

范志宇, 魏后军, 仇汝龙, 等. 一株新型家兔肠炎沙门氏菌的分离鉴定及防治[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1367-1371.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.06.026

一株新型家兔肠炎沙门氏菌的分离鉴定及防治

范志宇, 魏后军, 仇汝龙, 胡波, 宋艳华, 陈萌萌, 徐为中, 王辉, 薛家宾, 王芳

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: 针对山东省某兔场发生以仔兔脾脏肿大、母兔流产为特征的传染病, 本研究对发病濒死兔进行细菌分离, 利用 16S rRNA 基因扩增技术、特异性 PCR 技术和生化试验对致病细菌进行鉴定, 并进行了药敏试验和自制疫苗效力试验。分离菌株 16S rRNA 基因序列与肠炎沙门氏菌相似度大于 99.0%, 培养特性和生化特性符合肠炎沙门氏菌特性。分离菌株特异性 PCR 产物序列与肠炎沙门氏菌 *sefA* 基因的同源性为 99.3% ~ 100.0%, 因此将其命名为 *Salmonella* SD/2016。动物回归试验成功复制出该病并分离到目的细菌。自制疫苗安全性良好, 对断奶幼兔能提供免疫保护。

关键词: 兔; 肠炎沙门氏菌; 16S rRNA 基因扩增技术; 特异性 PCR

中图分类号: S829.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)06-1367-05

Isolation, identification and control of a novel *Salmonella enteritidis* strain from rabbit

FAN Zhi-yu, WEI Hou-jun, QIU Ru-long, HU Bo, SONG Yan-hua, CHEN Meng-meng, XU Wei-zhong, WANG Hui, XUE Jia-bin, WANG Fang

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: In February 2016, a novel contagious disease outbreak in a rabbit farm of Shandong province, characterized by splenomegaly of weaning rabbit and abortion of female rabbit. The pathogenic bacteria were isolated and identified by biochemical tests, specific PCR assay, 16S rRNA detection and antimicrobial susceptibility test. The safety and efficiency of the autogenous vaccine were detected as well. The 16S rRNA gene sequences of the isolates shared homologies of 99.0% with that of *Salmonella enteritidis*, and the isolates presented the cultural and chemical characteristic of *S. enteritidis*. The *sefA* gene of the isolates shared 99.3% to 100.0% homology with that of *S. enteritidis*. Therefore, the isolate was named *Salmonella* SD/2016 strain. A similar disease was reproduced in healthy rabbits and mice, and the bacteria were successfully isolated. Self-made vaccine was safe and could provide immune protection to weaning rabbit.

Key words: rabbit; *Salmonella enteritidis*; 16S rRNA gene amplification; specific PCR

收稿日期: 2016-08-29

基金项目: 现代农业产业技术体系建设兔体系病毒病预防与控制岗位项目(CARS-44-C-1); 农业部公益性行业(农业)科研专项项目(201303046)

作者简介: 范志宇(1982-), 男, 山西太谷人, 博士, 助理研究员, 主要从事家兔疾病防治与兽医生物技术研究。
(Tel) 025-84390337; (E-mail) fanzhiyu2007@163.com

通讯作者: 王芳, (E-mail) rwangfang@126.com

肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, SE)属于沙门氏菌属, 是近年来全世界报道力度最大、关注最广的沙门氏菌血清型之一, 它宿主广泛, 能引起人和各种动物的沙门菌病^[1]。有研究结果表明, 大部分人类沙门氏菌感染都与食用了沙门氏菌污染的动物

性食品有关,在中国 70.0%~80.0% 的食源性疾病爆发是由沙门氏菌引起的^[1-3]。肠炎沙门氏菌病可用抗生素治疗,但是长期使用抗生素会造成药物残留等公共卫生问题,且易产生耐药菌株。家兔虽然不是沙门氏菌的主要宿主,而且关于家兔沙门氏菌感染的报道也比较少,但是中国是世界上兔肉生产和出口第一大国,兔肉的食品卫生与安全显得尤为重要。

