生物学信息数据,对食源性人畜共患沙门氏菌的检测具有重要的公共卫生学意义。

关键词:蛋鸡,肠炎沙门氏菌,分离鉴定,生物学特性

Isolation, identification and characterization of *Salmonella enteritidis* from Yunnan laying hensLI Tingcui^{Δ1,2} YAN Hongya^{Δ1} CHANG Zhishun¹ LI Ke¹ QIN Xiuwei¹
ZHAO Rong¹ XIN Aiguo^{*1}

1 Yunnan Animal Science and Veterinary Institute, Kunming, Yunnan 650224, China

2 College of Animal Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China

Abstract: [Background] *Salmonella enteritidis* is an important zoonotic pathogenic bacterium that is transmitted essentially by poultry meat products and eggs. [Objective] In order to confirm pathogen information in a breeder farm where the poultry was suspected to be infected by *Salmonella* in Yunnan

Foundation items: Ten Thousand Talent Program in Yunnan Province (YNWR-CYJS-2018-047); Applied Basic Research Project of Yunnan Province Science and Technology Department (2017FD057)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-871-65017572; E-mail: aiguo_xin@hotmail.com

Received: 01-04-2020; Accepted: 07-05-2020; Published online: 12-08-2020

基金项目: 云南省“万人计划”产业技术领军人才专项(YNWR-CYJS-2018-047); 云南省科技厅应用基础研究计划(2017FD057)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 0871-65017572; E-mail: aiguo_xin@hotmail.com

收稿日期: 2020-04-01; 接受日期: 2020-05-07; 网络首发日期: 2020-08-12

province. **[Methods]** We collected liver tissues from infected chicken in sterile environment to isolate and culture bacteria, then performed drug sensitive test and pathogenicity test, as well as identification of virulence genes for obtained strain. **[Results]** The isolated bacterium was identified to be *Salmonella enteritidis* and named SSYN001. Its antigen structural formula consists of the O antigen 1(+), 9(+), 12(+), H antigen gm(+) and [1,7](+). Drug resistance assay suggests that this strain was resistant to penicillin, bactrim, doxycycline and tetracycline, but sensitive to 8 antibiotics, include amoxicillin, ampicillin, gentamicin, tobramycin and ceftazidime. By detecting its resistance gene, we found that the strain contains *tetA*, a tetracycline resistance gene. The pathogenicity test shows the lethality of this strain for chicks, layer chicken and mice was 40%, 80% and 100%, respectively; eventually, we found this bacterium has 15 virulence genes consisted of *spvB*, *spiA*, *pagC*, *msgA*, *invA*, *sipB*, *prgH*, *spaN*, *tolC*, *iroN*, *sitC*, *lpfC*, *sifA*, *sopB* and *orgA*. **[Conclusion]** The present study provides new data of the pathogenicity of laying hen's *Salmonella enteritidis* in Yunnan province, with implication for public health on detection of foodborne zoonotic *Salmonella*.

Keywords: laying hens, *Salmonella enteritis*, separation and identification, biological characteristics

沙门氏菌属(*Salmonella*)包括肠道沙门氏菌 [*Salmonella enterica*, 又称为猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*)] 和邦戈尔沙门氏菌属 (*Salmonella bongori*) 2 个种^[1]。沙门氏菌属肠杆菌科, 是一种很常见的革兰氏阴性杆菌^[2]。沙门氏菌在环境中广泛分布, 动物的肠道是该菌的主要栖息地。沙门氏菌通常存在于家禽中, 所以家禽肉制品和蛋类一直是食源性疾病的重要媒介。有研究表明, 世界上 20% 的家禽产品受到沙门氏菌的污染, 其可以通过生物膜的形成在动物和人类的环境和设施中长期存在^[3]。沙门氏菌的传播方式有水平传播和垂直传播, 是一种严重危害人类健康及养殖业发展的人畜共患病。在多数由食用家禽产品引起的沙门氏菌病暴发中, 已经分离出肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌这两种血清型^[4]。

肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)是一种典型的食源性致病菌, 具有侵袭性, 普遍存在于世界范围内的各个地区。丁孟建等对重庆某肉鸡场的病原菌进行分离鉴定, 分离出 26 株肠炎沙门氏菌^[5]; 李晨等对贵州省 5 个地区 7 个规模化养猪场的 128 份腹泻仔猪肠道样本进行细菌分离鉴定, 结果显示肠炎沙门氏菌为优势血清型之一^[6]; 吴洁等采集深圳市龙岗区感染性腹泻病人的样本进行病原分离鉴定, 结果表明深圳市龙岗区腹泻病例主要由沙门菌感染引起, 肠炎沙门菌为常见的病原

菌^[7]。这些报道说明国内的畜禽和人群中均存在肠炎沙门氏菌的流行, 而且为优势血清型之一。本研究对云南某蛋鸡场送检的以败血症为主要特征的病死鸡进行病原菌分离培养, 经革兰氏染色镜检、生化试验、沙门氏菌血清型鉴定、16S rRNA 基因序列测定和相似性分析鉴定分离菌株, 并进一步对分离菌株进行了药敏试验、耐药基因检测以及对不同动物的致病性研究和毒力基因的检测, 以为鸡肠炎沙门氏菌的诊断检测和防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源及实验动物

2018 年 8 月, 云南某蛋鸡场饲养的 1 万羽 220 日龄左右的褐壳蛋鸡陆续发病并出现死亡, 伴随产蛋量下降, 日死亡率达 1.0%–1.2%。病(死)鸡样品送至我院进行临床剖检及实验室确诊。健康的 7 日龄和 200 日龄海兰灰蛋鸡由云南畜牧兽医科学院养禽与禽病所提供。成年小鼠购自昆明医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂、仪器及培养基

