

免疫抑制性病毒感染肉鸡群继发大肠杆菌的分离鉴定及多样性研究

据思迪¹,董宣¹,赵鹏¹,李阳¹,孟凡峰¹,孙鹏¹,董向磊²,高崧²,崔治中^{1*}

(1. 山东农业大学动物科技学院,泰安 271018;2. 扬州大学兽医学院,扬州 225009)

摘要:旨在了解免疫抑制性病毒感染肉鸡群后继发大肠杆菌的血清型及其耐药性的多样性。用J亚群禽白血病毒与禽网状内皮增生症病毒感染或共感染1日龄商品代肉鸡,对两次重复试验中发生细菌感染而导致死亡的鸡进行麦康凯培养基分离培养。每个病变脏器各随机挑取5个红色菌落或(及)白色菌落,并分别进行生化试验、血清型鉴定和药敏试验。结果从58只呈现肝炎或(和)心包炎的死亡鸡中分离到典型的红色菌落445个,白色菌落71个。经生化试验鉴定,516个菌落均为大肠杆菌。O抗原血清型鉴定结果表明,这些菌落分别属于12个不同的血清型。对12种常用抗生素的药敏试验(药敏片法和试管稀释法)结果表明,共感染能在较短时间内引起典型的大肠杆菌病,并引起较高的死亡率。从516个大肠杆菌中挑选的17组菌落(来自同一病鸡、同一脏器且经鉴定为同一血清型的5个菌落定义为一组菌落)的试管药敏试验的比较表明,第3组的5个菌落对黏杆菌素的最小抑菌质量浓度的范围为0.05~51.20 mg·mL⁻¹;第17组菌落对丁胺卡那的最小抑菌质量浓度从0.05到51.20 mg·mL⁻¹,均相差1000倍。同一群鸡肝周炎和心包炎的大肠杆菌分离株的高度多样性,证明这是在病毒感染诱发免疫抑制状态下发生条件性致病菌的继发性细菌感染。鸡群中大肠杆菌在耐药性上的多样性,是鸡群在不合理应用抗生素的条件下体内大肠杆菌迅速产生耐药菌株的遗传基础。

关键词:免疫抑制性病毒;肉鸡;大肠杆菌;血清型;耐药性

中图分类号:S852.612

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2014)11-1858-08

Isolation, Identification and Diversity Study of *Escherichia coli* from Broilers Infected with Immunosuppressive Viruses

JU Si-di¹, DONG Xuan¹, ZHAO Peng¹, LI Yang¹, MENG Fan-feng¹,
SUN Peng¹, DONG Xiang-lei², GAO Song², CUI Zhi-zhong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: This study aimed to investigate the diversity of serotype and drug resistance of *E. coli* from the secondary infection of broilers that primarily infected by immunosuppressive viruses. *E. coli* isolates derived from one-day-old broilers single-infected or co-infected with avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) and reticuloendotheliosis virus (REV) were isolated, identified and used for drugs sensitivity experiment. Five red or (and) white clones were picked from the diseased organs. Results showed that 516 *E. coli* isolates were isolated from 58 diseased chickens and identified from two repeated experiments including 445 red colonies and 71 white colonies. Results also reveal that the co-infection could infect more serious mortality and among these 516 tested *E. coli* colonies, 12 serotypes of O-antigen were identified. *E. coli* of different serotypes was even isolated

收稿日期:2014-04-08

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201203055)

作者简介:据思迪(1990-),女,山东诸城人,硕士生,主要从事分子病毒学的研究,E-mail:jusidiapple@163.com

*通信作者:崔治中,教授,E-mail:zccui@sdau.edu.cn

from the same organ in the same bird. Then 17 groups of colonies (5 same O-serotype colonies isolated from the same organ in the same bird were identified as a group of colonies) were selected to drug susceptibility test for 12 kinds of common antibiotics. The results showed that the minimum inhibitory concentration was from 0.05 to 51.20 mg · mL⁻¹ in the third group to colimycin and from 0.05 to 51.20 mg · mL⁻¹ in the seventeen group to amikacin. However, differences in the other groups were not significant. The high-degree diversity of *E. coli* isolated from our experiments proved that the infection was the secondary *E. coli* infection. It was happened in the immunosuppression condition under the viruses infection. At the same time, the diversity of drug resistance is the genetic basis for resistant strains rapidly generated from the *E. coli in vivo* under the condition of irrational use of antibiotics.