2016 年 2~5 月期间,山东省某规模化兔场出现仔兔、幼兔死亡,母兔流产、死亡的情况,不同兔舍饲养的家兔发病率不同,发病率较高的为 50.0% 左右,发病率较低的在 10.0% 左右,且几个生产周期都有发病,病死率随仔兔日龄增大逐渐降低,20~25 日龄期间病死率最高,平均病死率约 20.0% 左右。在消毒隔离控制较好的条件下该病传染性不强,呈散发性,曾使用阿奇霉素、替米考星、安普霉素等进行防治,效果欠佳,给养殖场造成了巨大的经济损失。面对此疫情,本研究开展了流行病学、临床症状、剖检病变等调查研究。通过对分离菌株进行 16S rRNA 基因分析、特异性 PCR 及其他各项鉴定,最终确定本次发病为肠炎沙门氏菌感染。随后,进行了药敏试验和动物回归试验,为家兔生产中肠炎沙门氏菌病的诊断、防治提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 培养基与主要试剂

三糖铁琼脂、改良马丁肉汤培养基购自青岛高科园海博生物科技有限公司,麦康凯琼脂培养基、胆硫乳琼脂(DHL)、绵羊血平板、微量生化反应管、药敏纸片购自杭州微生物试剂公司,细菌 DNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司,Pfx 高保真酶购自 Invitrogen 公司,凝胶回收纯化试剂盒等购自 TaKaRa 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验动物

清洁级 ICR 小鼠购自扬州大学比较医学中心,35 日龄断奶幼兔由金陵种兔场提供。

1.3 引物

引物全部由上海 Invitrogen 公司合成。

1.3.1 肠炎沙门氏菌特异性引物 按蒋颖等^[4]根据肠炎沙门氏菌菌毛 SEF14 主要结构亚单位 *sefA* 基因序列设计的引物合成。

1.3.2 细菌 16S rRNA 基因通用引物 按 Corby-

Harris 等^[5]设计的细菌 16S rRNA 基因通用引物序列 27-F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492-R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 合成。

1.4 细菌分离培养

无菌采集典型临床症状的濒死兔心血、肝脏、脾脏,分别接种于添加 4% 小牛血清的改良马丁肉汤,37℃ 培养 18~24 h,另取一组用厌氧培养罐 37℃ 培养并观察。对各脏器分离培养物分别划线接种于绵羊血平板、麦康凯琼脂平板、三糖铁琼脂斜面,经过多次鉴别培养后选择 1 株脾脏分离菌株作为代表菌株进行相关试验。

1.5 分离菌株培养特性及生化试验

将分离菌株分别再次划线接种于绵羊血平板、麦康凯琼脂平板、DHL 平板观察记录培养特性,进行革兰氏染色及镜检观察,同时接种于葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、山梨醇、卫矛醇、硫化氢、明胶、硝酸盐(还原)、葡萄糖磷酸盐蛋白胨水(MR、VP)、蛋白胨水(靛基质)、尿素、氰化钾、赖氨酸脱羧酶等微量生化反应管,37℃ 培养 24 h,观察结果。

1.6 分离菌株 16S rRNA 基因的分析

1.6.1 分离菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增 用分离菌株培养物,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌的基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增。反应体系如下:模板 DNA 1.0 μl,2.5 mmol/L dNTP 4.0 μl,50 mmol/L MgSO₄ 2.0 μl,10.0 mmol/L 上下游引物各 1.0 μl,10×Pfx buffer 5.0 μl, Pfx 高保真酶 0.4 μl,加 ddH₂O 至总体积 50.0 μl。反应条件为 94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 15 s,55℃ 退火 30 s,68℃ 延伸 90 s,30 个循环,68℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后,以 DNA 凝胶回收试剂盒对目的片段进行回收纯化。

1.6.2 16S rRNA 基因的序列分析 将回收纯化的 PCR 扩增产物送上海 Invitrogen 公司测序。测序结果在 NCBI 数据库中以 BLAST 程序进行同源性比对,从中选取相似性较高的代表菌株 16S rRNA 序列,用 MEGA 5.22 中 Kimura-2 参数矩阵的邻接法构建系统发育树。

1.7 分离菌株 PCR 鉴定

参照蒋颖等建立的肠炎沙门氏菌 PCR 方法^[4]对分离菌株进行肠炎沙门氏菌特异性 PCR 鉴定。

1.8 分离菌株药敏试验

用纸片扩散法进行药敏试验,取100.0 μ l 分离菌株纯培养物,均匀涂布于绵羊血平板。将选取的16种药敏纸片贴于平板内,37 $^{\circ}$ C培养24 h,观察结果。抑菌圈直径大于15 mm为高度敏感,小于10 mm为不敏感或耐药,介于两者间为中度敏感。

