

张保平, 李娜, 高惠林, 等. 豪猪致病性大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 189-190.

豪猪致病性大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验

张保平¹, 李娜², 高惠林¹, 王前光¹, 任国冀¹, 唐瑞华¹, 童学勤³

(1. 常德职业技术学院, 湖南常德 415000; 2. 湖南文理学院, 湖南常德 415000;

3. 湖南省桃源县堆金豪猪养殖基地, 湖南桃源 415000)

摘要:从腹泻病死仔豪猪的心血、肝脏、脾脏和腹泻粪便中分离到 2 株细菌, 染色镜检革兰氏阴性, 细菌在麦康凯培养基上呈红色菌落。生化试验结果显示分离到的 2 株细菌对葡萄糖、乳糖、麦芽糖产酸产气, 不分解尿素, 无硫化氢产生。药敏试验结果表明, 分离到的 2 株细菌对头孢噻吩、头孢曲松、先锋霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、万古霉素、复方新诺明等高度敏感。动物致病性试验结果表明, 分离到的 2 株细菌对小鼠有强致病性。

关键词:豪猪; 大肠埃希菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S855.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0189-02

豪猪(*Hystrix hodgsoni*), 又称箭猪、刺猪。在动物分类学上属于哺乳纲、啮齿目、豪猪科^[1-3], 是一种经济价值很高的珍稀动物, 具有食用价值、药用价值和观赏价值^[4-5]。但由于野生豪猪日益枯竭, 面临绝迹, 2000 年 8 月 1 日国家林业局第 7 号令发布《国家保护的有益的或者具有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录》, 将豪猪列入保护物种, 禁止捕猎。故对豪猪进行规模化人工驯养繁殖, 大量生产商品豪猪, 不仅可以满足市场需要, 创造较好的经济效益, 同时也可发展地方经济, 调整农业产业化结构^[6-8]。豪猪的抗病能力很强, 很少发生疾病, 仔豪猪腹泻是引起豪猪死亡的主要病因, 是由致病性大肠埃希菌(*Escherichia coli*)引起的一种初生仔豪猪的急性致死性传染病, 多发于 7 日龄以内的仔豪猪, 发病率和死亡率均高。目前尚未有湖南常德地区豪猪大肠杆菌病的相关报道。本研究对湖南省常德市桃源县豪猪养殖场进行了调查, 采集了病死仔豪猪的病料, 经革兰氏染色、生化试验和药敏试验鉴定, 确诊病原菌为 *E. coli*, 这为常德地区豪猪 *E. coli* 病的防治提供了可靠的依据, 也为更好地指导和应用于生产实践, 以减少由此造成的经济损失提供了科学的保证。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品 麦康凯培养基, 购于北京奥博星生物技术责任有限公司; 普通营养肉汤培养基, 自制; 营养琼脂培养基, 购于北京奥博星生物技术责任有限公司; 细菌微量发酵管, 杭州天和微生物试剂有限公司生产; 药敏纸片, 北京天坛药物生物技术开发公司生产。

1.1.2 试验动物 20~22 g 小白鼠, 购自湖南农业大学小动物房。

1.1.3 病料来源 湖南常德市桃源县堆金豪猪养殖基地发生仔豪猪黄痢的病死豪猪的心血、肝脏、脾脏和腹泻粪便。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离 取病死仔豪猪的心血、肝、脾和粪便, 分别接种于普通营养肉汤中, 37℃ 培养 24 h, 取有细菌生长的普通营养肉汤接种于麦康凯琼脂平板, 37℃ 培养 24 h, 观察并记录。

1.2.2 细菌纯培养 将以上麦康凯培养基中的红色菌落接种于普通营养肉汤中 37℃ 培养 24 h, 再将肉汤接种于麦康凯琼脂 37℃ 培养 24 h, 进行细菌纯化。