Key words: immunosuppressive viruses; broilers; *E. coli*; serotype; drug resistance

鸡大肠杆菌病是由某些血清型大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 引起的急性或慢性传染病的总称,各品种各日龄的鸡均可发病,临床上表现为败血症、肝周炎和心包炎等^[1-2],该病既是鸡原发性疾病,又可成为支原体和病毒感染以及环境因素的继发病^[3],造成高发病率和死亡率,是近年来养鸡业发病率最高,危害最严重的疾病之一,给养鸡业造成了极大的经济损失。

寄生于健康人和动物肠道内的大肠杆菌,正常情况下是不致病的,在特定条件下才引起大肠杆菌病,只有少数大肠杆菌与人和动物疾病密切相关^[4]。近几年随着中国集约化养鸡业的不断发展,大肠杆菌病的发生呈上升趋势,并发现多种过去认为不致病的血清型也能引起鸡的大肠杆菌病,国内报道能致病的血清型已有 60 余种^[5],呈现多样化的趋势。本实验室之前的研究发现,一些免疫抑制性疾病(如 ALV-J 和 REV)的单独感染或共感染可以在短时间内继发大肠杆菌的感染,并造成较大的发生率^[6]。

抗菌药是治疗动物疾病、维持健康和生产的重要工具^[7],同样也是促进动物和人类耐药性微生物产生、选择和传播的重要因素^[8-9]。细菌耐药性和耐药机制是非常复杂的问题,既有病原生物学方面的原因,也有人类社会、行为与财富损失管理方面的原因。当前国内外报道的研究进展显示细菌耐药性的产生机制还没有一个完全一致的观点,主要有以下几种观点:①基因水平,细菌可通过自身基因的突变、染色体垂直传播和质粒或转座子水平传播而获得耐药性基因,还可通过整合子捕获外源基因并使之转变为功能性基因来传播耐药性基因^[10-11];②蛋白质水平,细菌无论对杀菌或抑菌药物都可以形成耐药性,其耐药表型借助蛋白质的改变而表现^[12];

③细菌的耐药特性,细菌耐药性具有交叉耐药与多重耐药(MDR)的特性^[13]。

作者通过 J 亚群禽白血病病毒(avian leukosis virus subgroup J, ALV-J)与禽网状内皮增生症病毒(reticuloendotheliosis virus, REV)共感染继发的大肠杆菌为模型研究细菌多样性问题。解释了疾病产生的多样性及存在的持续、反复问题,为进一步研究分析耐药机制及制定合理有效的抗生素使用规范提供理论参考数据。

1 材料与方法

1.1 毒株和主要试剂

NX0101 株(GenBank accession No. DQ115805) ALV-J 是 2001 年由本实验室从宁夏回族自治区某父母代种鸡场分离到^[14],经 IFA 鉴定表明无 REV 污染。HA9901 株(GenBank accession No. AY842951) REV 是 1999 年本实验室从中国江苏省的肉用型父母代具有免疫抑制的病鸡中分离到^[15],经 IFA 鉴定无 ALV-J 污染。NX0101 株 ALV-J 在每 0.1 mL DF1 细胞上清液中含有 10^{4.5} TCID₅₀。HA9901 株 REV 在每 0.1 mL 的 CEF 细胞上清液中含有 10^{4.5} TCID₅₀。

麦康凯干粉培养基、普通琼脂、普通肉汤,均购自青岛高科园海博生物技术有限公司。克林霉素、G-青霉素、左旋氧氟沙星、阿莫西林、阿奇霉素、强力霉素、头孢噻唑、头孢拉定、氟苯尼考、丁胺卡那、头孢曲松、黏杆菌素均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 试验设计