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR MasterMix, 天根生化科技(北京)有限公司; 沙门氏菌属诊断血清 60 种, 宁波天润生物药业有限公司; 革兰氏染液、沙门氏菌生化鉴定管, 广东环凯

微生物科技有限公司; 抗生素药敏纸片, 杭州天和微生物试剂有限公司。PCR 扩增仪, Applied Biosystems 公司; 凝胶成像紫外仪, Tanon 天能公司; 超净工作台, 广州市深华生物技术有限公司; 电泳仪, 北京六一生物技术有限公司。普通琼脂、麦康凯琼脂、MH 琼脂、SS 琼脂、三糖铁琼脂培养基, 北京奥博星生物技术有限公司。

1.3 细菌分离培养

无菌挑取病(死)鸡肝脏病料, 划线接种于普通琼脂平板, 37 °C 培养 24 h; 挑取单个典型菌落转接麦康凯琼脂平板进行纯培养, 37 °C 培养 24 h; 挑取纯培养菌落划线接种于 SS 琼脂平板, 37 °C 培养 24 h; 在麦康凯琼脂和 SS 琼脂平板上呈现半透明的圆整菌落再接种到三糖铁琼脂平板, 37 °C 培养 24 h, 将纯化好的细菌保种并进行细菌染色镜检。

1.4 生化试验

将分离纯化的分离菌分别接种于三糖铁斜面培养基、硫化氢 H₂S、赖氨酸脱羧酶、甘露醇、山梨醇、靛基质、尿素、氰化钾和 β-半乳糖苷等沙门氏菌微量生化反应管, 37 °C 培养 18–24 h, 观察并记录。

1.5 血清型鉴定

按沙门氏菌属诊断血清试剂盒使用说明, 采用玻片凝集法进行鉴定。于洁净玻片上滴加沙门氏菌标准血清, 将菌苔加入少量灭菌生理盐水制成浓菌液, 取少量菌液与血清混合均匀, 2 min 内判断结果, 同时用生理盐水设置阴性对照。

1.6 细菌 16S rRNA 基因分析

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 提取分离菌基因组 DNA。采用赵鹤庭等扩增细菌 16S rRNA 基因鉴定细菌种属分类的方法及引物^[8](表 1)。PCR 反应体系(25 μL): 2×*Taq* PCR MasterMix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL, 上游引物(10 μmol/L) 1 μL, 下游引物(10 μmol/L) 1 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件: 93 °C 3 min; 93 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 进行 35 个循

表 1 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因的引物

Table 1 PCR primers for amplifying 16S rRNA gene of bacteria

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	目的片段大小 Size (bp)
16S-27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	500
16S-519R	GWATTACCGCGGCKGCTG	
16S-357F	CTCCTACGGGAGGCAGCAG	750
16S-1115R	AGGGTTGCGCTCGTTGC	
16S-926F	AAACTYAAAKGAATTGACGG	560
16S-1492R	TACGGCTACCTTACGACTT	

环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。表 1 中所有引物的 PCR 反应体系和反应条件相同。将分离菌株的 16S rRNA 基因分成首尾重叠的 3 个片段进行扩增, PCR 产物纯化后用相应的扩增引物进行双向测序, 结果采用 Vector NTI 软件拼接, 得到大约 1 450 bp 的细菌 16S rRNA 基因序列。所得序列提交 GenBank 进行 BLAST 比对, 确定细菌的种属分类。利用 MEGA 6.0 软件构建分离菌进化树。引物合成及 PCR 产物测序由昆明硕擎生物有限公司完成。

1.7 药敏试验

用 K-B 纸片扩散法测定分离菌株的药物敏感性, 选取临床常用的复方新诺明、阿莫西林等 12 种药物, 用灭菌棉签拭取新鲜的细菌悬液涂布 MH 琼脂平板, 将药敏纸片均匀贴于培养基表面, 37 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈, 依照美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (<https://www.techstreet.com/publishers/clsi>) 制定的药敏标准判定细菌对不同药物的敏感性。

1.8 耐药基因检测

选取 10 种抗生素耐药基因, 分别为: 磺胺类耐药基因 *sul1*、*sul2*、*sul3*, β-内酰胺类耐药基因 *bla_{PSE1}*、*bla_{TEM}*, 四环素类耐药基因 *tetA*、*tetB*, 氨基糖苷类耐药基因 *aadA1*、*aadA2*、*aadB*。耐药基因的引物序列参考文献[9–12] (表 2)。PCR 反应体系(25 μL): 2×*Taq* PCR MasterMix 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL, 上游引物(10 μmol/L) 0.5 μL, 下

表 2 耐药基因引物信息

Table 2 Primers of resistance genes

耐药基因	引物名称	引物序列	目的片段大小	参考文献
Resistance gene	Primers name	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)	References
<i>sul1</i>	sul1-F	CGGACGCGAGGCCTGTATC	591	[9]
	sul1-R	GGGTGCGGACGTAGTCAGC		
<i>sul2</i>	sul2-F	GCGCAGGCGCGTAAGCTGAT	514	[12]
	sul2-R	CGAAGCGCAGCCGCAATTC		
<i>sul3</i>	sul3-F	GGGAGCCGCTTCCAGTAAT	500	[10]
	sul3-R	TCCGTGACACTGCAATCATTA		
<i>blaPSE1</i>	blaPSE1-F	GCAAGTAGGGCAGGCAATCA	422	[11]
	blaPSE1-R	GAGCTAGATAGATGCTCACAA		
<i>blaTEM</i>	blaTEM-F	ATCAGTTGGGTGCACGAGTG	608	[11]
	blaTEM-R	ACGCTCACCGGCTCCAGA		
<i>tetA</i>	tetA F	GCTGTCGGATCGTTTTCGG	658	[11]
	tetA R	CATTCCGAGCATGAGTGCC		
<i>tetB</i>	tetB F	CTGTGCGGCGCATCGGTCAT	615	[11]
	tetB R	CAGGTAAAGCGATCCCACC		
<i>aadA1</i>	aadA1-F	CTCCGCAGTGGATGGCGG	631	[11]
	aadA1-R	GATCTGCGCGCGAGGCCA		
<i>aadA2</i>	aadA2-F	CATTGAGCGCCATCTGGAAT	500	[11]
	aadA2-R	ACATTTCTGCTCATCGCCGGC		
<i>aadB</i>	aadB-F	CTAGCTGCGGCAGATGAGC	300	[12]
	aadB-R	CTCAGCCGCCTCTGGGCA		

