

桂文龙, 胡新岗, 管远红, 等. 21 株猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 190-192.

# 21 株猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及药敏试验

桂文龙, 胡新岗, 管远红, 唐露露, 陈 凤

(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

**摘要:**对来自苏中地区 25 个疑似感染多杀性巴氏杆菌的规模化猪场随机采取的 250 份病料, 通过涂片镜检、分离纯化、生化试验、PCR 鉴定和动物试验, 从 4 个猪场分离出共 21 株多杀性巴氏杆菌。采用纸片法检测了分离菌株对 13 种药物的敏感性, 其耐药性顺序为: 头孢氨苄、复方新诺明 > 红霉素、链霉素 > 青霉素 G、四环素、林可霉素 > 卡那霉素 > 庆大霉素 > 利福平 > 诺氟沙星 > 氧氟沙星 > 氟苯尼考。分离株对氟苯尼考和氧氟沙星敏感的比例分别为 85.71% 和 80.95%, 可作为临床控制猪多杀性巴氏杆菌病的首选药物。

**关键词:**猪; 多杀性巴氏杆菌; 分离; 鉴定; 药敏试验

**中图分类号:** S852.61<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0190-02

多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) 是一种重要的病原菌, 对多种动物和人均有致病性, 常引起猪发生肺炎和萎缩性鼻炎, 也是猪呼吸道疾病综合征 (porcine respiratory disease complex, PRDC) 的重要致病因子之一<sup>[1]</sup>。该菌正常存在于多种动物的口腔和咽部黏膜, 当动物处于应激状态和机体抵抗力下降时细菌大量繁殖并致病, 发生内源性感染<sup>[2]</sup>。近年来, 苏中地区部分规模化猪场受多杀性巴氏杆菌的侵害呈逐年上升趋势, 尤其是与其他病毒和细菌的混合感染和继发感染<sup>[3]</sup>。为此, 本试验对苏中地区猪场感染的多杀性巴氏杆菌进行了分离鉴定及药物敏感性试验, 为该地区猪群感染多杀性巴氏杆菌的药物预防和治疗提供科学依据。

## 1 材料与设备

### 1.1 供试菌株与动物

2011 年 8 月至 2012 年 12 月, 从苏中地区 25 个疑似感染多杀性巴氏杆菌的规模化猪场采取猪耳静脉血、肺、心血、脑、脾、淋巴结等共 250 份病料。通过涂片镜检、分离纯化、生化试验、PCR 鉴定和动物试验等方法分离鉴定获得的 21 株多杀性巴氏杆菌菌株。供试动物: 健康绵羊 4 只、健康小白鼠若干只, 均由江苏农牧科技职业学院教学动物医院提供。

### 1.2 试剂与仪器

试剂: 生化试验的糖或醇; 革兰氏和美蓝染液; MR、VP、接触酶、脲酶等试验用的试剂; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 DNA marker 等。以上主要试剂均购自正规厂家。仪器设备: 凝胶成像系统、电泳仪、PCR 扩增仪、CO<sub>2</sub> 培养箱、超低温冰箱、生物显微镜等, 主要仪器设备均为江苏省动物流行病学研究中心提供。细菌药敏试纸: 选用了青霉素 G、头孢氨苄、红霉素、复方新诺明、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、氧氟沙星、诺氟沙星、四环素、林可霉素、利福平、氟苯尼考等 13 种临

床上常用的抗菌药敏试纸, 均购于正规厂家。

## 2 试验方法

### 2.1 培养基

血清和鲜血琼脂平板、鲜血琼脂斜面、麦康凯琼脂平板和普通肉汤培养基等, 以上培养基均按常规方法制备。

### 2.2 病料采样

从苏中地区 25 个疑似感染多杀性巴氏杆菌的规模化猪场, 每个猪场随机采取 10 份, 共 250 份疑似病料。疑似病猪生前无菌采取耳静脉血, 死后 6 h 内剖检尸体, 无菌采取新鲜的肺、心血、脑、脾、淋巴结等材料。

