

## 香炉山鸡源沙门氏菌的分离鉴定及耐药性研究

廖飞<sup>1,2</sup>, 包涛涛<sup>1</sup>, 吴冬梅<sup>3</sup>, 刘铭英<sup>3</sup>, 杨先富<sup>1\*</sup>, 赵孝木<sup>1</sup> (1. 黔东南州动物疫病预防控制中心, 贵州凯里 556000; 2. 贵州农业职业学院, 贵州贵阳 550000; 3. 凯里市动物疫病预防控制中心, 贵州凯里 556000)

**摘要** 为了掌握凯里市及周边地区香炉山鸡源沙门氏菌的流行情况和耐药情况, 通过细菌分离、形态学观察、生化试验、药敏试验等方法对凯里市及周边地区饲养的香炉山鸡进行了调查研究。结果表明: 从调查的香炉山鸡中共分离鉴定出 12 株鸡源沙门氏菌, 而 12 株沙门氏菌都具有多重耐药性。其中, 对阿莫西林(AMO)、青霉素(PEN)的耐药率达 100%; 其次, 对庆大霉素(GEN)、甲硝唑(MTR)、链霉素(STR)、四环素(TET)、苯唑西林(OXA)、复方阿莫西林(AMC)的耐药率也相对较高, 分别为 91.7%、83.3%、83.3%、75.0%、75.0% 和 66.7%; 对头孢唑林(CEF)、头孢噻吩(CFT)、卡拉霉素(KAN)、多西环素(DOT)、氧氟沙星(OFL)、大观霉素(SPE)的耐药率分别为 41.7%、33.3%、25.0%、25.0%、16.7% 和 16.7%, 但对安普霉素(CMP)和复方新诺明(TSU)敏感, 耐受菌株均为 0 株。这说明香炉山鸡鸡白痢沙门氏菌的感染率较高, 且具有不同程度的耐药性。

**关键词** 沙门氏菌; 耐药性; 香炉山鸡

中图分类号 S858.31 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)19-0109-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.19.028



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Study on the Isolation, Identification and Antibiotic Resistance of *Salmonella* sp. from Censer Mountain Chicken

LIAO Fei<sup>1,2</sup>, BAO Tao-tao<sup>1</sup>, WU Dong-mei<sup>3</sup> et al (1. Animal Epidemic Disease Control Center of Qiandongnan Prefecture, Kaili, Guizhou 556000; 2. Guizhou Vocational College of Agriculture, Guiyang, Guizhou 550000; 3. Animal Epidemic Disease Control Center of Kaili City, Kaili, Guizhou 556000)

**Abstract** In order to grasp the epidemic situation and drug resistance of *Salmonella* sp. in Kaili City and its surrounding areas, Censer mountain chicken were investigated by bacterial isolation, morphological observation, biochemical test and drug sensitivity test. The results showed that 12 strains of *Salmonella* sp. from Censer mountain chicken were isolated and identified, and 12 strains of *Salmonella* sp. had multiple drug resistance. The drug resistance rate of 12 isolated strains to both amoxicillin (AMO) and penicillin (PEN) were 100%. The drug resistance rates to gentamicin (GEN), metronidazole (MTR), streptomycin (STR), tetracycline (TET), oxacillin (OXA) and amoxicillin (AMC) were relatively high, being 91.7%, 83.3%, 83.3%, 75.0%, 75.0% and 66.7%, respectively. The drug resistance rates to cefazolin (CEF), ceftiofen (CFT), karamycin (KAN), doxycycline (DOT), ofloxacin (OFL) and spectinomycin (SPE) were 41.7%, 33.3%, 25.0%, 25.0%, 16.7% and 16.7%, respectively. But apramycin (CMP) and compound neomine (TSU) were sensitive, the drug-resistant strain was found. The results showed that the infection rate of *Salmonella* sp. in Censer mountain chickens was high, and it had different degrees of drug resistance.