游引物(10 μmol/L) 0.5 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 57 °C 45 s, 72 °C 1 min, 进行 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。表 2 中所有引物的 PCR 反应体系和反应条件相同。

1.9 致病性试验

1.9.1 对蛋雏鸡致病性试验

将纯化的分离菌接种到营养肉汤培养基, 37 °C 恒温培养 8–12 h, 用分光光度计法测定细菌原液浓度, 用营养肉汤调整菌液量至 5×10⁸ CFU/mL; 按 0.2 mL/只的剂量腿部肌肉注射 7 日龄健康京粉蛋鸡 10 只, 另取 10 只注射等体积的营养肉汤作对照; 接种后试验组和对照组隔离饲养, 禁饮、禁食 5 h, 后续使用未加抗生素的自配料饲料饲喂, 观察 10 d, 记录发病及死亡情况, 对死亡鸡只进行剖检, 取肝脏病料进行细菌分离; 至实验结束日, 将存活鸡只及对照组鸡只进行剖检, 观察内脏

病变发生情况, 取肝组织再次进行细菌分离与鉴定。

1.9.2 对产蛋鸡致病性试验

对 210 日龄在产海兰褐蛋鸡, 分别采血、分离血清, 用鸡白痢鸡伤寒多价染色抗原进行血清平板凝集试验, 挑选结果为阴性的健康鸡 20 只作为试验鸡, 分为试验组及对照组, 每组各 10 只进行致病性试验, 方法同 1.9.1。

1.9.3 对成年小鼠的致病性试验及病理切片观察

将 20 只体重在 38.0–41.0 g 之间的成年小白鼠随机分为试验组和对照组各 10 只进行致病性实验, 方法同 1.9.1, 只是注射方式为腹腔注射。小鼠死亡后剖解观察, 取肝和肾组织制备病理切片。

1.10 毒力基因检测

参考文献[13]报道的引物序列(表 3), 利用 PCR 方法检测分离菌株毒力基因。PCR 反应体系: 2×Taq PCR MasterMix 12 μL, ddH₂O 10 μL, 上游引物(10 μmol/L) 1 μL, 下游引物(10 μmol/L)

表 3 沙门氏菌毒力基因分型引物信息

Table 3 Primers used for typing virulence genes of *Salmonella*

基因名称 Gene name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	目的片段大小 Size (bp)
<i>spvB</i>	CTATCAGCCCCGACGAGAGCAGTTTTTA GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	717
<i>spiA</i>	CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550
<i>pagC</i>	CGCCTTTTCCGTGGGGTATGC GAAGCCGTTTATTTTGTAGAGGAGATGTT	454
<i>cdtB</i>	ACAAGTGTGCGATCTCGCCCCGTCATT CAATTTGCGTGGGTCTGTAGGTGCGAGT	268
<i>msgA</i>	GCCAGGCGCACGCGAAATCATCC GCGACCAGCCACATATCAGCCTCTTCAAAC	189
<i>invA</i>	CTGGCGGTGGGTTTTGTGTCTTCTCTATT AGTTTCTCCCCCTCTTCATGCGTTACCC	1 070
<i>sipB</i>	GGACGCCGCCCGGGAAAACTCTC ACACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA	875
<i>prgH</i>	GCCCCGAGCAGCCTGAGAAGTTAGAAA TGAAATGAGCGCCCCCTTGAGCCAGTC	756
<i>spaN</i>	AAAAGCCGTGGAATCCGTTAGTGAAGT CAGCGCTGGGGATTACCGTTTGTG	504
<i>orgA</i>	TTTTTGGAATGCATCAGGGAACA GGCGAAAGCGGGGACGGTATT	255
<i>tolC</i>	TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	161
<i>iroN</i>	ACTGGCACGGCTCGCTGTCGCTCTAT CGCTTTACCGCCGTTCTGCCACTGC	1 205
<i>sitC</i>	CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768
<i>lpfC</i>	GCCCCGCCTGAAGCCTGTGTTGC AGGTCGCCGCTGTTTGAGGTTGGATA	641
<i>sifA</i>	TTTGCCGAACGCGCCCCACACG GTTGCCTTTTCTTGCGCTTTCCACCCATCT	449
<i>sopB</i>	CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	220
<i>pefA</i>	GCGCCGCTCAGCCGAACCAG GCAGCAGAAGCCCAGGAAACAGTG	157

1 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 66.5 °C 30 s, 72 °C 1 min, 进行 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。引物由昆明硕擎生物有限公司合成。

2 结果与分析

2.1 发病鸡临床症状及剖检情况

发病鸡精神萎靡, 食欲不振, 鸡冠苍白, 被毛松乱, 消瘦, 排黄白色和绿色稀便, 发病鸡产蛋停止。病死鸡剖检可见肝脏明显肿大, 个别脾脏肿大, 肝脏呈土黄色或黄褐色, 少部分呈铜绿色, 大部分肝上有出血点、出血斑, 同时可见灰白

