



DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2023.08.0096

山东地区驴源沙门氏菌的分离鉴定及其生物学特性比较分析

刘 香¹, 刘奕萱¹, 邵长军², 邹 玲¹, 任慧英^{1*}, 刘文华^{1*}

(1. 青岛农业大学 动物医学院, 山东 青岛 266109; 2. 烟台市农业科学研究院, 山东 烟台 264200)

中图分类号: S858.23

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2024)10-0094-09

摘要: 为了解山东地区驴源沙门氏菌的流行情况及其生物学特性, 试验将来自山东多地的 14 份驴流产病料及 137 份驴粪便样本分别接种于沙门氏菌显色培养基中对沙门氏菌进行分离培养, 提取细菌基因组 DNA 后采用双重 PCR 方法判定分离菌是否为沙门氏菌并进一步判定是否为马流产沙门氏菌, 并对分离到的沙门氏菌进行血清型鉴定、生化试验、细菌运动力和生物膜形成能力检测及药敏试验, 选取部分菌株进行致病性试验, 并采用双层平板法检测分离菌对 9 株噬菌体 A18028、C59102、F59102、F18024、F18038、E17016、DS2、DS4、5FS4 的敏感性。结果表明: 从驴流产病料中共分离到 14 株马流产沙门氏菌(A1~A14 株); 从驴粪便样本中共分离到 22 株其他血清型沙门氏菌(F1~F22 株), 其中 F1 株为山夫顿堡沙门氏菌, F2、F3、F4、F5、F7、F8、F9、F10、F12、F13、F15 株为肯塔基沙门氏菌, F6、F11 株为 Give 沙门氏菌, F14 株为乙型副伤寒 *Java* 型沙门氏菌, F16、F20 株为阿哥纳沙门氏菌; F17 株为鼠伤寒沙门氏菌, F18、F19 株为汤卜逊沙门氏菌, F21 株为阿伯丁沙门氏菌, F22 株未鉴定出血清型; 36 株分离菌均符合沙门氏菌属的生化特性, 但马流产沙门氏菌与其他血清型沙门氏菌生化特性略有差异; 14 株马流产沙门氏菌的平均运动力较 22 株其他血清型沙门氏菌弱; 36 株沙门氏菌均能形成生物膜; 36 株沙门氏菌对链霉素、庆大霉素、呋拉西林的耐药率较高, 对亚胺培南和美罗培南的耐药率为 0; 小鼠接种 A2 株 14 d 后的死亡率为 100%, 接种 F14 株和 F20 株 14 d 后死亡率分别为 50.0% 和 62.5%, 接种 F1、F2、F6、F18、F21、F22 株 14 d 后无死亡情况; 14 株马流产沙门氏菌对 9 株噬菌体均敏感, 而 22 株其他血清型沙门氏菌对 9 株噬菌体的敏感性不同, 其中沙门氏菌 F1、F6、F11 株仅对 1 株噬菌体敏感, F18、F19、F20 株对 9 株噬菌体均不敏感。说明不同沙门氏菌的生物学特性存在差异, 马流产沙门氏菌对噬菌体具有很高的敏感性。

关键词: 驴; 沙门氏菌; 马流产沙门氏菌; 细菌运动力; 致病性; 生物膜形成能力

Isolation, identification and comparative analysis of biological characteristics of *Salmonella* of donkey origin in Shandong Province

LIU Xiang¹, LIU Yixuan¹, SHAO Changjun², ZOU Ling¹, REN Huiying^{1*}, LIU Wenhua^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai 264200, China)

Abstract: In order to understand the prevalence status and biological characteristics of *Salmonella* in donkey farms from Shandong Province, 14 samples of donkey abortion and 137 samples of donkey feces were inoculated with *Salmonella* chromogenic medium for isolation and culture. After extracting genomic DNA of bacteria, double PCR method was used to determine whether the isolated bacteria were *Salmonella* and further determine whether the isolated bacteria were *Salmonella abortus equi*. Serotype identification, biochemical test, bacterial motility test, biofilm formation ability detection, and drug susceptibility test were carried out on the isolated *Salmonella*. Some strains were selected for pathogenicity test, and the sensitivity of the isolates (A18028, C59102, F59102, F18024, F18038, E17016, DS2, DS4, 5FS4) was detected by double-layer plate method. The results showed that a total of 14 strains of *Salmonella abortus equi* (A1-A14) were isolated from the donkey abortion samples. A total of 22 strains of other serotypes of *Salmonella* (F1-F22) were isolated from donkey feces, of which F1 was *Salmonella Senftenberg*, F2, F3, F4, F5, F7, F8, F9, F10, F12, F13 and F15 were *Salmonella Kentucky*; F6 and F11 were *Salmonella Give*; F14 was *Salmonella paratyphoid* B var. *Java*; F16 and F20 were *Salmonella argonauticus*; F17 was *Salmonella typhimurium*; F18 and F19 were *Salmonella thompson*; F21 was *Salmonella aberdeen*. The serotype of F22 was not identified. The 36 isolates were consistent with the biochemical characteristics of *Salmonella*, but the biochemical characteristics of *Salmonella abortus equi* were slightly different from those of other serotypes. The average motility of 14 strains of *Salmonella abortus equi* were weaker than that of 22 strains of other serotypes of

收稿日期: 2023-08-14; 修回日期: 2024-02-28

基金项目: 山东省产业技术体系驴产业创新团队项目 (SDAIT-27); 青岛农业大学 2023 年大学生创新创业训练计划项目 (2023-117)

作者简介: 刘 香 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为兽医微生物与免疫学, 1434382414@qq.com.

