

王 涛,陈广仁,蔡丙严.猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定与药敏试验[J].江苏农业科学,2014,42(10):207-208.

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定与药敏试验

王 涛¹,陈广仁²,蔡丙严¹

(1.江苏农牧科技职业学院动物医学院,江苏泰州 225300; 2.江苏省建湖县草堰口兽医站,江苏盐城 224733)

摘要:从苏北地区某疑似猪传染性胸膜肺炎发病猪采集病料,经细菌分离培养得到 3 株分离株,分别命名为 YC01、YC02、YC03。经形态学检查、CAMP 试验、卫星生长现象、尿素酶试验鉴定,3 株分离菌均为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌。药敏试验显示,3 株分离菌对头孢噻肟、氟苯尼考及由板蓝根、麻黄、连翘等组成的中药复方高度敏感。采用高敏药物对某感染猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的商品猪场进行治疗,结果表明,板蓝根、麻黄、连翘等组成的中药复方水提物口服与头孢噻肟肌肉注射联用对控制猪传染性胸膜肺炎死亡有较好效果。

关键词:胸膜肺炎放线杆菌;分离鉴定;药敏试验

中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0207-02

猪传染性胸膜肺炎 (porcine contagious pleuropneumonia, PCP) 是由猪胸膜肺炎放线杆菌 (actinobacillus pleuropneumoniae, APP) 引起的猪的一种接触性呼吸道传染病,以急性出血性纤维素性肺炎、慢性纤维素性坏死性胸膜肺炎为主要特征^[1]。2~5 月龄猪最易感,急性暴发时,有很高的发病率、死亡率,一些病猪康复后常伴有慢性肺炎,导致猪生长停滞且长期带菌,从而成为其他猪的传染源,此病给养猪业造成较大的经济损失^[2]。APP 是革兰氏阴性、有荚膜的多形球杆菌,有时呈线性,无鞭毛,不运动,不形成芽孢。根据培养时是否需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD, 又称 V 因子),可将 APP 分为生物 I 型、生物 II 型,生物 I 型为 NAD 依赖株,包括血清型 1~12 型、15 型,生物 II 型生长不依赖 NAD,但需要其他特定嘌呤或嘌呤前产物以辅助生长,含有 2 个血清型,分别为血清型 13 型、14 型^[1]。对 APP 的分离鉴定是确诊 PCP 感染的重要依据,常用的方法是细菌分离、NAD 依赖性、CAMP、尿素酶等生化试验及 PCR 扩增^[3-4]。近年来,伴随养殖业集约化生产规模的不断扩大,APP 防治困难逐渐增大。2013 年 5 月,江苏省盐城市建湖县某商品猪场 300 多头 4~5 月龄的育肥猪出现体温升高、呼吸困难、死前口鼻有血色泡沫等症状,经诊断为猪传染性胸膜肺炎。为了更好地控制该病,笔者在病原分离鉴定确诊此病的基础上进行了高敏药物的筛选与临床防治试验。

1 材料与方法

1.1 材料

TSA、TSB 琼脂、NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)均购于江苏省扬州市广陵区全球通实验用品销售中心,按照说明书进行配制。犊牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司;中药麻黄、黄芩、连翘、板蓝根等购自江苏省泰州市中药材市场;常规培养基、生化试剂、药敏纸片(氟苯尼考、强力霉素、麻黄、黄芩、连翘、板蓝根及其复方药敏纸片等均为自制)购

于杭州天和微生物试剂有限公司;金黄色葡萄球菌由笔者所在实验室保存;待检病料来源于苏北某规模猪场疑似胸膜肺炎的发病猪;试验猪场为建湖县某商品猪场,存栏 1 153 头。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离培养与形态观察 无菌取死亡猪的气管分泌物、肺脏作触片,革兰氏染色,镜检。同时取病料接种于含 0.04% NAD 的 TSA 琼脂平板,在需氧及 5%~10% CO₂ 条件下 37℃ 培养 24 h,挑取可疑菌落涂片,镜检。纯培养后, -70℃ 下用 50% 甘油生理盐水保存备用^[3]。

