doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.12.05

市售鸡蛋壳表面携带 β-内酰胺酶耐药基因假单胞菌的分离鉴定

杜金泽,吕 琴,金晓晓,王 硕,黄海龙*,马红霞*

(吉林农业大学动物科学技术学院,长春 130118)

[收稿日期] 2018-04-04 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2018) 12-0030-05 [中图分类号]S852.61

[摘 要] 为研究鸡蛋壳表面携带耐药细菌的情况,选取吉林省四家蛋鸡养殖场内新鲜鸡蛋,采取传统细菌学方法从鸡蛋壳表面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,成功分离鉴定出 4 株嗜麦芽窄食假单胞菌;抑菌试验结果显示,分离菌对环丙沙星敏感,对林可霉素、氟苯尼考、阿米卡星中敏感,对头孢曲松、阿莫西林、多粘菌素 E 不敏感;在 4 株假单胞菌分离株中检出 CTX-M 型 β-内酰胺酶耐药基因。此结果为进一步研究假单胞菌对蛋鸡养殖的危害和食品卫生安全提供了试验依据。

[关键词] 鸡蛋壳;分离鉴定;假单胞菌;抑菌试验;β-内酰胺酶

Isolation and Identification of *Pseudomonas* Carrying β-lactamase Resistant Gene on the Surface of Egg Shell

DU Jin-ze, LV Qin, JIN Xiao-xiao, WANG Shuo, HUANG Hai-long*, MA Hong-xia*

(*College of Animal Science and Technology*, *Jilin Agricultural University*, *Changchun* 130118, *China*)

Corresponding author: *HUANG Hai-long*, *E-mail*: *huanghail@163.com*; *MA Hong-xia*, *E-mail*: *hongxia*0731001@163.*com*

Abstract: In order to study the drug-resistant bacteria on the surface of egg shell, fresh eggs were selected from four chicken farms in Jilin province, 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 from egg shell surface. The results showed that: four strains of *Pseudomonas maltophilia* were successfully isolated and identified. The results of the antibiotic resistance test showed the isolate was highly sensitive to ciprofloxacin; was insensitive to ceftriaxone, amoxicillin, polymyxin, and it had different degrees to other drugs. The CTX-M type β-lactamase resistance genes were detected in *Pseudomonas* isolates. This provides an experimental basis for further study on the harm of *Pseudomonas* in layer culture and food hygiene safety.

Key words: egg shell; isolation and identification; *Pseudomonas*; bacteriostasis test; β-lactamase

---

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0501301);国家自然科学基金(31702293);吉林省科技发展计划项目(20170520074JH)

作者简介: 杜金泽,研究生,从事临床兽医学研究。

通讯作者: 黄海龙, E-mail:huanghail@163.com;马红霞,E-mail:hongxia0731001@163.com

鸡蛋是日常生活中常见的食物,2000 年以来,城市居民人均鸡蛋年消费量保持在 10 kg 以上[1]。全世界每年发生的腹泻病有 1.5 亿人,46.4%是食源性致病菌引起的疾病[2]。假单胞菌是严重危害动物的食源性细菌之一。该菌可引起动物体发生局部或全身不同程度的感染,条件性致病各日龄的蛋鸡,使出壳率下降,导致大量死弱病鸡[3]。陈力力等对鸡蛋壳表面分离的细菌数量及种群结构研究表明,以假单胞菌的分离率最高[4]。为了保护消费者,很多国家法律规定对鸡蛋进行各种消毒措施,如紫外线辐射[5],气态臭氧[6],氯气[7]或热处理[8],以避免主要由假单胞菌、大肠杆菌等引起的疾病感染,使消费者获得安全、卫生的鸡蛋。本试验通过对吉林省四家蛋鸡养殖场不同鸡舍内鸡蛋壳表面细菌的分离培养,最终筛选出耐多粘菌素类和 β-内酰胺类药物的假单胞菌,经测序分析该假单胞菌分离株中携带 CTX-M 型 β-内酰胺酶耐药基因,这在国内外尚属首次发现[8-10]。本研究结果为临床防治蛋鸡假单胞菌病提供了试验依据。

1　材料与方法

1.1　主要培养基及试剂　SS 培养基、Mueller-Hinton 琼脂培养基购自青岛高科园海博生物技术有限公司;麦康凯培养基购自北京奥博星生物技术有限公司;ESBL 显色培养基购自法国科马嘉生物技术有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA Marker DL15000、DNA Marker DL2000、EX Taq PCR MasterMix 购自天根生化试剂(北京)有限公司;革兰氏染液购自南京建成科技有限公司;药敏片购自杭州生物试剂有限公司。