色、黄白色点状坏死灶和不规则条纹状、斑块状坏死灶, 肠道肠壁变薄, 卵巢轻度出血, 卵泡萎缩、变性、软化、坏死。个别病死鸡有卵黄性腹膜炎症状。

2.2 细菌分离培养及镜检结果

从送检病(死)鸡的肝脏病料中分离到一株细菌, 该分离菌在普通营养琼脂平板上生长良好(图 1A), 经 24 h 培养后形成圆形、表面光滑、无色、半透明、边缘整齐的菌落; 在麦康凯、SS 琼脂平板上菌落呈半透明状(图 1B 和图 1C), 在三糖铁琼脂平板上产酸、不产气, 不产生 H₂S (图 1D)。挑取纯化好的菌落革兰氏染色后, 显微镜油镜下观察细菌的染色特性, 可见细菌呈革兰氏阴性短杆菌。

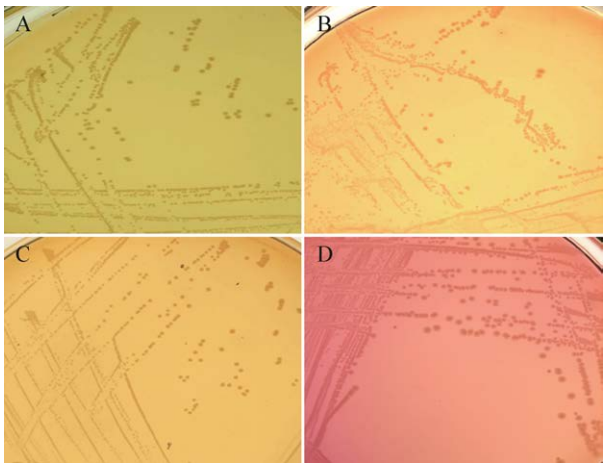


图 1 分离菌在不同琼脂培养基上的菌落形态
Figure 1 Colony morphology of isolated bacteria in different agar plates

注: A: 普通琼脂平板; B: 麦康凯琼脂平板; C: SS 琼脂平板; D: 三糖铁琼脂平板
Note: A: The ordinary agar; B: MacConkey agar; C: SS agar; D: Triple sugar iron agar

2.3 生化特性及血清型鉴定结果

沙门氏菌细菌微量生化反应管检测结果显示, 该分离株属于沙门氏菌属(表 4); 血清型鉴定结果显示, 该分离株属于 D 群的肠炎沙门氏菌, 其抗原式为: O 抗原 1(+)、9(+)、12(+); H 抗原 gm(+)、[1,7](+)。分离菌株命名为 SSYN001 株。

2.4 16S rRNA 基因鉴定结果

分离菌株 SSYN001 的 16S rRNA 基因测序拼接

后, 获得 1 450 bp 序列。将获得的序列在 NCBI-BLAST 中进行比对, 与已知菌株 *Salmonella enteritidis* strain FC1856-1 相似性为 100%。采用 MEGA 6.0 将来源于 GenBank 中的沙门氏菌参考菌株进行多重序列比对, 并采用最大似然法 (Maximum Composite Likelihood) 构建系统进化树, 从构建的系统发育树(图 2)可知, 菌株 SSYN001 的 16S rRNA 基因与 *Salmonella enteritidis* strain FC1856-1 和 *Salmonella enteritidis* strain LBMM 891 处在系统发育树的同一分支, 亲缘关系最为接近, 聚为一族。因此, 分离株 SSYN001 鉴定为肠炎沙门氏菌(GenBank 登录号为 MT500568)。

表 4 分离菌株的生化鉴定结果

Table 4 Biochemical identification of isolated bacteria

项目 Items	结果 Results
硫化氢 H ₂ S	—
靛基质 Indole	—
尿素 Urea	—
氰化钾 Potassium cyanide	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+
甘露醇 Mannitol	+
山梨醇 Sorbitol	—
β-半乳糖苷 ONPG	—

注: +: 阳性; -: 阴性
Note: +: Positive; -: Negative

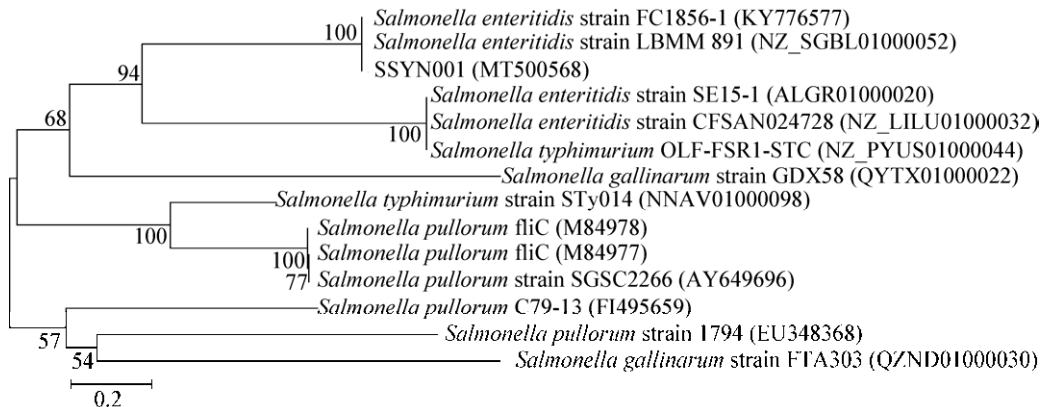


图 2 分离菌株 SSYN001 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树
Figure 2 The phylogenetic tree of the isolated SSYN001 strain based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号内数字: 菌株的 GenBank 序列号; 分支处数字: Bootstrap 支持率; 标尺: 0.2 差异的分支长度
Note: Numbers in brackets: GenBank accession numbers of the strain; Numbers in branch points: Percentages supported by bootstrap; Bar: 0.2 nucleotide divergence

2.5 药敏试验结果

对 12 种抗菌药物药敏试验结果显示,分离的肠炎沙门氏菌株 SSYN001 对青霉素、复方新诺明、强力霉素和四环素 4 种药物耐药,对阿莫西林、氨苄西林、庆大霉素、妥布霉素和头孢他啶等 8 种抗菌药物敏感(表 5)。