通信作者: 任慧英 (1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为噬菌体的开发与应用, renren0228@sina.com; 刘文华 (1970—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为兽医细菌学, wenhualiu2668@126.com.



Salmonella. All 36 strains of *Salmonella* could form biofilm. The resistance rate of 36 *Salmonella* strains to streptomycin, gentamicin and piperacillin was high, and the resistance rate to imipenem and meropenem was 0. The mortality rate of mice inoculated with A2 strain was 100% after 14 days, and the mortality rate of mice inoculated with F14 strain and F20 strain was 50.0% and 62.5% after 14 days, respectively. No death occurred after inoculation with strains F1, F2, F6, F18, F21 and F22. The 14 strains of *Salmonella abortus equi* were sensitive to 9 phages, while the sensitivity of 22 strains of other serotypes of *Salmonella* was different. *Salmonella* F1, F3, F6 and F11 were only sensitive to 1 phage, while *Salmonella* F18, F19 and F20 were not sensitive to 9 phages. These results indicated that the biological characteristics of different *Salmonella* bacteria were different, and *Salmonella equi abortus* had a high sensitivity to phages.

Keywords: donkeys; *Salmonella*; *Salmonella abortus equi*; bacterial motility; pathogenicity; biofilm formation ability

近年来,驴肉、驴皮的需求量不断攀升,而驴奶则以其低胆固醇、高钙、富含硒等特点成为备受欢迎的奶产品^[1]。驴产品需求的增加促进了驴养殖业的发展,但驴是单胎动物,繁殖周期长,一年只有一胎,“怀不上,留不住,活不了”成为很多驴场的“卡脖子”问题,病原感染是重要的原因之一^[2-3]。沙门氏菌是动物的常见致病菌,给畜禽养殖和公共卫生安全带来巨大的挑战。沙门氏菌耐药株的出现给沙门氏菌的防控带来了一定困难^[4]。沙门氏菌的宿主广泛,根据其对其宿主的嗜性可以分为仅对特定动物或人产生疾病的专嗜性沙门氏菌及对人和动物都具有普遍致病性的泛嗜性沙门氏菌^[5]。马流产沙门氏菌属于专嗜性沙门氏菌,为驴沙门氏菌病的主要致病菌,不仅可引起母驴流产和子宫内膜炎,还会引起公驴睾丸炎、幼驹腹泻、败血症等疾病,既可垂直传播,也可通过饲草、粪便、接触等途径水平传播,给驴场造成巨大经济损失^[6]。

近年来山东省驴产业发展迅速,截至2021年全省驴存栏量为7.47万头,其中母驴存栏量为2.86万头^[7]。为了解山东地区驴源沙门氏菌的流行情况及其生物学特性,本试验对采自山东多地的驴流产病料及粪便样本中的沙门氏菌进行了分离鉴定、运动力和生物膜形成能力检测、小鼠致病性试验、药敏试验及对噬菌体敏感性检测,以期对山东地区驴源沙门氏菌的防控提供参考。

1 材料

1.1 病料和菌株

驴流产病料(流产胎驴肝脏、脾脏、肺脏、胎盘及母驴羊水)14份、驴粪便样本137份,均采自山东省阳谷县、禹城市、东阿县的驴场。马流产沙门氏菌 ATCC9842、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、鸡白痢沙门氏菌 CVCC533 和噬菌体 A18028、C59102、F59102、F18024、F18038、E17016、DS2、DS4、5FS4,由青岛农业大学兽医微生物学实验室保存。

1.2 试验动物

6~8周龄的健康昆明小鼠80只,购自青岛大吴富城科技有限公司。

1.3 主要试剂与仪器

沙门氏菌显色培养基、SS培养基、营养琼脂培养

基、LB肉汤、四硫磺酸盐煌绿(TTB)增菌液、缓冲蛋白胨水(BPW)、MRSV半固体培养基、脑心浸出液肉汤(BHI)培养基、细菌微量生化反应管,均购自青岛海博生物技术有限公司;药敏纸片,购自杭州滨河微生物试剂有限公司;沙门氏菌诊断血清,购自宁波天润生物药业有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;结晶紫,购自北京索莱宝科技有限公司;异丙醇、无水乙醇,均购自国药集团化学试剂有限公司;Accurate Taq DNA聚合酶,购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;DL2000 DNA Maker,购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

高速离心机(型号为3-18KS),购自德国SIGMA公司;PCR仪(型号为T20),购自杭州朗基科学仪器有限公司;摇床(型号为MQT-60R),购自上海旻泉仪器有限公司;恒温培养箱(型号为DHP-9272B),购自上海一恒科学仪器有限公司;酶标仪(型号为Spark),购自瑞士Tecan公司。

2 方法

2.1 沙门氏菌的分离培养

将14份驴流产病料分别划线接种于沙门氏菌显色培养基中,37℃倒置培养24h,观察菌落特征。

将137份驴粪便样本(每份取10g)分别加入到100mL BPW中,37℃静置18h进行预增菌培养;培养结束后取1mL BPW加入到9mL TTB增菌液中,37℃、220r/min振荡24h进行增菌培养;培养结束后取20μL菌液接种于含有新生霉素的MSRV半固体培养基平板中央,37℃培养24h;取灰白色扩散区域于沙门氏菌显色培养基上进行三区划线,37℃倒置培养24h后观察并拍照;取紫色菌落划线接种于SS培养基中,反复纯化3代。

