

某蛋鸡养殖场沙门氏菌病的诊断及致病菌耐药元件的检测

姜玉莎, 陶芬, 苗睿, 邵博, 赵浪, 孙嘉良, 吴培福*

西南林业大学, 生命科学学院, 云南 昆明

收稿日期: 2022年3月21日; 录用日期: 2022年4月22日; 发布日期: 2022年4月29日

摘要

目的: 分析某养殖场蛋鸡死亡的原因, 为疾病防控提供借鉴。方法: 剖检病死鸡, 结合病理变化和临床特征作出疑似诊断; 从内脏组织分离致病菌, 并对分离株的耐药元件进行PCR检测, 为治疗提供借鉴。结果: 病鸡呈现副伤寒样病变, 如肝肿大出血, 有坏死灶; 肾肿大; 心和肠黏膜有出血点; 卵泡充血、变形、萎缩等; 从病变组织中分离鉴定出4株肠炎沙门氏菌; 分离株携带多种耐药基因(*bla*_{TEM}、*tetA*、*tetB*等)与可移动遗传元件。结论: 该场蛋鸡死亡的原因可能是因感染多重耐药性肠炎沙门氏菌引起的; 致病菌携带多种耐药基因, 可合理使用多粘菌素类药物进行疾病治疗; 此外分离株携带多种可移动元件, 易发生耐药性传播, 应引起重视。

关键词

沙门氏菌, 蛋鸡, 感染, 分离鉴定, 耐药基因

Diagnosis of Salmonellosis from a Layer Farm and Detection of Drug-Resistant Elements in the Isolates

Yusha Jiang, Fen Tao, Rui Miao, Bo Shao, Lang Zhao, Jialiang Sun, Peifu Wu*

College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming Yunnan

Received: Mar. 21st, 2022; accepted: Apr. 22nd, 2022; published: Apr. 29th, 2022

Abstract

Aim: The reasons for the death of laying hens in a farm were analyzed to provide information for

*通讯作者。

文章引用: 姜玉莎, 陶芬, 苗睿, 邵博, 赵浪, 孙嘉良, 吴培福. 某蛋鸡养殖场沙门氏菌病的诊断及致病菌耐药元件的检测[J]. 亚洲兽医病例研究, 2022, 11(1): 1-7. DOI: 10.12677/acrpvm.2022.111001

disease prevention and control. Methods: The sick and dead chickens were necropsied, and the suspected diagnosis was made based on the pathological changes and clinical features. Pathogenic bacteria were isolated from the visceral tissues. Then, the drug resistance elements of the isolated strains were detected by PCR to provide support for the treatment. **Results:** In this case, the sick chickens showed paratyphoid like lesions, such as hepatomegaly, hemorrhage and necrosis; nephromegaly; bleeding spots in heart and intestinal mucosa; follicular congestion, deformation and atrophy; 4 suspected pathogenic bacteria were isolated from different internal organs and identified as *Salmonella enteritidis*. The isolates carried a variety of drug resistance genes (*bla*_{TEM}, *tetA*, *tetB*, etc.) and mobile genetic elements. **Conclusion:** The death of this case was caused by the infection of multiple drug-resistant *Salmonella enteritidis*. Since the bacteria carry multiple drug-resistant genes, polymyxins can be used rationally for disease treatment. In addition, we should be paid attention to resistance transmission, because of the isolates carrying a variety of mobile genetic elements with high transmission properties.

Keywords

Salmonella, Laying Hen, Infection, Isolation and Identification, Drug Resistance Genes

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

禽副伤寒是由鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌等引起的一类禽类疾病，具有重要的公共卫生学意义，是引发人食物中毒的主要原因之一。该病可感染不同年龄段的鸡，给家禽养殖业带来了巨大的经济损失。2021年7月云南省红河州开远地区某蛋鸡养殖场饲养的鸡出现发病死亡情况。该场饲养蛋鸡8000羽，采用智能化管理系统，具有较先进的饲养管理措施，但有一区间的2月龄蛋鸡出现发病。初期，病鸡表现为精神沉郁，食欲不振，伴有腹泻，粪便呈黄白色。随着病情发展，病鸡出现死亡，高峰期时每天达100只左右。早期采用青链霉素治疗，未见明显效果。养殖场将病鸡和组织样送往我校实验室做进一步的诊断和病原鉴定。为了给防治提供参考，我们对分离株的耐药基因型进行了扩增分析。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