### 2.3 菌株分离鉴定

2.3.1 涂片镜检 将上述疑似病料分别按照常规染色法进行革兰氏染色和美蓝染色, 然后镜检。

2.3.2 分离纯化 将镜检结果为革兰氏阴性且美蓝染色为两极浓染杆菌的疑似病料划线接种于血清琼脂平板和绵羊鲜血琼脂平板, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 ℃ 培养 24 h, 挑取圆形、透明、直径 1~2 mm 的灰白色可疑菌落, 抹片革兰氏染色和美蓝染色, 显微镜下观察细菌的形态特点。同时, 挑取上述典型菌落划线接种于绵羊鲜血琼脂斜面上, 进行纯培养。取纯培养的单个典型菌落进行革兰氏染色和美蓝染色, 镜检观察纯培养后细菌的形态和染色特点。并将纯培养物接种于鲜血琼脂平板、麦康凯琼脂平板和普通肉汤培养基, 37 ℃ 有氧条件下培养, 同时设另一组在厌氧条件下培养, 观察其生长特性。

2.3.3 生化试验 将接种分离菌的 24 h 纯培养物, 做水杨酸、葡萄糖、果糖、甘露醇、半乳糖、蔗糖、甘露糖、山梨醇、乳糖、鼠李糖、菊糖、麦芽糖、阿拉伯明胶等糖 (醇) 发酵试验。并按常规方法分别进行硫化氢试验、脲酶试验、接触酶试验、吲哚试验、MR 试验和 VP 试验。

2.3.4 PCR 鉴定 将上述纯化初步鉴定的细菌进一步用 PCR 方法确定。用灭菌接种环取少许被检纯培养后菌落与 100 μL 无菌 PBS 液混匀, 取 1 μL 菌悬液作 PCR 模板。按照唐先春等猪多杀性巴氏杆菌 PCR 鉴定方法操作<sup>[3]</sup>。根据巴氏杆菌 *Kml* 基因 (No. AF016259) 序列设计引物 P<sub>1</sub>: 5' - GGTCT - TAGATGAGCGACAAGG - 3' 和 P<sub>2</sub>: 5' - GCGCTAT -

收稿日期: 2013-01-17

基金项目: 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划 (编号: 2012JSSPITP3455)。

作者简介: 桂文龙 (1978—), 男, 湖南江永人, 硕士研究生, 讲师, 主要研究方向为动物传染病的防控。E-mail: guiw120@163.com。

TACTTCCTTCGTTC-3', 扩增片段大小为 457 bp, 引物由某正规公司合成。反应体系 (50  $\mu$ L): 10  $\times$  缓冲液 5  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L, *Taq* E 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 40  $\mu$ L。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 59  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 0.5 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收测序。

2.4 动物试验

将分离菌纯培养物接种于血清肉汤培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养 12 h。用生理盐水将培养悬液稀释菌数约为 10<sup>9</sup> CFU/mL, 分别腹腔注射 5 只健康小白鼠, 0.2 mL/只, 同时设立生理盐水阴性对照组。在接种后 72 h 内观察小白鼠死亡情况, 并剖检小白鼠, 观察其病理变化, 且采取小白鼠心血等病料组织涂片, 染色镜检, 并进行细菌分离鉴定。

2.5 药敏试验

将通过以上方法鉴定确定的 21 株多杀性巴氏杆菌, 利用上述 13 种药敏试纸分别按照常规的纸片法操作进行药敏试验, 通过测量各纸片的抑菌圈 (mm) 大小, 参照美国国家临床实验室标准委员会 (NCCLS) 提供的判断标准<sup>[4]</sup>, 确定该地区猪多杀性巴氏杆菌的耐药顺序, 进而筛选预防与治疗本病的首选药物。

3 结果与分析

3.1 镜检结果

镜检可见 25 个疑似猪场中有 4 个猪场, 250 份疑似病料中共有 21 份存在可疑病菌。镜下观察到的细菌为革兰氏阴性球状短杆菌, 散在或成对存在; 美蓝染色为两极浓染的球状杆菌, 有荚膜。

