

李珮瑶,高晶萍,田 勇,等. 鸽源绿脓杆菌的分离鉴定及致病性试验[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):189-191.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.035

# 鸽源绿脓杆菌的分离鉴定及致病性试验

李珮瑶<sup>1</sup>,高晶萍<sup>1</sup>,田 勇<sup>1</sup>,徐明举<sup>1</sup>,利 凯<sup>1</sup>,李 军<sup>2</sup>,张瑞华<sup>1</sup>,徐 彤<sup>2</sup>

(1.河北北方学院预防兽医学重点实验室,河北张家口 075000;2.河北北方学院生命科学研究中心,河北张家口 075000)

**摘要:**从疑似赛鸽绿脓杆菌感染病料中分离绿脓杆菌并进行相关致病性试验和药敏试验,为今后赛鸽绿脓杆菌防治提供参考。采用常规方法从肝脏、肺脏等组织中无菌灼取细菌于普通琼脂、麦康凯、鲜血琼脂平板培养基中,随后进行染色镜检、生化试验鉴定;对分离菌株进行致病性研究,将 10 只未经免疫的 30~40 日龄的雏鸽随机分为对照组和试验组进行感染,10 只 BALB/c 小鼠同样随机分组进行感染,观察并记录感染动物临床症状及死亡率;通过药敏试验检测该菌对庆大霉素、恩诺沙星、复方新诺明等 10 余种药的敏感性。结果表明,分离得到的菌株根据培养及菌落特征、生化试验确定为绿脓杆菌;人工感染小鼠发病率为 100%,死亡率为 60%;试验组鸽子发病率为 60%,无死亡;该菌对庆大霉素、恩诺沙星、妥布霉素和环丙沙星高度敏感。

**关键词:**赛鸽;绿脓杆菌;细菌分离鉴定;致病性;药敏试验

**中图分类号:**S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)08-0189-03

绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)1882 年由 Gessard 从伤口脓液中首次分离报道<sup>[1]</sup>。该菌在自然界中分布十分广泛,是临床常见的条件致病菌之一。临床中常因注射污染、疲劳运输、惊吓等应激因素导致动物机体抵抗力下降,引起该病发生。绿脓杆菌可引起多种家畜、家禽、野生动物发病,尤其可引起雏鸡和貂的出血性肺炎、奶牛的子宫炎和乳房炎等,同时也可感染人类<sup>[2]</sup>。随着集约化的快速发展和养殖规模的不断扩大,该菌在感染过程中的角色也由之前的继发或混合感染逐渐演变为原发或并发<sup>[3]</sup>,这使得该病死亡率愈来愈高。近年,雏鸡、山羊、水貂、獭兔、狐狸、小熊猫及鸵鸟等均有感染绿脓杆菌的报道<sup>[4-10]</sup>,可见绿脓杆菌对不同种类的动物均有易感性,但临床表现及剖检症状有差异。

近年来,赛鸽成为一项重要的竞技运动,随着人们的关注度越来越高,赛鸽运动飞速发展。然

而,在“集鸽”这一特殊饲养模式下,不同免疫水平的鸽子经长途运输后集中于同一棚内,因此临床中鸽绿脓杆菌一般是新城疫、鸽痘等疾病的继发菌<sup>[11]</sup>,导致赛鸽大量死亡,给养殖户带来不可估量的经济损失。但由于人们之前对其重视程度不够,在临床中没有良好的治疗方案。笔者通过对临床病料进行实验室细菌分离鉴定并做相关致病性试验及药敏试验,为临床中绿脓杆菌的预防和治疗提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料及试验动物

疑似鸽绿脓杆菌的病料,由天津某赛鸽公棚提供;6~8 周龄、SPF 级 BALB/c 小鼠,购于北京实验动物中心;30~40 日龄、未经任何免疫试验的雏鸽 10 羽,购于河北省张家口市某肉鸽养殖户。