1.2　鸡蛋的选取　选取吉林省某四家蛋鸡场内 13 个不同鸡舍内的鸡蛋,每个鸡舍随机选取 10 枚鸡蛋。

1.3　病原菌的分离　无菌采集鸡蛋壳表面一定面积,划线接种于 LB 固体培养基,37 ℃培养 18 h,观察细菌生长情况。挑取单个菌落进行纯培养后,取细菌纯培养物分别接种于多粘菌素 B 固体培养基、多粘菌素 E 固体培养基、10%兔血琼脂平板、SS 固体培养基、麦康凯固体培养基和 ESBL 固体显色培养基,37 ℃培养 18 h,观察细菌生长情况。对分离菌株进行革兰氏染色镜检,观察细菌染色特性及形态。

1.4　16S rDNA 基因扩增　取菌液按基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA,以其为模板利用 16S rDNA 通用引物进行基因扩增。上游引物:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′;下游引物:5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′。25 μL PCR 体系,扩增条件:95 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,30 个循环后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,观察结果。按照试剂盒步骤对产物回收,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.5　抑菌试验　参照临床实验室标准化协会(CLSI)的标准,利用琼脂纸片扩散法,检测所分离细菌对上述药敏纸片的敏感程度。

1.6　耐药基因检测　采用 CTX-M 引物进行基因扩增,该引物扩增 593 bp 的特异片段。上游引物:5′-GGGCTGAGATGGTGACAAAGAG-3′;下游引物:5′-CGTGCGAGTTCGATTTATTCAAC-3′。25 μL PCR 体系,扩增条件:95 ℃预变性 10 min, 95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,30 个循环后 72 ℃延伸 7 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,观察结果。按照试剂盒步骤对产物回收,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

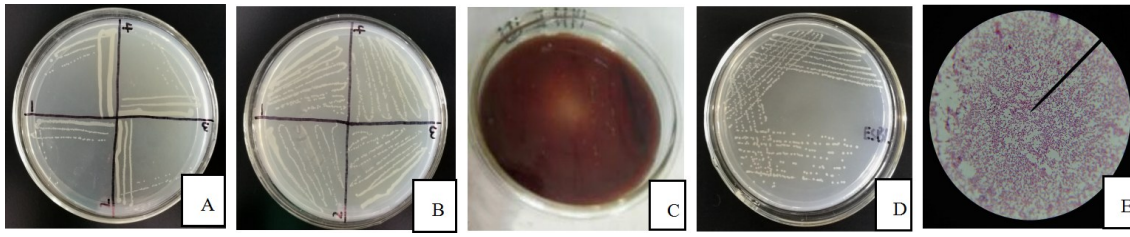
2　结果与分析

2.1　细菌分离培养与镜检　在 LB 固体培养基(图 1 A)和含多粘菌素的固体培养基(图 1 B)上生长为边缘光滑、整齐、菌落黄色、略透明状微隆起的菌落;在 10%兔血琼脂平板上生长为金属色光泽的菌落,周围出现溶血环(图 1 C);在 ESBL 显色固体培养基上生长为半透明状,绿色色素沉淀样的菌落,表明该菌可能产 β-内酰胺酶(图 1 D);镜检可见革兰氏阴性杆菌(图 1 E)。

2.2　细菌基因组 DNA 提取结果　提取的产物通过 1%琼脂凝胶电泳检测,可见一条大于 15000 bp 的明亮条带(图 2)。

2.3　分离菌株的 16S rDNA 基因序列分析　16S rDNA 引物 PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测,在 1500 bp 左右有明亮的条带,与目的条带相符

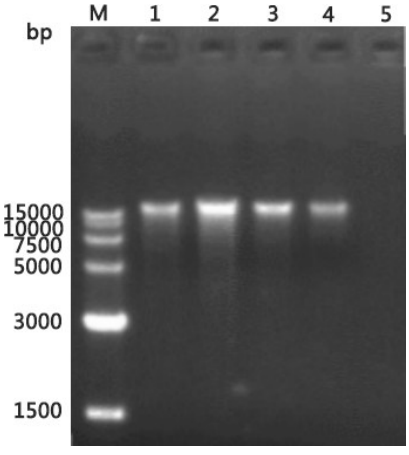
(图 3)。测序得到的核苷酸序列在 NCBI BLAST 数据库中对比分析,结果显示该菌与已知假单胞菌同源性为 95.7%~96.2%(图 4),结合该菌株的培养染色特征,可确定分离菌株为嗜麦芽窄食假单胞菌。



A:LB 固体培养基;B:多粘菌素固体培养基;C:10%兔血琼脂平板;D:ESBL 固体培养基;E:革兰染色镜检(× 1000)