源自云南省红河州开远某蛋鸡养殖场的病鸡；伊红美蓝培养基、麦康凯培养基、LB固体培养基、SS固体培养基，均购自海博生物技术有限公司；琼脂糖凝胶、2×Taq Master Mix。

2.2. 剖检与病原菌分离

解剖死亡蛋鸡，肉眼观察各脏器病变，记录病理变化，并取肺、肝、脾、肾和卵巢，进行病原菌的分离培养。采用接种环挑取器官内部组织，涂布接种于不同的培养基(伊红美蓝培养基、麦康凯培养基和SS固体培养基)，置培养箱中37℃培养48h。观察菌落形态和大小，再次传代培养，以纯化分离株。

2.3. 菌种鉴定

首先，对分离株进行革兰氏染色，观察细菌形态。随后，采用SDS法提取分离菌株的DNA，用16S

rDNA 通用引物(27F、1492R)扩增分离株的 16S rDNA 基因。对阳性扩增产物测序(由上海捷瑞生物工程有限公司完成),用 NCBI 数据库对测序结果进行 BLAST 分析比对,以确定菌种。

2.4. 耐药基因检测

设计引物(表 1),对 13 种耐药基因、10 种质粒复制酶基因和 I 类整合酶基因进行 PCR 检测。耐药基因包括: β -内酰胺类耐药基因 *bla_{SHV}*、*bla_{TEM}*、*bla_{CTX-M-1}*、*bla_{CTX-M-2}*、*bla_{CTX-M-9}*、*bla_{CTX-M-8/25}*、*bla_{NDM}*; 多粘菌素类耐药基因 *CLR5*; 四环素类耐药基因 *tetA*、*tetB* 和磺胺类耐药基因 *sul1*、*sul2*、*sulA*; 质粒检测包括 *IncB/O*、*IncFIC*、*IncP*、*IncFIIA*、*IncFIA*、*IncFIB*、*IncI1*、*IncFrep*、*IncN* 和 *IncL/M*。扩增体系为 25 μ l, 含上下游引物各 1 μ l、2 \times Taq Master Mix 12.5 μ L、DNA 模板 1 μ L、ddH₂O 9.5 μ L; PCR 产物送上海捷瑞生物工程有限公司测序,以验证扩增结果的特异性。

Table 1. The primers used in this study.

表 1. 本研究所用的引物

耐药元件种类	基因	序列(5'-3')	片段大小/bp	退火温度/°C
整合子	I 类整合子	F: ACGAGCGCAAGGTTTCGGT R: GAAAGGTCTGGTCATACATG	565	52
	<i>bla_{SHV}</i>	F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R: GTTGCCAGTGCTCGATCAGC	786	55
	<i>bla_{TEM}</i>	F: CATTTCGGTGTCGCCCTTATTC R: CCAATGCTTAATCAGTGAGGC	846	55
	<i>bla_{CTXM-1}</i>	F: CGTCACGCTGTTGTTAGGAA R: ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT	781	55
β -内酰胺类	<i>bla_{CTXM-2}</i>	F: CTCAGAGCATTGCGCGCTCA R: CCGCCGCAGCCAGAATATCC	843	55
	<i>bla_{CTXM-9}</i>	F: GCGCATGGTGACAAAGAGAGTGCAA R: GTTACAGCCCTTCGGCGATGATTC	876	55
	<i>bla_{CTXM-8/25}</i>	F: CCAGGCGAACGATGTTCAACA R: CGGCTCCGACTGGGTGAAGTA	730	55
	<i>bla_{NDM}</i>	F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC	621	55
多粘菌素类	<i>CLR5</i>	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTTC R: CTTGGTCGGTCTGTA GGG	309	55
	<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	54.6
四环素类	<i>tetB</i>	F: GGTTGAGACGCAATCGAATT R: AGGCTTGGGAATACTGAGTGTA	206	52.9