2.2 分离菌基因组DNA的提取及PCR鉴定

按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书方法提取分离菌的基因组DNA,并将其作为模板,参照参考文献[8]采用双重PCR方法判定分离菌是否为沙门氏菌并进一步判定是否为马流产沙门氏菌。所用引物由青岛擎科生物科技有限公司合成,具体信息见表1。PCR扩增体系(25μL):模板2μL,Accurate Taq DNA聚合酶12.5μL,引物invA-F、invA-R、fliC-F、fliC-R各1μL,ddH₂O 6.5μL。PCR扩增



程序:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 30s,52 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 34 个循环;72 ℃ 终延伸 5 min。同时设置阳性对照和阴性对照,阳性对照以马流产沙门氏菌 ATCC9842 基因组 DNA 为模板,阴

性对照以 ddH₂O 为模板。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。若 invA 基因为阳性,可判定分离菌为沙门氏菌;若 FliC 基因为阳性,可判定分离菌为马流产沙门氏菌。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因	引物名称	引物序列	片段长度/bp
invA	invA-F	5'-GTCACCGTGGTCCAGTTT-3'	175
	invA-R	5'-CTCTTTCCAGTACGCTTCG-3'	
FliC	FliC-F	5'-ATGGCACAAGTCATTAATAC-3'	747
	FliC-R	5'-TTTATAGAATCCGCCTTTGT-3'	

2.3 分离菌的血清型鉴定

挑取 SS 培养基上的单菌落,划线接种于营养琼脂培养基上,参照沙门氏菌诊断血清说明书对分离菌进行玻片凝集试验和结果判定,以鉴定分离菌的血清型。

2.4 分离菌的生化鉴定

对分离菌进行生化鉴定,包括葡萄糖、乳糖、靛基质、尿素酶、赖氨酸脱羧酶、氰化钾、三糖铁、卫矛醇等 19 种生化试验,具体操作和结果判定方法参照细菌微量生化反应管说明书。

2.5 分离菌运动力的检测

参照参考文献[9]的方法进行细菌运动力的检测,具体步骤:将分离菌菌液的 OD₆₀₀ 值调至 0.8,吸取 1 μL 菌液以点样方式接种于 0.5% 的 BHI 半固体培养基上,置于 28 ℃ 温箱中培养 24 h,同时以产生鞭毛的鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 作为阳性对照,以鸡白痢沙门氏菌 CVCC533 作为阴性对照,通过测量细菌在平板中迁移所形成的扩散圈直径评估其运动力。

2.6 分离菌生物膜形成能力的检测

采用结晶紫染色法^[10]测定分离菌的生物膜形成能力,具体步骤:将分离菌菌液 OD₆₀₀ 值调至 0.1,将 20 μL 菌液与 180 μL 的 LB 肉汤混合后加入到 96 孔细菌培养板中,置于 37 ℃ 温箱分别培养 24 h 和 48 h;弃菌悬液,用超纯水洗板 3 次,用甲醇固定 15 min;弃甲醇,用超纯水洗板 3 次,用结晶紫染色 30 min;用超纯水洗板 3 次,用无水乙醇脱色 30 min;使用酶标仪测定 OD₅₇₀ 值,并以 OD₅₇₀ 值表示细菌生物膜形成能力,以 LB 肉汤作为空白对照。采用 Prism 6.02 软件对各分离菌培养菌液和 LB 肉汤的 OD₅₇₀ 值进行 *t* 检验,以 *P*<0.05 作为细菌生物膜形成标准。

2.7 药敏试验

按照美国临床实验室标准化协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 推荐的纸片扩散法

用 16 种抗菌药物 (庆大霉素、链霉素、哌拉西林、氨曲南、妥布霉素、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、阿米卡星、美罗培南、亚胺培南、头孢曲松、头孢他啶、氨苄西林和卡那霉素) 对所有分离菌进行药敏试验,参照《欧盟药敏试验标准》根据抑菌圈直径判定分离菌对抗菌药物的敏感性,并计算分离菌对各抗菌药物的耐药率 (耐药菌株数/菌株总数)。

2.8 致病性试验

从各血清型中随机选择 1 株分离菌进行致病性试验,具体步骤:将分离菌接种于 LB 肉汤,37 ℃、220 r/min 振荡培养过夜,菌落计数后将菌液浓度调整为 1×10⁹ cfu/mL。每株分离菌腹腔接种 8 只昆明小鼠,0.2 mL/只;同时以 8 只昆明小鼠作为阴性对照,每只小鼠腹腔注射 LB 0.2 mL。观察 14 d,期间记录小鼠的发病情况并统计死亡率,剖检小鼠,观察病理变化,并取肝脏和脾脏进行细菌的分离培养,以及 16S rDNA 基因的 PCR 扩增与测序。

2.9 分离菌对噬菌体敏感性的检测

采用双层平板法^[11]分别检测分离菌及马流产沙门氏菌 ATCC9842 对噬菌体 A18028、C59102、F59102、F18024、F18038、E17016、DS2、DS4、5FS4 的敏感性,具体步骤:取 100 μL 菌液添加至 5 mL 50 ℃ 的半固体琼脂培养基中,充分混匀后平铺到普通琼脂平板上,待凝固后吸取 2 μL 噬菌体增殖液接种于平板上,37 ℃ 培养 16 h,根据噬菌斑的生成情况判断分离菌对噬菌体的敏感性。

3 结果与分析

3.1 沙门氏菌的分离结果

从 14 份驴流产病料中分离到疑似沙门氏菌 14 株,均在沙门氏菌显色培养基上形成表面光滑、边缘整齐的紫色菌落,分别命名为 A1~A14;从 137 份驴粪便样本中分离到疑似沙门氏菌 22 株,在 SS 培养基上形成边缘整齐、无色,中心黑色的菌落,分别命名为 F1~F22。代表菌株的菌落形态见 116 页彩图 1。