1 日龄健康商品代罗斯 308 肉鸡随机分为 5 组:REV 组、ALV-J 组、REV+ALV-J(大剂量组)、

REV+ALV-J(小剂量组)和空白对照组。前3周,5个组分别饲养在不同的带有正压过滤的隔离罩中,3周后转移到5个不同的房间中。1日龄时,REV组每只鸡腹腔注射REV病毒稀释液0.2 mL和PBS 0.2 mL,约400 TCID₅₀·只⁻¹;ALV-J组腹腔接种ALV-J病毒稀释液0.2 mL和PBS 0.2 mL,约3 000 TCID₅₀·只⁻¹;REV+ALV-J(大剂量组)腹腔接种REV病毒稀释液0.2 mL和ALV-J病毒稀释液0.2 mL,分别相当于400和3 000 TCID₅₀·只⁻¹;REV+ALV-J(小剂量组)腹腔接种REV病毒和ALV-J病毒的量分别相当于200和1 500 TCID₅₀·只⁻¹。对照组注射0.4 mL生理盐水(分2次注射)。为了保证试验的准确性,本试验重复2次。共饲养6周,将6周内出现肝周炎或心包炎等典型大肠杆菌病变的死鸡作为病料,所有菌株均来自患鸡。

1.3 大肠杆菌的分离培养

无菌取典型病死鸡的心、肝表面的包裹物等病料,划线接种于麦康凯培养基平板上,37℃培养18 h,然后挑取麦康凯琼脂平板上粉红色单个菌落,每个病变脏器挑取5个单菌落,不足5个的将该平板上的单菌落全部挑取,纯培养后穿刺保存。另个别有白色菌落的一并挑取保存并于三糖铁琼脂37℃培养24 h后观察进行鉴定^[16]。

1.4 生化试验

将分离菌株接种于葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、吡啶、MR、VP、枸橼酸盐等细菌生化微量鉴定管中,37℃培养18~24 h,观察并记录生化反应结果。

1.5 大肠杆菌O血清型的鉴定

参照中国兽医药品监察所大肠杆菌“O”抗原定型血清使用说明完成鉴定。所有分离株首先经玻板凝集试验初步筛选可能的O血清型,然后通过试管凝集试验确定其O血清型。定型标准为血清的试管凝集价达到原血清“O”效价的1/2以上^[17-18]。

1.6 大肠杆菌药物敏感性试验

1.6.1 药敏片法比较菌株对抗生素的抗药性
从分离到的大肠杆菌中挑选17组。每组是分属于同一病鸡的相同脏器相同血清型的5个单菌落的集合。取菌液100 μL滴于普通琼脂培养基表面,用无菌L棒涂布使其覆盖整个培养基表面,待琼脂表面干燥后,用无菌镊子取12种抗生素纸片,分别对称地贴到培养基表面(每个平皿贴6种纸片),37℃培

养18~24 h后观察结果,测量各个抑菌圈直径,根据抑菌圈直径位于CLSI规定的敏感(susceptible, S)、中介(intermediate, I)、耐药(resistance, R)折点值范围判断结果^[19]。

1.6.2 试管稀释法比较部分菌株对某些抗生素的易感性
为了提高药敏试验结果的可靠性,对于在抑菌圈试验中,抑菌圈直径相差较大的菌株针对某一特定药物进一步做细菌试管敏感试验(MIC法)。药物敏感性检测按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的操作程序进行^[20]。

2 结果

2.1 REV和ALV-J单独感染或共感染对肉鸡死亡率和继发大肠杆菌死亡率的影响

试验1中,对照组有8.1%的死亡率,ALV-J组有13.5%的死亡率,REV组有37%的死亡率,而两个共感染组的死亡率分别是41.9%和51.4%。在试验2中,对照组、ALV-J组、REV组的死亡率分别是8.6%、16.7%、30%,共感染小剂量组的死亡率为39%,共感染大剂量组为46.7%。两次结果汇总后可以看出(表1),共感染小剂量组和REV单独感染组与空白对照组和ALV-J组差异显著($P < 0.05$),而共感染小剂量组与REV单独感染组差异不显著($P > 0.05$)。共感染大剂量组与两个单独感染组均差异显著($P < 0.05$)。

试验过程中,剖检死鸡会发现很高比例的鸡出现肝周炎和心包炎。试验1中,经过麦康凯培养基培养后,白色菌落31个,红色菌落共253个。经生化鉴定,分离到的284株均为大肠杆菌(包括白色菌落)。空白对照组的大肠杆菌死亡率为8.1%,ALV-J组、REV组、REV和ALV-J共感染小剂量组、共感染大剂量组的死亡率分别为1.9%、3.7%、22.6%、18.1%。试验2中,经过麦康凯培养基培养后,白色菌落40个、红色菌落共192个。经鉴定,分离到的232株均为大肠杆菌(包括白色菌落)。空白对照组的大肠杆菌死亡率为0%,ALV-J组、REV组、REV和ALV-J共感染小剂量组、共感染大剂量组的死亡率分别为7.1%、12.5%、17.1%、18.3%。2次试验的汇总结果显示(表1),共感染小剂量组继发大肠杆菌引起的死亡率显著高于单独感染组和对照组($P < 0.05$),但共感染大剂量组与REV单独感染组之间的差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 REV 和 ALV-J 单独感染和共感染对于肉鸡死亡率和继发大肠杆菌死亡率的影响