### 1.2 试剂

普通琼脂培养基、麦康凯培养基、鲜血琼脂培养基,购于北京奥博星生物技术有限责任公司;苏木精、伊红,购于天津光复精细化学研究所有限公司;药敏片,购于杭州天和微生物试剂有限公司。

### 1.3 主要仪器

电热恒温培养箱,购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂;超净台,购自苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;显微镜,购自 Olympus。

### 1.4 背景调查

病鸽主要表现吃食减少,精神不振;不同程度

收稿日期:2019-03-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31672522);国家自然科学基金青年科学基金(编号:31602030);河北省第二期现代农业产业技术体系蛋肉鸡产业创新团队建设专项经费(编号:HBCT2018150207);河北省教育厅在读研究生创新能力培养资助项目(编号:CXZZSS2018129);赛鸽主要疫病防控技术体系研究(自筹经费)。

作者简介:李珮瑶(1996—),女,河北邯郸人,硕士研究生,主要从事基础兽医学研究。E-mail:peiyaoli19@163.com。

通信作者:徐 彤,教授,主要从事动物流感病毒诱导肺损伤机理研究。E-mail:xutong1969@sohu.com。

下痢,粪便水样,呈淡黄绿色,严重的粪中带血;腹部膨大,手压柔软,后期呈腹式呼吸;有的眼周围发生不同程度水肿,水肿部破裂流出液体,形成痂皮,眼全闭或半闭,流泪;颈部皮下水肿,严重的两腿内侧部皮下也见水肿。

1.5 细菌分离

从病死鸽的肝脏、脾脏、肺脏等无菌操作钓菌分别划线接种于普通琼脂、鲜血琼脂和麦康凯培养基,置于恒温培养箱中 37 ℃ 培养 24 h,观察培养基颜色及菌落形态,挑取有代表性的菌落进行纯化培养。

1.6 细菌鉴定

1.6.1 涂片染色镜检 将纯化培养的细菌典型菌落钓菌进行涂片,进行革兰氏染色,于油镜下观察菌落的形态及染色特征。

1.6.2 生化鉴定 将纯化后的细菌分别接种于葡萄糖、乳糖、苯丙氨酸、甲基红、三糖铁等生化管中,放置于 37 ℃ 培养箱中,培养 24 h,观察并记录生化结果。

1.7 致病性试验

1.7.1 BALB/c 小鼠致病性试验 采用上述细菌接种鲜血琼脂培养基培养 18 h 后,将 10 只 SPF BALB/c 小鼠随机分为试验组和对照组,每组各 5 只,感染组每只腹腔注射 0.1 mL 该细菌,对照组相同途径注射 0.1 mL 生理盐水,饲养于环境相同的独立通风笼内,观察并记录其临床表现、发病率及死亡率。取死亡小鼠的肝脏进行钓菌、染色,以验证致病菌与接种菌是否一致。

1.7.2 鸽子致病性试验 取 10 羽未经免疫、30 ~ 40 日龄的雏鸽,随机分为感染组和对照组,每组 5 羽,感染组每羽肌肉注射 0.2 mL 细菌鲜血琼脂培养物,对照组肌肉注射 0.2 mL 生理盐水,观察记录其临床症状、发病率和死亡率。

1.8 药敏试验

参照 Kirby - Barer 氏法,将纯培养的绿脓杆菌鲜血琼脂培养物均匀涂抹至普通琼脂平板的表面,用镊子无菌取抗生素药敏试纸片均匀等距贴在培养基表面,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养,24 h 后观察并记录不同药物抑菌圈的直径,判定该菌对不同药物的敏感性。

2 结果与分析

2.1 细菌分离结果

在普通琼脂培养基上 18 h 已长出湿润、光滑的蓝绿色菌落;在麦康凯培养基中生长良好,呈边缘

整齐、光滑的暗绿色菌落;鲜血琼脂培养基中可见细菌生长良好,菌落周围有溶血;可看到试管整体呈绿色,随着培养时间的延长,培养基的表面有一层菌膜形成。

2.2 鉴定结果

2.2.1 细菌鉴定结果 经革兰氏染色后,镜下可见无芽孢、中等大小的红色杆菌。

2.2.2 生化鉴定结果 由表 1 可知,该菌发酵葡萄糖,不分解乳糖,三糖铁不产生硫化氢,试管底部未变黄,甲基红 (M. R.) 试验呈阴性,可分解尿素,能液化明胶,符合绿脓杆菌的生化特点。根据染色镜检特征和生化结果可确定该菌为绿脓杆菌。