1.2.3 油镜镜检 取普通营养肉汤及麦康凯培养基中的细菌, 涂片, 革兰氏染色镜检。

1.2.4 生化试验 按文献[9]的方法进行, 取分离菌接种于细菌微量发酵管中, 37℃ 培养, 每隔 24 h 观察 1 次, 连续 7 d, 并做好记录。

1.2.5 动物试验 用 20 只 20~22 g 健康正常的小白鼠, 进行致病性测定, 将小鼠分为 2 组, 实验组 14 只, 对照组 6 只, 实验组每只小白鼠腹腔注射分离菌肉汤培养物 0.2 mL, 对照组每只小白鼠腹腔注射灭菌肉汤培养物 0.2 mL。饲养并观察, 同时对死亡小鼠剖检, 心血接种于普通营养肉汤中 37℃ 培养 24 h, 染色镜检, 观察是否为接种菌。

1.2.6 药敏试验 将分离菌株按 Kirby-Bauer 建立的 K-B 纸片法^[10]进行药敏试验, 依次将药敏纸片均匀贴于琼脂平板表面并做好标记, 37℃ 培养 24 h, 测量抑菌圈的直径。

2 结果与分析

2.1 细菌的形态

该豪猪场病死仔豪猪的心血、肝、脾和粪便, 接种于普通营养肉汤中, 发现营养肉汤均匀浑浊, 管底有沉淀; 接种在麦康凯琼脂平板上长出圆形、表面光滑、湿润的红色菌落。涂片染色镜检可见红色、中等大小、短小的革兰氏阴性杆菌。

2.2 生化特性

从生化试验结果可以看出, 分离的 2 株细菌都能发酵葡萄糖、甘露糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖和鼠李糖, 并产酸产气; 均不产生硫化氢, 不分解尿素, 不利用枸橼酸盐; 吲哚和甲基红试

收稿日期: 2013-12-21

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(编号: 12JC0974); 湖南省常德市科技计划(编号: 2012CK03, 2011CK01)。

作者简介: 张保平(1978—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为预防兽医学。

E-mail: bpzhang2007@126.com。

通信作者: 高惠林, 教授。E-mail: ghl1133@126.com

验(MR)均为阳性,VP 试验为阴性(表 1),由此可判定分离的 2 株细菌为大肠埃希菌。

2.3 动物试验结果

每只小白鼠腹腔注射分离菌肉汤的试验组小白鼠全部死亡,而每只小白鼠腹腔注射灭菌肉汤的对照组小白鼠存活。从死亡的小白鼠的心血中分离到接种菌。

2.4 药敏试验结果

2 株分离菌对头孢曲松等 15 种供试药物存在不同的反应性,其中分离菌对阿莫西林、吡哌酸、青霉素 G、羧苄青霉素和环丙沙星等耐药;分离菌对头孢噻肟和诺氟沙星敏感性中等;高敏药物分别为头孢曲松、头孢噻吩、链霉素、万古霉素、卡那霉素、复方新诺明、先锋霉素和庆大霉素(表 2)。

表 1 豪猪致病细菌生化试验结果

试验名称	结果	试验名称	结果
葡萄糖	+	卫芽醇	-
甘露糖	+	山梨醇	+
麦芽糖	+	VP 试验	-
蔗糖	+	甘露醇	+
乳糖 5	+	甲基红(MR) 试验	+
鼠李糖	+	赖氨酸脱羧酶	-
棉籽糖	-	鸟氨酸脱羧酶	-
β-半乳糖苷	-	尿素	-
七叶苷	-	吲哚试验	+
蛋白胨	-	H ₂ S 试验	-
枸橼酸盐	-	氨基酸对照	-