Table 1 The influence of single infection and co-infection of REV and ALV-J on mortality

只·组⁻¹

组别 Group	死亡数/总数(死亡率/%) Death count/Total count (Mortality)			继发大肠杆菌死亡数/总数(死亡率/%) Death count of <i>E. coli</i> secondary infection/ Total count (Mortality)		
	试验 1 * Exp. 1 *	试验 2 Exp. 2	汇总 Summary	试验 1 * Exp. 1 *	试验 2 Exp. 2	汇总 Summary
	空白对照组 Control	3/37(8.1) ^A	3/35(8.6) ^A	6/72(8.3) ^A	3/37(8.1) ^{AB}	0/35(0.0) ^A
ALV-J 组	7/52(13.5) ^A	7/42(16.7) ^{AB}	14/94(14.9) ^A	1/52(1.9) ^A	3/42(7.1) ^{AB}	4/94(4.3) ^A
REV 组	10/27(37.0) ^B	12/40(30.0) ^{BC}	22/67(32.8) ^B	1/27(3.7) ^{AC}	5/40(12.5) ^B	6/67(9.0) ^{AB}
REV+ALV-J 小剂量组	26/62(41.9) ^B	16/41(39.0) ^C	42/103(40.8) ^{BC}	14/62(22.6) ^B	7/41(17.1) ^B	21/103(20.4) ^C
REV+ALV-J(L)						
REV+ALV-J 大剂量组	37/72(51.4) ^B	28/60(46.7) ^C	65/132(49.2) ^C	13/72(18.1) ^{BC}	11/60(18.3) ^B	24/132(18.2) ^{BC}
REV+ALV-J(H)						

* 同一列数据上标字母不同代表差异显著($P < 0.05$)* Averages without a superscript letter in common are significantly different from one another within a column ($P < 0.05$) based on Chi-square test

2.2 血清型鉴定结果

对 2 次试验中分离到的 516 个菌落的大肠杆菌进行血清学鉴定表明,这些大肠杆菌表现出血清型多样性,甚至来自同一病鸡的血清型也不相同。两次试验挑取和鉴定的 516 个大肠杆菌中,定型的细菌共有 408 株,分别属于 10 个不同的血清型,其中, O24(26.9%)、O15(24.6%)、O29(16.9%)、O142(3.5%)和 O7(2.9%)为主要的流行血清型,其他还有 O21、O51、O6、O74、O71 等 5 种血清型。另外,有 91 株自己发生凝集,17 株与 157 种 O 抗原的标准血清都不凝集。其中,试验 1 的 31 株白色菌落中 29 株(93.5%)为 O24,2 株(6.5%)为 O71;试验 2 的 40 株白色菌落中 20 株(50%)为 O24,20 株(50%)自己发生凝集。

对来自同一只鸡同一脏器的 5 个菌落的血清型结果也表明,不仅同一只鸡从肝或心包分离到的大肠杆菌可能属于不同血清型,甚至同一脏器中也分离到不同血清型的大肠杆菌。在 58 只死亡鸡中,35 只同时表现肝周炎和心包炎,有 5 只鸡从肝周炎和心包炎同时分离到的大肠杆菌属不同血清型。有 51 例显示心包炎,其中 4 只鸡从同一个心包炎中分离的 5 个菌落属于不同血清型;在 43 只表现肝周炎的鸡中,有 1 只分离的 5 个菌落属于不同血清型。

2.3 药物敏感性试验

2.3.1 药敏片法比较菌株对抗生素的抗药性 对 12 种药敏片进行抑菌圈试验结果显示,来自同一病鸡同一脏器的属于同一血清型的 5 个单菌落,他们的耐药性并不是完全一致的,存在一定的差异,有的易感,有的耐药。其中,第 5 组的差异尤其明显,5 个单菌落分别对于克林霉素、左旋氧氟沙星、丁胺卡那、头孢曲松呈现出显著不同的耐药性。具体结果见表 2。

