

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.12.03

# 盐源县部分养鸭场主要病原菌分离鉴定 及其耐药性分析

周厚继<sup>1</sup>, 郑 敏<sup>2</sup>, 汪德生<sup>2\*</sup>

(1.四川省盐源县职业技术中学校, 四川盐源 615700; 2.贵州大学动物疫病研究所, 贵阳 550025)

[收稿日期] 2017-05-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 12-0013-06 [中图分类号] S852.61

**[摘 要]** 为掌握养鸭场病原菌种类及其耐药情况, 采用传统细菌学方法进行病原菌分离鉴定和药敏试验, PCR 方法进行耐药基因检测, 结果显示: 养鸭场病原菌主要是大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和鸭里默氏杆菌三种; 主要病原菌对 20 种抗菌药呈现多重耐药现象, 在大肠埃希氏菌分离株中检出 TEM 和 CTX-M 耐药基因, 在金黄色葡萄球菌分离株中检出 mecA 和 blaZ 耐药基因。这些结果为盐源县养鸭场细菌性疾病的预防与控制提供了科学依据。

**[关键词]** 养鸭场; 病原菌; 分离鉴定; 耐药性

## Isolation and Identification of Main Pathogenic Bacteria and Its Drug Resistance Analysis in Duck Farms

ZHOU Hou-ji<sup>1</sup>, ZHENG Min<sup>2</sup>, WANG De-sheng<sup>2\*</sup>

(1. Vocational Technical Middle School of Yanyuan County, Sichuan, Yanyuan 615700, China;

2. Institute of Animal Diseases, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Corresponding author: WANG De-sheng, E-mail: zjqzsb110513@163.com

**Abstract:** In order to master the pathogen species and its drug resistance in duck field, the traditional bacteriological method was used to identify the pathogen and drug susceptibility test, and the PCR method was used to detect the drug resistance gene. The results showed that the pathogen is *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Riemerella spp.*; The main pathogens showed multiple drug resistance to 20 kinds of antibiotics, and the TEM and CTX-M resistance genes were detected in *Escherichia coli* isolates, MecA and blaZ resistance genes were detected in *Staphylococcus aureus* isolates. These results provide a scientific basis for the prevention and control of bacterial diseases in Yanyuan county.

**Key words:** duck farm; pathogen; isolation and identification; drug resistance

作者简介: 周厚继, 中教高级教师, 从事畜牧兽医方面教学与科研工作。

通讯作者: 汪德生。E-mail: zjqzsb110513@163.com。

随着鸭养殖业的规模化与集约化发展,鸭传染性疾病已成为阻碍养鸭业发展的重要因素<sup>[1]</sup>。引起养鸭场发生鸭传染性疾病的病原微生物主要有细菌、病毒和寄生虫等,但以细菌感染最为常见<sup>[2]</sup>。养鸭场为防止细菌性疾病的发生与流行,常采用抗菌药拌料饲喂或直接肌内注射等,特别是有些抗菌药作为添加剂,可用来预防细菌性疾病和促进动物生长发育。目前,抗菌药广泛应用导致的细菌耐药性问题,已成为全世界关注的热点。据世界卫生组织统计,全世界生产的抗菌药有 50% 以上用于畜禽和水产养殖中,且很多养殖场认为只要加大剂量和延长使用,即可控制细菌性疾病的发生与流行。而小剂量与长时间给药,实际上是细菌耐药性的诱导过程;细菌耐药性可通过耐药质粒等传递给其他菌株,并通过污染环境、水源、食品或人与动物直接接触而传给人,严重影响人类健康。本研究拟通过对养鸭场菌的分离鉴定、耐药性分析和耐药基因检测,以期为养鸭场细菌性疾病的预防与控制提供科学依据。

## 1 材料与方法

1.1 主要药品和试剂 细菌培养基、革兰氏染色试剂、细菌生化培养管、细菌药敏纸片,购自杭州微生物试剂有限公司;琼脂糖、DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR Master Mix、DL2000 Marker、GoldView 核酸染料,购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 病料来源与实验动物 病死鸭内脏器官(如心、肝、脾、肾等)等组织病料,采自盐源县部分规模

