

蔡丙严,王 涛,吴 植,等. 鸭疫里默氏杆菌血清型鉴定及耐药性分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):168-169.

鸭疫里默氏杆菌血清型鉴定及耐药性分析

蔡丙严,王 涛,吴 植,李巨银

(江苏农牧科技职业学院动物医学院,江苏泰州 225300)

摘要:从泰州地区疑似鸭疫里默氏杆菌感染鸭场采集病料,经细菌分离培养得到 2 株菌株,通过细菌形态、培养特性、生化试验等方法鉴定为鸭疫里默氏杆菌,分别命名为 TY1 株和 TY2 株。采用玻片凝集试验对 2 个分离株进行血清型鉴定、K-B 纸片扩散法进行 12 种常用抗菌药物的药敏试验,结果显示,TY1 和 TY2 株均为血清 1 型,对头孢吡肟、环丙沙星高度敏感,对复方新诺明、阿米卡星、庆大霉素、青霉素、链霉素、阿奇霉素、林可霉素、利福平耐药。

关键词:鸭疫里默氏杆菌;血清型;鉴定;药敏试验

中图分类号: S858.322.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0168-02

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种革兰氏阴性、无鞭毛、无芽孢的棒状杆菌,瑞氏染色呈两极着色。鸭疫里默氏杆菌所引起的传染病称为鸭传染性浆膜炎,该病呈世界范围分布,给养鸭业带来了巨大的经济损失^[1]。

RA 对营养要求较高,在普通营养琼脂和麦康凯琼脂上不生长,在胰酶大豆琼脂(TSA)、血液琼脂、巧克力琼脂上生长良好。RA 在初次分离培养时对 CO₂ 依赖性强,一般在烛罐或 CO₂ 培养箱中,提高 CO₂ 浓度和湿度,37 ℃ 培养 48~72 h,RA 生长最佳^[2]。RA 血清型众多且非常复杂,现在国际上报道的血清型共有 21 种,其中优势血清型为 1 型和 2 型^[3],在我国,程安春等在此基础上又发现了 4 个新的血清型^[4]。血清型的复杂及血清型之间无交叉保护力给此病的防治带来极大的困难,多年来,由于生产上盲目用药、滥用药或超剂量用药,RA 对各种抗生素均产生不同程度的耐药性,尤其对喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素的耐药性非常普遍,耐药率极高,耐药情况复杂,并且来自同一群不同株对同一药物敏感性有差异的情况非常普遍^[5-6]。

从江苏泰州周边地区 2 个规模养鸭场临床疑似鸭疫里默氏杆菌感染的病死鸭中,进行病原分离和血清型鉴定,并且对分离菌株进行药敏试验,为切实做好该病的防治工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源 2013 年 3 月,从泰州周边地区获得临床具有典型鸭疫里默氏杆菌感染的病死鸭,从病死鸭的脑、心血、肝脏中分离获得 2 株菌株,分别命名为 TY1、TY2。

1.1.2 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA,批号:

2107469)、胰蛋白酶大豆肉汤培养基(TSB,批号:2191068),均购自碧迪医疗器械(上海)有限公司;麦康凯琼脂培养基(批号:12075)、普通琼脂培养基(批号:120909),均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.3 药品 阿莫西林、庆大霉素、环丙沙星、多西环素、头孢吡肟、阿米卡星、复方新诺明、青霉素、链霉素、阿奇霉素、林可霉素、利福平等 12 种药敏试纸(批号:20120920),购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.4 试剂 革兰氏染液、瑞氏染液、微量生化发酵管,均购自杭州天和微生物试剂有限公司;犍牛血清,购自浙江天航生物科技有限公司;鸭疫里默氏杆菌 1~10 型阳性血清,购自中国兽医药品监察所。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养与形态观察 无菌采取病死鸭脑、心血、肝脏等病料,分别接种于普通琼脂培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、巧克力琼脂培养基、鲜血琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基平板上,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。观察菌落形态,挑取单个疑似菌落涂片,革兰氏染色和瑞氏染色镜检,纯培养后,以 40% 甘油生理盐水于 -70 ℃ 保存备用。

