

司振书, 张海涛, 邵 丹, 等. 肉杂鸡肺炎克雷伯菌耐药菌株的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 152–153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.042

肉杂鸡肺炎克雷伯菌耐药菌株的分离鉴定

司振书¹, 张海涛², 邵 丹¹, 秦飞燕¹

(1. 聊城大学农学院, 山东聊城 252000; 2. 山东省聊城市东昌府区畜牧局, 山东聊城 252000)

摘要:2015 年 6 月中旬, 山东省莘县、高唐等地多个养殖场 3 日龄肉杂鸡出现张口、伸颈、呼吸困难等症状, 剖检呼吸道无明显病变, 心脏、肝脏周围及皮下有大量淡黄色胶冻样渗出物, 肝脏有大量点状坏死, 为确定病原, 对发病鸡的喉拭子进行了流感抗原性检测; 对病鸡的肺脏进行了病毒分离培养; 对其肝脏、心脏进行了细菌的分离培养、生化鉴定及药敏试验。结果表明, 肉杂鸡发病由金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌的混合感染所致, 针对无禽流感病毒和新城疫病毒的感染, 采取了敏感药物治疗、消毒、加强饲养管理等综合措施, 7 d 后, 发病情况逐渐好转, 鸡群 15 日龄时趋于稳定。

关键词:肉杂鸡; 肺炎克雷伯菌; 金黄色葡萄球菌; 分离鉴定; 耐药菌株

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0152-02

鲁西小型肉杂鸡是用快大型白羽肉鸡的母代父系公鸡作父本, 褐壳商品蛋鸡作母本杂交而来, 具有生长速度快、饲料报酬高、饲养周期短、料肉比低、肉质嫩、易加工、易成熟等特点, 是制作脱骨扒鸡的最理想原料, 在山东聊城各县(区)均具有较大养殖规模。2015 年 6 月中旬, 山东省莘县、高唐等地多个肉杂鸡养殖场相继发生同样疾病, 3 日龄小肉鸡开始出现张口、伸颈、呼吸困难, 生长发育受阻, 剖检呼吸道无明显病变, 心脏、肝脏周围及皮下有大量的淡黄色胶冻样渗出物, 肝脏有大量点状坏死。通过对鸡苗来源与去向等调查排除了鸡苗质量问题。采取病料进行细菌的分离培养, 经鉴定分离到 1 株肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)和 1 株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 且肺炎克雷伯菌分离株对多种药物具有耐药性。

1 材料与方

收稿日期: 2016-02-15

基金项目: 山东省农业良种工程重点课题(编号: 25114426); 聊城大学博士启动基金(编号: 318051310); 聊城大学大学生科技文化创新项目(编号: SF2014214)。

作者简介: 司振书(1971—), 女, 山东冠县人, 博士, 副教授, 研究方向为预防兽医学。E-mail: dckszs@163.com。

1.1 材料与设备

营养琼脂平板、高盐甘露醇琼脂平板、麦康凯琼脂平板由聊城大学动物预防兽医实验室制备。禽流感病毒(通用)抗原快速检测卡, 购于深圳真瑞生物科技有限公司; XK 型自动细菌鉴定仪、肠杆菌鉴定试剂盒、葡萄球菌鉴定试剂盒等由山东鑫科生物科技有限公司提供; 各种药敏纸片, 购于浙江杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 病料的采取

进行无菌操作, 取发病肉鸡的喉拭子、肺脏、肝脏、心脏。

1.3 禽流感抗原检测

将喉拭子立即用禽流感病毒抗原快速检测卡进行检测, 操作方法按说明书进行。

1.4 病毒的分离培养与鉴定

进行无菌操作, 取少量肺脏样品, 放入灭菌的研磨器, 加含双抗的 PBS 研磨成 10%~20% 的悬液。4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 接种于 4 枚 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 0.2 mL/胚, 每 12 h 照胚 1 次, 弃去 24 h 内死亡胚, 及时取出 24~72 h 死胚, 于 4℃ 冰箱过夜, 72 h 未死亡的全部取出置于冰箱内冻死, 无菌收取尿囊液。用 1% 的鸡红细胞测定尿囊液有无血凝性; 若无血凝性, 则可排除新城疫病毒、禽流感病毒的感染; 若有, 则通过血凝抑制试验进一步进行鉴定。

[8] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 56–60.