2.3.2 药敏片法与试管稀释法比较部分菌株对某些抗生素的易感性 为了更准确地比较来自同一个体的不同菌落的对抗生素的敏感性,又选择一部分菌落群对一些药物做了更准确的试管药敏试验。根据抑菌圈直径大小的差异,从 17 组菌落中(每组是分属于同一病鸡的相同脏器相同血清型的 5 个单菌落的集合)挑选 11 组分别对应特定的某一种抗生素进行药物敏感试验,测定其最小抑菌质量浓度。其中第 3 组菌落对黏杆菌素的最小抑菌质量浓度的范围为 0.05 ~ 51.20 mg · mL⁻¹,易感性的高低相差 1 000 倍;第 17 组菌落对丁胺卡那的最小抑菌质量浓度从 0.05 到 51.20 mg · mL⁻¹,也相差 1 000 倍。其他各组虽然差异不如上述显著,但也有明显差异。具体见表 3。这些结果表明,即使是来自同一只鸡的同一肝周炎或心包炎病变的 5 个大肠杆菌菌落中,虽然血清型相同,但在对某些抗生素的敏感性方面已发生了显著的变异。

表 2 药敏片法比较 17 组菌落对 12 种抗生素的耐药性

Table 2 The comparison of 17 groups of colonies aimed at 12 kinds of antibiotics in antimicrobial susceptibility testing

菌落 Bacterial colony		抗生素 Antibiotics											
组别 Group	血清型 Serotype	克林霉素 Clindamycin	青霉素 G PenicillinG	左氧氟沙星 Levofloxacin	阿莫西林 Amoxicillin	阿奇霉素 Azithromycin	强力霉素 Doxycycline	头孢噻吩 Cefthiofur	头孢拉定 Cefradine	氟苯尼考 Florfenicol	丁胺卡那 Amikacin	头孢曲松 Ceftriaxone	黏杆菌素 Colimycin
1	O29	2/3/0*	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	4/1/0
2	O24	1/4/0	5/0/0	4/1/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	2/1/2	5/0/0	4/1/0
3	O142	3/2/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	3/2/0	5/0/0	4/1/0
4	O29	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	4/1/0
5	O6	2/1/2	4/1/0	3/1/1	5/0/0	4/0/1	4/0/1	4/0/1	5/0/0	5/0/0	3/1/1	3/1/1	4/1/0
6	O24	0/4/1	5/0/0	0/1/4	5/0/0	5/0/0	5/0/0	0/2/3	4/1/0	5/0/0	2/2/1	0/1/4	3/2/0
7	O15	5/0/0	5/0/0	4/1/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	0/2/3	5/0/0	5/0/0	3/1/1	0/2/3	4/1/0
8	O15	1/4/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	4/0/1	4/1/0	4/1/0
9	O15	4/1/0	5/0/0	4/1/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	2/3/0	5/0/0	4/1/0
10	O15	4/1/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	4/1/0	5/0/0	4/1/0
11	O15	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	3/2/0
12	O15	4/1/0	5/0/0	4/1/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0
13	O24	2/3/0	5/0/0	3/2/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	4/1/0
14	O15	1/4/0	5/0/0	4/1/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	3/2/0	5/0/0	5/0/0
15	O15	4/1/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	3/2/0	5/0/0	5/0/0
16	O15	5/0/0	5/0/0	4/1/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	5/0/0	3/2/0	5/0/0	5/0/0
17	O51	3/2/0	5/0/0	3/0/2	5/0/0	5/0/0	5/0/0	1/1/3	5/0/0	3/2/0	3/2/0	0/2/3	3/2/0

每个菌落组是指来自同一鸡同一脏器而且血清型相同的 5 个单菌落的集合。下表同

* “a/b/c”表示的是对于同一抗生素的不同耐药程度的菌落数目。“a”代表耐药的菌落数,“b”代表中介的菌落数,“c”代表敏感的菌落数

The colony group referred to 5 same O-serotype colonies isolated from the same organ in the same bird. The same as below

* The “a/b/c” was on behalf of the drug resistance situation. “a” represents the number of drug resistant colonies, “b” represents the intermediated strains and “c” represents the sensitive colonies