Continued

磺胺类	<i>sul1</i>	F: CGCACCGGAAACATCGCTGCAC R: TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG	163	55.8
	<i>sul2</i>	F: GCACTCCAGCAGGCTCGTAA R: CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	191	60
	<i>sulA</i>	F: GCACTCCAGCAGGCTCGTAA R: CTCTGCCACCTGACTTTTCCA	198	56.8
质粒	IncB/O	F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC R: TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA	159	60
	IncFIC	F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262	60
	IncP	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534	60
	IncFIIA	F: CTGTCGTAAGCTGATGGC R: CTCTGCCACAAACTTCAGC	270	60
	IncFIA	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	60
	IncFIB	F: GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702	60
	IncI1	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139	60
	IncFrep	F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG R: GAAGATCAGTCACACCATCC	270	60
	IncN	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	60
	IncL/M	F: GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785	60

3. 结果

3.1. 剖检观察

剖检发现：病鸡肝肿大，有出血点，出现灰白色坏死灶；肾肿大，内有尿酸盐沉着，呈斑驳状；心冠状脂肪有出血点，有些鸡的心内外膜出血；脾肿大，充血；肠黏膜充血，以小肠部位最为明显；卵泡充血、变形、萎缩。根据该病理变化初步判断病鸡为细菌性感染。

3.2. 病原菌分离鉴定

从发病鸡的肝、脾、肾和心脏中分离出 4 株疑似病原菌。普通琼脂培养基上，分离株菌落呈圆形，中等大小，边缘光滑整齐，呈灰白色(图 1(a))；在伊红美蓝培养基(图 1(b))和麦康凯培养基(图 1(d))上菌落大小相近，呈光滑的圆形，中心微隆起；在 SS 培养基(图 1(c))上呈光滑的圆形菌落，但菌落较小。革兰

氏染色发现, 分离株呈革兰氏阴性, 呈两端钝圆的短杆状。经 16Sr RNA 基因测序比对, 该 4 种分离株与肠炎沙门氏菌有很高的相似性, 序列相似性均在 99% 以上。

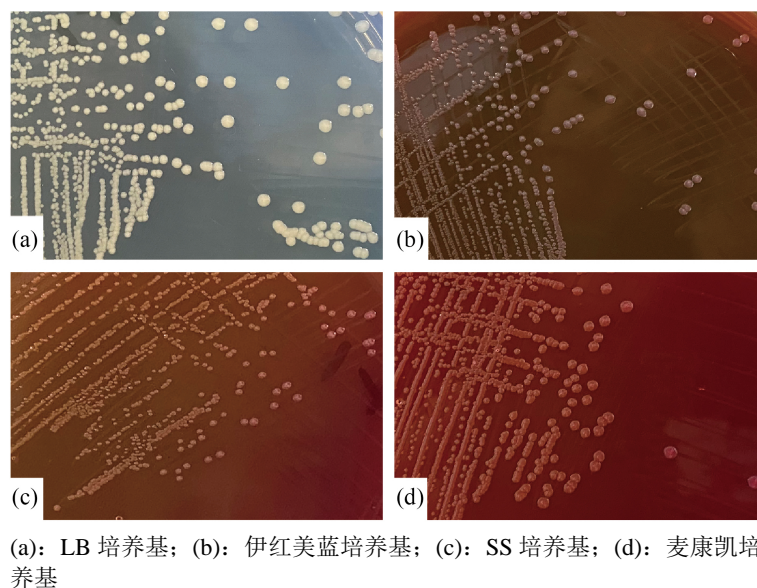


Figure 1. Colony morphology of the isolates on different mediums
图 1. 分离株在不同培养基上的菌落形态

3.3. 耐药基因携带情况

分离株(F1、F2、F3、F4)耐药元件的检测结果见表 2。分离株 F1、F2、F4 均携带 5 种耐药基因, F3 携带 7 种耐药基因。*bla*_{TEM}、*tetB* 和 I 类整合子的检出率最高(均为 100%), 其次为 *bla*_{CTX-M-2} (为 75%)。未检测到 *bla*_{CTX-M-1}、*bla*_{NDM}、*CLR5* 和 *sulA*。在质粒检测方面: 从 F1 和 F4 中检测到了 *IncP*、*IncFIIA*; 从 F2 中检测到了 *IncFIB*、*IncI1* 和 *IncFrep*; 从 F3 中检测到了 *IncFIC*、*IncFIB*、*IncI1* 和 *IncFrep*。