**Key words** *Salmonella* sp.; Antimicrobial resistance; Censer mountain chicken

香炉山鸡是一个历史悠久的贵州地方优良品种, 属贵州优良地方品种黔东南小香鸡的一个品系, 主产于黔东南州凯里市地区及周边地区的麻江、丹寨、雷山、黄平、台江、等县<sup>[1-2]</sup>。香炉山鸡是当地苗族群众长期饲养、在长期封闭的自然社会历史条件下形成的一个地方品种。该鸡品种体型较小, 结实紧凑, 结构匀称, 是贵州省极富特色的小型肉蛋兼用型鸡种, 具有觅食活动能力强, 生产性能好, 遗传性稳定、耐粗饲、抗逆与适应性强、肉质风味鲜香、性成熟较晚等特点。香炉山鸡的养殖占据着凯里市鸡养殖业有利的市场。目前, 在人类临床治疗、农业及畜牧业生产中, 抗生素仍然是对付各种病原菌的首选药物<sup>[3]</sup>。各种抗生素药物的广泛使用导致沙门氏菌及其他细菌对抗菌药物的耐药状况已经十分严重<sup>[4]</sup>。随着抗菌药的乱用、滥用, 给养殖业带来了巨大的危害, 同时给香炉山鸡的养殖也带来巨大的威胁。调查研究表明, 沙门氏菌病给香炉山鸡带来的危害越来越严重。笔者研究了香炉山鸡鸡白痢的感染程度及耐药情况, 初步判定沙门氏菌对香炉山鸡养殖业的危害程度, 旨在为香炉山鸡的

养殖生产提供理论依据, 也为公共卫生安全和农产品安全问题的研究提供基础。

#### 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 2018 年, 在凯里市及周边地区规模化香炉山鸡养殖场, 无菌操作采集鸡肛拭子 200 份, 于 -20 °C 下保存备用。

**1.2 细菌的分离与鉴定** 将鸡肛拭子于增菌培养基 37 °C 下培养 20 h 后, 再划线接种于 SS 琼脂平板培养基上 37 °C 条件下培养 20 h 后, 对 SS 琼脂培养基上带有黑点的或者透明的疑似菌落进行纯培养。挑取 SS 琼脂培养基纯培养的单菌落进行革兰氏染色, 光学显微镜下观察。

**1.3 生化鉴定** 用接种环挑取单菌落, 分别接种于尿素、靛基质、氧化钾、氰化钾对照、赖氨酸脱羧酶及赖氨酸脱羧酶对照生化管内, 37 °C 下培养 18~24 h, 根据微量生化反应管说明书进行结果判断。

**1.4 PCR 鉴定** 针对沙门氏菌菌属特异性基因 *invA*<sup>[5]</sup> 的核苷酸序列, 参照上游引物 5'-CGTTATGGCGTAGCCTGGCGG-3', 下游引物 5'-TCGCACCGTCAAAGGAACCG-3'<sup>[6]</sup>。目的片段大小为 252 bp。模板为纯化后疑似沙门氏菌单菌落提取的 DNA。PCR 扩增条件如下: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 72 °C 终

**基金项目** 凯里市科技项目(凯教科合[2017]2-2号)。

**作者简介** 廖飞(1986—), 男, 贵州余庆人, 兽医师, 硕士, 从事动物疫病防控研究。\*通信作者, 高级兽医师, 硕士, 从事动物疫病防控研究。

**收稿日期** 2020-03-25

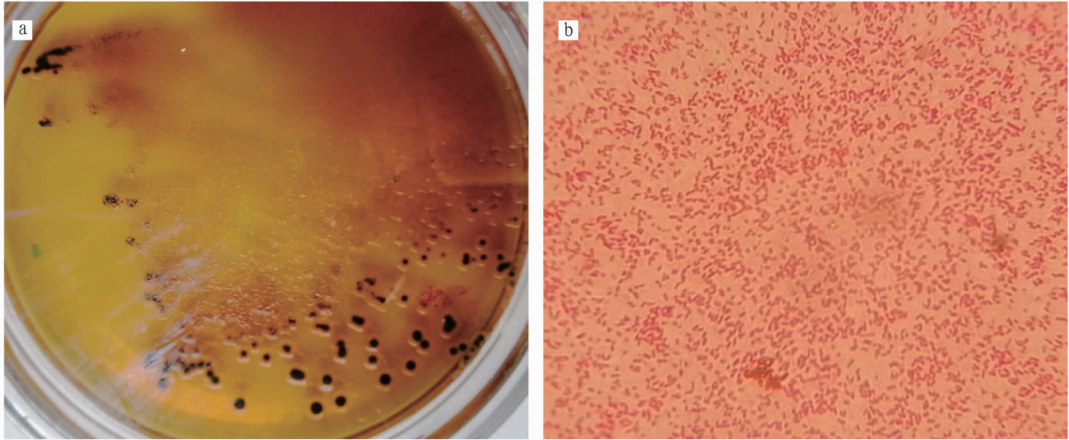
延伸 10 min。对 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.5 沙门氏菌分离株的药物敏感性试验** 将沙门氏菌单菌落接种于 LB 培养基中,37 ℃ 摇床培养 8 h。稀释菌液浓度达到 0.5 麦氏比浊度即可。用灭菌棉签蘸取菌液,并在管壁内轻轻挤去多余菌液,交叉涂布 2~3 次,每次将平皿旋转 60°,使菌液均匀地涂布于整个平板上。然后,将平皿静置 3~5 min,使培养基表面菌液得到吸收后贴药敏纸片,每个纸片中心至少相距 24 mm,并用镊子轻轻压一下药敏纸片,确保其与培养基表面接触完全。贴完纸片后,将平皿倒置,于