1.9 动物回归试验

分离菌株培养物经过平板计数后进行动物回归试验。断奶幼兔随机分组,每组5只,其中2组分别皮下注射细菌培养物1.0 ml、0.5 ml,第3组口服细菌培养物1.0 ml,第4组作为对照不进行处理。ICR小鼠攻毒,每组5只,分别腹腔注射细菌培养物0.2 ml、0.1 ml。攻毒后观察记录死亡情况,对死亡动物进行剖检和细菌分离。

1.10 分离菌株灭活苗安全试验和效力试验^[6-7]

1.10.1 分离菌株灭活苗制备 用含4%血清的改良马丁肉汤在37 $^{\circ}$ C下培养分离菌株18 h,纯粹性检验合格后加入甲醛溶液(终浓度为0.4%),37 $^{\circ}$ C灭活24 h。灭活检验合格后备用。

1.10.2 安全性试验 用自制灭活苗进行断奶幼兔免疫,每组5只,每只皮下注射2.0 ml,同时以相同条件不接种疫苗家兔作为对照,观察家兔精神状态等,连续观察14 d。

1.10.3 效力试验 用自制灭活苗进行断奶幼兔免疫,每组5只,每只皮下注射1.0 ml,同时以相同条件不接种疫苗家兔作为对照,21 d后进行攻毒效力试验。

2 结果

2.1 临床症状和病理剖检

家兔主要是在15日龄左右开始发病,持续到35日龄,转群后发病率逐渐降低。发病幼兔表现为食欲减退或废绝,精神沉郁,体温升高,生长速度缓慢,其他症状不明显。发病的怀孕母兔阴户流出脓性分泌物,阴道黏膜潮红肿胀,流产,部分母兔死亡。流产的胎儿全身水肿,多为死胎,少数弱胎,产出后很快死亡。发病母兔在产后1~3 d采食量迅速下降,比同期正常采食量下降30%~40%。死亡幼兔剖检特征性病变为脾脏肿大、发黑,其他器官如肝脏、肺脏、肾脏以及肠道肉眼可见病变不明显(图1)。

2.2 细菌分离培养

各脏器培养物在绵羊血平板、麦康凯琼脂平板、



图1 自然感染仔兔脾脏病变

Fig.1 Splenomegaly for naturally infected infant rabbit

三糖铁琼脂斜面培养16 h左右即有相关细菌生长,在麦康凯琼脂平板均为无色菌落,在绵羊血平板上菌落约2 mm,三糖铁琼脂斜面底部变黑,斜面依然为红色,菌株形态比较单一。各脏器接种物厌氧培养72 h后培养基仍然没有混浊,判定各脏器没有厌氧菌生长。因此,初步将可疑病原缩小为沙门氏菌属、变形杆菌属和枸橼酸杆菌属。

2.3 分离菌株培养特性^[8]

分离菌株在绵羊血平板上生长为无色半透明菌落,菌落中心为黑色,不溶血;在麦康凯琼脂平板上长出无色半透明、边缘整齐、湿润隆起的小菌落;在DHL平板上为中间黑色边缘半透明的小菌落。分离菌株为革兰氏阴性菌,呈直杆状(图2)。

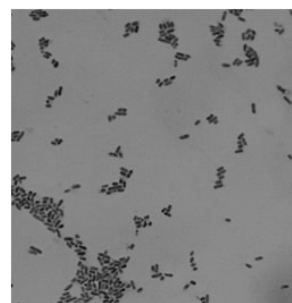


图2 分离菌株革兰氏染色

Fig.2 Identification of the isolates by gram stain

2.4 分离菌株生化试验

按照常规方法进行分离菌株生化试验,结果见表1。

按照2010年食品安全国家标准《食品微生物学检验-沙门菌检验》的评判标准^[9],分离菌株的主要生化特性,如硫化氢、靛基质、尿素、氰化钾、赖氨酸、三糖铁等试验结果均符合肠炎沙门氏菌生化特性。

表 1 分离菌株生化特性

Table 1 Biochemical properties of the isolates

葡萄糖	乳糖	麦芽糖	蔗糖	阿拉伯糖	木糖	半乳糖	山梨醇	卫矛醇	硫化氢	明胶	硝酸盐	MR VP	靛基质	尿素	氰化钾	赖氨酸	三糖铁斜面 (斜面/底部)
-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	红/黑

+: 阳性; -: 阴性。

2.5 分离菌株 16S rRNA 分析

以提取的细菌基因组 DNA 为模板, 采用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增, 获得大小在 1 500 bp 左右的特异性条带。将回收纯化的 PCR 产物进行序列测定, 所得基因序列命名为 *Salmonella* SD/