2.6 耐药基因检测结果

对肠炎沙门氏菌(SSYN001)进行 10 种耐药基因 PCR 检测,以质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 为阴性对照。只有 *tetA* 被检出,其余 9 种耐药基因未被检出;其检测的目的片段大小均与预期一致,肠炎沙门氏菌 PCR 扩增产物的电泳条带结果见图 3。测序结果显示,扩增的 *tetA* 耐药基因序列与 GenBank 中的参考序列相似性高达 99.76% 以上。

2.7 致病性试验结果

2.7.1 对雏鸡致病性试验结果

将菌株 SSYN001 接种 7 日龄蛋雏鸡后,临床表现为精神沉郁、被毛松乱、采食量减少,部分鸡出现“糊肛”症状;死亡时间集中在攻毒后 3–6 d,此后鸡只逐渐恢复正常。10 d 内实验组死亡率为 40% (4/10),对照组全部健活。死亡鸡剖检病理变化:肺炎,肝脏有明显的白色结节,肝脏肿大、呈

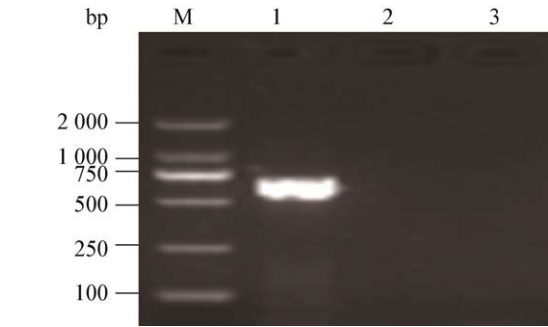


图 3 *tetA* 基因 PCR 电泳图
Figure 3 PCR electrophoresis image of *tetA* gene
注: M: DL2000 DNA Marker; 1: SSYN001; 2: 阴性对照; 3: 空白对照
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: SSYN001; 2: Negative control; 3: Blank control

土黄色、褐色或绿色,上有灰色坏死灶或出血斑。从病死鸡肝组织均回收到接种菌。试验观察期结束时将鸡全部处死并剖检,6 只试验组耐过鸡剖检病变均与死亡鸡相一致,但病变更为典型,从耐过鸡肝组织未回收到接种菌;对照组鸡只剖检无病变,也未分离到细菌。

2.7.2 对产蛋鸡致病性试验结果

试验用 210 日龄产蛋鸡接种 SSYN001 菌株后,表现为俯卧、缩颈、嗜睡、共济失调和腹泻、产软壳蛋或绝产。死亡时间集中在 3–7 d,死亡率

表 5 肠炎沙门氏菌株 SSYN001 药敏试验结果
Table 5 Drug sensitive test results of *Salmonella enteritis* SSYN001 strain

抗生素种类 Types of antibiotics	抗生素 Antibiotics	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	判定结果 Result
β-内酰胺类 β-lactams	青霉素 G PEN	24	R
	头孢氨苄 LEX	36	S
	氨苄西林 AMP	28	S
	阿莫西林 AMO	33	S
氨基糖苷类 Aminoglycosides	庆大霉素 GEN	30	S
	阿米卡星 AMI	26	S
	卡那霉素 KAM	32	S
	链霉素 STR	19	S
	妥布霉素 TOB	32	S
四环素类 Tetracyclines	四环素 TET	0	R
	强力霉素 DOX	0	R
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 SXT	0	R

注: S: 敏感; I: 中敏; R: 耐药
Note: S: Sensitivity; I: Intermediary; R: Resistance

为 80% (8/10); 试验死亡鸡及 2 只处于发病状态的存活鸡剖检病变与自然发病鸡病变相一致, 从病死鸡肝组织分离到细菌。对照组正常, 无明显临床症状, 剖检无病变, 未分离到细菌。

2.7.3 对成年小鼠的致病性试验及病理切片观察

成年小鼠接种分离菌后出现被毛凌乱、精神萎靡、行动迟缓, 有的小鼠出现血便等症状。死亡时间集中在 2~4 d, 4 d 试验组死亡率为 100% (10/10)。试验组剖解后可见肝脏出血肿大、脾脏肿大。取发病小鼠肝脏做病理切片观察, 如图 4 所示, 组织可见多处肝细胞小灶性坏死, 细胞分界不清, 胞核碎裂溶解(黑色箭头), 部分坏死灶伴有少量炎性细胞浸润(红色箭头), 肝窦内炎性细胞增多, 并可见大量肝窦淤血(黄色箭头); 组织皮质广泛可见肾小管坏死, 上皮细胞核固缩深染或碎裂, 部分上皮细胞脱落(黑色箭头), 较多肾小管内可见嗜酸性团块(绿色箭头), 肾小球毛细血管淤血(红色箭头)。对发病小鼠进行病原菌的分离培养, 可以分离到菌落形态、生化特性和血清型鉴定一致的肠炎沙门氏菌。阴性对照组小鼠观察期内正常健活。

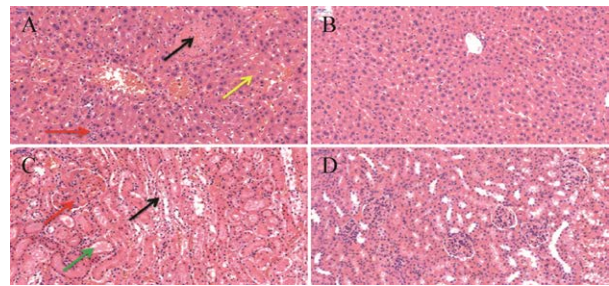


图 4 小鼠病理组织学观察结果(20×)

Figure 4 Results of histopathological observation in mice (20×)