养鸭场;实验动物 BALB/c 鼠,购自西昌学院动物医学实验教学示范中心。

1.3 病原菌分离鉴定 无菌采集病死鸭组织病料,划线接种于细菌培养基,37 ℃ 厌氧培养 48 h,观察细菌生长情况;挑取单个菌落进行纯培养后,取细菌纯培养物进行革兰氏染色镜检、生理生化鉴定和动物感染试验,分析致病菌种类。

1.4 病原菌耐药性分析 取已鉴定的细菌分离物,接种液体培养基,取细菌液体培养物 150 μL,均匀涂布于营养琼脂平板,待自然凉干后,贴上药敏纸片,37 ℃ 厌氧培养 48 h,测定抑菌圈直径并记录,分析分离细菌的耐药情况。

1.5 病原菌耐药性基因检测 设计和合成埃希氏菌 β-内酰胺酶 TEM、CTX-M 和 SHV 耐药基因引物以及葡萄球菌 β-内酰胺类 mecA 和 blaZ 耐药基因引物,提取细菌培养物 DNA 样本,采用 PCR 扩增,1.0% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察和分析结果。

## 2 结果与分析

2.1 病死鸭细菌分离培养与染色镜检 无菌采集病死或濒死鸭的内脏器官组织,划线接种于营养琼脂培养基上,采用厌氧或兼性厌氧法进行培养,37 ℃ 培养 24~48 h 观察,结果如图 1 所示。

从图 1 结果可看出,在巧克力营养琼脂平板上可见圆形、边缘整齐、乳白色、光滑的菌落;在鲜血琼脂平板上形成凸起、边缘整齐、透明、有光泽、无溶血的菌落。挑取单个菌落进行革兰氏染色,于光学显微镜下观察,部分结果如图 2 所示。

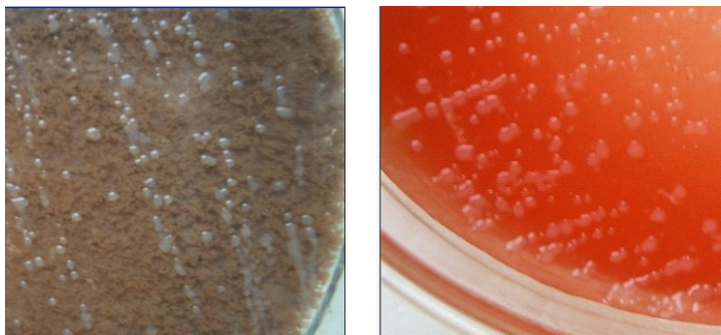


图 1 部分病死鸭组织样本细菌分离培养结果

Fig 1 The isolated culture results of bacteria from the partial diseased duck tissue samples



图 2 部分分离细菌革兰氏染色结果

Fig 2 The Gram staining results of partial isolated bacteria

2.2 分离细菌鉴定结果 挑取单个菌落进行纯培养后,接种细菌生化管,培养 48 h 观察分离细菌发酵情况,并结合其菌落形态特点和菌体染色特征,判定分离细菌种类,结果如表 1 所示。

表 1 养鸭场分离细菌鉴定结果

Tab 1 The identification results of isolated bacteria in duck farm

| 分离菌株<br>种类 | 心脏或心血 |      | 肝脏 |      | 脾 脏 |      | 肾 脏 |      | 心包膜或<br>心包液 |      | 气囊 |      | 总计 137 株 |       |
|------------|-------|------|----|------|-----|------|-----|------|-------------|------|----|------|----------|-------|
|            | 株数    | 比例/% | 株数 | 比例/% | 株数  | 比例/% | 株数  | 比例/% | 株数          | 比例/% | 株数 | 比例/% | 株数       | 分离率/% |
| 埃希氏菌       | —     | —    | 31 | 53.4 | 15  | 25.9 | 12  | 20.7 | —           | —    | —  | —    | 58       | 42.34 |
| 葡萄球菌       | 12    | 25.5 | 16 | 34.0 | —   | —    | 11  | 23.4 | 8           | 17.0 | —  | —    | 47       | 34.31 |
| 里默氏杆菌      | 3     | 21.4 | —  | —    | —   | —    | —   | —    | 5           | 35.7 | 6  | 42.9 | 14       | 10.22 |
| 变形杆菌       | —     | —    | 5  | 71.4 | —   | —    | —   | —    | —           | —    | 2  | 28.6 | 7        | 5.11  |
| 耶尔森菌       | —     | —    | —  | —    | 1   | 25.0 | 3   | 75.0 | —           | —    | —  | —    | 4        | 2.92  |
| 枸橼酸杆菌      | —     | —    | 1  | 25.0 | —   | —    | 3   | 75.0 | —           | —    | —  | —    | 4        | 2.92  |
| 假单胞菌       | —     | —    | —  | —    | 2   | 66.7 | 1   | 33.3 | —           | —    | —  | —    | 3        | 2.19  |

