



CHICK
PROGRAM

第11期/2013年9月

家禽生产中的大肠杆菌问题 禽致病菌株的实验室诊断（禽大肠杆菌病）

Vincent TURBLIN 博士

法国诗华动物保健公司亚太区家禽技术与市场经理

大肠杆菌可能是在肉鸡生产中最为人所知的细菌—它与支原体的共同感染造成了很严重的经济损失（肉类抗生素残留）。大肠杆菌病确实是家禽疾病普查或屠宰废弃方面报道最为频繁的疾病。例如Yogarathnam 在1995年发现，屠宰过程中有43%的胴体废弃是与大肠杆菌菌血症病变相关。

此外，大肠杆菌感染对于公众健康具有重要意义。首先，尽管大多数从家禽分离的禽大肠杆菌只对禽类致病，但鸡对于大肠杆菌O157: H7（一个重要的产志贺样毒素导致人类肠道出血的病原体）的定殖也是易感的。具毒力的禽类大肠杆菌和感染其他“动物”的大肠杆菌有很多共同的特点，因此，一些研究已经表明禽类大肠杆菌菌株可以成为编码耐药性和毒力因子的基因和质粒的来源。

该疾病本身在鸡上可能表现为大肠杆菌败血症，这通常会导致死亡。一些鸡只可以完全从大肠杆菌败血症康复，其他鸡只可能会康复但会有后遗症。大肠杆菌病也可能是局部感染，表现为脐炎、卵黄囊感染、蜂窝组织炎、肿头综合症、肠炎、急性阴道炎、输卵管炎或腹膜炎。

有趣的是，通常存在于鸡肠道的大肠杆菌的10%至15%是具有潜在致病性的菌株。然而，通常需要不利的环境因素或其它传染性因子诱导，大肠杆菌感染才能显现出来：在农场，具有侵袭性的新城疫疫苗株的应激，饮水接种疫苗本身或免疫抑制性疾病（如IBD）是最常见的诱发二次感染如大肠杆菌病的因素。因此本文将讨论关于这一对于家禽生产者来说很重要的疾病的实验室诊断。

大肠杆菌菌株的共同特点及基本细菌学鉴定

大肠杆菌属于肠杆菌科，是一种革兰氏阴性球杆菌（ $2-3 \times 0.6$ 微米），无孢子形成，能够在有氧和无氧条件下生长。某些菌株有囊膜。大多数菌株可以运动，有周鞭毛。该种肠杆菌的基本代谢特征是过氧化氢酶阳性、氧化酶阴性，以及可发酵葡萄糖和将硝酸盐还原成亚硝酸盐。大肠杆菌属与志贺氏杆菌属密切相关。



CHICK PROGRAM

首先，为了避免结果的难于判定，需要进行正确的取样：

只有内部器官或血液是有用的样品，而不是粪便或肠道。由于肠道正常菌群大肠杆菌在宿主死亡后很容易侵入其他组织，因此从新鲜尸体采集标本是必要的。当怀疑为急性大肠杆菌败血症时，应对心脏血液和肝脏进行无菌采样。可以使用针头和注射器采集1毫升的血液接种到肉汤培养基（1:10），随后接种在琼脂平板上。

无菌培养棉签或接种环可以进入到：

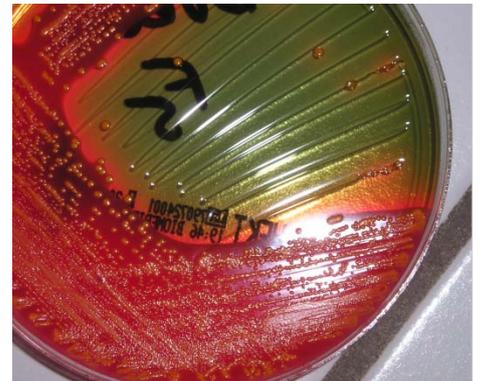
- 用灼烧过的手术刀或抹刀烧烙肝脏表面后探入肝实质
- 或当出现纤维素性或脓性病变，怀疑为亚急性大肠杆菌病时可探入心包，气囊，关节中采集样本。不过，病变持续1周以上时往往呈无菌状态。
- 或当死后变化非常明显时，应探入骨髓采样，因为肠道中的大肠杆菌可能已扩散到肝脏和其他组织。