1.2.2 CAMP 试验 用金黄色葡萄球菌在兔血琼脂平板上划 1 条直线,再用分离菌划与该线垂直但不相接触的 2 条线, 37℃ 培养 24~36 h,观察试验结果。

1.2.3 卫星现象 取分离菌均匀涂布于普通琼脂培养基上,再在培养基中央作 2 条金黄色葡萄球菌平行划线,37℃ 有氧条件下培养 24 h,观察菌株生长情况。

1.2.4 尿素酶试验 取培养 24 h 的分离菌株接种于含 0.02% NAD 的尿素酶液体培养基中,摇匀,37℃ 培养 10、60、120 min,分别观察结果。

1.2.5 药敏试验 分离菌株检测其对头孢噻肟、氟苯尼考、恩诺沙星、强力霉素、复方新诺明、丁胺卡那霉素、红霉素、阿莫西林等 8 种抗生素与麻黄、黄芩、连翘、板蓝根等 4 种中药及复方 1(板蓝根、黄芩、金银花等)、复方 2(板蓝根、麻黄、连翘等)、复方 3(麻黄、蒲公英、连翘等)水提物的敏感性。4 种中药、3 种复方按传统水煎法进行煎煮,真空抽滤并浓缩,最后浓缩为 1 g/mL 生药, -20℃ 保存。滤纸打孔直径为 6 mm 的纸片,121℃ 高压灭菌,将纸片放入药液里浸 2 h,37℃ 烘干, -20℃ 保存备用。将培养好的菌液(浓度稀释至 1.5 亿 CFU/mL)均匀涂布在 TSA 琼脂上,然后将药敏纸片贴在平皿上,培养 24 h 后观察结果,并按抗菌药物药敏试验判定标准判定分离菌株对不同抗生素的敏感程度^[5]。

1.2.6 高敏药物对猪传染性胸膜肺炎的防治试验 苏北某猪场自然发病三元杂交育肥猪发病后经临床诊断、实验室诊断确诊为传染性胸膜肺炎。选择 120 头日龄 110~135 d、体质量 70~80 kg、出生后均未接种过胸膜肺炎放线杆菌疫苗的三元杂交育肥猪,试验前常规饲养,自由饮水,随机分成 6 组: I

收稿日期:2013-12-30

作者简介:王 涛(1965—),男,江苏泰州人,硕士,副教授,从事动物传染病防治教学与科研工作。E-mail: wangt61@hotmail.com。

组氟苯尼考肌肉注射、Ⅱ组头孢噻肟肌肉注射、Ⅲ组中药复方 2 口服、Ⅳ组中药复方 2 口服 + 头孢噻肟肌肉注射、Ⅴ组感染对照、Ⅵ组空白对照, 每组 20 头。除空白对照组外, 其余每组每天给药, 每次用药前测量直肠温度并观察临床症状, 试验前后对每头猪进行称重, 总疗程均为 5 d。

1.3 数据处理

采用 SPSS 软件对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定结果

病料触片以及分离纯化菌革兰氏染色、镜检都可见有革兰氏阴性、多形态的细菌, 多为球杆菌、短杆菌, 偶有成丝状的细菌, 着色不均。在加入 0.04% NAD 的 TSA 固体培养基上初次分离培养 24 h, 可见 1 ~ 2 mm、露珠状、半透明的菌落, 共获得 3 株分离菌。3 株分离菌在靠近溶血性金黄色葡萄球菌的地方出现明显的溶血区域, 即 CAMP 试验阳性。3 株分离菌离金黄色葡萄球菌越近, 菌落越大、越多; 反之菌落越小、越少, 证明 3 株分离菌为依赖 NAD 生长的细菌。3 株分离菌均可水解尿素酶, 液体培养基变为粉红色, 菌株生长需要 NAD, 3 株分离菌株为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌。

2.2 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的药敏试验结果

由表 1 可知, 3 株分离菌对头孢噻肟、氟苯尼考、中药复方 2 高度敏感, 对恩诺沙星、强力霉素、复方新诺明、板蓝根、连翘、中药复方 1、中药复方 3 中度敏感, 对阿莫西林、丁胺卡那霉素、红霉素、麻黄、黄芩不敏感。