由表 1 结果可知,从规模养鸭场病死鸭病料组织中分离出 7 个属 137 株菌,其中主要是埃希氏菌属细菌(58 株)、葡萄球菌属细菌(47 株)和里默氏杆菌属细菌(14 株),分离率分别为 42.34%、34.31%和 10.22%。随机选取埃希氏菌 30 株、葡萄球菌 30 株和里默氏杆菌 10 株的液体培养物,接种 BALB/c 鼠,结果发现分离的细菌均能致死 BALB/c 鼠,致死率分别为 40%、40%和 20%。

2.3 养鸭场病原菌耐药性检测结果 取分离的主要病原菌(即埃希氏菌 30 株、葡萄球菌 30 株和里默氏杆菌 10 株)液体培养物进行药敏试验,结果如

表 2 所示。

从表 2 结果可知,养鸭场主要病原菌均有不同程度的耐药现象,其中埃希氏菌分离株对青霉素 G、阿莫西林、头孢曲松、头孢噻肟、先锋霉素、四环素、乙酰螺旋霉素、环丙氟哌酸、磺胺甲基异恶唑和林可霉素的耐药率达 100%;葡萄球菌分离株对青霉素 G、头孢噻肟、先锋霉素、四环素、红霉素、乙酰螺旋霉素、阿奇霉素和氟苯尼考的耐药率达93.3%;里默氏杆菌分离株对青霉素 G、阿莫西林、卡那霉素、链霉素、红霉素、阿奇霉素、磺胺甲基异恶唑和氟苯尼考的耐药率达 100%。

表 2 规模养鸭场主要病原菌药敏试验结果

Tab 2 The results of drug susceptibility test of the main pathogens in scale duck farms

| 抗生素类型  | 抗生素名称   | 埃希氏菌分离株 |       | 葡萄球菌分离株 |       | 里默氏杆菌分离株 |       |
|--------|---------|---------|-------|---------|-------|----------|-------|
|        |         | 耐药株数    | 耐药率/% | 耐药株数    | 耐药率/% | 耐药株数     | 耐药率/% |
| β-内酰胺类 | 青霉素 G   | 30      | 100   | 28      | 93.3  | 10       | 100   |
|        | 阿莫西林    | 30      | 100   | 6       | 20.0  | 10       | 100   |
|        | 头孢曲松    | 30      | 100   | 8       | 26.7  | 8        | 80    |
|        | 头孢噻肟    | 30      | 100   | 28      | 93.3  | 8        | 80    |
|        | 先锋霉素    | 30      | 100   | 28      | 93.3  | 4        | 40    |
|        | 庆大霉素    | 12      | 40.0  | 0       | 0     | 8        | 80    |
| 氨基糖苷类  | 卡那霉素    | 18      | 60.0  | 0       | 0     | 10       | 100   |
|        | 链霉素     | 20      | 66.7  | 16      | 53.3  | 10       | 100   |
|        | 新霉素     | 12      | 40.0  | 0       | 0     | 2        | 20    |
| 四环素类   | 四环素     | 30      | 100   | 28      | 93.3  | 2        | 20    |
|        | 强力霉素    | 28      | 93.0  | 20      | 66.7  | 4        | 40    |
|        | 红霉素     | 24      | 80.0  | 28      | 93.3  | 10       | 100   |
| 大环内酯类  | 乙酰螺旋霉素  | 30      | 100   | 28      | 93.3  | 8        | 80    |
|        | 阿奇霉素    | 8       | 26.7  | 28      | 93.3  | 10       | 100   |
| 喹诺酮类   | 诺氟沙星    | 24      | 80    | 14      | 46.7  | 8        | 80    |
|        | 环丙氟哌酸   | 30      | 100   | 14      | 46.7  | 8        | 80    |
| 磺胺类    | 磺胺甲基异恶唑 | 30      | 100   | 22      | 73.3  | 10       | 100   |
| 多肽类    | 多粘菌素 B  | 4       | 13.3  | 10      | 33.3  | 8        | 80    |
| 林可胺类   | 林可霉素    | 30      | 100   | 0       | 0     | 8        | 80    |
| 氯霉素类   | 氟苯尼考    | 28      | 93.3  | 28      | 93.3  | 10       | 100   |