在储存和运输途中，尽管大肠杆菌菌株可在密封的琼脂斜面上生长良好，但若需长期储存，建议将肉汤培养物用无菌甘油以1:1的比例进行混合（-20° 至-60℃ ）。

这种细菌很容易在18℃至44℃甚至更低温度下的普通营养培养基上生长。

可使用选择培养基进行鉴别：

- Tergitol琼脂糖（黄色菌落）
- EMB培养基（黑色菌落，金属光泽）
- 麦康凯琼脂糖（粉红色菌落）。山梨糖醇麦康凯琼脂可用于区分大肠杆菌 O157H7与其它大肠杆菌，因为它不发酵山梨糖醇。
- Drigalzski Hektoen培养基（参见图片）



生长的最佳条件是 37 °C，在此温度下，传代时间为 20 分钟，可以在 24h 后分离大肠杆菌菌落。如需信息，可根据下表确定在特定的时间段期间与温度有关的传代时间和菌体数量。

温度	传代时间	24小时内的大肠杆菌数量
0	20 小时	2
4.4	6 小时	8
10	3 小时	128
15.6	2 小时	2048
21.1	1 小时	8388608
26.7	45 分钟	3435973800
32.2	30 分钟	24073749000000
37.8	20 分钟	23611832000000000000



CHICK PROGRAM

关于生长菌落的鉴别，其不同特性（通常使用API 20E系统或自动识别机器）有以下几种：

- 产生吡啶
- 往往存在 β -半乳糖苷酶
- 硫化氢阴性（不同于沙门氏菌），柠檬酸阴性，尿素酶阴性（不同于克雷伯氏菌），附录表中给出了大肠杆菌的诊断特征的更多细节。

完成了培养并鉴别清楚之后，有两种方式可以知道分离株的抗生素敏感性（抗菌谱）：

基于稀释的定量方式：建立抗生素系列稀释梯度（这是一系列抗生素的浓度逐渐降低的反应瓶）。没有细菌生长的最后一个小瓶即抗生素的最小抑制浓度。

基于扩散的半定量方法（KB法）：小片中含有不同的抗生素，或树脂浸渍纸片，被放置在琼脂平板培养基上的不同区域，琼脂平板是一种细菌可以增殖的营养丰富的环境。抗生素会在各自的周围区域扩散，细菌溶解的部分将变得可见。由于抗生素的浓度在中心最高，并在此区域的边缘浓度最低，直径代表了最低抑菌浓度，或MIC（根据已知的线性回归曲线进行直径【mm】到MIC【微克/毫升】的转换）。



如今，市场上已有更快和更实际的方法。自动机器（同时间鉴定和抗菌谱）和E-试验（参见图片 - Biomerieux / AB Biodisk）是可承担日常分析。然而，这些方法的成本效益取决于分析的数量和频率。



大肠杆菌的多样性和分离菌株的特征

埃希氏大肠杆菌是一种异质性的细菌种类，不仅是它们的基因组大小不同：4.6 至 5.3 Mpb，其表面抗原也不同，更重要的是，它们的致病性也不同。因此，应该对分离株进行一个更精确的识别，主要基于表面抗原和毒力因子。这对于在家禽业分析中知道感染的来源和得到流行病学数据是很有用的。

表面抗原的多样性

我们可以区分的抗原主要有 5 组，其中存在许多不同的形式。

 O抗原：173 个不同种类的LPS，脂多糖

它们是位于细菌细胞膜外层的与脂质A相连的多糖链，所以被称为“内毒素”。它可以保护细菌免受补体系统（先天免疫）的影响。



鸡计划

CHICK PROGRAM

K 抗原: 表面多糖 (荚膜), 有 80 多种不同种类

这些水合多糖使该细菌属的荚膜表现出很大的多样性。荚膜的作用是避免免疫系统的清除, 这些抗原具很低免疫原性但致病性更强 (例如 K1, K5)。已有特异性抗血清用来区分血清型。