3.2 分离鉴定结果

3.2.1 分离纯化鉴定结果 21 株疑似病原菌在血清琼脂平板和鲜血琼脂平板上均长成边缘整齐、表面光滑、湿润、露珠样的细小菌落, 在鲜血琼脂平板上无溶血现象。对分离菌进行纯培养, 纯培养物为革兰氏阴性短杆菌, 无芽孢, 两极着色不明显, 美蓝染色两极浓染明显, 多数为单个存在。纯培养物为需氧或兼性厌氧菌, 无运动性。再次接种在鲜血琼脂平板上, 呈现露珠样的细小菌落, 无溶血; 在麦康凯琼脂平板上不生长; 在普通肉汤培养基中, 液面开始轻度浑浊, 4~5 d 后液体变得清晰, 管底出现黏稠沉淀, 振荡后不浑浊, 不分散, 表面形成菌环。

3.2.2 生化试验鉴定结果 24 h 后纯培养物能发酵葡萄糖、果糖、甘露醇、半乳糖、蔗糖、甘露糖、山梨醇和麦芽糖, 产酸不产气; 不能发酵水杨酸、乳糖、鼠李糖、菊糖和阿拉伯明胶; 脲酶试验、MR 试验和 VP 试验均为阴性; 硫化氢试验、接触酶试验和吲哚试验均为阳性。

3.2.3 PCR 鉴定结果 对以上分离鉴定的可疑菌株再进行 PCR 鉴定, 产物经琼脂糖凝胶电泳, 检测到的大小均一致, 与预期大小高度一致。PCR 产物经测序分别与巴氏杆菌 *Kml* 基因 (No. AF016259) 序列同源性在 98.31% 以上, 扩增序列同源性较高, 引物也设计合理, 可用于病原菌的快速鉴定。结合以上鉴定结果, 共鉴定出猪多杀性巴氏杆菌 21 株, 并主要来自肺部。

3.3 动物试验结果

接种病料的小白鼠均在 1 d 时间内全部死亡, 生理盐水阴性对照组的小白鼠全部存活。剖检死亡小白鼠, 可见腹腔液明显增多, 心包和胸腔有不同程度的浆液性纤维素性渗出物, 心内外膜、肠黏膜出血, 肝、淋巴结肿大。采取死亡小白鼠病料涂片镜检, 镜下观察到的细菌为革兰氏阴性短杆菌, 美蓝染色具有明显的两极特性, 有荚膜。进一步分离鉴定与病猪的结果一致。

3.4 药敏试验结果

临床分离的 21 株猪源多杀性巴氏杆菌对 13 种抗菌药物的敏感度详见表 1。根据敏感度结果, 参照 NCCLS 提供的判断标准<sup>[4]</sup>, 按照“高敏菌株数 + 中敏菌株数 = 敏感菌株数”和“低敏率 = 耐药率”, 确定上述试验药物的耐药率大小顺序为: 头孢氨苄、复方新诺明 > 红霉素、链霉素 > 青霉素 G、四环素、林可霉素 > 卡那霉素 > 庆大霉素 > 利福平 > 诺氟沙星 > 氧氟沙星 > 氟苯尼考。

表 1 21 株猪源多杀性巴氏杆菌分离株对 13 种药物的敏感度

抗菌药物	菌株数及敏感度 (%)			
	高敏	中敏	低敏	敏感
青霉素 G	1 (4.76)	2 (9.52)	18 (85.71)	3 (14.29)
头孢氨苄	0 (0)	1 (4.76)	20 (95.24)	1 (4.76)
红霉素	0 (0)	2 (9.52)	19 (90.48)	2 (9.52)
复方新诺明	0 (0)	1 (4.76)	20 (95.24)	1 (4.76)
链霉素	1 (4.76)	1 (4.76)	19 (90.48)	2 (9.52)
卡那霉素	3 (14.29)	5 (23.81)	13 (61.90)	8 (38.10)
庆大霉素	4 (19.15)	6 (28.57)	11 (52.38)	10 (47.62)
氧氟沙星	9 (42.86)	8 (38.10)	4 (19.05)	17 (80.95)
诺氟沙星	8 (38.10)	5 (23.81)	8 (38.10)	13 (61.90)
四环素	1 (4.76)	2 (9.52)	18 (85.71)	3 (14.29)
林可霉素	1 (4.76)	2 (9.52)	18 (85.71)	3 (14.29)
利福平	7 (33.33)	5 (23.81)	9 (42.86)	12 (57.14)
氟苯尼考	10 (47.62)	8 (38.10)	3 (14.29)	18 (85.71)

