

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^[1]。

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^[1],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.

了迅速有效防止该病的发生和流行,特进行了病原的分离鉴定及药敏试验,选择敏感的药物进行治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 三糖铁琼脂购自北京奥博星生物技术责任有限公司;伊红美蓝琼脂购自浙江杭州微生物试剂厂;普通肉汤培养基、营养肉汤、普通琼脂平板、购自上海中国惠兴生化试剂有限公司;麦康凯琼脂、营养琼脂购自北京双旋微生物培养基制品厂。

1.1.2 生化试剂 甲基红(M. R.)试剂、维陪(V-P)试剂、吡唑试剂均现用现配,醋酸铅试纸条、灭菌生理盐水、糖类发酵管等均按常规方法制备^[2]。

1.1.3 动物 小白鼠 20 只,体重 18~20 g,购自新乡医学院;10 日龄 AA 雏鸡购自当地市场。

1.1.4 药物 阿米卡星、链霉素、庆大霉素、氟苯尼考、环丙沙星、诺氟沙星的药敏片购自新乡市畜牧兽医工作站。

1.2 方法

1.2.1 病料来源与采集 2012 年 2 月新乡某鸡场送检的疑似大肠菌病的病、死鸡若干羽,死亡鸡死亡时间不超过 12 h;将送检的病鸡进行解剖,无菌采取明显病变部位如心包、气囊、肝脏表面的渗出物涂片,革兰氏染色,镜检,然后无菌操作将可疑的病料接种于麦康凯琼脂平板上。

1.2.2 细菌分离培养 接种过病料的麦康凯琼脂平板置 37℃ 生化培养箱培养 24 h,然后以无菌操作挑选单个的可疑典型菌落接种于伊红美蓝琼脂平板上进行培养;接着以无菌操作挑单个的可疑典型菌落到普通斜面上进行纯培养,同时将另一半菌落涂片,革兰氏染色,进行镜检;纯培养物置 4℃ 冰箱备用^[2]。

1.2.3 细菌形态学观察 取在麦康凯琼脂平板上培养 24 h 的新鲜菌落,抹片进行革兰氏染色镜检^[3]。

1.2.4 生化试验 从分离并纯化的菌种中钓菌,分别接种于伊红美蓝琼脂平板斜面上,葡萄糖发酵管,普通肉汤培养基,三糖铁琼脂培养基中置 37℃ 生化培养箱中培养,其中三糖铁琼脂培养基,糖发酵试验,V-P 试验,M. R. 试验,吡唑试验于接种后 2~3 d 即可观察结果,柠檬酸盐试验于接种后 2~4 d、硫化氢试验第 7 天时观察结果^[4]。

1.2.5 致病力测定 (1)菌液制备。将分离菌接种于营养

肉汤中,于 37℃ 培养 24 h,4℃ 保存备用。(2)动物试验。小白鼠 20 只,随机分为 A1、B1 等 2 组,每组 10 只。A1 组为试验组,B1 组为对照组。A1 组腹腔接种营养肉汤菌液,每只 0.2 mL;B1 组腹腔接种相同剂量的灭菌生理盐水,隔离饲养^[5]。从市场购 10 日龄 AA 雏鸡 20 羽,饲养 1 周,临床健康。随机分为 A2、B2 等 2 组,每组 10 羽。A2 组雏鸡颈部皮下接种 0.2 mL 营养肉汤菌液;B2 组腹腔接种相同剂量的灭菌生理盐水,隔离饲养^[6]。

1.2.6 药敏试验 按 K2B 纸片扩散法将被检细菌无菌接种于普通琼脂平板上,间隔一定距离贴上各种药敏试纸^[3],于 37℃ 培养 24h,结果判断依据《纸片法抗菌药物敏感试验操作标准(第 4 版)》进行。

1.2.7 治疗措施 根据药敏试验结果,采用敏感药物对发病鸡进行治疗,投药 7 d,配合电解多维糖饮水,对同群鸡进行药物预防,并对发病鸡舍专人饲养,加强消毒^[7]。