H 抗原: 鞭毛蛋白 (蛋白质), 有 56 种不同种类 (无致病性)。

F 抗原: 菌毛抗原 (蛋白质), 有 17 种不同种类。

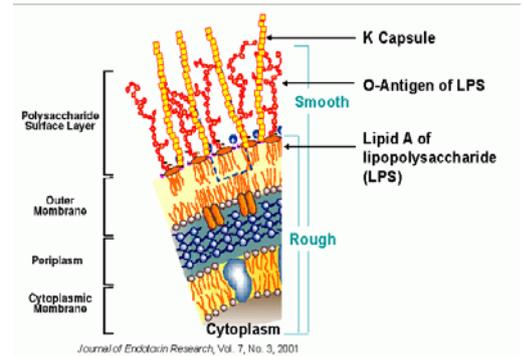
它们的表达与生长介质有关, 并且参与与细胞的吸附。已经开发了用于检测它们的许多方法, 尤其是用于人类 (F1, F2, F3), 猪 (F4) 和小牛 (F5) 的方法。它们可以通过甘露糖敏感性/抗性实验根据是否抑制其凝集进行分类。

外膜: 外膜蛋白 (微管)

目前, 仍然使用基于表面抗原的考夫曼分类方法 (1944), 模型如下:

Ox: Ky : Hz

由于 O, K 和 H 抗原之间具有一些优先组合的关系, 分离株的血清型总数明显少于可能的组合数量。



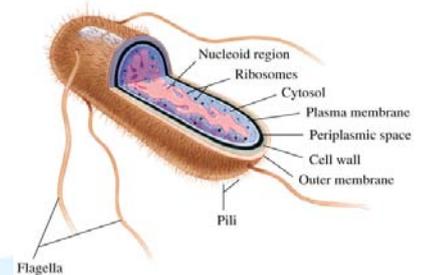
毒力的多样性

根据菌株的不同, 在显示的毒力方面有很大的差异。有完全非致病性大肠杆菌 (例如 K12), 另一方面存在几种致病型大肠杆菌。

一个致病型是一系列显示出如下特征的菌株的集合:

- 特有的毒力
- 与特定类型的感染相关
- 而且往往与宿主特异性有关

作为提示, 下表列出了两大致病型, 用图表列出了 APEC (禽致病性大肠杆菌) 的致病型。



肠型		肠外	
ETEC	产肠毒素	UPEC	尿路感染
EPEC	肠致病性	MENEC	脑膜炎
EIEC	肠侵袭性	SEPEC	败血症
EHEC (VTEC)	肠出血性	APEC	禽大肠杆菌病
EAggEC	肠聚集性	(*)备注 直至目前, 没有大肠杆菌被证实为禽类消化道的首要致病菌	
AIEC	与克罗恩病有关		



