

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父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 材料与与方法

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℃12000 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24h,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,18h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72h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、草糖、果糖等均为+,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23mm、头孢他啶18mm,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25mm、丁胺卡那霉素24mm、庆大霉素

22mm、头孢氨苄21mm、卡那霉素21mm、环丙沙星20mm,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,7d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, 侯冠彧, 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.