表 3 用药敏片法与试管稀释法比较部分菌落对某些抗生素的易感性

Table 3 The antibacterial circle diameter and the minimum inhibitory concentration (MIC) of some colonies aimed at specific antibiotics in antimicrobial susceptibility testing

抗生素 Antibiotic	组别 Group	菌落 1 Bacterial colony 1		菌落 2 Bacterial colony 2		菌落 3 Bacterial colony 3	
		最小抑菌 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) MIC	抑菌圈直径/cm Inhibition zone diameter	最小抑菌 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) MIC	抑菌圈直径/cm Inhibition zone diameter	最小抑菌 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) MIC	抑菌圈直径/cm Inhibition zone diameter
左氧氟沙星 Levofloxacin	1	0.40	7	0.10	7	0.40	11
	7	0.40	7	0.80	12	0.40	10
黏杆菌素 Colimycin	3	0.05	11	0.05	10	51.20	7
	4	0.05	12	0.05	12	0.05	11
	9	0.05	10	0.10	12	0.05	14
	10	0.05	14	0.05	7	0.05	11
	16	0.10	13	0.20	7	0.10	13
头孢曲松 Ceftriaxone	5	0.10	13	0.40	11	0.20	14
	8	0.40	7	0.20	11	0.10	7
	15	0.20	10	0.20	7	0.10	7
丁胺卡那 Amikacin	17	3.20	7	0.05	11		
抗生素 Antibiotic	组别 Group	菌落 4 Bacterial colony 4		菌落 5 Bacterial colony 5			
		最小抑菌质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) MIC	抑菌圈直径/cm Inhibition zone diameter	最小抑菌质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) MIC	抑菌圈直径/cm Inhibition zone diameter		
左氧氟沙星 Levofloxacin	1	0.10	11	0.40	9		
	7	0.40	15	0.80	7		
黏杆菌素 Colimycin	3	0.05	12	0.05	11		
	4	0.05	11	0.05	11		
	9	0.05	7	0.10	11		
	10	0.05	12	0.05	10		
	16	0.10	14	0.10	13		
头孢曲松 Ceftriaxone	5	0.10	12	0.40	10		
	8	0.10	7	0.20	7		
	15	0.10	7	0.20	7		
丁胺卡那 Amikacin	17	51.20	8	0.05	11		

3 讨论

鸡大肠杆菌病既是鸡原发性疾病,又可成为支原体和病毒感染以及环境因素的继发病,造成高发病率和死亡率,是近年来养鸡业发病率最高,危害最严重的疾病之一,给养鸡业造成了极大的经济损失^[21]。高璐等^[22]研究了低致病性禽流感与大肠杆菌的协同致病作用,发现 MPAIV 和 *E. coli* 间存在协同致病作用,这种协同机制可能与因 MPAIV 的感染导致一定程度的免疫抑制并进而促进了 *E. coli* 在体内的定居和繁殖有关。本实验室经过多年动物试验观察和总结,发现多种免疫抑制病毒病的单独感染和共感染能够引起肉鸡的大肠杆菌病,剖检可见典型的心包炎和腹膜炎^[6]。

本试验中,经过 2 次 ALV-J 和 REV 的共感染 1 日龄商品代肉鸡试验证实共感染能在较短时间内引起典型的大肠杆菌病,并引起较高的感染率和死亡率。经过本实验室多年的试验条件摸索,ALV-J 攻毒剂量为每只鸡 3 000 TCID₅₀ 较为合适,然而,由于 1 日龄攻毒 REV 剂量过大会造成后期死亡鸡过多,影响试验样本量,最终作者选择的剂量为每只鸡 400 TCID₅₀。同时,作者设计了一个共感染小剂量组,攻毒剂量均减半,来更好地比较 REV 与 ALV-J 共感染引起的继发大肠杆菌感染的情况。从表 1 的结果可以看出,共感染小剂量组、REV 单独感染组与空白对照组和 ALV-J 组差异显著($P < 0.05$),而共感染小剂量组与 REV 单独感染组差异不显著($P > 0.05$)。共感染大剂量组与两个单独感染组均差异显著($P < 0.05$)。在继发大肠杆菌引起的死亡率方面,共感染小剂量组的死亡率显著高于两个单独感染组和对照组($P < 0.05$),但共感染大剂量组的死亡率虽显著高于 ALV-J 单独感染组和对照组,但与 REV 单独感染组之间的差异不显著($P > 0.05$)。推测可能的原因是因为共感染大剂量组引起了大量的死亡率,使免疫抑制的鸡在继发大肠杆菌发病之前已经死亡,而共感染小剂量组恰恰能够很好的引起免疫抑制但不导致快速死亡,这也从另一个角度说明了这种继发感染与两种病毒造成的免疫抑制有很大关系。