由上述结果可以看出, 本次分离株可能为多重耐药菌株。此外, 从分离株中还检测到了整合子和质粒等移动元件, 说明该养殖场环境中存在耐药基因的水平转移或克隆转移现象, 在疾病治疗和饲养管理过程中需合理用药, 注重耐药性的产生和转移问题。

Table 2. Resistance element test results

表 2. 耐药元件检测结果

耐药元件	F1	F2	F3	F4	耐药元件	F1	F2	F3	F4
<i>bla</i> _{SHV}	+	-	-	+	<i>sulA</i>	-	-	-	-
<i>bla</i> _{TEM}	+	+	+	+	I 类整合子	+	+	+	+
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	-	-	-	-	<i>IncB/O</i>	-	-	-	-
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	+	-	+	+	<i>IncFIC</i>	-	-	+	-
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	-	+	+	-	<i>IncP</i>	+	-	-	+
<i>bla</i> _{CTX-M-8/25}	+	-	-	+	<i>IncFIIA</i>	+	-	-	+
<i>bla</i> _{NDM}	-	-	-	-	<i>IncFIA</i>	-	-	-	-
<i>CLR5</i>	-	-	-	-	<i>IncFIB</i>	-	+	+	-

Continued

<i>tetA</i>	-	+	+	-	IncI1	-	+	+	-
<i>tetB</i>	+	+	+	+	IncFrep	-	+	+	-
<i>sul1</i>	-	-	+	-	IncN	-	-	-	-
<i>sul2</i>	-	+	+	-	IncL/M	-	-	-	-

注：表格中“+”表示 PCR 检测阳性，“-”表示 PCR 检测阴性。

4. 分析与讨论

肠炎沙门氏菌病是家禽中最常见的人兽共患病之一，造成了重大经济损失。每年，全球因沙门氏菌感染引起约 9300 万例胃肠炎病例和 15.5 万人死亡[1]。多项研究探讨了肠沙门氏菌作为最重要的食源性病原体所带来的风险，认为与禽产品污染直接关联[2] [3] [4] [5]。蛋鸡养殖场中沙门氏菌的污染尤为严峻，主要原因有以下几个方面：1) 沙门氏菌可发生垂直传播，致使孵化雏鸡发生感染，并污染孵化器、饲料和饮水等，难以根除该病原菌；2) 沙门氏菌病还可通过消化道、眼结膜等途径发生水平传播，进而感染周边的健康群体[6] [7]；3) 健康动物携带沙门氏菌，可在各种应激条件下诱发该病。早在 1989 年文其乙等[8]成功从病死鸡肝脏中分离出病原沙门氏菌，发病鸡的肝肿大呈古铜色或充血，表面可见坏死灶。戴亚斌等[9]从沙门氏菌病病鸡中不仅观察到了肝病变，还发现其胆囊、脾脏肿大坏死灶，腹腔积液，内脏发生黏连，肠黏膜充血，卵巢病变明显，呈全身性病变趋势。本研究通过对蛋鸡养殖场发病鸡进行剖检观察，发现各脏器病变情况与上述沙门氏菌感染相似，初步诊断为细菌性感染，进而对病原菌进行分离鉴定，通过菌落形态、分离株染色及 16SrDNA 扩增测序，最终确诊此次发病是由肠炎沙门氏菌感染引起的。

沙门氏菌易产生多药耐药[10] [11] [12] [13]。本研究中，对分离株的耐药基因进行了 PCR 检测，发现 4 株分离株可能是多药耐药菌，其中，一株分离株携带 7 种耐药基因，提示目前细菌耐药性非常严重，在临床治疗过程中需基于药敏试验来选择合适的治疗用药，不可盲目用药，以避免耐药性的产生和扩散。研究表明萘啶酸和氨苄青霉素是家禽生产链中耐药水平最高的两种抗生素[2]。值得注意的是，本研究中 4 株肠炎沙门氏菌均不携带多粘菌素类耐药基因。多粘菌素是由多粘类芽孢杆菌产生的一类多肽类抗生素，对大多数革兰氏阴性菌具有强大的抗菌作用[14]，因此，可考虑使用多粘菌素类抗生素来治疗该养殖场病鸡。然而，为避免因多粘菌素的过度或长期使用使细菌产生相应的耐药性，在实践中需合理用药[15]。另外 4 株分离菌均携带多种移动元件，提示其耐药性有高度转移的风险，应引起重视。