37 ℃ 恒温培养箱内培养 16~18 h,取出。观察结果,并用游标卡尺测量抑菌圈直径<sup>[6-7]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 细菌分离鉴定结果** 该试验中共采集 200 份肛拭子,分离到 12 株沙门氏菌。该菌在营养琼脂培养基上呈圆形、微隆起、光滑湿润、半透明、边缘整齐、针尖大小露珠状的小菌落;在 SS 琼脂培养基上,菌落呈灰色或菌落中心为黑色(图 1a)。显微镜下观察,细菌染色后呈现红色(图 1b),判定为革兰氏阴性杆菌。



注:a. 菌落中心为黑色;b. 革兰氏染色呈红色

Note:a. The center of the colony was black;b. The result of Gram staining was red

图 1 细菌分离鉴定结果

Fig. 1 Isolation and identification results of pathogen

**2.2 生化鉴定结果** 12 株沙门氏菌分离株的生化鉴定结果均符合沙门氏菌的生长特性。尿素试验结果呈阴性,赖氨酸试验结果呈阳性,赖氨酸对照试验、氰化钾试验结果均呈阴

性,氰化钾对照试验结果呈阴性,靛基质试验结果呈阴性。生化鉴定结果具体见表 1。

表 1 12 株沙门氏菌生化鉴定结果

Table 1 Biochemical identification results of 12 strains of *Salmonella* sp.

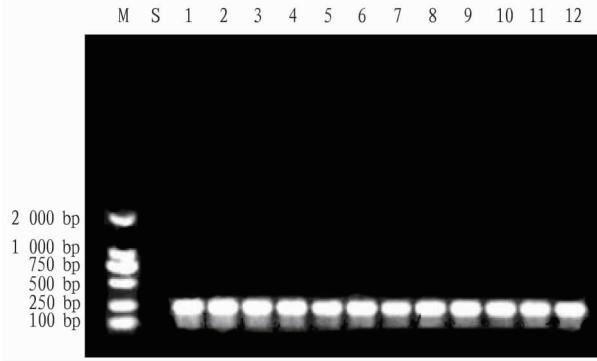
菌株 Strain	尿素 Urea	赖氨酸 Lysine	赖氨酸对照 Lysine control	氰化钾 Potassium cyanide	氰化钾对照 Potassium cyanide control	靛基质 Indole
KL-1	-	+	-	-	-	-
KL-2	-	+	-	-	-	-
KL-3	-	+	-	-	-	-
KL-4	-	+	-	-	-	-
KL-5	-	+	-	-	-	-
KL-6	-	+	-	-	-	-
KL-7	-	+	-	-	-	-
KL-8	-	+	-	-	-	-
KL-9	-	+	-	-	-	-
KL-10	-	+	-	-	-	-
KL-11	-	+	-	-	-	-
KL-12	-	+	-	-	-	-