图 1　细菌分离培养与染色镜检结果

Fig 1　Results of bacteria culture and staining

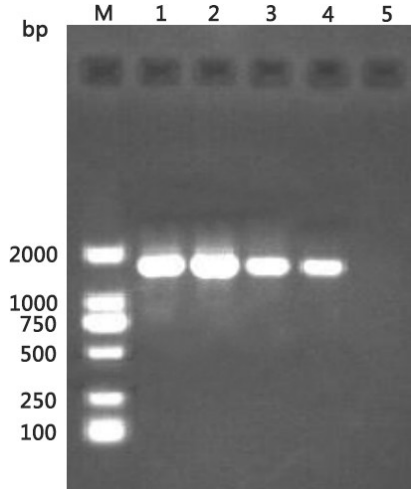


M:DL15000 DNA Marker;1~4:细菌基因组 DNA 提取结果;5:阴性对照

M:DL15000 DNA Marker;1~4: Results of bacterial genome DNA extraction;5:negative control

图 2　细菌基因组 DNA 提取结果

Fig 2　Results of bacterial genome DNA extraction



M:DL2000 DNA Marker;1~4: 16S rDNA PCR 扩增产物;5:阴性对照

M:DL2000 DNA Marker;1~4:PCR results of 16S rDNA gene;5:negative control

图 3　分离菌 16S rDNA PCR 扩增产物

Fig 3　PCR results of 16S rDNA gene from isolated bacteria

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1		99.2	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	95.8	1	JN873340.1
2	0.8		99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	96.3	2	AB550660.1
3	1.1	1.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.7	3	MF144457.1
4	1.1	1.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.7	4	MF144455.1
5	1.1	1.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.7	5	KM388709.1
6	1.1	1.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	95.7	6	KY882122.1
7	1.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	95.7	7	KY882118.1
8	1.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	95.7	8	KY882095.1
9	1.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	95.7	9	KY882081.1
10	1.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		95.7	10	KR067597.1
11	4.3	3.8	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4		11	16S rDNA.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

图 4　分离菌株 16S rDNA 同源性比较

Fig 4　Homology comparison of nucleotide sequences of 16S rDNA gene

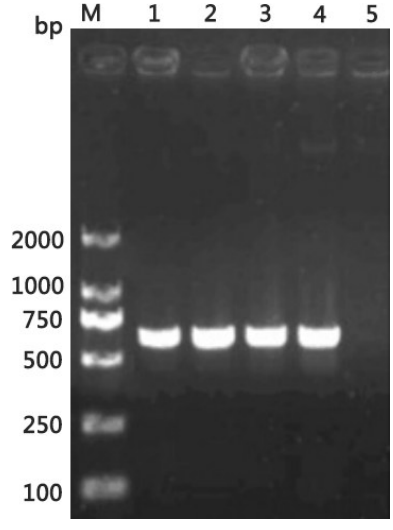
2.4　抑菌试验结果　4 株嗜麦芽窄食假单胞菌同时对头孢曲松、多粘菌素 E、阿莫西林 3 种药物 100%耐药，对环丙沙星 100%高度敏感，对磷霉素 100%中度敏感，对林可霉素、氟苯尼考 75%中度敏感，对阿米卡星 50%中度敏感（表 1）。上述结果表明，该菌对 β-内酰胺类药物（头孢曲松、阿莫西林）和多粘菌素类药物具有很强的耐药性。

表 1　分离菌株抑菌试验结果

Tab 1　The results of isolated strains bacteriostasis test

药物名称	含量（μg/片）	耐药 Rmm	中介 Imm	敏感 Smm	抑菌圈直径/mm			
					菌株 1	菌株 2	菌株 3	菌株 4
头孢曲松	30	≤14	15~17	≥18	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
阿莫西林	20	≤13	14~17	≥18	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
环丙沙星	5	≤15	16~20	≥21	S(30)	S(31)	S(32)	S(34)
多粘菌素 E	300	≤8	9~11	≥12	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
磷霉素	200	≤12	13~15	≥16	S(20)	I(15)	S(21)	S(21)
氟苯尼考	30	≤12	13~17	≥18	I(15)	I(16)	R(12)	I(14)
林可霉素	2	≤13	14~17	≥18	S(21)	R(0)	I(14)	I(17)
丁胺卡那	30	≤14	15~16	≥17	R(0)	I(15)	I(16)	R(0)

2.5　耐药基因检测结果　CTX-M 引物 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，在 593 bp 处有明亮的条带，与目的条带相符（图 5）。说明所分离的 4 株嗜麦芽窄食假单胞菌均携带 β-内酰胺酶耐药基因。