鸡计划

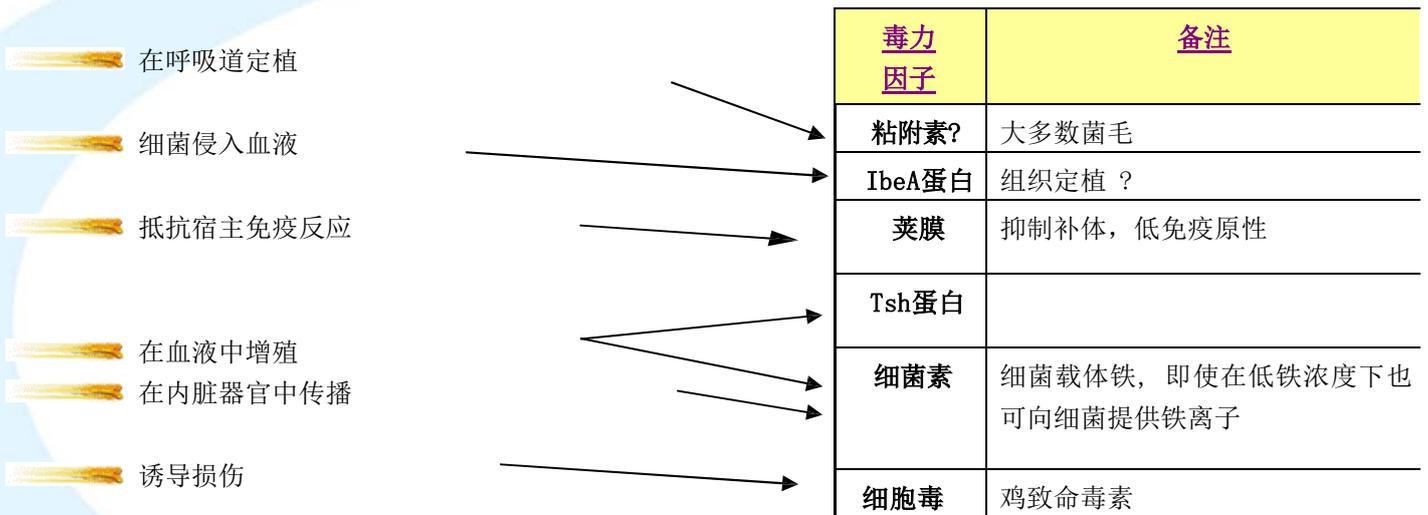
CHICK PROGRAM

有不同的方法来确定一个特定的大肠杆菌分离菌株的致病性，如下所示（详细信息包含在附录 2 的图表中）：

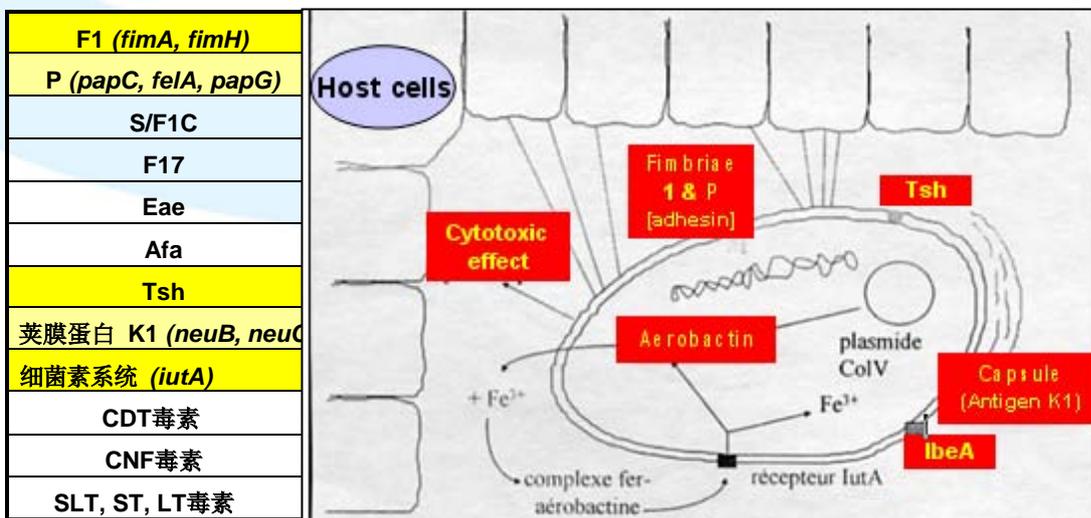
- 理所当然有一日龄雏鸡的攻毒实验
- 遗传特征
- 根据例如 API 20 E 系统分出的生物型
- 根据上述的表面抗原分出的血清型。