许多属种大肠杆菌是人和动物体内正常内源菌群,寄生于人和动物肠道中^[21]。只有少数大肠杆菌与人和动物的疾病密切相关,病原性大肠杆菌正常情况下极少存在于健康机体内。本研究从 ALV-J 和 REV 共感染引起继发大肠杆菌病的肉鸡体内共

分离挑取了 516 株大肠杆菌。该 516 株大肠杆菌分别属于 10 个不同的血清型,其中以 O24、O15、O29、O142、O7 为主要流行血清型。其中还有 91 株自己出现凝集,17 株与所有诊断血清皆不出现凝集现象。我们还观察到,即使是同一病鸡同一脏器分离到的 5 个克隆的 O 抗原的血清型也存在多样性,其中有 4 例心包炎和 1 例肝周炎上的 5 个克隆分别属于不同血清型。

本研究从每只病鸡的同一病变脏器上取 5 个大肠杆菌克隆,从分离到的大肠杆菌中挑出 17 组取自相同病鸡相同脏器的同一血清型的菌落进行药敏试验,药敏试验结果显示虽然取自同一病鸡同一脏器的相同血清型的 5 个菌株,其药物敏感性是不一致的,为了进一步确定对药物敏感性的差异,作者选取了 11 组分别对应特定的某一种抗生素进行药物敏感试验(MIC),结果发现其中第 3 组菌株对黏杆菌素的最小抑菌质量浓度的范围为 0.05 ~ 51.20 mg · mL⁻¹;第 17 组菌株对丁胺卡那的最小抑菌质量浓度为 0.05 ~ 51.20 mg · mL⁻¹,高低相差高达 1 000 倍,即使它们是取自同一病鸡同一脏器的 5 个克隆。显然,菌落间对抗生素的敏感性已发生了改变。同时,在试验过程中发现,药敏片法和试管稀释法的试验结果存在一定的偏差,可能是由于药敏片法的均一性较差引起的,最终以试管稀释法的结果为准。这也提示在临床过程中,不能单纯以药敏片法的结果为最终依据。

本试验从选择性培养基形态鉴别、O 抗原血清型以及耐药性三方面说明,在由免疫抑制性病毒 REV 和 ALV 感染特别是它们的共感染引起免疫抑制时,由此诱发的肝周炎和心包炎中分离到的大肠杆菌存在着高度多样性。这表明,这些大肠杆菌性肝周炎和心包炎大多是条件致病性大肠杆菌引起的继发性感染。因为,一种特定的致病菌不可能在同一发病鸡群中显示如此的多样性,这充分显示了鸡体内环境中大肠杆菌的多样性。作者着重比较研究了大肠杆菌耐药性的多样性。这是第一次对来自一个鸡群一定时期内甚至同一个体的同一脏器分离到的大量大肠杆菌耐药性的多样性比较。本研究不仅证明了在同一鸡群中存在对许多不同抗生素耐药性差异很大的大肠杆菌,而且即使在不用抗生素的条件下也可能出现自发性的对某种抗生素有高度耐药性的菌株,如同对黏杆菌素和丁胺卡那高度耐药的菌株。因此,一旦鸡群使用某种抗生素,在这种抗生素的选择作用下,对该抗生素耐药的菌株就会成

为该鸡群或鸡场的优势菌群。中国是畜牧养殖业大国,用药特点和模式与其它国家有很大差异,这为病原变异的多样性提供了便利条件。

综上所述,由免疫抑制性病毒感染或共感染所继发的大肠杆菌不仅在 O 抗原血清型方面表现多样性,而且在耐药性方面也存在着高度的多样性,即使在本试验过程中从来没有用过任何抗生素。显然,如此多样的细菌不大可能都是特异性致病菌,而是在鸡群免疫抑制状态下才表现致病作用的条件致病性大肠杆菌。在本试验中显示的大肠杆菌在 O 抗原和耐药性方面的多样性反映了在临床健康鸡群内或环境中存在的大肠杆菌的多样性。