4 小结与讨论

本试验于 2011 年 8 月至 2012 年 12 月从苏中地区 25 个疑似感染多杀性巴氏杆菌的规模化猪场, 随机取 250 份疑似病料, 通过分离培养、染色镜检、生化试验、PCR 鉴定和动物试验等, 共分离出 4 个猪场, 21 株猪多杀性巴氏杆菌, 猪场感染率为 16.0%, 总分离率为 8.4%。说明猪多杀性巴氏杆菌感染在苏中地区比较普遍, 流行情况较为严重, 已对苏中地区养猪业构成潜在威胁, 成为养猪业的重要呼吸道疾病之一, 因此应引起各养猪场和动物防疫部门的高度重视。同时, 猪场的感染率高于总分离率, 说明目前养殖场还是以抗生素进行猪病防治, 并长期、大量使用该类药物所致, 这样将会导致细菌的抗药性越来越强, 治疗效果将会越来越差, 应引起重视。

本试验初步染色镜检时发现菌株有荚膜, 通过分离培养和纯培养, 发现荚膜不明显, 并两极浓染现象也不明显。通过动物接种试验后, 再次用试验动物病料染色中又发现了荚膜, 这与有关报道基本一致, 多杀性巴氏杆菌的荚膜是主要的毒力因子, 强毒株是有荚膜的, 弱毒株一般无荚膜, 并且荚膜的形成受到培养物的影响, 当培养物中铁受到限制时, 荚膜物质会显著减少<sup>[5]</sup>。因此, 此次试验表明分离的细菌具有较强的致病力, 说明此时间段苏中地区部分规模化猪场受到较强毒

董永军,王宪文,王丽荣. 鸡致病性大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):192-194.

# 鸡致病性大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验

董永军,王宪文,王丽荣

(河南科技学院动物科学学院/河南科技学院抗体工程重点实验室,河南新乡 453003)

**摘要:** 无菌采取新乡某鸡场送检的疑似大肠杆菌病的病死鸡的心血、肝、脾,进行病原菌的分离、鉴定、生化试验、动物试验和药敏试验。结果表明:引起该鸡场鸡发病的病原为大肠杆菌,该菌对小白鼠和鸡有较强的致病力。对常规药物进行药敏试验,结果表明该鸡场出现了耐药的致病性大肠杆菌,在使用药物治疗大肠杆菌病时,应根据药敏试验结果,选择敏感药物,并应注意交替用药,按疗程投药。

**关键词:** 鸡;致病性大肠杆菌;分离鉴定;药敏试验

**中图分类号:** S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0192-03

大肠杆菌病是由某些致病性大肠杆菌引起的各种禽类的急性或慢性的传染病。它是畜禽肠道的常在菌株,广泛存在于饲料、垫草、粪便和鸡舍的灰尘中,当鸡体质下降、环境恶劣、强应激情况下,菌株的致病性即可表现出来,使鸡感染本病。其主要症状是精神沉郁,食欲不振,羽毛粗乱,脱水,呼吸困难,湿性啰音,腹泻,排黄白色或黄绿色水样稀粪,肛门周围被粪便污染,腹部膨大,触诊发硬;剖检症状是纤维素心包炎,包心、包肝,当出现腹水时肝脏萎缩,质地变硬,卵黄萎缩变性,腹腔中充满淡黄色腥臭液体或蛋黄凝块,恶臭,肠管相互粘连,有的黏着为一个整体难以分离。各种血清型的大肠杆