某些致病型与特定血清型相关联，可以在日常流行病学/诊断中提供参考。

然而，已找到新的方法来通过毒力因子研究 APEC 菌株的致病性。事实上，在感染过程中，一些特性可以帮助细菌进行以下步骤：



在欧洲1999年至2002年间进行的APEC菌株计划中，在560株确认为病原体的菌株中（致死性测试），致病基因的比例如下：





CHICK PROGRAM

即使到目前为止，血清分型依然是最简单最廉价的描述分离菌株致病性的方法，其中一些因素比较重要，并且可以帮助鉴定致病性菌株：

- 一些专业的禽类研究实验室在对菌株进行了传统的分离和血清分型步骤后，会使用 IutA 蛋白的特异性单克隆抗体鉴定菌落是否存在菌素系统（斑点杂交法，INRA，法国）。
- 也可以预见，为了进行诊断或流行病学调查，一些具有成本效益优势和节省时间的多重 PCR 程序会被应用。

应用：流行病学研究及污染管理

大肠杆菌感染是诱发因素和菌株致病性之间的平衡。因此，当一个地区或公司大肠杆菌病成为一个重大关切时，应该注意：

- 采取去除应激，改良疫苗接种计划，并尽可能地保护其免受免疫抑制疾病等措施以减少病禽中的细菌感染、临床表现和放大效应。
- 了解污染源以便针对更多的感染机会（生物安全，水净化，鸡蛋感染和其他）。

事实上，大肠杆菌是一种常见家禽肠道菌群，浓度高达 10^6 个 / 克。年龄越小、没有建立正常菌群的禽类或位置较后的肠道中数量越多。可以在垃圾和排泄物中发现大肠菌群，禽舍内的灰尘可能含有大肠杆菌 10^5 - 10^6 个 / 克。这些细菌会存活很长时间，尤其是在干燥的条件下。

饮用水中存在大肠菌群被认为是粪便污染的指标。在正常的鸡中，10-15%的肠大肠菌群属于潜在致病血清型。致病性血清型的确可以通过受污染的井水引入家禽，并黏附在管道的生物膜中持续存在，不断污染新引入的一日龄雏鸡。

致病性大肠杆菌在蛋中的传播是常见的，并与小鸡的高死亡率有关。新孵出的小鸡肠道中的致病性大肠杆菌比孵出它们的鸡蛋中的大肠杆菌数量更多，表明孵化后大肠杆菌迅速扩散。鸡蛋感染的最重要的来源似乎是被粪便污染的鸡蛋表面以及随后渗入蛋壳和膜中。

饲料经常被致病性大肠杆菌污染，但加热制粒过程可以破坏这些细菌。啮齿动物的粪便经常含有致病性大肠杆菌。



CHICK PROGRAM

结论

为了管理家禽养殖业中种类繁多的大肠杆菌病，应建立一个明确的和有组织的措施。因获得性大肠杆菌耐受性所需花费（轮换使用新的抗生素等）以及对公共健康越来越多的关注使得养禽业需要这样一系列措施。普遍认为，大肠杆菌的有效控制依赖于在肉鸡生产每个阶段识别并消除这些诱因：

- 种鸡阶段
- 孵化场阶段
- 肉鸡在农场的生长阶段。

一个好的流行病学诊断是必须的，应锁定准确的目标。如果能同时去除诱发因素的话，减少致病性菌株的感染毫无疑问是更为有效。

因此，应密切关注其他疾病的预防计划。农场中的所有应激都可能增强大肠杆菌的发病，应加以避免。同时，免疫抑制性疾病的最优管理是降低本病发病率的主要因素之一。



CHICK PROGRAM

附录：大肠杆菌的识别

特性	大肠杆菌结果
过氧化氢酶	+
氧化酶	-
吲哚	+
硫化氢 (H ₂ S)	-
柠檬酸盐 (Simmons)	-
尿酶	-
葡萄糖	+
乳糖/ β -半乳糖苷酶	+
蔗糖	+ / -
甘露醇	+
半乳糖醇	+ / -
核糖醇	-
肌醇	-
降解硝酸盐 (为亚硝酸盐)	+
明胶	-
吲哚	+
甲基红	+
V-P反应	-
氰化钾培养基	-
赖氨酸脱羧酶	+
鸟氨酸脱羧酶	+ / -
苯丙氨酸脱羧酶	-
水杨苷	+ / -