2 结果与分析

2.1 剖检变化

肝脏大且表面被 1 层透明的胶冻样覆盖,纤维素性心包炎、心与心包粘连。当出现腹水时,肝脏萎缩质地变硬,卵黄萎缩。腹腔中充满淡黄色腥臭液体或蛋黄凝块及破裂卵黄,恶臭,肠管相互粘连,有的黏着为一个整体难以分离,输卵管内含有黄白色豆腐渣样物,表面粗糙^[8]。

2.2 细菌分离培养

将所分离的细菌分别置于 37℃ 生化培养箱中培养 24 h,在麦康凯琼脂上形成较小的疑似大肠杆菌的粉红色菌落,取菌落接种在伊红美蓝琼脂上产生黑色带金属光泽的菌落,取菌落接种在营养琼脂上形成圆形凸起、光滑、湿润、半透明、灰白色菌落,直径约 2~3 mm^[2]。

2.3 细菌形态学观察

病死鸡肝、脾等组织培养物涂片染色镜检,均可见两端钝圆,多数散在排列,偶尔有 2~3 个连在一起的革兰氏阴性短杆菌。

2.4 生化试验

将纯培养物接种于生化培养管中,进行 7 项生化试验鉴定,由于细菌不同对生化试验鉴定的结果不同,可发酵葡萄糖产酸、产气,不产生硫化氢,M. R. 试验为阳性,V-P 试验为阴性,吡唑试验为阳性,不能利用柠檬酸盐^[9]。由表 1 可得分离菌 1、3、4 为大肠杆菌,分离菌 2 不是大肠杆菌。

表 1 生化试验结果

生化指标	分离菌				标准菌株
	1	2	3	4	
TSI 反应模式	A(K)/A + (-); -	K(A)/A + (-); (-)	A(K)/A + (-); -	A(K)/A + (-); -	A(K)/A + (-); -
葡萄糖	+	+	+	+	+
吡唑	+	-	+	+	+
柠檬酸盐	-	+	-	-	-
V-P	-	-	-	-	-
M. R.	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	+	-	-	-

注:“+”为 90%~100% 阳性;“-”为 0~10% 阴性。TSI(三糖铁培养基)上反应情况为 A=产酸(黄色),K=产碱(红色),“+”为阳性,“-”为阴性,()偶尔可见的反应。

2.5 动物试验

2.5.1 肉汤中生长情况 分离菌在肉汤中培养 18~24 h,

呈均匀混浊,管底有黏性沉淀,液面管壁有菌环。

2.5.2 致病性 A1 组小鼠有 8 只 24 h 内死亡,2 只 36 h 内

死亡。剖检可见肝脏肿大,有出血点和坏死点;肠严重膨气,心包淤血,肺出血,脾脏淤血采取 A1 组小鼠的心血、肝和脾接种在普通琼脂平板及普通肉汤,37 ℃ 培养 24 h,有细菌生长。革兰氏染色及生化鉴定表明,此菌与接种细菌为同种细菌。表明该菌对小白鼠具有较强的致病力。B1 组饲养 7 d 后全部存活,剖检未见病变。

A2 组雏鸡 3 d 内全部死亡,剖检有与原发病鸡相同的明显病变,雏鸡的心血、肝和脾均能分离出大肠杆菌;B2 组雏鸡全部健康存活,7 d 后剖检未见有病变。

2.6 药敏试验

由表 2 可见,此次分离的大肠杆菌对阿米卡星、链霉素、庆大霉素、氟苯尼考敏感,对环丙沙星中度敏感,对诺氟沙星不敏感。

表 2 分离菌株对 7 种药物的敏感性

药物	纸片药物含量 (μg/片)	抑菌圈直径 (mm)	判定标准		
			耐药 (R)	中度敏感 (M)	敏感 (S)
阿米卡星	30	22	≤14	15 ~ 16	≥17
链霉素	10	19	≤11	12 ~ 14	≥15
庆大霉素	10	23	≤12	13 ~ 14	≥15
环丙沙星	5	20	≤15	16 ~ 20	≥21
氟苯尼考	30	29	≤12	13 ~ 17	≥18
诺氟沙星	10	11	≤12	13 ~ 16	≥17