表 2 高敏药物对猪传染性胸膜肺炎的治疗试验结果

组别	试验数 (只)	死亡率 (%)	有效率 (%)	治愈率 (%)	15 d 增重 (%)	相对增重率 (%)
Ⅰ组氟苯尼考注射	20	30.57	69.43	65.27a	18.1 ± 1.41c	53.51
Ⅱ组头孢噻肟注射	20	23.55	76.45	70.56b	20.8 ± 1.32c	68.97
Ⅲ组中药复方 2 口服	20	37.80	62.20	61.45a	15.3 ± 1.61b	47.63
Ⅳ组中药复方 2 口服 + 头孢噻肟注射	20	0	100.00	92.78c	23.4 ± 1.45d	78.82
Ⅴ组感染对照	20	57.79			7.8 ± 1.51a	22.19
Ⅵ组空白对照	20	0			26.6 ± 1.67e	100.00

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

胸膜肺炎放线杆菌营养要求高且受外界影响较大^[6]。在分离过程中, 最好在病死猪刚死亡或濒临死亡时采集病料, 否则, 即使病料中有 APP 感染, 也会因死亡时间太长, 致使病料中 APP 死亡^[7]。初次分离培养基中要加入 NAD, 胸膜肺炎放线杆菌在常规培养基中大多不生长或生长不良。本研究选择加入 NAD 的 TSA 琼脂培养基, 成功分离到 3 株 APP, 分别命名为 YC01、YC02、YC03。抗生素滥用是困扰兽医临床治疗猪病的难题, 根据药敏试验结果指导临床合理用药是比较科学的方法^[5]。猪胸膜肺炎放线杆菌对头孢噻肟、地米考星、氟甲砜霉素等敏感。本研究表明, 3 株分离菌对头孢噻肟、氟苯尼考及由板蓝根、麻黄、连翘等组成的中药复方高度敏感。中西药联用控制猪传染性胸膜肺炎效果较好^[8]。在发病猪群的饮水中按 20 mL/50 kg 添加中药复方 2 水煎剂, 2 次/d, 连续添加 5 d, 同时肌注头孢噻肟 15 ~ 30 mg/kg, 1 次/d, 连续注射 3 d, 即可控制该病。

表 1 3 株分离菌的药敏试验结果

药物名称	抑菌圈直径 (mm)		
	YC01	YC02	YC03
头孢噻肟	20	20	22
氟苯尼考	18	20	17
恩诺沙星	17	13	14
强力霉素	13	9	11
复方新诺明	11	7	10
阿莫西林	7	3	5
丁胺卡那霉素	8	7	10
红霉素	5	3	5
板蓝根	11	14	15
连翘	12	13	13
麻黄	10	8	10
黄芩	5	7	7
中药复方 1	15	13	12
中药复方 2	18	19	18
中药复方 3	11	16	14

2.3 高敏药物对猪传染性胸膜肺炎的治疗试验结果

由表 2 可知, Ⅰ ~ Ⅳ组给药后, 与感染对照组比较, 临床症状明显减轻, 一般给药 3 次左右, 大多数猪的体温、食欲基本恢复正常。中药复方 2 口服 + 头孢噻肟肌肉注射组有效率 100%, 治愈率达 92.78%, 相对增重率达 78.82%, 且没有死亡猪。氟苯尼考注射组、头孢噻肟注射组、中药复方 2 口服组均有死亡猪, 死亡率分别为 30.57%、23.55%、37.8%。可见, 中药与抗生素联用对控制猪传染性胸膜肺炎死亡效果较好。

参考文献:

[1] 唐文山, 李 昕. 猪传染性胸膜肺炎研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(2): 98 - 102.

[2] 徐公义, 王海丽, 葛长城, 等. 猪传染性胸膜肺炎的诊断与治疗[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(5): 106 - 107.

[3] 刘 伟, 王 慧, 陈小军, 等. 头孢噻呋混悬剂治疗人工感染仔猪传染性胸膜肺炎的效果观察[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(7): 164 - 166.

[4] 吴文学, 岳永波, 高 光, 等. 注射用阿莫西林钠对人工感染猪胸膜肺炎的疗效试验[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(12): 68 - 70.

[5] 江新生, 贾卫军. 猪传染性胸膜肺炎病原分离鉴定及防治试验[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2008, 28(3): 15 - 16, 21.

[6] 陈丽雯, 杨正梅, 毛家伟, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定[J]. 动物医学进展, 2009, 30(7): 17 - 19.

[7] 蔡丙严, 周建强, 陈长春, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的血清型鉴定与药敏试验[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(4): 780 - 781, 784.

[8] 刘秀玲. 中西药结合治疗猪传染性胸膜炎[J]. 中兽医学杂志, 2006(2): 20 - 21.