

黄银云, 胡新岗, 郭广富, 等. 樱桃谷肉鸭大肠杆菌病 PCR 鉴定及治疗药物筛选与应用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 241–243.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.069

樱桃谷肉鸭大肠杆菌病 PCR 鉴定 及治疗药物筛选与应用

黄银云, 胡新岗, 郭广富, 徐婷婷

(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要:为给如皋地区养鸭合作社肉鸭养殖诊治大肠杆菌病提供依据, 采用 PCR 技术鉴定长期困扰养鸭业疑似大肠杆菌病的病原, 通过 27 种药敏制片试验筛选出适合当地的先锋霉素 V、先锋霉素 VI、头孢呋辛、丁胺卡那霉素、新霉素、多黏菌素 B 等 6 种高敏药物及头孢哌酮、头孢曲松、羧苄西林、氨苄西林等 4 种中敏药物, 确定链霉素、卡那霉素、新霉素、强力霉素、氧氟沙星等 17 种抗菌药物不适于在该地区应用。并采用 6 种高敏药物分组, 治疗病鸭均取得了良好的临床疗效。

关键词:樱桃谷鸭; 大肠杆菌病; PCR; 药敏试验; 疗效

中图分类号: S858.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0241-03

随着集约化养鸭业的发展, 大肠杆菌病已严重威胁到养鸭业的健康发展。大肠杆菌属于条件性致病菌, 当由于各种应激刺激造成鸭体的免疫功能降低时, 鸭群就会发生感染^[1]。该病既可通过消化道感染, 也可通过呼吸道感染, 甚至可以通过种蛋垂直传播。肉鸭发病多见于 10~30 日龄, 发病率和死亡率较高, 临床常见肝周炎、气囊炎、心包炎和脑炎病变^[1-2]。常见的发病原因包括鸭舍环境卫生差、空气污浊灰尘多、不重视消毒预防、引进带有大肠杆菌的鸭苗等。此外, 由于养殖户缺乏科学给药知识, 临床上频繁使用某些抗菌药物, 导致地方性大肠杆菌耐药严重, 治疗效果不佳, 而抗菌

药物虽然可以暂时控制疫情发展, 但停药后常会复发, 给鸭场造成了极大的损失^[3]。江苏省如皋市某樱桃谷肉鸭养殖合作社长期受疑似大肠杆菌病困扰, 笔者应用 PCR 技术鉴定该病病原, 并通过药敏试验筛选了该合作社可用的敏感药物, 并取得了很好的临床效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备 Mikro200R 冷冻高速离心机、JS-380A 自动凝胶图像分析仪、PCR 仪 (PTC-200rev)、DYY-7C 型电泳仪、DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳槽、恒温箱、微量移液器等。
1.1.2 试剂 麦康凯平板、伊红美兰平板、鲜血平板培养基, 由江苏省动物流行病学研究中心制备提供; TSB 培养基、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mix、25 mmol/L MgCl₂、10 × PCR buffer、100 bp DNA Ladder 和 6 × DNA 凝胶载入染料 (Loading

收稿日期: 2015-03-22

基金项目: 江苏省高校“青蓝工程”资助。

作者简介: 黄银云 (1977—), 女, 江苏泰州人, 硕士, 副教授, 主要从事动物疫病防控研究及动物医学专业教学工作。E-mail: gxh008@qq.com。

[5] Abbas A K, Murphy K M, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes[J]. Nature, 1996, 383(6603): 787–793.

[6] Mena A, Ioannou X P, Kessel A V, et al. Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real-time PCR[J]. Journal of Immunological Methods, 2002, 263(1/2): 11–21.

[7] Dinarello C A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock[J]. Chest, 1997, 112(6): 321–329.

[8] Cannon J G, Clark B D, Wingfield P, et al. Rabbit IL-1 Cloning, expression, biologic properties, and transcription during endotoxemia[J]. Journal of Immunology, 1989, 142(7): 2299–2306.

[9] Shakhov A N, Kuprash D V, Azizov M M, et al. Structural analysis of the rabbit TNF locus, containing the genes encoding TNF- β (lymphotoxin) and TNF- α (tumor necrosis factor)[J]. Gene, 1990, 95(2): 215–221.