根据养鸭场主要病原菌(埃希氏菌、葡萄球菌和里默氏杆菌)对 20 种抗生素的耐药情况进行统计分析,结果如表 3 所示。

由表 3 结果可知,养鸭场主要病原菌均存在多重耐药现象,其中埃希氏菌分离株多重耐药现象最为严重,呈现 13 重以上耐药;里默氏杆菌分离株多重耐药现象次之,以 9~12 重常见;葡萄球菌分离株多重耐药现象相对较少,以 5~12 重耐药为主。

2.4 养鸭场主要病原菌耐药基因检测

2.4.1 埃希氏菌 β-内酰胺酶耐药基因检测 选取 30 株埃希氏菌分离株培养物,提取细菌质粒 DNA 作为模板,采用 β-内酰胺酶耐药基因引物进行 PCR 扩增,结果如图 3 所示。

从图 3 结果可看出,在 30 株埃希氏菌分离株

中,可检测到 β-内酰胺酶 TEM 型耐药基因(1080 bp)和 CTX-M 型耐药基因(585 bp),检出率分别为 46.7%(14/30)和 100%(30/30),而未检测到 β-内酰胺酶 SHV 型耐药基因。

2.4.2 葡萄球菌 β-内酰胺酶基因检测 选取 30 株葡萄球菌分离株培养物,提取细菌质粒 DNA 作为模板,采用 β-内酰胺类耐药基因(mecA 耐药基因和 blaZ 耐药基因)引物进行 PCR 扩增,结果如图 4 所示。

从图 4 结果可看出,在 30 株葡萄球菌分离株中,可检测到 β-内酰胺类 mecA 耐药基因(1847 bp)和 blaZ 耐药基因(800 bp),检出率分别为 13.3%(4/30)和 60.0%(18/30)。

表 3 养鸭场病原菌多重耐药性分析结果

Tab 3 The analysis results of multiple drug resistance of pathogen in duck farms

| 多重耐药数 | 埃希氏菌分离菌 (n=30) |        | 葡萄球菌分离菌 (n=30) |        | 里氏杆菌分离菌 (n=10) |        |
|-------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
|       | 菌数             | 耐药比例   | 菌数             | 耐药比例   | 菌数             | 耐药比例   |
| 5 重   | —              | —      | 2              | 6.7 %  | —              | —      |
| 6 重   | —              | —      | 4              | 13.3 % | —              | —      |
| 7 重   | —              | —      | 4              | 13.3 % | —              | —      |
| 8 重   | —              | —      | 4              | 13.3 % | —              | —      |
| 9 重   | —              | —      | 2              | 6.7 %  | 2              | 6.7 %  |
| 10 重  | —              | —      | 8              | 26.7 % | 2              | 6.7 %  |
| 11 重  | —              | —      | 4              | 6.7 %  | 4              | 13.3 % |
| 12 重  | —              | —      | 2              | 6.7 %  | 2              | 6.7 %  |
| 13 重  | 2              | 6.7 %  | —              | —      | —              | —      |
| 14 重  | 2              | 6.7 %  | —              | —      | —              | —      |
| 15 重  | 4              | 13.3 % | —              | —      | —              | —      |
| 16 重  | 10             | 33.3 % | —              | —      | —              | —      |
| 17 重  | 12             | 40.0 % | —              | —      | —              | —      |