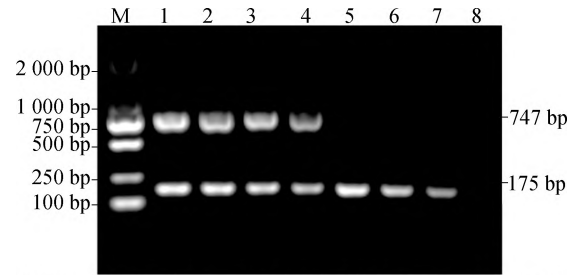
3.2 分离菌的 PCR 鉴定结果

对分离到的 36 株疑似沙门氏菌进行双重 PCR 扩增,结果显示,从驴流产病料中分离到的菌株均能扩增到大小分别为 175 bp 和 747 bp 的目的条带,而从驴粪便样本中分离到的菌株仅能扩增到一条大小为 175 bp 的目的条带,因此确定 A1~A14 株为马流产沙门氏菌,F1~F22 株为其他血清型沙门氏菌,代表菌株的 PCR 扩增结果见图 2。

3.3 分离菌的血清型鉴定结果

结果显示:沙门氏菌 A1~A14 株为马流产沙门氏菌,F1 株为山夫顿堡沙门氏菌,F2、F3、F4、F5、F7、F8、F9、F10、F12、F13、F15 株为肯塔基沙门氏菌,F6、F11 株为 Give 沙门氏菌,F14 株为乙型副伤寒 *Java* 型沙门氏菌,F16、F20 株为阿哥纳沙门氏菌,F17 株

为鼠伤寒沙门氏菌,F18、F19 株为汤卜逊沙门氏菌,F21 株为阿伯丁沙门氏菌,F22 株未鉴定出血清型,见表 2。



M,DL 2 000 DNA Marker; 1.马流产沙门菌 ATCC9842; 2-4.分离菌 A1、A5、A11株; 5-7.分离菌 F1、F16、F14株; 8.阴性对照。

图 2 分离菌的 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Results of double PCR identification of isolated strains

表 2 分离菌的血清型鉴定结果

Table 2 Results of serotype identification of isolateol strains

菌株名称	血清型	所属群
A1~A14	马流产沙门氏菌 (<i>Salmonella abortus equi</i>)	B
F1	山夫顿堡沙门氏菌 (<i>Salmonella senftenberg</i>)	E
F2、F3、F4、F5、F7、F8、F9、F10、F12、F13、F15	肯塔基沙门氏菌 (<i>Salmonella kentucky</i>)	C
F6、F11	Give 沙门氏菌 (<i>Salmonella Give</i>)	E
F14	乙型副伤寒 <i>Java</i> 型沙门氏菌 (<i>Salmonella paratyphi</i> B var. <i>Java</i>)	B
F16、F20	阿哥纳沙门氏菌 (<i>Salmonella agonaoticus</i>)	B
F17	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	B
F18、F19	汤卜逊沙门氏菌 (<i>Salmonella thompson</i>)	C
F21	阿伯丁沙门氏菌 (<i>Salmonella aberdeen</i>)	F
F22	未鉴定出	

3.4 分离菌的生化鉴定结果

结果显示:36 株分离菌均符合沙门氏菌属的生化特性,但马流产沙门氏菌与其他血清型沙门氏菌生化特性具有差异。14 株马流产沙门氏菌均不产硫化氢,不利用枸橼酸盐,卫矛醇试验为阴性;而 22 株其他血清型沙门氏菌中,仅 Give 沙门氏菌 F6 和 F11 株不产硫化氢,其余 20 株均产 H₂S;仅 Give 沙门氏菌 F11 株不利用枸橼酸盐,其余 21 株均可利用枸橼酸盐;22 株其他血清型沙门氏菌的卫矛醇试验均为阳性。具体结果见表 3。

3.5 分离菌运动力的检测结果

结果显示,马流产沙门氏菌 A1~A14 株的扩散圈平均直径为 0.8 cm,其他血清型沙门氏菌的扩散圈平均直径为(2.7±0.3)cm。可见 22 株马流产沙门氏菌的平均运动力较 14 株其他血清型沙门氏菌弱,代表菌株的扩散圈见图 3。

3.6 分离菌生物膜形成能力的检测结果

结果(见图 4)显示:所有分离菌培养 24 h 和 48 h 的 OD₅₇₀ 值均显著或极显著高于对照($P < 0.05$

或 $P < 0.01$),说明所有分离菌均能形成生物膜。

3.7 致病性试验结果

结果显示:小鼠接种马流产沙门氏菌 A2 株后第 10 小时左右出现嗜睡、被毛凌乱等症状,第 16 小时左右陆续死亡,接种 14 d 后死亡率为 100%(见表 4);死亡小鼠剖检可见肝脏出现大量针尖状白色坏死点,脾脏肿大,见 116 页彩图 5A。接种乙型副伤寒 *Java* 型沙门氏菌 F14 株和阿哥纳沙门菌 F20 株后第 10 小时左右出现精神萎靡、食欲不振等症状,第 18 小时左右小鼠陆续死亡,接种 14 d 后死亡率分别为 50.0%和 62.5%(见表 4);死亡小鼠剖检可见肝脏出现大量坏死灶(见 116 页彩图 5B、D)。接种鼠伤寒沙门菌 F17 株后第 10 小时左右出现被毛凌乱、精神沉郁等症状,第 20 小时左右小鼠有死亡现象,接种 14 d 后死亡率为 12.5%(见表 4);死亡小鼠剖检可见肝脏有出血点(见 116 页彩图 5C)。接种其他菌株及阴性对照小鼠均无死亡(见表 4),剖检后肝脏无明显变化(见 116 页彩图 5E)。取病死小鼠肝脏和脾脏进行细菌分离培养、16S rDNA 基因的 PCR 扩增与测