[10] Isono T, Nagano Y, Seto A. Expression of the interferon- γ and interleukin-10 genes in rabbit HTLV-I-transformed T-

cell lines[J]. Immunogenetics, 1996, 44(4): 306–308.

[11] Perkins H, Van L B C, Kerr P. The complete cDNA sequences of IL-2, IL-4, IL-6 AND IL-10 from the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)[J]. Cytokine, 2000, 12(6): 555–565.

[12] Liu W K, Dang R Y, Wang X L. Development of a SYBR-based real-time PCR to detect rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and analyze its tissue distribution in experimentally infected rabbits[J]. Virol Sin, 2015, 30(3): 228–30.

[13] Espino A M, Rivera F. Quantitation of cytokine mRNA by real-time RT-PCR during a vaccination trial in a rabbit model of fascioliasis[J]. Vet Parasitol, 2010, 169(1/2): 82–92.

[14] Duarte M D, Carvalho C L, Barros S C, et al. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2)[J]. J Virol Methods, 2015, 219: 90–5.

[15] Abrantes J, Loo W V D, Pendu J L, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. Veterinary Research, 2012, 43(6): 162–172.

Dye),均为上海生工生物工程有限公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.1 病料 选取如皋市某樱桃谷肉鸭养殖合作社疑似感染大肠杆菌新鲜病死鸭 10 羽,无菌采集肝脏、脾脏、心脏和大脑, -20 ℃ 保存备用。

1.1.2 药敏试纸 先锋霉素 V、先锋霉素 VI、头孢呋辛、头孢哌酮、头孢曲松、头孢氨苄、头孢他啶、红霉素、麦迪霉素、美满霉素、丁胺卡那霉素、新霉素、万古霉素、多黏菌素 B、氧氟沙星、羧苄西林、哌拉西林、氨苄西林、链霉素、卡那霉素、强力霉素、诺氟沙星、盐酸环丙沙星、庆大霉素、克林霉素、四环素、杆菌肽共计 27 种药敏纸片,购于杭州微生物试剂有限公司。

1.1.3 试验动物 试验鸭为如皋市某养鸭合作社发生大肠杆菌病的 600 羽 20 日龄樱桃谷鸭。试验于 2014 年 5 月 4 日至 6 月 9 日进行,试验期间均按照该养鸭合作社的常规饲养管理办法进行日常饲养与管理,重视带鸭消毒。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离及 TSB 培养基增菌 无菌划线分离,将病料接种于鲜血平板培养基,置于 37 ℃ 烛缸中培养 24 h,观察菌落形态和溶血情况。经革兰氏染色镜检后,挑取目的菌落,利用 TSB 培养基增菌。同时接种于麦康凯、伊红美蓝培养基,37 ℃ 培养 24 h,观察其生长特性。

1.2.2 细菌 DNA 的提取 细菌 DNA 提取采用热裂解法^[4]。

1.2.3 PCR 检测细菌 引物设计参考文献^[5]。以提取的细菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 采用 50 μL 反应体系:5 μL 10 × buffer、3 μL 25 mmol/L MgCl₂、1 μL 10 mmol/L dNTPs、上下游引物各 1 μL、3 μL cDNA、Taq DNA 聚合酶 1 μL,用灭菌超纯水补足 50 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 40 s,52 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察电泳图谱,拍照记录结果。

1.2.4 药敏试验 将经过分离纯培养的菌株按 KB 纸片法进行药敏试验^[6],37 ℃ 温箱培养 24 h,分别测量药敏纸片的抑菌圈直径的大小,结果按美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 的标准判断(表 1)。

1.2.5 治疗设计 将 600 羽病鸭随机分成 6 组,每组 100 羽。根据药敏试验结果,选择药物敏感性较好的 6 种药物进行治疗,对应的组别分别是先锋霉素 V 组、先锋霉素 VI 组、头孢呋辛组、丁胺卡那霉素组、红霉素组、多黏菌素 B 组。治愈判定标准:临床症状基本消失,精神、饮食、粪便正常。观察疗效,统计治愈率,用统计学方法分析各组间疗效差异显著性。

2 结果

2.1 分离菌株的培养特性

目的菌为革兰氏染色阴性短小杆菌。鲜血平板培养的菌落灰白色,呈凸起圆形,光滑而湿润,无溶血;在麦康凯培养基上呈粉红色菌落;伊红美蓝平板上形成的菌落呈黑色且有金属光泽。