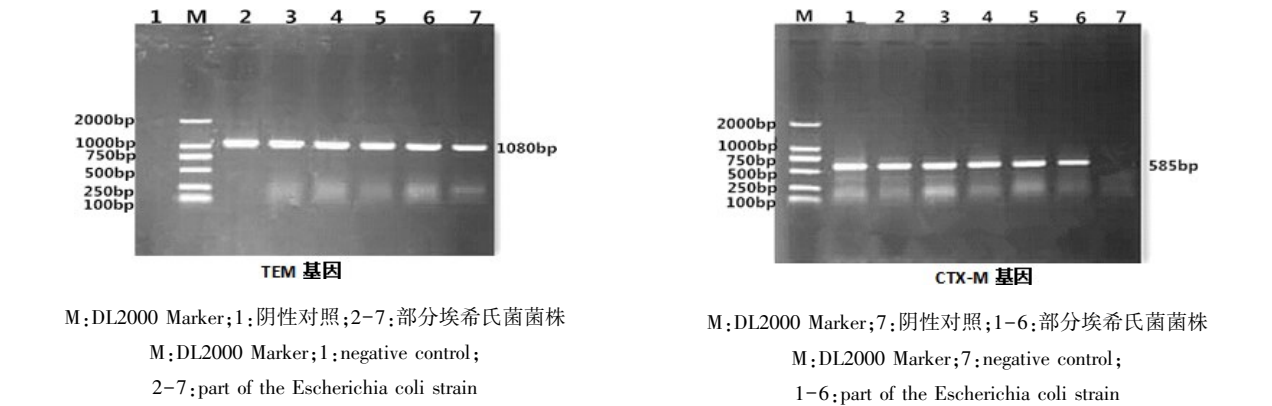


图 3 部分埃希氏菌菌株 β-内酰胺酶耐药基因 PCR 结果

Fig 3 The PCR results of part of the Escherichia coli strain β-lactamase resistance gene

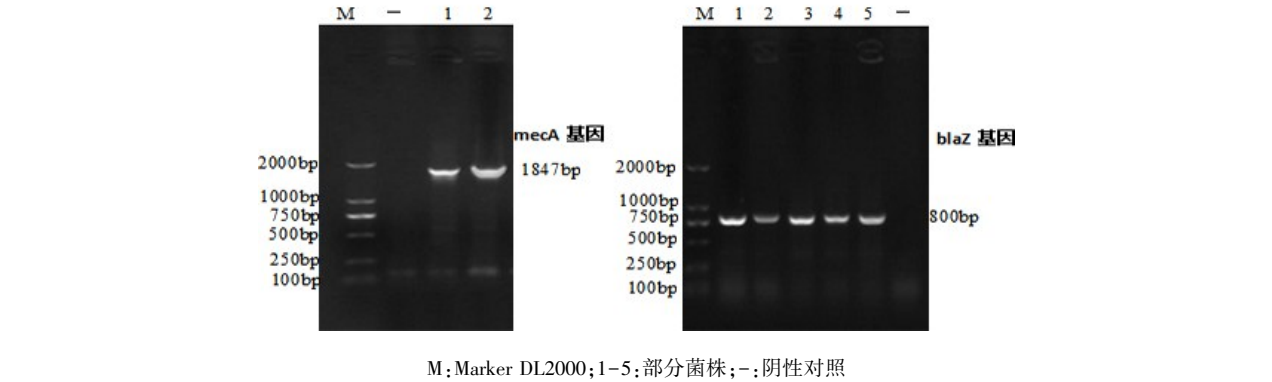


图 4 葡萄球菌部分菌株 β-内酰胺酶基因 PCR 结果

Fig 4 The β-lactamase gene PCR results of part of Staphylococcus

### 3 讨论与小结

随着养鸭业规模化与集约化发展,鸭传染性疾病的发生也日益频繁,特别是细菌性疾病,常给养鸭场造成严重的经济损失<sup>[3]</sup>。引起养鸭场发生细菌性疾病的病原较多,有埃希氏菌、葡萄球菌、里默氏杆菌等,但不同地区分离的病原菌有所不同,例如邓伯雄等<sup>[4]</sup>在四川省凉山州规模养鸭场中分离鉴定的致病菌主要是大肠埃希氏菌;杨军等<sup>[5]</sup>对广西和湖北部分规模养鸭场病死鸭分离得到的病原菌主要是葡萄球菌;陈俊等<sup>[6]</sup>在重庆等地区规模养鸭场发病鸭中分离出的主要是沙门氏菌;邹宇靖等<sup>[7]</sup>对江苏省等地区规模养鸭场调查发现里默氏杆菌是主要病原菌。本研究从盐源县养鸭场病死鸭组织病料中分离出的细菌较多,包括 7 个属细菌,其中主要是埃希氏菌、葡萄球菌和里默氏杆菌,说明盐源县养鸭场的病原菌较为复杂,混合感染的可能性比较大。