序,结果显示,分离菌与接种菌的测序结果相同。以上结果说明马流产沙门氏菌 A2 株的致病性强于乙型副伤寒 Java 型沙门氏菌 F14 株和阿哥纳沙门氏菌 F20 株。

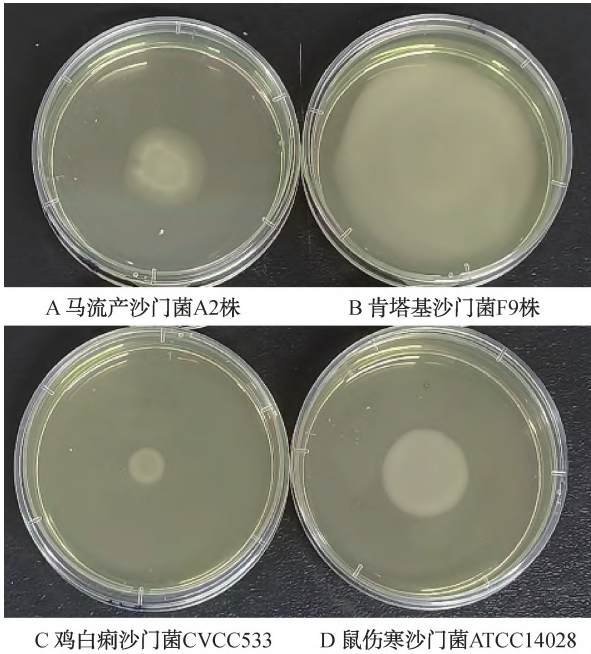
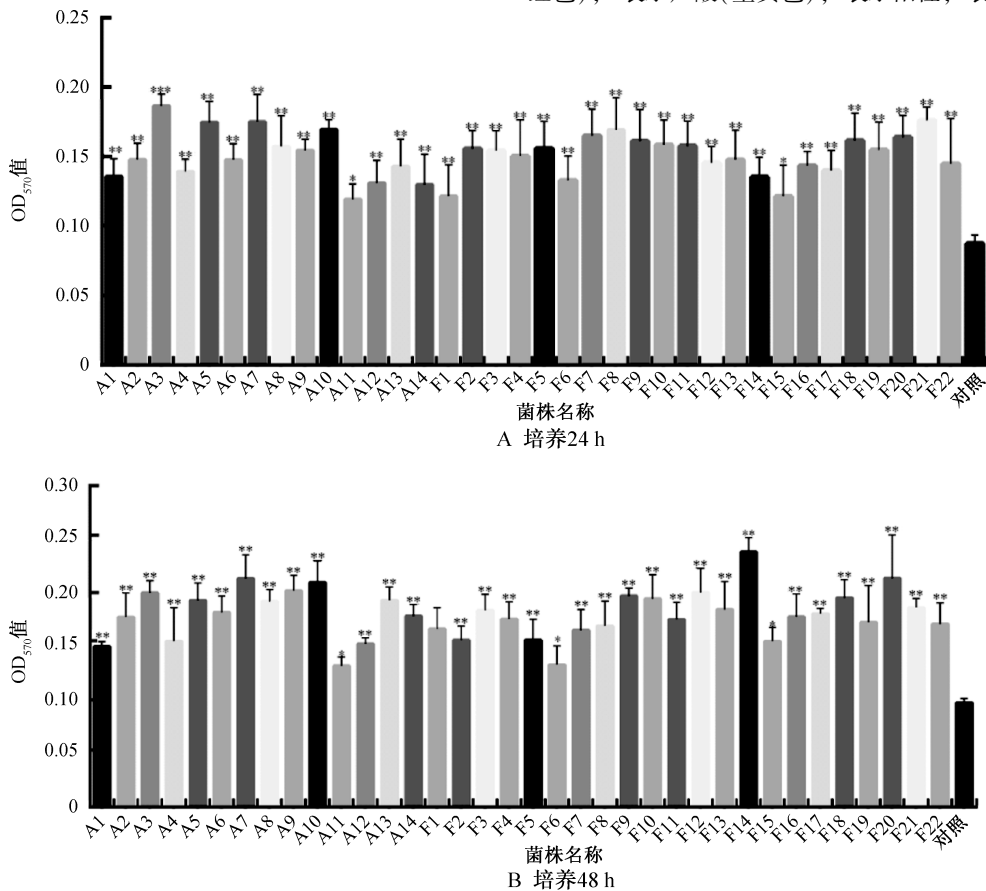


图3 代表菌株的扩散圈

Fig. 3 Diffusion of represent strains



注:与对照相比,柱标*表示差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)。

图4 分离菌培养 24 h 和 48 h 生物膜形成能力的检测结果

Fig. 4 Detection results of biofilm formation ability of the isolated strains cultured for 24 h and 48 h