表 1 生化鉴定结果

试验项目	结果
葡萄糖	+
赖氨酸	+
鸟氨酸	+
硫化氢	-
蛋白胨水	-
乳糖	-
卫矛醇	-
苯丙氨酸	-
尿素分解	+
西蒙氏枸橼酸盐	+
M. R.	-
明胶液化	+

2.3 致病性试验

2.3.1 BALB/c 小鼠致病性试验 对照组精神状态良好、行动十分敏捷、被毛光滑。试验组接种细菌后 7 h,小鼠全部出现精神沉郁、行动迟缓现象;22 h 死亡 1 只,其余 4 只精神萎靡;45 h 死亡 2 只,剩余 2 只被毛粗乱无光泽;96 h 剩余 2 只小鼠有恢复迹象。综上所述,共死亡 3 只小鼠,通过从死亡小鼠的肝脏钓菌,确定致病菌与接种菌一致。

2.3.2 鸽子致病性试验 对照组鸽子无异常,试验组鸽子接种 24 h 后粪便变为墨绿色稀粪,精神无异常;48 h 时试验组 3 羽鸽子出现精神沉郁、羽毛松乱、行动迟缓、粪便为绿色水样稀粪;观察 1 周,无死亡。

2.4 药敏试验

由表 2 可知,该菌对恩诺沙星、妥布霉素、庆大霉素和环丙沙星高度敏感,对丁胺卡那、阿奇霉素、复方新诺明中度敏感;而对青霉素、磺胺嘧啶等耐药性较强。

表 2 药敏试验结果

药物名称	抑菌圈直径 (mm)	判定结果
恩诺沙星	21.3	高度敏感
妥布霉素	23.0	高度敏感
庆大霉素	24.0	高度敏感
环丙沙星	23.0	高度敏感
丁胺卡那	17.1	中度敏感
阿奇霉素	17.5	中度敏感
复方新诺明	17.0	中度敏感
磺胺嘧啶	10.0	不敏感
青霉素	9.2	不敏感
氨苄西林	7.0	不敏感
氟苯尼考	8.0	不敏感
氯霉素	9.0	不敏感
四环素	10.3	不敏感

3 讨论与结论

绿脓杆菌在自然界土壤、空气、水中分布广泛，同时在各种动物的肠道和皮肤中也有存在，是临床常见的条件致病菌。绿脓杆菌在鸡中常是霉形体、鸡痘等的继发菌，还可与大肠杆菌等细菌发生混合感染<sup>[12-13]</sup>；在水貂中常与克雷伯氏菌混合感染引发水貂的出血性肺炎<sup>[14-15]</sup>。随着现代养鸽业的飞速发展，绿脓杆菌在鸽群中也渐有报道，常与鸽痘、鸽新城疫等发生混合感染，导致鸽大量死亡<sup>[16-17]</sup>。

本研究从天津某赛鸽养殖场分离到 1 株细菌，通过培养基生长特性、染色镜检、生化鉴定确定其为绿脓杆菌。随后进行该菌的致病性研究，通过给小鼠、鸽子接种感染绿脓杆菌后发现该菌对两者的致病性不同，试验组小鼠的发病率为 100%，病死率达 60%，在临床症状上表现比鸽子更为明显，并且在剖检过程中发现死亡小鼠整体腹部呈绿色，肠道黏液增多，其余症状不明显；在鸽子的致病性试验中鸽子的发病率为 60%，未发生死亡。