2.2 PCR 扩增结果

对病料进行 PCR 检测,得到大肠杆菌 OmpA 目的基因片段,片段大小为 408 bp(图 1),与预期的结果相符。确诊该养殖合作社肉鸭感染大肠杆菌病。

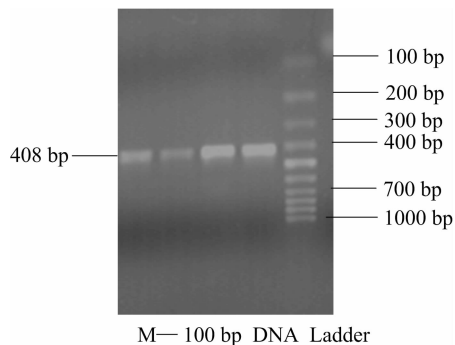


图1 大肠杆菌检测电泳结果

2.3 药敏试验结果

试验结果见表 1。在本试验病料采集地,鸭源大肠杆菌对先锋霉素 V、先锋霉素 VI、头孢呋辛、丁胺卡那霉素、新霉素、多黏菌素 B 等 6 种试验药物高敏,对头孢哌酮、头孢曲松、羧苄西林、氨苄西林等 4 种试验药物中敏,而对其他试验药物耐药。根据试验结果,高敏药物和中敏药物均可用于该群病鸭的治疗,以高敏药物为佳。

2.4 治疗效果

由药物治疗试验结果(表 2),采用经药敏试验选取的治疗药物,临床均能及时控制疫情并取得了较理想的治疗效果。先锋霉素类的先锋霉素 V 组、先锋霉素 VI 组、头孢呋辛组之间治疗效果差异不显著($P > 0.05$);丁胺卡那霉素组与先锋霉素类组比较差异不显著($P > 0.05$);红霉素组与多黏菌素 B 组比较,差异显著($P < 0.05$),这 2 组与先锋霉素类组间比较差异亦显著($P < 0.05$)。

3 分析与讨论

研究表明,鸭病原性大肠杆菌血清型复杂,不同地区的血清型存在差异^[7]。此外,鸭大肠杆菌病与鸭疫里默氏杆菌病都是危害肉鸭养殖业最重要的传染病,2 种病的临床表现极为相似,诊断时容易混淆。这些都导致大肠杆菌病采用病原学诊断具有一定的困难。而 PCR 诊断具有方便、快捷、特异性强、诊断结果准的特点,为鸭大肠杆菌病的快速诊断、及时处理提供了准确可靠的依据^[5]。

在如皋地区,肉鸭源大肠杆菌对先锋霉素 V、先锋霉素 VI、头孢呋辛、丁胺卡那霉素、新霉素、多黏菌素 B 最为敏感,可能与这些药物在该地区临床应用频度小有关。头孢氨苄、头孢他啶、链霉素、庆大霉素、强力霉素等药物可能由于广泛而长期应用,导致其耐药性也较为严重。本次药敏试验也表明,鸭源大肠杆菌的多重耐药性还是比较严重的,应给予足够重视。这也提醒养殖户一旦发现疫情,应立即向畜牧兽医部门求助,及时通过药敏试验选取有效治疗药物,以免错误用药贻误最佳治疗时机。在用药时要注意轮换、联合、交叉用药,尽量不给细菌产生耐药性的机会。

大肠杆菌作为条件性致病菌,对污染的环境适应性强,不重视鸭舍环境卫生,不进行鸭舍场地消毒,是该养鸭合作社肉鸭养殖中连续多批次发病的主要诱因。因此,实行引进鸭苗检疫、执行全进全出制度、严格遵守兽医卫生防疫制度、加强饲养管理、减少应激因素是养鸭业预防鸭大肠杆菌病的有效措施。