表3 分离菌的生化鉴定结果

Table 3 Results of biochemical identification of isolated strains

项目	结果(阳性菌株数/检测菌株数)	
	马流产沙门氏菌	其他血清型沙门氏菌
甘露醇	+(14/14)	+(22/22)
葡萄糖	+(14/14)	+(22/22)
麦芽糖	+(14/14)	+(22/22)
乳糖	-(14/14)	-(22/22)
蔗糖	-(14/14)	-(22/22)
三糖铁(TSI)	$\frac{K;A}{-;-}$ (14/14)	$\frac{K/A}{+;+/-}$ (20/22)
甲基红(MR)	+(14/14)	+(22/22)
VP	-(14/14)	-(22/22)
靛基质	-(14/14)	-(22/22)
硫化氢	-(14/14)	+/(20/22)
枸橼酸盐	-(14/14)	+/(21/22)
尿素酶	-(14/14)	-/(21/22)
赖氨酸脱羧酶	+(14/14)	+(22/22)
丙二酸盐	-(14/14)	-(22/22)
卫矛醇	-(14/14)	+(22/22)
氰化钾	-(14/14)	-(22/22)
山梨醇	+(14/14)	+(22/22)
酒石酸盐	-(14/14)	-(22/22)
明胶	-(14/14)	-(22/22)

注:三糖铁试验结果以斜面;底层表示,K表示产碱(呈红色),A表示产酸(呈黄色),+表示阳性,-表示阴性。



表4 致病性试验结果

Table 4 Results of pathogenicity tests

项目	死亡数量/只	死亡率/%	项目	死亡数量/只	死亡率/%
A2	8	100	F18	0	0
F1	0	0	F20	5	62.5
F2	0	0	F21	0	0
F6	0	0	F22	0	0
F14	4	50.0	阴性对照	0	0
F17	0	12.5			

3.8 药敏试验结果

36株分离菌的药敏试验结果见表5,耐药率统计结果见图6。

由表5和图6可知:36株沙门氏菌分离株对链霉素、庆大霉素、哌拉西林的耐药率较高,其中对链霉素的耐药率最高(75%);对庆大霉素和哌拉西林的耐药率分别为68%、66%;对亚胺培南和美罗培南的耐药率为0。

表5 36株分离菌的药敏试验结果

Table 5 Drug susceptibility test results of 36 isolated strains

菌株名称	庆大霉素	链霉素	哌拉西林	氨基曲南	妥布霉素	环丙沙星	诺氟沙星	氧氟沙星	恩诺沙星	阿米卡星	美罗培南	亚胺培南	头孢曲松	头孢他啶	氨苄西林	卡那霉素
A1	R	R	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I
A2	R	R	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	I
A3	R	R	I	R	I	I	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
A4	R	R	R	S	R	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S
A5	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A6	R	R	S	I	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S	I	S
A7	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
A8	I	I	R	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S
A9	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I	I	S	S
A10	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A11	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	I	S
A12	I	R	S	I	R	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	I
A13	R	I	R	S	S	S	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S
A14	R	R	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F1	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I
F2	R	R	R	S	I	S	I	S	I	I	S	S	S	S	S	S
F3	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
F4	I	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
F5	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	I	I
F6	I	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	I
F7	R	R	S	I	S	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	I
F8	I	R	I	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	I	I	S
F9	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F10	I	I	I	S	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
F11	S	R	R	R	S	S	S	R	S	I	S	S	R	S	S	R
F12	I	R	R	S	S	I	I	S	R	S	S	I	I	S	S	S
F13	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	I	S	S	S	R
F14	I	I	S	R	I	S	S	R	S	S	S	I	R	S	R	I
F15	R	R	R	S	I	S	I	S	I	S	S	S	I	S	S	I
F16	R	R	R	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I
F17	R	I	I	S	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S
F18	I	R	S	I	I	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	I
F19	R	R	R	I	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	S	I
F20	I	R	R	R	S	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S
F21	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	I	I	S	S	S
F22	I	R	R	I	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S

注:R表示耐药,S表示敏感,I表示中敏。

3.9 分离菌对噬菌体敏感性的检测结果

结果显示:14株马流产沙门氏菌对9株噬菌体均敏感;而其他血清型沙门氏菌对9株噬菌体的敏感性不同,其中山夫顿堡沙门氏菌F1株及Give沙门氏菌F6、F11株仅对1株噬菌体敏感,汤卜逊沙门氏菌F18、F19及阿哥纳沙门氏菌F20株对9株噬菌体均不敏感。见表6。

4 讨论

研究表明,马流产沙门氏菌可以引起孕鼠流产^[12]。本试验从14份驴流产病料中分离到了14株马流产沙门氏菌,说明马流产沙门氏菌是引起孕驴流产的重要病原。另外本试验还分离到了22株其他血清型沙门氏菌,其中F1株为山夫顿堡沙门氏菌,F2、



培南类药物(亚胺培南和美罗培南)的耐药率为0。培南类药物属于碳青霉烯类抗生素,主要针对顽固性细菌感染^[19],驴场在临床上很少使用该类抗生素,因此具有较高的敏感性。Y. S. Chung 等^[20]的研究结果表明,链霉素为治疗马属动物革兰氏阴性菌病的首选抗菌药。本试验分离到的36株沙门氏菌对链霉素耐药率高达75%,这可能与驴场长期使用链霉素有关。细菌耐药性的普遍存在会导致临床上出现无药可用的尴尬局面,尤其是妊娠母驴使用药物时更应该考虑药物的不良反应,因此开发和研制替抗药物势在必行。