为预防和控制细菌性疾病的发生与流行,一个主要措施是应用抗生素拌料饲喂或肌内注射。但随着抗菌药的广泛应用,细菌耐药现象不断增多。张济培等<sup>[8]</sup>对广东省水禽大肠埃希氏菌耐药性调查发现,其耐药率高达 81.58%,说明大肠埃希氏菌对多数抗菌药已普遍产生了耐药性。本研究发现,盐源县养鸭场分离的主要病原菌耐药性较高,其中埃希氏菌分离株对 10 种抗菌药的耐药率达 100%;里默氏杆菌分离株对 8 种抗菌药的耐药率达 100%;葡萄球菌分离株对 8 种抗生素的耐药率为 93.3%,且这三种主要病原菌均呈现多重耐药现象。细菌产生耐药性的原因很多,但最常见的是细菌本身携带耐药基因。本研究发现,规模养鸭场分离出的三种病原菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素( $\beta$ -lactam antibiotics)的耐药最为常见。因此选取埃希氏菌和葡萄球菌分离株进行  $\beta$ -内酰胺耐药基因检测,结果发现,埃希氏菌分离株主要存在 CTX-M 型和 TEM 型  $\beta$ -内酰胺耐药基因,而葡萄球菌分离株则主要存在 mecA 型和 blaZ 型耐药基因。这些研究结果为盐源县养鸭场细菌性疾病的预防与控制提供了科学依据。

### 参考文献:

- [1] 陈溥言. 兽医传染病学(第五版)[M]. 北京:中国农业出版社,2011.  
Chen F Y. Veterinary Epidemiology (Fifth edition) [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2011.
- [2] 张大丙. 当前鸭病流行现状及防控对策[J]. 中国家禽, 2012, 34(7): 38-40.  
Zhang D B. Present Situation and Control Countermeasures of Current Duck Disease[J]. China Poultry, 2012, 34(7): 38-40.
- [3] 林安,喻元,胡岚岚,等. 鸭源大肠杆菌和沙门菌混合感染的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(4): 45-47.  
Lin A, Yu Y, Hu L L, et al. Isolation, Identification and Drug Sensitivity Test of Mixed Infection of *Escherichia coli* and *Salmonella* in Duck[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2012, 48(4): 45-47.
- [4] 邓伯雄,刘情,邓安元,等. 鸭致病性大肠杆菌分离鉴定及其相关致病性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(1): 235-241.  
Deng B X, Liu Q, Deng A Y, et al. Isolation, Identification and Related Pathogenicity Analysis of Duck Pathogenic *E. Coli* [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 43(1): 235-241.
- [5] 杨军. 鸭源葡萄球菌分离鉴定、毒力基因检测及与致病性相关性分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2014.  
Yang J. Isolation, Identification, Virulence Gene Detection of Ducks Staphylococci and Pathogenicity on Ducks[D]. Wuhan: Hua Zhong agricultural university, 2014.
- [6] 陈俊,蒋文灿,程平,等. 四川和重庆地区鸭源沙门氏菌分离鉴定及血清型分析[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(4): 262-265.  
Chen J, Jiang W C, Cheng P, et al. Isolation, Identification and Serotype Analysis of Salmonella from Ducklings and Dead Duck-embryos in Sichuan and Chongqing [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2015, 37(4): 262-265.
- [7] 邹宇靖,丁志国,李军朝,等. 鸭疫里默氏杆菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 6: 114-115.  
Zhou Y J, Ding Z G, Li J C, et al. Isolation and Identification of *Riemerella Anatipestifer* [J]. Heilongjiang Animal Science And veterinary Medicine, 2016, 6: 114-115.
- [8] 张济培,韦庆兰,谭华龙,等. 广东水禽源大肠埃希氏菌耐药性及氨基糖苷类耐药基因研究[J]. 动物医学进展, 2016, 37(5): 42-46.  
Zhang J P, Wei Q L, Tan H L, et al. Investigation on Aminoglycosides Antibiotics Resistance and Resistance Genes of *Escherichia coli* Isolated from Waterfowl in Guangdong Province[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(5): 42-46.