表 1 药敏试验的判断标准及结果

药 物	批号	每片含药量 (μg)	抑菌圈直径 (mm)			本试验结果	
			高度敏感(S)	中毒敏感(M)	耐药性(R)	直径 (mm)	敏感性
先锋霉素 V	130901	30	≥18	15 ~ 17	≤14	25	S
先锋霉素 VI	131028	30	≥18	15 ~ 17	≤14	18	S
头孢呋辛	130714	30	≥18	15 ~ 17	≤14	20	S
头孢哌酮	130909	75	≥21	16 ~ 20	≤15	20	M
头孢曲松	131010	30	≥21	14 ~ 20	≤13	15	M
头孢氨苄	130911	30	≥18	15 ~ 17	≤14	11	R
头孢他啶	130825	30	≥18	15 ~ 17	≤14	11	R
羧苄西林	131107	100	≥23	20 ~ 22	≤19	20	M
哌拉西林	130911	100	≥21	18 ~ 20	≤17	17	R
氨苄西林	031107	10	≥15	12 ~ 14	≤11	13	M
丁胺卡那霉素	130913	30	≥17	15 ~ 16	≤14	22	S
新霉素	130826	30	≥17	13 ~ 16	≤12	19	S
链霉素	130826	10	≥15	12 ~ 14	≤11	10	R
卡那霉素	131101	30	≥18	14 ~ 17	≤13	0	R
庆大霉素	131028	10	≥15	13 ~ 14	≤12	0	R
万古霉素	131008	30	≥17	15 ~ 16	≤14	0	R
多黏菌素 B	130828	300	≥12	8 ~ 11	≤8	14	S
杆菌肽	130820	10IU	≥13	9 ~ 12	≤8	0	R
氧氟沙星	130725	5	≥16	13 ~ 15	≤12	0	R
诺氟沙星	130919	10	≥17	13 ~ 16	≤12	0	R
盐酸环丙沙星	131008	5	≥21	16 ~ 20	≤15	0	R
四环素	131020	30	≥19	15 ~ 18	≤14	0	R
美满霉素	130727	30	≥19	15 ~ 18	≤14	8	R
强力霉素	131020	30	≥16	13 ~ 15	≤12	0	R
克林霉素	130829	2	≥21	15 ~ 20	≤14	0	R
红霉素	131020	15	≥23	14 ~ 22	≤13	0	R
麦迪霉素	130825	30	≥18	14 ~ 17	≤13	0	R

表 2 应用高敏药物治疗试验结果

治疗药物	试验鸭 (只)	制剂名称	治疗方法	疗程 (d)	10 d 内死亡数 (只)	死亡率 (%)	治愈数	治愈率 (%)
先锋霉素 V	100	头孢唑啉钠粉针剂	按产品说明书肌肉注射	3 ~ 5	3	3	97a	97a
先锋霉素 VI	100	头孢拉定可溶性粉剂	按产品说明书混饮或混饲	3 ~ 5	5	5	95a	95a
头孢呋辛	100	头孢呋辛钠可溶性粉剂	按产品说明书混饮或混饲	3 ~ 5	4	4	96a	96a
丁胺卡那霉素	100	硫酸卡那霉素可溶性粉剂	按产品说明书混饮或混饲	2 ~ 4	6	6	94a	94a
新霉素	100	硫酸新霉素可溶性粉剂	按产品说明书混饮或混饲	3 ~ 5	17	17	83b	83b
多黏菌素 B	100	硫酸黏菌素预混剂	按产品说明书混饮或混饲	3 ~ 5	22	22	78c	78c

注:同列不同行小写字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$)。

参考文献:

[1]王永坤,朱国强,金山,等. 水禽病诊断与防治手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:82-90.

[2]陈博言. 兽医传染病学[M]. 5版. 北京:中国农业出版社,2006:111-118.

[3]周作勇,胡世君,王芝英,等. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2009,34(3):159-161.

[4]朱开春,张富春,肖冲,等. 连续热裂解法大规模提取质粒 DNA[J]. 农业生物技术学报,2006,14(1):51-54.

[5]王春平,韦强,鲍国连,等. 鸭疫里默氏菌病和大肠杆菌病多重 PCR 诊断方法的建立[J]. 中国兽医学报,2010,30(3):352-355.

[6]桂炳东,孙敬,徐建民. 细菌药物敏感性试验测定手册[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2001:70-79.

[7]李文杨,黄瑜,施少华,等. 我国部分地区致病性鸭大肠杆菌的分离及血清型鉴定[J]. 中国兽医杂志,2009,45(12):43-44.