注: A: 病变肝组织; B: 正常肝组织; C: 病变肾组织; D: 正常肾组织

Note: A: Diseased liver tissue; B: Normal liver control; C: Diseased kidney tissue; D: Normal kidney control

2.8 毒力基因检测结果

沙门氏菌毒力基因检测表明, SSYN001 株 15 种毒力基因(*spvB*、*spiA*、*pagC*、*msgA*、*invA*、*sipB*、*prgH*、*spaN*、*tolC*、*iroN*、*sitC*、*lpfC*、*sifA*、*sopB* 和 *orgA*)检测呈阳性结果, 而 *pefA* 和 *cdtB* 这 2 个毒力基因没有扩增出目的条带, 表明该菌株不含有这 2 个毒力基因(图 5)。

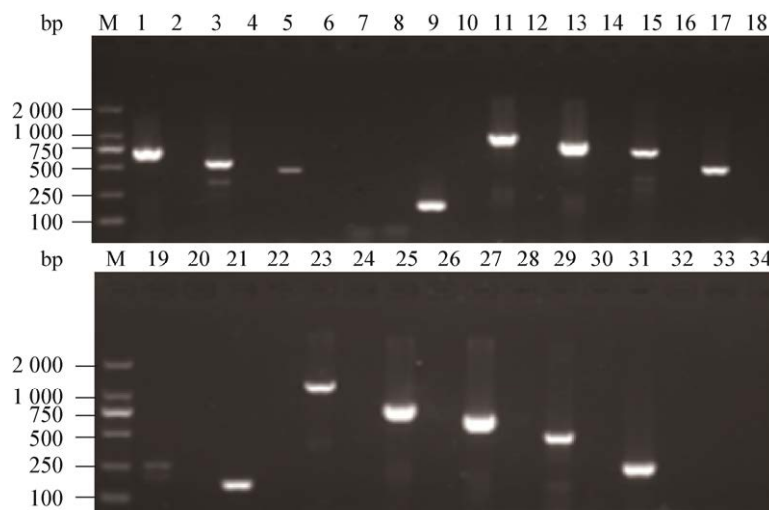


图 5 肠炎沙门氏菌株 SSYN001 毒力基因检测结果

Figure 5 Identification results for virulence gene of *Salmonella enteritidis* SSYN001 strain

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: *spvB* 基因; 3: *spiA* 基因; 5: *pagC* 基因; 7: *cdtB* 基因; 9: *msgA* 基因; 11: *invA* 基因; 13: *sipB* 基因; 15: *prgH* 基因; 17: *spaN* 基因; 19: *orgA* 基因; 21: *tolC* 基因; 23: *iroN* 基因; 25: *sitC* 基因; 27: *lpfC* 基因; 29: *sifA* 基因; 31: *sopB* 基因; 33: *pefA* 基因; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34: 各毒力基因相应的阴性对照

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: *spvB* gene; 3: *spiA* gene; 5: *pagC* gene; 7: *cdtB* gene; 9: *msgA* gene; 11: *invA* gene; 13: *sipB* gene; 15: *prgH* gene; 17: *spaN* gene; 19: *orgA* gene; 21: *tolC* gene; 23: *iroN* gene; 25: *sitC* gene; 27: *lpfC* gene; 29: *sifA* gene; 31: *sopB* gene; 33: *pefA* gene; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34: Negative control of the corresponding gene

3 讨论与结论

影响食品安全的沙门氏菌主要血清型是肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌,其中肠炎沙门氏菌是目前主要流行的优势血清型^[14]。在美国和欧洲,肠炎沙门氏菌血清型被认为是暴发人类沙门氏菌病的主要原因,主要与食用受污染的家禽产品有关,包括鸡蛋^[15-17]。虽然所有家畜都可能感染沙门氏菌,但受污染的禽肉和禽蛋是人类肠炎沙门氏菌的主要来源^[18-19]。肠炎沙门氏菌的流行已经成为世界公共卫生所关注的问题。

本研究从云南某蛋鸡场在产褐壳蛋鸡发病鸡群中分离到一株肠炎沙门氏菌,云南省关于蛋鸡肠炎沙门氏菌的研究报道较少。该株肠炎沙门氏菌对青霉素、复方新诺明、强力霉素和四环素4种药物耐药,是一株多重耐药性菌株。宋欣媛等对昆明周边养鸡场分离出的8株沙门氏菌进行耐药状况研究,结果表明分离株对氨苄西林和头孢氨苄有较强的耐药性,对四环素中介耐药^[20];崔苗苗等对辽宁某规划养殖场分离到的73株肠炎沙门氏菌进行药敏试验分析,结果显示,该分离菌对氨苄西林、磺胺异恶唑等耐药性较强,而对头孢噻唑、恩诺沙星等药物的耐药性较弱^[21];冯国金等对广东某“海南黄”鸡养殖场分离到的一株肠炎沙门氏菌进行耐药分析,结果表明该分离菌对青霉素和红霉素耐药^[22]。由此可见,不同地区分离到相同血清型的肠炎沙门氏菌菌株,其耐药情况各有差异,可能与当地养殖场平时使用的治疗药物有关。耐药基因检测结果表明,肠炎沙门氏菌分离株携带 *tetA* 耐药基因,蛋鸡肠炎沙门氏菌耐药表型与耐药基因型的符合率存在差异不显著的相关性。除了四环素类符合率较高,分离株药敏试验结果表明其对青霉素和复方新诺明耐药,但却未检测到相应的耐药基因,可能是含有耐药基因太多而未扩增到相应的耐药基因,或者该菌株可能还存在其他未知耐药基因或耐药机制。

为了研究分离到的肠炎沙门氏菌株 SSYN001

的致病性,人工感染蛋雏鸡、产蛋鸡和成年小鼠的结果显示,雏鸡死亡率为40% (4/10),存活鸡生长发育受阻,内脏器官病变明显;蛋鸡产蛋停止,死亡率达80% (8/10);小鼠死亡率达100% (10/10)。从养殖户了解到自然感染在产蛋鸡群每天的死亡率高达1.5%,造成巨大的经济损失。