[9] Kamps-Holtzapfel C, Carlin R, Sheffield C, et al. Analysis of hapten-carrier protein conjugates by nondenaturing gel electrophoresis[J]. Journal of Immunological Methods, 1993, 164(2): 245–253.

[10] Liu X, Eichenberger M, Fujioka Y, et al. Improved detection sensitivity and selectivity attained by open-sandwich selection of an anti-estradiol antibody[J]. Analytical Sciences, 2012, 28(9): 861–867.

[11] Tolra F, Reig M. Analytical tools for assessing the chemical safety of meat and poultry[M]//Springer briefs in food, health, and nutrition.

New York: Springer, 2012: 61–67.

[12] 刘雅红, 单国强, 康彦龙. 己烯雌酚人工抗原的合成研究[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(10): 43–46.

[13] Pallardy M, Alberici G, Goodman A, et al. Antibody recognition of substituted ammonium ions. Modulation by the counterion[J]. Journal of Immunological Methods, 1987, 99(2): 179–183.

[14] Mcadam D P, Hill A S, Beasley H L, et al. Mono- and polyclonal antibodies to the organophosphate fenitrothion. 1. Approaches to hapten-protein conjugation[J]. J Agri Food Chem, 1992, 40(8): 1466–1470.

[15] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 17–18.

1.5 细菌的分离培养

取肝脏、心脏分别接种营养琼脂平板、高盐甘露醇琼脂、麦康凯琼脂平板,37℃恒温培养 24 h,观察结果,挑取单个菌落进行纯培养。

1.6 细菌的形态染色观察

将分离得到的细菌纯培养物进行革兰氏染色,镜检观察。

1.7 细菌的鉴定

将分离纯化的细菌分别采用适宜的细菌鉴定试剂盒,通过 XK 型自动细菌鉴定仪进行鉴定,操作方法按说明书进行。

1.8 药敏试验

挑取分离纯化的细菌菌落,用灭菌的生理盐水制成悬液,校正浓度为 0.5 麦氏标准,用灭菌棉签均匀涂布平板,贴上各种药敏纸片,置于 37℃恒温箱培养,18 h 后取出测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 禽流感病毒抗原检测结果

经检测,病鸡喉拭子禽流感病毒抗原为阴性。

2.2 病毒分离结果

接种病料的 4 枚 SPF 鸡胚孵化 72 h 均未死亡,对尿囊液进行 HA 检测,均无血凝性。

2.3 细菌的分离培养结果

从肝脏分离得到的细菌在营养琼脂平板上形成光滑、隆起、圆整的橙黄色菌落;在高盐甘露醇琼脂上,形成淡黄色、光滑、湿润、圆形的小菌落;在麦康凯琼脂上不生长。从心脏分离得到的细菌,在营养琼脂平板上形成光滑、湿润、乳白色、凸起、浓厚黏稠的菌落;在麦康凯琼脂平板上,菌落淡红色,黏稠、胶状;在高盐甘露醇琼脂上不生长。对分离得到的细菌进一步纯化,最后获得 2 种细菌的纯培养物。

2.4 细菌形态染色特点

从肝脏分离到的细菌呈球形,革兰氏染色呈阳性,多呈葡萄串状,也有成对或短链状排列的;从心脏分离到的细菌呈杆形,革兰氏染色呈阴性,多单个存在。

2.5 分离菌的鉴定结果

将分离得到的革兰氏阴性杆菌用肠杆菌鉴定试剂盒进行检测,各生化孔显示,蔗糖+、蔗糖+、赖氨酸脱羧酶+、乳糖+、尿素酶+、靛基质试验-、七叶苷+、丙二酸盐+、鸟氨酸脱羧酶-、山梨醇+、OF+、水杨素+、枸橼酸盐-、肌醇+、精氨酸-、棉子糖+、 β 半乳糖+、甘露醇+,鉴定结果表明该菌为肺炎克雷伯菌,鉴定概率为 99.99%。将分离到的革兰氏阳性球菌用葡萄球菌鉴定试剂盒进行检测,各生化孔显示,乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、甘露糖、蔗糖、果糖等均+、硝酸盐-、鸟氨酸脱羧酶-、水杨苷-、纤维二糖-、 β 半乳糖-、精氨酸+、尿素酶试验+、溶血+、棉子糖-、七叶苷-,鉴定结果表明该菌为金黄色葡萄球菌,鉴定概率为 99.99%。