2.7 治疗效果

通过选用敏感药物对病鸡进行治疗,投药 7 d,同时饮用电解多维糖,对同群鸡进行药物预防。对发病鸡舍专人饲养,加强消毒,注意通风换气,淘汰症状严重的病鸡。采取上述措施后,鸡群采食量逐渐增加,腹泻逐渐停止,1 周后基本恢复正常。

3 结论与讨论

近年来,在鸡产业化生产中,为了控制大肠杆菌及某些细菌感染,在饲料添加剂及治疗中,盲目使用某些抗菌药物,导致耐药菌株越来越多并日趋严重。大肠杆菌可通过菌毛将抗药性质粒传递给其他大肠杆菌,导致大肠杆菌的抗药性形成较快,环境中大肠杆菌耐药性菌株越来越多^[10]。药敏试验结果显示,曾对大肠杆菌比较敏感的环丙沙星、诺氟沙星等随着不断的应用均产生了不同程度的抗药性。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,且应注意交替用药,按疗程投药,才能收到较好的治疗效果。

大肠杆菌是条件性致病菌,防治该病关键在于加强饲养管理,做好各个环节卫生消毒,消除各种发病诱因。要逐步改善鸡舍的通风条件,减少鸡的饲养密度,定期对鸡舍及周围环境进行消毒,及时清扫鸡舍内的粪便,保持良好的通风,并净

化饮水保证水质的清洁,定期消灭蚊蝇,定期杀虫,有鼠类活动的鸡舍还应做好灭鼠工作,要建立健全兽医卫生防疫制度。在进雏前 2 周,舍内必须进行清洗和消毒。平常要注意舍内外环境的清洁卫生,经常洗刷水槽,料槽和饲喂用具等,定期消毒,并且要搞好常见多发病的预防工作^[11]。日常要提供全价优质饲料,足量补充维生素和电解质;夏季还要注意防暑;应添加饲料添加剂,如碳酸氢钠、杆菌肽锌、维生素 C 等;严格执行卫生防疫措施,创造良好的饲养环境^[12]。

由于各地大肠杆菌的血清型,特别是优势血清型存在差异,有效而通用的菌苗尚未出现,筛选地区性免疫原性优良的大肠杆菌菌株制作菌苗,是防治鸡大肠杆菌免疫预防基础。有条件的鸡场最好采用自家灭活苗,为疫苗制备做好初步的工作^[13]。

对病例通过流行病学调查,结合病理变化并通过涂片检查、细菌分离培养及生化试验,该菌株可以进一步确定为大肠杆菌,确定病原后,通过药敏试验,筛选出敏感药物,为该病的诊治提供了科学依据,治疗更具有针对性,治疗效果显著。

参考文献:

[1] 蔡宝祥. 家禽传染病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 66-68.

[2] 王选年, 冯春花, 王新华, 等. 河南省鸡大肠杆菌病原分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 河南职技师院学报, 1995, 23(1): 32-36.

[3] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 240-244.

[4] 郭万柱, 吴 彤, 陈瑶先. 动物微生物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1997: 9-16.

[5] 邵华斌, 杨 峻, 黎秋华, 等. 湖北省鸡大肠杆菌病流行情况调查及其病原分离鉴定[J]. 湖北畜牧兽医, 1998(3): 3-6.

[6] 刘玉涛, 周伦江, 王长兵. 闽北地区鸡致病性大肠杆菌的分离与血清型鉴定[J]. 福建农业学报, 2000, 15(3): 15-17.

[7] 甘孟侯. 禽病诊断与防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 67-68.

[8] 焦库华. 禽病的临床诊断与防治[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 36-38.

[9] 崔保安. 动物微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 32-34.

[10] 刁有祥, 李久芹, 陈庆普. 山东省鸡大肠杆菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1): 21-23.

[11] 高 波. 鸡病防控与治疗技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 45-47.

[12] 汪 毅, 刘永德, 刘 帅, 等. 鸡大肠杆菌分离鉴定与药敏试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2001(4): 18-19.

[13] 王双山, 张敬礼, 刘庆昌, 等. 肉鸡大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 河南农业科学, 2003(6): 43-45.