沙门氏菌病的致病过程和感染的严重程度主要取决于一系列协同作用的因素,这些因素可维持宿主体内微生物的生长,并协助微生物表达其毒性,这些因素被称为毒力基因^[23]。本研究主要针对17个已知与家禽沙门氏菌感染有关的基因(*spvB*、*spiA*、*pagC*、*cdtB*、*msgA*、*invA*、*sipB*、*prgH*、*spaN*、*orgA*、*tolC*、*iroN*、*sitC*、*lpfC*、*sifA*、*sopB* 和 *pefA*)。在17个检测到的毒力基因中有15个毒力基因(*spvB*、*spiA*、*pagC*、*msgA*、*invA*、*sipB*、*prgH*、*spaN*、*orgA*、*tolC*、*iroN*、*sitC*、*lpfC*、*sifA* 和 *sopB*)被检测到,而 *cdtB* 和 *pefA* 这2个基因未检测到。*invA*^[24]、*orgA*^[25]、*prgH*^[26]、*tolC*^[27]、*sopB*^[28]、*lpfC*^[29] 和 *pefA*^[30] 在宿主识别和入侵中发挥作用;*cdtB* 可诱导宿主DNA的损伤,使细胞死亡^[31]; *pagC*、*msgA*、*spiA*、*spaN* 和 *sipB* 均是微生物在宿主巨噬细胞中生存所需的基因,其 *spaN* 和 *sipB* 可发挥杀死巨噬细胞的作用^[32]; *sitC* 和 *iroN* 丝状结构的形成主要是通过 *sifA* 基因协助进行的^[33]; *spvB* 毒力基因在体外对巨噬细胞的细胞毒性和在感染过程中增强细胞内的细菌增殖是必需的,*spvB* 可以编码一种二磷酸腺苷(Adenosine Diphosphate, ADP)核糖化酶,导致感染细胞中肌动蛋白细胞骨架的解聚;此外,*spvB* 的腺苷二磷酸化活性对沙门氏菌在小鼠体内的毒力至关重要;*spvB* 可能最终诱发细胞毒性导致细胞凋亡,并且通过吞噬感染的凋亡细胞促进沙门氏菌在细胞间的传播,对沙门氏菌感染的发病机制至关重要^[34]。本次分离到的肠炎沙门氏菌株 SSYN001 未检测到 *cdtB* 和 *pefA* 这2个基因,可能会影响该菌株识别和入侵宿主以及对宿主细胞致死的能力,但其对菌株毒力的影响有待进一步研究。结合动物致病性结果表明,肠炎沙门氏菌株 SSYN001 毒力较强,

对动物的致死率高; 而且在生产中对蛋鸡影响较大, 尤其对产蛋期的蛋鸡影响最为严重, 致死率极高, 并影响生产性能, 使产蛋率下降, 应引起足够重视。

REFERENCES

- [1] Park SH, Aydin M, Khatiwara A, Dolan MC, Gilmore DF, Bouldin JL, Ahn S, Ricke SC. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products[J]. Food Microbiology, 2014, 38: 250-262
- [2] Yan SS, Pendrak ML, Abela-Ridder B, Punderson JW, Fedorko DP, Foley SL. An overview of *Salmonella* typing: public health perspectives[J]. Clinical & Applied Immunology Reviews, 2004, 4(3): 189-204
- [3] Vestby LK, Møretrø T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories[J]. BMC Veterinary Research, 2009, 5(1): 20
- [4] Vose D, Koupeev T, Mintiens K. A quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* spp. in broiler (*Gallus gallus*) meat production[J]. EFSA Supporting Publications, 2011, 8(7): 183E
- [5] Ding MJ, Gao JY, Tang Y, Wang M, Li JX. The isolation, identification and biological characteristics research of *Salmonella enteritidis* from broiler[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2009, 36(5): 203-205 (in Chinese)
丁孟建, 高继业, 唐妤, 汪敏, 李继祥. 肉鸡源肠炎沙门氏菌的分离与鉴定及生物学特性观察[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(5): 203-205
- [6] Li C, Zhang SX, Zhou BJ, Cheng ZT, Wen M, Ma GQ, Wang W, Hu XY, Zhang H, Ding ZE, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of interstitial pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from diarrhea piglets[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 44(12): 3625-3633 (in Chinese)
李晨, 张双翔, 周碧君, 程振涛, 文明, 马光强, 王伟, 胡兴义, 张海, 丁尊俄, 等. 腹泻仔猪肠道致病性大肠埃希氏菌和沙门氏菌的分离鉴定与耐药性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(12): 3625-3633
- [7] Wu J, Liu LH, Jin YJ, Zou HY, Wang Q. Epidemiological characteristics and molecular typing of *Samonella* spp. in Longgang district of Shenzhen during 2010-2013[J]. Journal of Tropical Medicine, 2015, 15(9): 1262-1265 (in Chinese)
吴洁, 刘丽红, 金玉娟, 邹惠英, 王齐. 2010-2013 年深圳市龙岗区沙门菌分子流行病学分析[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(9): 1262-1265
- [8] Zhao HT, Yan HY, He H, Luo WH, Zi JX, Chang ZS, Xin AG. Isolation, identification and drug resistance analysis of *S. aureus* from chickens in Yunnan[J]. Yunnan Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019(4): 5-7 (in Chinese)
赵鹤庭, 严红亚, 何辉, 罗文华, 字吉祥, 常志顺, 信爱国. 一例鸡源金黄色葡萄球菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 云南畜牧兽医, 2019(4): 5-7
- [9] Chuanchuen R, Khemtong S, Padungtod P. Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine[J]. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health, 2007, 38(5): 855-862
- [10] Chuanchuen R, Koowatananukul C, Khemtong S. Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates[J]. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health, 2008, 39(3): 419-424
- [11] Chuanchuen R, Pathanasophon P, Khemtong S, Wannaprasat W, Padungtod P. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2008, 70(6): 595-601
- [12] Chuanchuen R, Padungtod P. Antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine in Thailand[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2009, 71(10): 1349-1355
- [13] Tarabees R, Elsayed MSA, Shawish R, Basiouni S, Shehata AA. Isolation and characterization of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* from chicken meat in Egypt[J]. The Journal of Infection in Developing Countries, 2017, 11(4): 314-319
- [14] Fan ZJ, Xu BJ, Zhai CK, Yu C, Wang HL. Establishment of rapid detection method of *Salmonella enteritidis* and drug resistance analysis of isolates from chickens[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2017, 46(10): 137-142 (in Chinese)
范忠军, 许保疆, 翟崇凯, 郁川, 王欢莉. 鸡源肠炎沙门氏菌快速检测方法的建立及其分离株的耐药性分析[J]. 河南农业科学, 2017, 46(10): 137-142
- [15] Collard JM, Bertrand S, Dierick K, Godard C, Wildemaue C, Vermeersch K, Duculot J, van Immerseel F, Pasmans F, Imberechts H, et al. Drastic decrease of *Salmonella enteritidis* isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks[J]. Epidemiology and Infection, 2008, 136(6): 771-781
- [16] Gould LH, Walsh KA, Vieira AR, Herman K, Williams IT, Hall AJ, Cole D. Surveillance for foodborne disease outbreaks — United States, 1998-2008[J]. MMWR Surveillance Summaries, 2013, 62(2): 1-34
- [17] Braden CR. *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* and eggs: A national epidemic in the United States[J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 43(4): 512-517