1.2.2 生化试验 挑取 TSA 琼脂培养基、鲜血琼脂培养基平板上纯化的疑似 RA 菌株,按 Edwards PR 的方法用接种环在超净台将菌落接种于乳糖、半乳糖、蕈糖、果糖、蔗糖、棉子糖、葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇、枸橼酸盐、H₂S、M-R、V-P 尿素酶、吡啶等生化培养基上,继续培养 48~72 h 观察试验结果。

1.2.3 血清型鉴定 将纯化培养的分离菌株在含有 5% 犍牛血清的 TSA 培养基上,37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h。取 1 滴标准阳性血清滴于干净玻片上,挑取少量菌落混匀于标准阳性血清中,静置片刻观察玻片凝集结果。

1.2.4 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法,将保存的 2 株菌株分别在 TSA 琼脂培养基平板上扩增培养,刮取菌落,用灭菌生理盐水稀释细菌悬液至 1.5×10^8 个/mL,吸取 0.1 mL 均匀涂布于 TSA 琼脂培养基平板上,待菌液表面干燥后,用灭菌镊子将抗生素纸片贴附在琼脂表面,继续培养 48 h 后测量抑菌圈直径。

收稿日期:2013-05-09

基金项目:江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(编号:2012JSSPITP3463);江苏农牧科技职业学院科技资助项目(编号:YB1204)。

作者简介:蔡丙严(1980—),男,河南濮阳人,硕士,讲师,主要从事动物防疫与检疫专业的教学及科研工作。E-mail:caibingyan20@163.com。

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养特性与形态特征

分离菌株在胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 上生长良好,菌落湿润,小菌落呈露滴样,在麦康凯琼脂培养基和营养琼脂培养基上不生长。取菌落涂片、染色镜检,革兰氏染色可见阴性小杆菌,单个或成双存在;瑞氏染色呈现两极浓染的小杆菌。

2.2 生化试验

由表 1 可见,TY1 和 TY2 株均不发酵乳糖、半乳糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖等多种碳水化合物,不产生胨基质和硫化氢,过氧化氢酶、氧化酶和明胶液化试验为阳性,符合鸭疫里默氏杆菌的生化反应特征。

表 1 2 株分离菌株生化特性鉴定结果

项目	结果	项目	结果	项目	结果
乳糖	-	麦芽糖	-	M-R	-
半乳糖	-	甘露醇	-	H ₂ S	-
覃糖	-	山梨醇	-	过氧化氢酶	+
果糖	-	枸橼酸盐	-	尿素酶	-
蔗糖	-	硝酸盐还原	-	氧化酶	+
棉子糖	-	柠檬酸盐	-	吲哚	-
葡萄糖	-	V-P	-	明胶液化	+

2.3 血清型鉴定

将 TY1 和 TY2 株分别与鸭疫里默氏杆菌 1~10 型单因子阳性血清做玻片凝集试验,两菌株均与 1 型阳性血清出现清晰的乳白色絮状凝集块,与其他型阳性血清均不反应。由此鉴定,TY1 和 TY2 株均为血清 1 型。

2.4 药敏试验

由表 2 可见,TY1 和 TY2 株对头孢吡肟、环丙沙星高度敏感,对强力霉素、阿莫西林中度敏感,对复方新诺明、阿米卡星、庆大霉素、青霉素、链霉素、阿奇霉素、林可霉素、利福平耐药。

表 2 2 株分离菌株的药敏试验结果

药物名称	抑菌圈直径 (mm)		药物浓度 (μg/片)
	TY1	TY2	
头孢吡肟	19	18	15
环丙沙星	16	17	5
强力霉素	12	13	30
阿莫西林	14	11	10
复方新诺明	9	9	23.71、1.25
阿米卡星	9	8	30
庆大霉素	8	8	10
青霉素	9	7	10
链霉素	7	8	10
阿奇霉素	8	6	15
林可霉素	5	7	2
利福平	5	3	5