临床中绿脓杆菌一般呈继发感染，并且临床症状缺乏明显特征，由于在病程的不同阶段表现出的临床症状也不同，因此仅靠临床症状不能判断是否有绿脓杆菌感染，确诊还须要借助实验室细菌分离鉴定等手段。

在细菌性疾病的治疗过程中，抗生素的耐药性是经常需要面临的问题。绿脓杆菌对多种抗生素均有耐药性，并且不同菌株对同一抗生素的敏感性也不同。药敏结果表明，此次分离的绿脓杆菌对恩

诺沙星、妥布霉素、庆大霉素和环丙沙星均高度敏感。在后期治疗的过程中，通过庆大霉素的治疗，该公棚赛鸽的症状的确得到缓解。

临床中一般在动物机体抵抗力下降时易被继发感染绿脓杆菌，该菌本身的致病性不强，但它对多种药物均有耐药性，因此在临床中预防本病应从改善养殖场饲养管理条件、加强兽医卫生措施着手，严格按照规定要求做好种蛋收集、保存及孵化全过程以及孵化设备、环境、注射疫苗器具的清洗和消毒工作。在养殖场通过饮水或拌料口服大剂量的庆大霉素等高度敏感药物，对该菌亦有一定的防治作用。

参考文献：

[1] Lusis P I. *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Veterinary Bulletin*, 1971, 41 (3) :53.

[2] 徐尤田. 动物绿脓杆菌病的流行、诊断和防治措施 [J]. *畜牧兽医学*, 2017 (9) :41.

[3] 牛钟相, 李雅林. 动物绿脓杆菌病研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2003, 24 (1) :16-18.

[4] 张香斋, 张艳英, 李蕴玉, 等. 鸡源绿脓杆菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42 (6) :1602-1607.

[5] 孙守峰, 刘超. 水貂绿脓杆菌病的鉴定及药敏试验 [J]. *中国畜禽种业*, 2014, 10 (11) :43-44.

[6] 迟静, 王晓艺. 獭兔绿脓杆菌病的病源分离鉴定及药敏试验 [J]. *畜禽业*, 2015 (2) :54-55.

[7] 刘庆生. 一例鸡绿脓杆菌病的诊疗报告 [J]. *福建畜牧兽医*, 2016, 38 (4) :71.

[8] 肖肖, 任艳丽, 郭玉璞, 等. 幼龄鸵鸟绿脓杆菌病的诊断 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30 (2) :34-35.

[9] 余星明, 王成东, 钟顺隆, 等. 小熊猫绿脓杆菌病的诊断 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30 (8) :36-36.

[10] 唐珂心, 牛钟相, 何元龙. 山羊慢性化脓性肺炎病原菌的分离鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 2001, 37 (6) :20-21.

[11] 花天荣, 花红, 倪干英. 肉鸽鸽痘和绿脓杆菌混合感染的诊断与治疗 [J]. *养禽与禽病防治*, 2014 (11) :30-43.

[12] 裴孝良, 郝勤宗, 屏新满. 育成鸡暴发鸡败血霉形体病并继发绿脓杆菌病的诊断报告 [J]. *中国家禽*, 1990 (2) :16-17.

[13] 刘兵, 刘保群, 袁明娅, 等. 雏鸡大肠杆菌和绿脓杆菌混合感染的诊治 [J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2012, 28 (10) :184.

[14] 陈超阳, 和彦良, 占才超. 一例水貂肺炎克雷伯氏菌与绿脓杆菌混合感染的确诊 [J]. *中国动物保健*, 2017, 19 (10) :82-83.

[15] 张术森. 水貂出血性肺炎和克雷伯氏菌混合感染的诊治 [J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2016, 32 (2) :218.

[16] 赵宝华, 窦新红, 刘敏, 等. 死胚鸽蛋中绿脓杆菌的分离鉴定与药敏试验 [J]. *经济动物学报*, 2015, 19 (1) :31-33.

[17] 赵振振, 许梦怡, 许静, 等. 一株鸽源绿铜绿假单胞菌的分离与鉴定 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2014 (4) :54-55, 57.