M：DL2000 DNA Marker；1~4：假单胞菌菌株；5.阴性对照

M：DL2000 DNA Marker；1~4：Pseudomonas strain；5：negative control

图 5　β-内酰胺酶基因 PCR 结果

Fig 5　The PCR results of β-lactamase gene

3　结　论

随着生活水平的不断提高，食品安全问题越来越成为人们关注的焦点。由病原微生物引起的食源性疾病是影响食品安全的最主要因素之一。然而，在鸡蛋的生产、运输和保存过程中，很多与蛋壳接触的因素都可能造成鸡蛋的污染，鸡蛋对微生物的侵入虽有一定的自卫能力（如溶菌酶的杀菌作用），但随着贮存时间延长、贮存温度变化，这种能力将会减弱，最后导致有害微生物侵入蛋内并繁殖。近年来，临床上由假单胞菌引起的人和畜禽感染越来越多[9]，而且随着抗生素的过度使用，使其耐药性不断上升，给临床用药带来很大困难。抑菌试验结果表明该假单胞菌分离株的多重耐药性较为严重，对选取的 8 种药敏纸片，最高可达到 5 耐的高度。因此，在临床用药之前必须进行药敏试验，从而提高治疗效果，减少使用无效药物造成的经济损失。在已有文献中，从人血液、鸡肠道内等分离出了携带 CTX-M 型 β-内酰胺酶耐药基因的假单胞菌[10-12]，而本试验从鸡蛋壳表面分离出携带此耐药基因的假单胞菌在国内外尚未见报道。

临床研究证实,CTX-M 型超广谱 β-内酰胺酶是细菌产生耐药性的重要机制[13]。本试验首次从吉林省四家蛋鸡场内鸡蛋壳表面成功分离出 4 株携带 CTX-M 型 β-内酰胺酶耐药基因的嗜麦芽窄食假单胞菌,为进一步研究假单胞菌对蛋鸡养殖的危害和食品卫生安全提供了试验依据,后续试验将扩大样品数量及耐药性的检测,以便更加充分掌握鸡蛋壳表面假单胞菌的相关数据。

参考文献:

[1] 王静怡, 陈珏颖, 刘合光. 中国鸡蛋消费现状和影响因素分析[J]. 农业展望, 2015, 11(1):75-80.
Wang J Y, Chen J Y, Liu H G. China's egg consumption and its influencing factors[J].Agricultural Outlook, 2015, 11(1):75-80.

[2] 李茂军. 食品中食源性致病菌污染状况分析[J]. 科技创新导报, 2015,(10):20-21.
Li M J. Advances on pollution of food-borne pathogens in food [J]. Science and Technology Innovation Herald, 2015,(10):20-21.

[3] 刘有龙. 一例鸡绿脓杆菌病的诊治[J]. 畜禽业, 2016,(9):72-73.
Lu Y W. A case of chicken Pseudomonas disease diagnosis and treatment[J]. Livestock and Poultry Industry, 2016,(9):72-73.

[4]] 陈力力, 杨伊磊, 青文哲, 等. 鸡蛋壳表面细菌数量及种群多样性分析[J]. 现代食品科技, 2015,(10):74-79.
Chen L L, Yang Y L, Qing W Z, *et al*. Aerobic plate count and bacterial diversity on the surface of eggshells[J]. Modern Food Science and Technology, 2015,(10):74-79.

[5] Chavez C, Knape K D, Coufal C D, *et al*. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation [J]. Poultry Science, 2002, 81(8):1132.

[6] Rodriguez-Romo L A, Yousef A E. Inactivation of Salmonella enterica serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation.[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(4):711.

[7] Patterson P H, Ricke S C, Sunde M L, *et al*. Hatching eggs sanitized with chlorine dioxide foam: egg hatchability and bactericidal properties.[J]. Avian Diseases, 1990, 34(1):1.

[8] Manfreda G, Cevoli C, Lucchi A, *et al*. Hot air treatment for surface decontamination of table eggs experimentally infected with Salmonella, Listeria, and Escherichia coli [J]. Veterinary Research Communications, 2010, 34(1):179-182.

[9] 秦绪伟, 白明月. 鸡绿脓杆菌病的诊断与治疗[J]. 山东畜牧兽医, 2017, 38(3):18.
Qin X W, Bai M Y. Diagnosis and treatment of chicken *Pseudomonas aeruginosa* disease [J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, 38(3):18.

[10] Poirel L, Naas T, Nicolas D, *et al*. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate in France.[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(4):891.

[11] Girlich D, Poirel L, Carattoli A, *et al*. Extended-Spectrum β-Lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* Isolates from Healthy Poultry in France[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(14):4681.

[12] Adegoke A A, Stenström T A, Okoh A I. Stenotrophomonas maltophilia as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8(8).

[13] 孙文萱, 田鹏飞, 李 轶,等. 产超广谱 β-内酰胺酶大肠埃希菌 blaCTX-M 基因分型及耐药特征研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(5):972-975.
Sun W X, Tian P F, Li T, *et al*. BlaCTX-M genotypes of extended-spectrum β-lactamases-producing Escherichia coli and characteristics of drug resistance[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2017, 27(5):972-975.

(编 辑:侯向辉)