4 结 论

J 亚群禽白血病毒与禽网状内皮增生症病毒感染或共感染 1 日龄商品代肉鸡,共感染能在较短时间内引起典型的大肠杆菌病,并引起较高的死亡率。用麦康凯培养基分离继发大肠杆菌菌株,从 58 只呈现肝周炎或(和)心包炎的死亡鸡中分离到典型的红色菌落 445 个,白色菌落 71 个。分别进行生化试验、血清型鉴定和药敏试验,516 个菌落均为大肠杆菌,分别属于 12 个不同的血清型。部分菌落对黏杆菌素或丁胺卡那的最小抑菌质量浓度的范围为 0.05 ~ 51.20 mg · mL⁻¹,均相差 1 000 倍。分离大肠杆菌在 O 抗原血清型方面和耐药性方面存在高度的多样性。

参考文献:

- [1] CALNEK B W. 禽病学 [M]. 高 福,刘文军,译. 9 版. 北京:北京农业大学出版社,1991:126-133.
- [2] DHO-MOULIN M, FAIRBROTHER J M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) [J]. *Vet Res*, 1999,30(2-3):299-316.
- [3] BLANCO J E, BLANCO M, MORA A, et al. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain) [J]. *Vet Microbiol*, 1998,31:229-235.
- [4] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2001:215-223.
- [5] 张春荣,苏亚拉图. 我国流行的鸡致病性大肠杆菌血清型[J]. *中国动物检疫*, 1996,13(1):27-27.
- [6] 崔治中. 鸡群中免疫抑制性病毒的共感染及其相互作用——对新城疫和禽流感疫苗免疫反应的抑制作用[J]. *中国动物检疫*, 2007,24(10):45-48.
- [7] YANG H, CHEN S, WHITE D G, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China[J]. *J Clin Microbiol*, 2004,42(8):3483-3489.
- [8] NEU H C. The crisis in antibiotic resistance[J]. *Science*, 1992,257(5073):1064-1073.
- [9] WITTE W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture[J]. *Science*, 1998,279(5353):996-997.
- [10] ALEKSHUN M N, LEVY S B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance[J]. *Cell*, 2007,128(6):1037-1050.
- [11] SUNDE M, NORSTRÖM M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006,58(4):741-747.
- [12] 丁元廷. 细菌耐药机制的国内外最新研究进展[J]. *现代预防医学*, 2013,40(6):1109-1111.
- [13] 吕晓菊. 细菌耐药的机制与对策[J]. *临床内科杂志*, 2007,24(5):295-297.
- [14] CUI Z, DU Y, ZHANG Z, et al. Comparison of Chinese field strains of avian leukosis subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains[J]. *Avian Dis*, 2003,47(4):1321-1330.
- [15] WANG Y, CUI Z Z, JIANG S. Sequence analysis for the complete proviral genome of reticuloendotheliosis virus Chinese strain HA9901[J]. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2006,49(2):149-157.
- [16] 成大荣,朱善元,钱金梅,等. 不发酵或迟发酵乳糖型禽大肠埃希菌的分离鉴定[J]. *动物医学进展*, 2009,30(5):28-31.
- [17] CHEN X, GAO S, JIAO X A, et al. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China[J]. *Vet Microbiol*, 2004,103(1-2):13-20.
- [18] 陈 祥,高 崧,王 雷,等. 华东地区致初生仔猪腹泻大肠杆菌的 O 血清型和毒力因子[J]. *微生物学报*, 2004,44(1):96-100.
- [19] JIANG H, LV D, CHEN Z, et al. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China[J]. *Vet J*, 2011,187(1):99-103.
- [20] WATTS J L. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard; NCCLS documents M31-A[S]. NCCLS, 1999.
- [21] 宋 立,宁宜宝,张秀英,等. 中国不同地区家禽大肠杆菌血清型分布和耐药性比较研究[J]. *中国农业科学*, 2005,38(7):1466-1473.
- [22] 高 璐,胡仁莉,陈 祥,等. SPF 鸡人工感染禽源大肠杆菌、H9 亚型禽流感病毒后的体液免疫应答和死亡率分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2006,37(9):899-902.