- [18] Garber L, Smeltzer M, Fedorka-Cray P, Ladely S, Ferris K. *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* in table egg layer house environments and in mice in U.S. layer houses and associated risk factors[J]. Avian Diseases, 2003, 47(1): 134-142
- [19] Altekruze S, Koehler J, Hickman-Brenner F, Tauxe RV, Ferris K. A comparison of *Salmonella enteritidis* phage types from egg-associated outbreaks and implicated laying flocks[J]. Epidemiology and Infection, 1993, 110(1): 17-22
- [20] Song XY, Tan S, Wu PF. Isolation, identification and drug resistance of *Salmonella* from chicken in Kunming[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019(4): 1-5 (in Chinese)
宋欣媛, 谭珊, 吴培福. 昆明地区鸡源沙门氏菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 现代畜牧兽医, 2019(4): 1-5
- [21] Cui MM, Tong YL, Li N, Su YM, Wei S, Ren YF, Li XN, Li B, Zhou TZ. Isolation, identification and drug susceptibility test of chicken enteritis *Salmonella*[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018(11): 14-19 (in Chinese)
崔苗苗, 佟彦林, 李宁, 苏玉铭, 魏澍, 任玉峰, 李欣南, 李冰, 周铁忠. 鸡肠炎沙门氏菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 现代畜牧兽医, 2018(11): 14-19
- [22] Feng GJ, Long JY. Isolation and identification of *Salmonella enteritidis* from chickens[J]. China Poultry, 2004, 26(23): 14-16 (in Chinese)
冯国金, 龙建勇. 鸡肠炎沙门氏菌病的病原分离与鉴定[J]. 中国家禽, 2004, 26(23): 14-16
- [23] Murugkar HV, Rahman H, Dutta PK. Distribution of virulence genes in *Salmonella* serovars isolated from man & animals[J]. The Indian Journal of Medical Research, 2003, 117: 66-70
- [24] Galán JE, Curtiss R III. Virulence and vaccine potential of *phoP* mutants of *Salmonella typhimurium*[J]. Microbial Pathogenesis, 1989, 6(6): 433-443
- [25] Jones BD, Falkow S. Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization[J]. Infection and Immunity, 1994, 62(9): 3745-3752
- [26] Behlau I, Miller SI. A *PhoP*-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(14): 4475-4484
- [27] Virlogeux-Payant I, Baucheron S, Pelet J, Trotureau J, Bottreau E, Velge P, Cloeckert A. *TolC*, but not *AcrB*, is involved in the invasiveness of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by increasing type III secretion system-1 expression[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2008, 298(7/8): 561-569
- [28] Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S, Khare S, Adams LG, Bäumlér AJ. *SipA*, *SopA*, *SopB*, *SopD*, and *SopE2* contribute to *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* invasion of epithelial cells[J]. Infection & Immunity, 2005, 73(1): 146-154
- [29] Bäumlér AJ, Tsois RM, Bowe FA, Kusters JG, Hoffmann S, Heffron F. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse[J]. Infection & Immunity, 1996, 64(1): 61-68
- [30] Ledebøer NA, Frye JG, McClelland M, Jones BD. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* requires the *Lpf*, *Pef*, and *TafI* fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(6): 3156-3169
- [31] Mezal EH, Bae B, Khan AA. Detection and functionality of the *CdtB*, *PltA*, and *PltB* from *Salmonella enterica* serovar *Javiana*[J]. Pathogens & Disease, 2014, 72(2): 95-103
- [32] Chen LM, Kaniga K, Galán JE. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages[J]. Molecular Microbiology, 1996, 21(5): 1101-1115
- [33] Brumell JH, Goosney DL, Finlay BB. *SifA*, a type III secreted effector of *Salmonella typhimurium*, directs *Salmonella*-induced filament (*Sif*) formation along microtubules[J]. Traffic, 2002, 3(6): 407-415
- [34] Lesnick ML, Reiner NE, Fierer J, Guiney DG. The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells[J]. Molecular Microbiology, 2001, 39(6): 1464-1470