菌菌株对药物的敏感性不同,给治疗带来困难。近年来,鸡大肠杆菌发病率日益增加,造成了鸡的成活率下降,给集约化鸡场造成了严重的经济损失<sup>[1]</sup>。

2012 年 2 月以来,河南新乡地区数个养鸡场的鸡有零星死亡的现象,不明原因突然死亡,死亡鸡出现羽毛松乱,鸡爪干瘪,消瘦,腹部膨大,青年鸡表现皮肤发炎、坏死、溃烂。剖检打开腹腔,卵黄变性落入腹腔,有恶臭味,肠道相互粘连,有的黏着为一个整体难以分离;纤维素心包炎、包心、包肝,取血液做涂片镜检,可见单个或成对的两端钝圆、中等大小红色的杆菌。经流行病学调查,由于环境条件不好,经常发生此病,剖检症状与现在的大致相同,死亡率为 10%~15%,经新乡市畜牧兽医工作站朱医生诊断为大肠杆菌病,用庆大霉素治疗及改变环境卫生,起到一定效果,病情得到一定的控制,当环境卫生差时,又会发生此病,给养鸡业带来较大的损失。为

收稿日期:2013-01-08

作者简介:董永军(1974—),男,讲师,从事基础兽医学的教学科研工作。E-mail:yaoli205@sina.com。

株的感染。在动物试验中,感染的小白鼠在 1 d 时间内全部死亡,也说明分离的巴氏杆菌具有较强的致病力。

多杀性巴氏杆菌在分离鉴定时,它的菌落、菌体形态特征与很多其他细菌相似,如溶血巴氏杆菌、嗜肺巴氏杆菌、波氏杆菌、放线杆菌等都为革兰氏阴性杆菌,都有两极着色特性<sup>[1]</sup>,因此,采用常规染色、生化等方法鉴定难度较大。而 PCR 引物具有很强的灵敏度和特异性,大大降低了分离细菌工作的难度。所以采取 PCR 鉴定技术结合生化等试验,可明显提高多杀性巴氏杆菌的分离鉴定率和准确度,完全适合应用于本菌株的流行病学调查。

从药敏试验结果看,在测试的 13 种抗菌药物中有 7 种耐药率在 85% 以上,它们分别是头孢氨苄、复方新诺明、红霉素、链霉素、青霉素 G、四环素、林可霉素,建议这 7 种抗菌药在针对猪多杀性巴氏杆菌的临床病例中暂停使用。耐药率在 30%~65% 的有 4 种,分别是卡那霉素、庆大霉素、利福平、诺氟沙星,在选用时应考虑作为次选药物。耐药率在 20% 以下的有 2 种,分别是氧氟沙星、氟苯尼考,可作为预防和治疗本病的首选药物。

表 1 表明,多杀性巴氏杆菌易产生耐药性。本次试验尚未发现对所有试验药物均敏感的菌株,而猪多杀性巴氏杆菌病是目前养猪场最常见的呼吸道疾病之一,畜主和猪场兽医

必须重视对本病的药物控制。猪场可根据本场的具体情况选择恰当的药物来控制本病:一是选择性价比合适的新型抗菌药物;二是定期分离本场的多杀性巴氏杆菌进行实验室药物敏感性监测,自常规药物中选择效果良好的品种用于临床。

多杀性巴氏杆菌是规模化猪场的一种重要病菌,严重影响猪群健康及饲料利用率,因此,对苏中地区部分规模化猪场进行多杀性巴氏杆菌的分离鉴定,为本病的快速诊断提供了科学依据。同时,对本地区分离的多杀性巴氏杆菌进行药物敏感性试验,了解其耐药性,确定在苏中地区控制本病的首选药物,更有利于对猪巴氏杆菌病的防控提供科学的参考。

## 参考文献:

- [1] 徐引弟,王治方,朱文豪,等. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 中国兽药杂志,2011,45(5):5-7.
- [2] 廖素环,蹇慧,吴雨清,等. 14 株猪源致病性多杀性巴氏杆菌的耐药谱分析[J]. 广西畜牧兽医,2011,27(2):72-74.
- [3] 唐先春,吴斌,索绪峰,等. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(6):590-595.
- [4] 胡继红,高振翔,尹铭芳. 美国 NCCLS2002 年版抗生素药敏试验操作标准更新内容[J]. 中华检验医学杂志,2002(6):46-48.
- [5] 李冰,曲祖乙,赵金梅. 猪巴氏杆菌病原的分离与鉴定[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(11):115-117.