注:“+”表示阳性或有反应,“-”表示阴性或无反应。

表 2 分离菌药敏试验结果

抗菌药物	药物含量 (μg/片)	判定标准(抑菌圈直径,mm)			抑菌圈直径 (mm)	结果
		耐药	中敏	高敏		
头孢曲松(CRO)	30	≤13	14~20	≥21	25	高敏
头孢噻吩(CTX)	30	≤14	15~17	≥18	21	高敏
链霉素(S)	10	≤11	12~14	≥15	19	高敏
万古霉素(VA)	30	≤14	15~16	≥17	24	高敏
卡那霉素(K)	30	≤14	15~16	≥17	21	高敏
头孢噻肟(CTX)	30	≤14	15~22	≥23	18	中敏
阿莫西林(AM)	10	≤13	14~16	≥17	11	耐药
复方新诺明(SXT)	25	≤10	11~12	≥13	22	高敏
吡哌酸(PT)	30	≤17	18~20	≥21	9	耐药
青霉素 G(P-G)	30	≤12	13~17	≥18	5	耐药
羧苄青霉素(CAR)	30	≤17	18~22	≥23	11	耐药
环丙沙星(CIP)	5	≤15	16~20	≥21	3	耐药
诺氟沙星(NOR)	10	≤12	13~16	≥17	14	中敏
先锋霉素(CTN)	30	≤14	15~17	≥18	26	高敏
庆大霉素(GM)	10	≤12	13~14	≥15	22	高敏

3 讨论

从湖南常德地区病死仔猪豪猪中分离的细菌经革兰氏染色镜检,为两端钝圆的革兰氏阴性短小杆菌;麦康凯琼脂培养基上,长出圆形、凸起,光滑半透明的红色菌落。生化试验结果显示,对葡萄糖、乳糖、麦芽糖产酸产气,不分解尿素,无硫化氢产生,与大肠杆菌的生化特征^[1]相符。接种小白鼠,小鼠全部死亡,由此证实从病死仔猪豪猪病料中分离到的 2 株细菌均是致病性大肠杆菌。另外由于试验设备欠缺,是否由病毒引起腹泻未能进行试验,但在仔猪豪猪腹泻病的诊断、治疗和防治过程中也不能忽视这些因素的影响。

经调查,该豪猪场在仔猪豪猪发生腹泻病时,曾使用了大量环丙沙星进行治疗,但效果不明显。通过药敏试验发现,该菌已经对环丙沙星、阿莫西林、吡哌酸、青霉素 G、羧苄青霉素产生耐药性,而头孢曲松、头孢噻吩、链霉素、万古霉素、卡那霉素、复方新诺明、先锋霉素和庆大霉素是高敏药物,在治疗时应作为首选药。因此在应用抗生素药物进行治疗时应进行药敏试验,避免不必要的经济损失。

豪猪大肠杆菌病跟其他动物大肠杆菌病一样,也是一种条件性疾病,本病最主要的防治措施是搞好豪猪舍环境卫生,改善饲养管理条件,防止水源污染,搞好清洁卫生和消毒工作。由于豪猪野性明显,听觉、嗅觉敏感,视觉发达,在饲养管

理上,尽量保持环境安静,由专人负责,减少对豪猪的应激刺激有利于防止大肠杆菌病的发生。

参考文献:

[1]张荣祖. 中国哺乳动物分布[M]. 北京:中国林业出版社,1997:172.
[2]王玉玺,张淑云. 中国兽类分布名录(四)[J]. 野生动物,1993,14(5):10-11.
[3]王西之,胡锦矗. 四川兽类原色图鉴[M]. 北京:中国林业出版社,1999:251.
[4]彭孟德,张晓梅. 特种药用动物养殖与加工技术[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1994:65-68.
[5]常祖光. 药用豪猪可大力养殖[J]. 农村实用科技信息,2005(9):40.
[6]郑国英. 豪猪人工养殖技术[J]. 云南农业,2005(3):12.
[7]武深秋. 豪猪的养殖技术[J]. 当代畜禽养殖业,2004(7):44.
[8]崔盛平. 豪猪的驯养特性[J]. 经济动物学报,2001,5(3):59-61.
[9]方定一,侯从远,杜念兴,等. 兽医微生物实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
[10]盛彤笙. 兽医微生物学实验指导[M]. 南京:畜牧兽医图书出版社,1957.
[11]陆承平. 兽医微生物和免疫学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2001:215.