噬菌体是一种高度特异性的病毒,可快速杀灭特定的细菌^[21]。研究表明,由多株噬菌体制备的鸡尾酒制剂可以拓宽宿主谱,对细菌具有较好的杀灭效果^[22-23]。本试验采用双层平板法分别检测36株沙门氏菌分离株对9株噬菌体A18028、C59102、F59102、F18024、F18038、E17016、DS2、DS4、5FS4的敏感性,结果表明:14株马流产沙门氏菌对9株噬菌体均敏感,因此用噬菌体治疗马流产沙门氏菌感染将会取得较好的效果;而22株其他血清型沙门氏菌对9种噬菌体的敏感性不同,其中山夫顿堡沙门氏菌F1株及Give沙门氏菌F6、F11株仅对1株噬菌体敏感,汤卜逊沙门氏菌F18、F19株及阿哥纳沙门氏菌F20株对9株噬菌体均不敏感,因此为了达到良好的治疗效果,可将多株噬菌体联合使用来治疗沙门氏菌感染。

5 结论

本试验从14份驴流产病料与137份驴粪便样本中分离得到14株马流产沙门氏菌和22株其他血清型沙门氏菌,这些沙门氏菌的生物学特性存在差异,其中马流产沙门氏菌对噬菌体具有很强的敏感性,该结果为驴源沙门氏菌病的防控提供一定的参考。

参考文献:

[1] GARHWAL R, SANGWAN K, MEHRA R, et al. A systematic review of the bioactive components, nutritional qualities and potential therapeutic applications of donkey milk[J]. J Equine Vet Sci, 2022, 115: 104006.

[2] 张振威, 黄炳舰, 王永辉, 等. 驴繁殖生理与繁殖技术研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(6): 41-48.

[3] 高楠楠. 规模化驴场繁殖障碍主要病因调查及防控措施的研究[D]. 西宁: 青海大学, 2022.

[4] THRELFALL E J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections[J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(2): 141-148.

[5] TANNER J R, KINGSLEY R A. Evolution of *Salmonella* within hosts[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(12): 986-998.

[6] BUSTOS C P, MORONI M, CAFFER M I, et al. Genotypic diversity of *Salmonella ser. Abortusequi* isolates from Argentina[J]. Equine

Vet J, 2020, 52(1): 98-103.

[7] 佚名. 第七届(2021)中国驴业发展大会暨第二届德州驴种质资源保护与开发利用高峰论坛在山东禹城召开[J]. 畜牧产业, 2021(12): 50-57.

[8] 刘香, 梁佳平, 张灿, 等. 马流产沙门菌双重PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2023, 53(3): 292-297.

[9] 李娜, 宁程程, 郭蕴, 等. sRNA STnc1220基因缺失株对鼠伤寒沙门氏菌生物学特性和致病力的影响[J]. 华北农学报, 2022, 37(1): 188-194.

[10] RINALDI F, MAURIZI L, CONTE A L, et al. Nanoemulsions of *Satureja montana* essential oil: Antimicrobial and antibiofilm activity against avian *Escherichia coli* strains[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(2): 134.

[11] TANG Z H, LI X J, WANG X W, et al. Characterization and genomic analysis of a novel lytic phage DCp1 against *Clostridium perfringens* biofilms[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 4191.

[12] LIU W H, HAN L T, SONG P, et al. Complete genome sequencing of a *Tequintavirus* bacteriophage with a broad host range against *Salmonella Abortus equi* isolates from donkeys[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 938616.

[13] 蒲小峰, 张雨薇, 李胜男, 等. 新疆地区2株驴源马流产沙门菌的分离鉴定及致病性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(1): 395-403.

[14] 孙阳阳, 杨美, 解晓莉, 等. 驴源沙门氏菌的分离鉴定、耐药及毒力分析[J]. 山东农业科学, 2019, 51(11): 143-148.

[15] PAVLOVA M, LAZAROVA G T, ALEKSANDROVA E, et al. Recurrent meningitis caused by *Salmonella enterica* Paratyphi B var. *Java* in a 3-month-old infant complicated by dilation of subarachnoid spaces, subdural effusion and right-sided hemiparesis[J]. Paediatr Int Child Health, 2022, 42(3/4): 157-160.

[16] KUANG D, ZHANG J M, MENG J H, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of *Salmonella agona* isolated from humans and other sources[J]. Foodborne Pathog Dis, 2014, 11(11): 844-849.

[17] 孙莹慧, 刘康军, 陶璐瑶, 等. 驴源马流产沙门菌的耐药表型及毒力基因检测[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(10): 1959-1962.

[18] 王思敏, 杨江峰, 赵晓锐, 等. 羊源沙门氏菌的分离鉴定及致病性和耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(6): 2385-2396.

[19] PASCALE R, GIANNELLA M, BARTOLETTI M, et al. Use of meropenem in treating carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2019, 17(10): 819-827.

[20] CHUNG Y S, SONG J W, KIM D H, et al. Isolation and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from national horse racetracks and private horse-riding courses in Korea[J]. J Vet Sci, 2016, 17(2): 199-206.

[21] ISLAM M S, HU Y, MIZAN M F R, et al. Characterization of *Salmonella* phage LPST153 that effectively targets most prevalent *Salmonella* serovars[J]. Microorganisms, 2020, 8(7): 1089.

[22] MIJBEL ALI B, GATEA KAABI S A, AL-BAYATI M A, et al. A novel phage cocktail therapy of the urinary tract infection in a mouse model[J]. Arch Razi Inst, 2021, 76(5): 1229-1236.