2016, 此序列已经上传 GenBank (登录号: KX819258)。将该序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 构建系统发育树, *Salmonella* SD/2016 与肠炎沙门氏菌在同一簇(图 3), 且序列相似度均大于 99.0%。

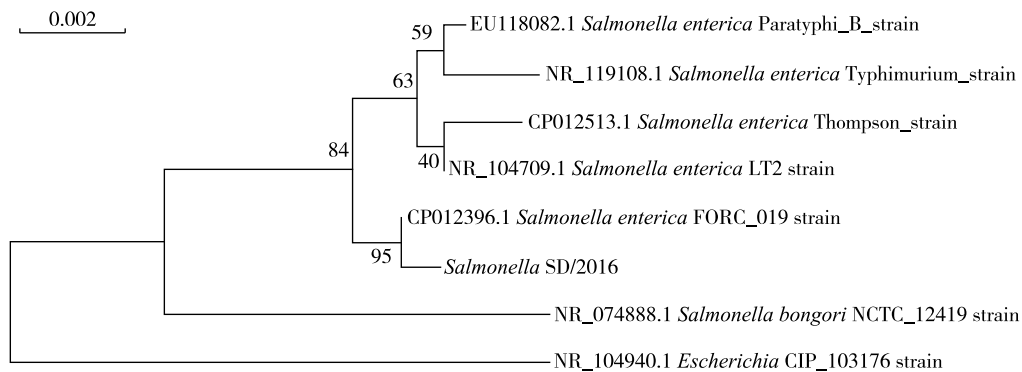


图 3 分离菌株 16S rRNA 基因的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of *Salmonella* SD/2016

2.6 分离菌株 PCR 鉴定

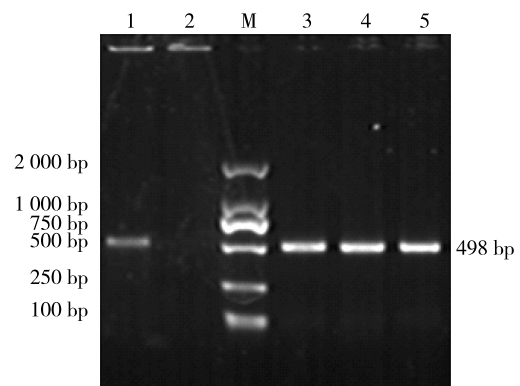
以各脏器分离菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测, 所扩增的基因片段大小为 498 bp(图 4), 经序列测定, 与肠炎沙门氏菌 *sefA* 基因的同源性为 99.3% ~ 100.0%。

2.7 分离菌株药敏试验

分离菌株对头孢他啶、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢曲松高度敏感, 对红霉素中度敏感, 对恩诺沙星、左氧氟沙星、卡那霉素、氟苯尼考、阿奇霉素、强力霉素、新霉素、庆大霉素、丁胺卡那、青霉素、链霉素均不敏感。因此, 将此药敏试验结果提供给该养兔场进行疾病防治, 使用该菌株敏感性药物一段时间后, 兔场所发疾病得到了有效控制。

2.8 动物回归试验

分离菌株培养物平板计数结果为 2.2×10^{10} CFU/ml。断奶幼兔和 ICR 小鼠攻毒结果(表 2)显示, 皮下注射 1.1×10^{10} CFU 分离菌株即造成断奶幼兔全部死亡, 口服 2.2×10^{10} CFU 分离菌株也可以引



M: DNA 相对分子质量标准(DL2000); 1: 阳性对照(肠炎沙门氏菌国际标准株 SD-2); 2: 阴性对照; 3: 心血分离菌; 4: 肝脏分离菌; 5: 脾脏分离菌。

图 4 分离菌株 *sefA* 基因的 PCR 鉴定Fig. 4 PCR amplification of *Salmonella enterica sefA* gene

发部分断奶幼兔死亡; 腹腔注射 2.2×10^9 CFU 分离菌株可以导致小鼠发生死亡, 攻毒死亡小鼠和幼兔剖检特征病变均为脾脏肿大, 而且在脾脏中可以分

离到纯净的攻毒菌,表明该分离菌株可以通过动物复制得到原有特征性剖检病变。

表2 断奶幼兔和 ICR 小鼠攻毒结果

Table 2 Challenge test to weaning rabbit and ICR mice

试验动物	攻毒分组	每只动物攻毒菌落数 ($\times 10^9$ CFU)	死亡数/ 攻毒数
断奶幼兔	皮下注射 1.0 ml 组	22	5/5
	皮下注射 0.5 ml 组	11	5/5
	口服 1.0 ml 组	22	1/5
	对照组	-	0/5
ICR 小鼠	腹腔注射 0.2 ml 组	4.4	5/5
	腹腔注射 0.1 ml 组	2.2	2/5