**2.3 PCR 鉴定结果** 经 PCR 鉴定最终分离到沙门氏菌 12 株,阳性检出率为 6%(12/200)。沙门氏菌分离株 PCR 鉴定结果见图 2。

**2.4 沙门氏菌分离株药敏试验结果** 12 株沙门氏菌分离株对 16 种抗菌药物的敏感性测定结果见表 2。从表 2 可以看出,12 株沙门氏菌都具有多重耐药性。其中,对阿莫西林

(AMO)、青霉素(PEN)耐药率达到 100%(耐受菌株为 12 株);其次,对庆大霉素(GEN)、甲硝唑(MTR)、链霉素(STR)、四环素(TET)、苯唑西林(OXA)、复方阿莫西林(AMC)的耐药率也相对较高,分别达到 91.7%、83.3%、83.3%、75.0%、75.0%和 66.7%(耐受菌株分别为 11、10、10、9、9、8 株);对头孢唑林(CEF)、头孢噻吩(CFT)、卡拉霉素

(KAN)、多西环素(DOT)、氧氟沙星(OFL)、大观霉素(SPE)的耐药率分别为41.7%、33.3%、25.0%、25.0%、16.7%和16.7%(耐受菌株分别为5、4、3、3、2和2株),但对安普霉素(CMP)和复方新诺明(TSU)敏感,耐受菌株均为0株。



注: M. DL2000 DNA Marker; S. 大肠杆菌; 1~12. 分离菌株

Note: M. DL2000 DNA Marker; S. *E. coli*; 1~12. Isolated strains

图2 沙门氏菌分离株 *invA* 基因 PCR 鉴定结果

Fig.2 PCR identification results of *invA* gene of *Salmonella* isolates

表2 12株沙门氏菌的耐药情况

Table 2 The drug resistance of 12 strains of *Salmonella* sp.

序号 No.	抗生素名称 Antibiotic name	耐受菌株数 Number of tolerant strains 株	耐药率 Drug resistance rate/%
1	阿莫西林(AMO)	12	100(12/12)
2	复方阿莫西林(AMC)	8	66.7(8/12)
3	苯唑西林(OXA)	9	75.0(9/12)
4	头孢唑林(CEF)	4	41.7(5/12)
5	头孢噻吩(CFT)	5	33.3(4/12)
6	庆大霉素(GEN)	11	91.7(11/12)
7	卡拉霉素(KAN)	3	25.0(3/12)
8	氧氟沙星(OFL)	2	16.7(2/12)
9	青霉素(PEN)	12	100(12/12)
10	甲硝唑(MTR)	10	83.3(10/12)
11	链霉素(STR)	10	83.3(10/12)
12	四环素(TET)	9	75.0(9/12)
13	大观霉素(SPE)	2	16.7(2/12)
14	安普霉素(CMP)	0	0(0/12)
15	多西环素(DOT)	3	25.0(3/12)
16	复方新诺明(TSU)	0	0(0/12)

### 3 讨论

沙门氏菌是肠杆菌科中一种重要的人畜共患病原菌,是

细菌性食物中毒的重要致病菌。沙门氏菌的多重耐药问题一直是医学、兽医学、公共卫生学关注的焦点<sup>[8]</sup>。导致沙门氏菌耐药率上升的原因很多,其中质粒携带耐药基因的转移是沙门氏菌产生耐药的一个重要机制<sup>[9]</sup>。含多种耐药基因的耐药质粒存在于大多数细菌并且广泛分布于自然界,它们可以通过接合或转导作用在不同的细菌之间进行转移,同时将多种耐药性从一个细菌传递给其他细菌。随着时间的推移,其耐药率将大幅度提升,很有可能会成为导致食源性沙门氏菌病的主因。因此,沙门氏菌病原菌对抗菌药物的耐药性研究已成为焦点问题之一。

该试验从香炉山鸡分离的12株沙门氏菌对临床上广泛使用的抗菌药物(阿莫西林、青霉素、四环素等)都产生了较高的耐药性,结果与 Zhao 等<sup>[10]</sup> 研究结果相一致。阿莫西林、青霉素、四环素等耐药率较高的原因很可能是青霉素类药物在养殖业中被广泛应用,存在乱用、滥用现象,并被添加于饲料中<sup>[11]</sup>。分离菌株对安普霉素(CMP)和复方新诺明(TSU)较为敏感,耐药率为0%,这一结果与方翟<sup>[7]</sup>的研究结果相一致。建议临床上合理用药,可对鸡沙门氏菌病的治疗起到较好的效果。坚持合理用药,减少和防止沙门氏菌耐药性的产生,保障食品安全。