注:抑菌圈直径 10 mm 以下为耐药 (不敏感);10~15 mm 为中度敏感;15 mm 以上为高度敏感。

3 小结与讨论

鸭疫里默氏杆菌初次分离培养,由于所需生长条件苛刻、病料不新鲜和鸭场大量使用抗生素等原因,往往不易分离到,

因此,RA 初次分离,病料的采取和培养条件的选择至关重要。从分离过程中发现,在病鸭刚死亡或濒临死亡时无菌采取鸭脑组织和心血,且在 TSA 琼脂培养基平板上 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24~48 h,病菌分离成功率较高。

血清型鉴定有利于疫苗的研究和 RA 控制。由于 RA 血清型较多,且各血清型之间的交叉保护性差,因此,研制针对本地血清型的 RA 疫苗对于鸭疫里默氏杆菌的防治具有重要意义^[7]。根据胡清海等人的调查,江苏地区主要以 1、2、10 型为主^[8]。从本次试验结果可知,泰州周边地区规模鸭场分离的 2 株 RA 菌株均为血清 1 型,基本摸清了本地区流行 RA 菌株的优势血清型,为研制相应血清型的疫苗、控制该病的发生奠定了理论基础。

目前,鸭疫里默氏杆菌已成为国内危害养鸭业最严重的传染病之一,大部分鸭场,尤其是肉鸭场都有此病发生。虽然 RA 对多种抗生素敏感,但极易产生耐药性,而且不同地区、不同菌株对抗菌药物的敏感性不一,给实际治疗工作带来困难,最好能对当地分离菌株进行药敏试验,以便选择最佳药物进行治疗^[9]。头孢吡肟为新的第四代注射用头孢菌素,对葡萄球菌属和肠杆菌属 (尤其产气和阴沟肠杆菌) 的作用更强,对多种质粒介导和染色体介导的 β 内酰胺酶稳定,兽医临床应用较少。本次药敏试验结果表明,泰州地区鸭疫里默氏杆菌对头孢吡肟和环丙沙星高度敏感,对氨基糖苷类抗生素如庆大霉素、丁胺卡那霉素、林可胺类抗生素和磺胺类抗生素等耐药。因此,临床选择用药时必须以药敏试验结果为依据,才能做到正确用药,减少耐药菌的产生,从而提高治愈率,减少经济损失^[10],有条件的鸭场更应定期对环境中 RA 的药敏特性进行监测,以便在发病时及时有效地用药。

参考文献:

[1] Calnek B W. 禽病学[M]. 11 版. 高福,苏敬良,索勋,等译. 北京:中国农业出版社,2005:767-772.

[2] 马志伟,刘世超,许家荣,等. 鸭疫里默氏杆菌的分离、鉴定及培养条件优化[J]. 浙江农业科学,2010(5):1123-1126,1155.

[3] Pathanasophon P, Phuektes P, Tanticharoenyos T, et al. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand[J]. Avian Pathology,2002,31(3):267-270.

[4] 程安春,汪铭书,陈孝跃,等. 我国鸭疫里默氏杆菌血清型调查及新血清型的发现和病原特性[J]. 中国兽医学报,2003,23(4):320-323.

[5] 刘颖,苏敬良,刘文华,等. 鸭疫里默氏菌的药物敏感性检测[J]. 中国兽医杂志,2005,41(5):10-12.

[6] 许金俊,范海峰,金文杰,等. 徐州地区鸭传染性浆膜炎的病原分离鉴定及药敏试验[J]. 中国预防兽医学报,2006,28(5):503-506.

[7] 吕敏娜,黄承锋,张毓金. 鸭疫里默氏杆菌大肠杆菌二联蜂胶苗的研制[J]. 中国兽医杂志,2005,41(1):48-50.

[8] 胡清海,张知良,苗晋锋,等. 江苏安徽两省鸭疫里默氏杆菌病的流行病学调查研究[J]. 中国兽医科技,2001,31(8):12-13.

[9] 谢永平,陈泽祥,许力干,等. 鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. 广西农业科学,2010,41(7):729-731.

[10] 都振玉. 潍坊地区鸭传染性浆膜炎病原体的分离鉴定与疫苗制备应用研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009:1-47.