2.6 药敏试验结果

分离得到的肺炎克雷伯菌敏感药及抑菌圈直径分别为米诺环素 23 mm、头孢他啶 18 mm,而对头孢噻吩、头孢呋辛、呋喃妥因、头孢吡肟、万古霉素、青霉素 G、四环素、克林霉素等均耐药;分离到的金黄色葡萄球菌的敏感药及抑菌圈直径分别为头孢呋辛 25 mm、丁胺卡那霉素 24 mm、庆大霉素

22 mm、头孢氨苄 21 mm、卡那霉素 21 mm、环丙沙星 20 mm,而对四环素、复方新诺明、克林霉素等耐药。

3 讨论

病鸡喉拭子禽流感病毒抗原检测为阴性,可初步排除禽流感病毒的感染,SPF 鸡胚进行病毒的分离培养,收获的尿囊液无血凝性,说明发病鸡群无禽流感病毒、新城疫病毒的感染;从病鸡肝脏及心脏分离到 2 种细菌纯培养物,根据其形态特征、培养特性及生化特点判断,两者分别为金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌。据此可初步判断,该发病由肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌混合感染所致。

肺炎克雷伯菌广泛存在于自然界,也存在于动物的肠道、呼吸道和泌尿道中,为条件性致病菌^[1]。当机体免疫力低下或长期使用抗生素时,引发人和动物的多种疾病。荣光等从发病濒死的五指山猪体内分离到肺炎克雷伯菌肺炎亚种^[2];刘燕等从白颊长臂猿的脓液中分离到肺炎克雷伯菌肺炎亚种,该菌感染导致白颊长臂猿的脓肿、死亡^[3]。肺炎克雷伯菌可引起人的肺炎、败血症、脑膜炎、肝脓肿等,在家禽,能引起死胚、卵黄囊感染、呼吸道病、眼病、败血症和繁殖性疾病^[1]。本次肉杂鸡的发病可能由于养殖场饲养管理水平较差,日常消毒等环境控制措施不到位,给金黄色葡萄球菌及肺炎克雷伯菌以可乘之机,造成严重的经济损失。

肺炎克雷伯菌感染家禽的病例报道较少,而对人感染的报道及研究较多。李振江等对 256 个肺炎克雷伯菌临床分离株进行了耐药性研究,结果表明该菌对抗菌药物的耐药性较高,49.0% 的产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的菌株呈多重耐药^[4]。本次从肉杂鸡分离到的肺炎克雷伯菌,除对米诺环素、头孢他啶具有一定的敏感性外,对其他多种药物均耐药,呈现强的耐药性,兽医临床应重视该菌的感染及流行情况,合理使用抗菌药物。翁幸璧等对 1 株耐药肺炎克雷伯菌的耐药相关基因进行研究,该菌株对哌拉西林、氨苄西林、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星等均耐药,该菌耐药与其携带获得性耐药基因 TEM-1、SHV-11、aac(3)-II 等基因相关^[5]。本次分离到的金黄色葡萄球菌则对多种药物敏感,综合 2 种病原菌的药敏试验结果,选用头孢他啶进行治疗,同时对所用器皿、工具、笼舍进行全面消毒,7 d 后,发病情况逐渐好转,15 日龄时鸡群趋于稳定。

参考文献:

- [1] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 兽医微生物学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2013:179-181.
- [2] 荣光,赵军明,侯冠戎,等. 五指山猪肺炎克雷伯菌肺炎亚种的分离及鉴定[J]. 西北农业学报,2011,20(10):1-5.
- [3] 刘燕,赵京,张成林,等. 肺炎克雷伯氏菌致白颊长臂猿脓肿一例[J]. 野生动物,2011,32(3):156-157.
- [4] 李振江,孙长贵,曾贤铭,等. 肺炎克雷伯菌医院感染监测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(6):737-739.
- [5] 翁幸璧,糜祖煌. 多耐药肺炎克雷伯菌获得性耐药基因及 ompK36 突变研究[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(17):2545-2548.