### 参考文献

- [1] 顾永芬,潘成勇,陶宇航. 香炉山鸡纯种选育技术探讨[J]. 宁夏农林科技,2013,54(5):82-83.
- [2] 潘成勇,申学林,陶宇航,等. 香炉山鸡的品种资源收集与利用[J]. 黑龙江畜牧兽医,2013(9):147-148.
- [3] SU L H, CHIU C H, CHU C, et al. Antimicrobial resistance in nontyphoid salmonella serotypes: A global challenge[J]. Clinical infectious diseases, 2004,39(4):546-551.
- [4] 金少鸿,马越. 国内细菌耐药性监测研究的回顾与展望[J]. 中国抗生素杂志,2005,30(5):257-259,283.
- [5] 许会会,雷连成,谢芳,等. 沙门氏菌 PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(4):94-97.
- [6] 王德宁. 鸡源沙门氏菌耐药性、致病性与毒力基因相关性分析[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2014.
- [7] 方翟. 湖北省鸡源沙门氏菌的分离鉴定和耐药性分析[D]. 武汉:华中农业大学,2014.
- [8] 胡彩光,高维凡,教郁. 沙门氏菌耐药机制的研究进展[J]. 现代畜牧兽医,2013(4):53-56.
- [9] 王明贵. 喹诺酮类抗菌药的耐药性及质粒介导耐药机制[J]. 中华医学杂志,2006,86(9):645-647.
- [10] ZHAO S, MCDERMOTT P F, WHITE D G, et al. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals[J]. Veterinary microbiology, 2007,123(1/2/3):122-132.
- [11] 郭云昌,刘秀梅. 市售鸡肉中沙门菌分离株多重耐药谱测定[J]. 中国食品卫生杂志,2005,17(2):100-103.
- [12] 变化分析[J]. 耕作与栽培,2018(5):5-7.
- [13] 潘世昌,李梅,宋致书. 息烽县农区鼠种群组成及种群数量变动规律[J]. 江西农业学报,2013,25(8):59-61,69.
- [14] 李梅,陈海燕,尹文书,等. 息烽县2013~2018年农区鼠类种群数量变化规律分析[J]. 山地农业生物学报,2019,38(5):42-46,52.
- [15] 张堰铭. 捕杀对高原鼯鼠种群年龄结构及繁殖的影响[J]. 兽类学报,1999,19(3):204-211.
- [16] 杨再学,郑元利,金星. 黑线姬鼠不同年龄组种群繁殖特征的研究[J]. 中国农学通报,2005,21(12):339-342.
- [17] 杨再学,金星,郭永旺,等. 高山姬鼠种群繁殖参数的变化[J]. 中国农学通报,2010,26(1):189-194.
- [18] 杨再学,周朝霞,潘世昌,等. 应用胴体重指标鉴定黄胸鼠的年龄[J]. 贵州农业科学,2010,38(3):110-113.
- [19] 杨再学,雷邦海,潘世昌,等. 贵州省大足鼠种群年龄鉴定和繁殖参数变化[J]. 山地农业生物学报,2015,34(4):39-42.
- [20] (上接第108页)
- [21] 杨再学,郑元利,潘世昌,等. 褐家鼠的年龄鉴定及种群年龄组成[J]. 中国农学通报,2009,25(14):218-223.
- [22] 杨再学,潘世昌,周朝霞,等. 应用胴体重指标鉴定贵州省褐家鼠的年龄[J]. 山地农业生物学报,2010,29(1):14-20.
- [23] 李梅,潘世昌. 息烽县褐家鼠形态特征、种群数量动态及预测研究[J]. 山地农业生物学报,2010,29(2):119-123.
- [24] 艾祯仙,周朝霞,白明琼,等. 贵州三都县农田褐家鼠发生规律与预报模型[J]. 贵州农业科学,2012,40(9):140-142.
- [25] 李恩涛,周全忠,李跃辉,等. 瓮安县褐家鼠的种群生态特征[J]. 贵州农业科学,2014,42(1):102-104.
- [26] 赵芳,龙贵兴,李蔚传,等. 大方县褐家鼠的种群数量动态及繁殖特征[J]. 贵州农业科学,2015,43(8):114-117.
- [27] 杨德辉,杨再学,留青,等. 贵州省安龙县褐家鼠种群数量及繁殖特征