集约化养鸡场应注重加强饲养管理，饲养密度过高、通风不良、气候聚变等因素均可诱发鸡沙门氏菌病。一旦发病，快速诊断并提出有效治疗方案是养殖场防控疾病的当务之急[16]。本研究采用基因扩增测序技术鉴定出了致病菌的种类，并对分离株的耐药元件进行了 PCR 检测，明显缩短了常规细菌分离鉴定和药敏试验所用的时间，能较快地诊断病因，并为治疗提供参考建议。随着测序成本的下降，全基因组测序技术不断地应用于疾病的诊断、流行病学调查和病原体溯源等，相信在以后的疾病诊断中，全基因组测序技术会得到广泛的应用。

参考文献

- [1] Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., *et al.* (2010) The Global Burden of Non-typhoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, **50**, 882-889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- [2] Castro-Vargas, R.E., Herrera-Sánchez, M.P., Rodríguez-Hernández, R. and Rondón-Barragán, I.S. (2020) Antibiotic Resistance in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry: A Global Overview. *Veterinary World*, **13**, 2070-2084. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2070-2084>

- [3] El-Saadony, M.T., Salem, H.M., El-Tahan, A.M., Abd El-Mageed, T.A., Soliman, S.M., Khafaga, A.F., *et al.* (2022) The Control of Poultry Salmonellosis Using Organic Agents: An Updated Overview. *Poultry Science*, **101**, Article ID: 101716. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101716>
- [4] Latash, J., Greene, S.K., Stavinsky, F., Li, S., McConnell, J.A., Novak, J., *et al.* (2020) Salmonellosis Outbreak Detected by Automated Spatiotemporal Analysis—New York City, May-June 2019. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **69**, 815-819. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6926a2>
- [5] Zamil, S., Ferdous, J., Zannat, M.M., Biswas, P.K., Gibson, J.S., Henning, J., *et al.* (2021) Isolation and Antimicrobial Resistance of Motile *Salmonella enterica* from the Poultry Hatchery Environment. *Veterinary Research Communications*, **45**, 277-284. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09807-1>
- [6] 贾立达. 蛋鸡沙门氏菌病的流行病学、临床症状、剖检变化和防控措施[J]. 现代畜牧科技, 2019(7): 62-63.
- [7] Wibisono, F.M., Wibisono, F.J., Effendi, M.H., *et al.* (2020) A review of Salmonellosis on Poultry Farms: Public Health Importance. *Systematic Reviews in Pharmacy*, **11**, 481-486.
- [8] 文其乙, 张如宽, 朱雁. 40 例鸡沙门氏菌病病原分离与鉴定[J]. 中国家禽, 1989(1): 30-31.
- [9] 戴亚斌, 陈宗椿, 陈应江. 蛋鸡沙门氏菌病的诊治[J]. 中国兽医杂志, 1994(4): 30-31.
- [10] 李廷翠, 严红亚, 常志顺, 李珂, 覃袖伟, 赵蓉, 信爱国. 云南蛋鸡源肠炎沙门氏菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 82-92.
- [11] 沈海燕, 郭慧霞, 许学斌, 周恒, 刘志成, 张春红. 上海市零售禽肉制品和活禽中沙门氏菌血清型与耐药性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(11): 263-266.
- [12] 李娜, 刘辉, 李健, 刘铭, 姜慧钰, 陈潇, 等. 济南市腹泻患者沙门氏菌 PFGE 分子分型及耐药特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(10): 893-897+902.
- [13] 苏战强, 马晓玉, 张毅, 张凌, 艾柯代·吐鲁洪, 佟盼盼. 新疆某种鸡场蛋鸡沙门氏菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 动物医学进展, 2021, 42(11): 60-64.
- [14] 黄晨, 肖永红. 多粘菌素临床应用与困局[J]. 医药导报, 2020, 39(1): 10-16.
- [15] Blázquez, J., Rodríguez-Beltrán, J. and Matic, I. (2018) Antibiotic-Induced Genetic Variation: How It Arises and How It Can Be Prevented. *Annual Review of Microbiology*, **72**, 209-230. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062139>
- [16] 高志平. 鸡沙门氏菌病流行病学及防控[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2021(8): 64-65.