2.9 分离菌株灭活苗的安全性和效力

每只断奶幼兔皮下注射 2 ml 自制灭活苗,观察期内精神状态良好,均健康存活,说明自制灭活疫苗安全性良好。

自制的灭活苗可以向受致死剂量分离菌株攻击的断奶幼兔提供保护,免疫组幼兔无死亡,而不免疫对照组 5 只家兔死亡 4 只。

3 讨论

兔沙门氏菌病又称兔副伤寒,以发生败血症、急性死亡、腹泻和流产为主要特征,特别是仔兔和怀孕母兔较易发生^[10]。但是,我们在临床中发现的这次病例特征性症状为死亡幼兔脾脏肿大,其他肉眼可见病变不明显,如未见幼兔有腹泻等症状,给诊断带来了较大的困难。《OIE 陆生动物诊断试验与疫苗手册》第 7 版也有相关报道,许多动物,尤其禽类和猪在感染沙门氏菌后无临诊病变或这些症状和病灶并不具有特异性,给疫病的确证造成误导。本研究首先通过麦康凯琼脂平板、三糖铁琼脂斜面、绵羊血平板对分离菌株进行鉴别培养,缩小可疑细菌种类,之后综合分析了脾脏分离菌株的培养特征、染色特性、生化特性、16S rRNA 序列及 PCR 鉴定等结果,鉴定分离菌株为肠炎沙门氏菌,最后通过动物回归试验成功复制出该病的临床病变特征,证实该病为兔沙门氏菌病。

此次发病兔场饲养管理水平较高,卫生消毒措施也比较完善。分析发病的原因可能是由于耐药性强的肠炎沙门氏菌通过饲料、兔舍用具或者饲养员衣物在兔舍中传播所致。有研究结果表明,沙门氏

菌宿主广泛,传染媒介众多,还可以形成生物被膜。生物被膜的形成可以显著增强细菌对抗生素、机体免疫力、消毒剂等不利因素的抵抗力^[11],是细菌持续感染和反复感染的重要原因。

近些年来,由于长期使用头孢菌素、喹诺酮类抗生素药物,以及在一些地区使用原料药,造成越来越多的多重抗药性细菌出现,也引起细菌毒力的改变^[2,11-12]。本次发病初期也使用多种抗生素进行预防和治疗,但是效果均欠佳,因此推测兔肠炎沙门氏菌的抗生素耐药性也是引起本次不间断发病的重要原因。

参考文献:

- [1] 殷俊磊,李求春,焦新安. 沙门菌致病岛 2Ⅲ型分泌系统研究进展[J]. 微生物学报,2016,56(4):561-569.
- [2] HUR J, JAWALE C, LEE J H, et al. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review[J]. Food Research International, 2012, 45(2):819-830.
- [3] 尹德凤,张莉,张大文,等. 食品中沙门氏菌污染研究现状[J]. 江西农业学报,2015,27(11):55-60.
- [4] 蒋颖,刘铁,郦晓琼,等. 肠炎沙门氏菌特异性诊断方法的建立[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2007,28(3):6-8.
- [5] CORBY-HARRIS V, PONTAROLI A C, SHIMKETS L J, et al. Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(11):3470-3479.
- [6] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2007:223-231.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:三部[M]. 北京:中国农业出版社,2011:附录 42-44.
- [8] 范志宇,魏后军,胡波,等. 兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗安全性及效力试验[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):272-275.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验—沙门菌检验:GB/T4789.4-2010[S].
- [10] 谷子林,秦应和,任克良. 中国养兔学[M]. 北京:中国农业出版社,2013:522-523.
- [11] STEENACKERS H, HERMANS K, VANDERLEYDEN J, et al. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication[J]. Food Research International, 2012, 45(2):502-531.
- [12] JAJERE S M, ADAMU N B, ATSANDA N N, et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolates in apparently healthy slaughtered food animals at Maiduguri central abattoir, Nigeria [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2015, 5(12):996-1000.

(责任编辑:王妮)