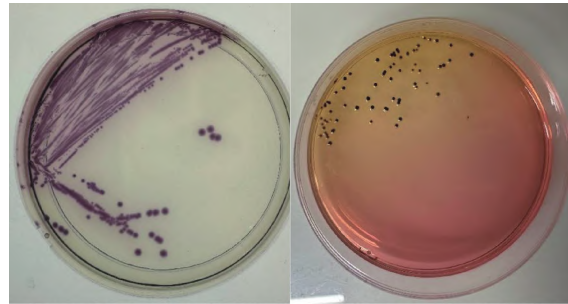
[23] KIM H J, JUN J W, GIRI S S, et al. Bacteriophage cocktail for the prevention of multiple-antibiotic-resistant and mono-phage-resistant *Vibrio coralliilyticus* infection in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae[J]. Pathogens, 2020, 9(10): 831.



· 特种动物研究 ·

山东地区驴源沙门氏菌的分离鉴定及其生物学特性比较分析

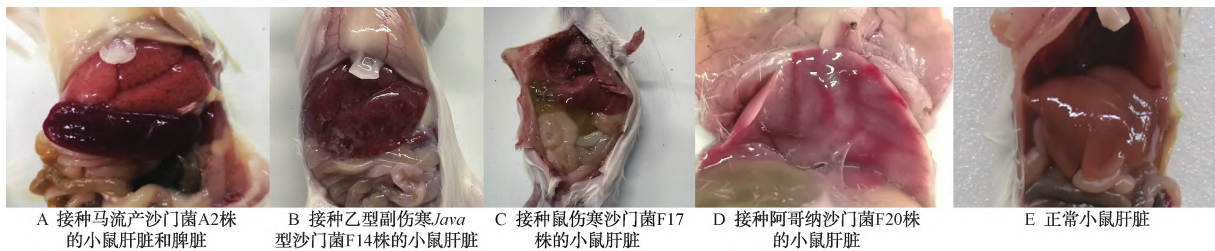
(作者刘香等,正文见第 94-101 页)



A 驴流产病料中分离的疑似沙门菌 B 驴粪便样本中分离的疑似沙门菌

图 1 代表菌株的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of the represent strains



A 接种马流产沙门菌A2株的小鼠肝脏和脾脏

B 接种乙型副伤寒Java型沙门菌F14株的小鼠肝脏

C 接种鼠伤寒沙门菌F17株的小鼠肝脏

D 接种阿哥纳沙门菌F20株的小鼠肝脏

E 正常小鼠肝脏

图 5 小鼠解剖结果

Fig. 5 Dissection results of mice

· 特种动物研究 ·

野血牦牛和家养牦牛瘤胃发酵参数及微生物多样性的比较分析

(作者洛桑顿珠等,正文见第 102-109 页)

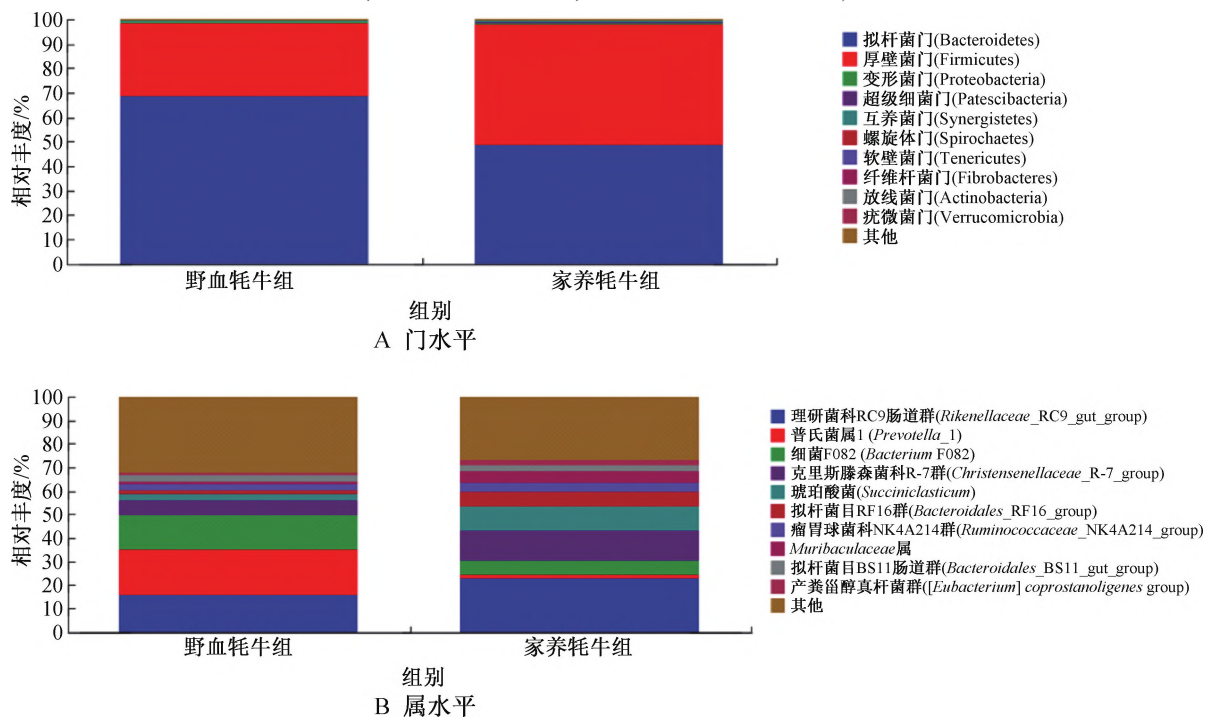


图 6 野血牦牛与家养牦牛瘤胃优势菌群分析结果

Fig. 6 Analysis results of rumen dominant microorganisms of wild blood yaks and domestic yaks