

衡阳某鸡场大肠杆菌感染的诊断与防控

廖华媛 张古月 龙 剑 李润成*

湖南农业大学动物医学院,长沙 410128

摘要 为有效防控某鸡场 70 日龄肉鸡出现发病死亡的情况,对发病鸡群进行临床诊断、细菌分离及 PCR 鉴定以确定病原体;对分离菌进行药物敏感性检测以确定病鸡药物治疗方案。结果表明:鸡群存在大肠杆菌感染;分离菌对人用庆大霉素、新霉素、多粘菌素 B、阿米卡星、头孢曲松比较敏感,对人用阿莫西林不敏感,对鸡场提供的兽药庆大霉素不敏感,对兽用阿莫西林克拉维酸钾、头孢噻唑钠、硫酸新霉素、硫酸阿米卡星敏感;通过使用敏感兽用抗菌药物并提高鸡舍温度、更换新的垫料成功控制了发病情况。说明兽医在进行细菌药物敏感性评价时,用人用药敏纸片和商品化的兽药得出的结果可能存在明显差异,同时也说明了使用药物的同时结合改善环境对于成功防控鸡群大肠杆菌感染具有重要的作用。

关键词 肉鸡群;大肠杆菌;诊断;药物敏感性;防控

鸡大肠杆菌病是由大肠埃希菌某些致病性菌株引起的,可产生不同的临床表现,如死胚、败血症、脑膜炎、全眼球炎、腹膜炎等^[1]。近年来,随着养鸡业的迅速发展,该病已成为困扰养鸡场的重要疾病之一。由于该菌在环境中广泛存在,且血清型较多,鸡只是否出现发病通常与鸡群的健康水平存在很大关系,饲养环境差、应激或其他病原的感染可导致鸡群发生大肠杆菌病。此外,由于抗菌药物的盲目使用,致使大肠杆菌耐药菌株越来越多^[2-4],造成该病的临床治疗难度增加,常给养鸡场带来巨大损失。

2019 年 12 月,衡阳某养鸡场有 3 栋鸡舍,共约 7 000 羽 70~80 日龄的肉鸡。陆续有鸡只发病,每天死亡 30~40 羽不等。本文收集典型发病鸡进行临床解剖观察、实验室诊断,并结合诊断结果采取了综合性防控措施,取得了明显效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

脑心浸液(BHI)培养基为 oxid 生产,麦康凯营

养琼脂、药敏纸片购于杭州微生物试剂有限公司,无菌脱纤维羊血购自郑州益康生物工程有限公司,PCR MIX 购于北京天恩泽生物技术有限公司,6 种不同厂家生产的兽药(阿莫西林克拉维酸钾粉末、硫酸庆大霉素可溶性粉、阿米卡星粉末、2 个不同厂家的头孢噻唑钠粉、新霉素可溶性粉)来自发病鸡场。

1.2 病鸡的临床解剖

从发病鸡场选取具有代表性临床症状的病鸡 3 只,采用常规方法进行解剖,同时根据临床解剖情况采集主要病变脏器进行下一步实验室检测。

1.3 细菌的分离鉴定

采用无菌操作,从 3 只鸡病变脏器取组织划线接种用 BHI 加绵羊血制备的巧克力色营养琼脂,37 °C 培养 12 h 后观察细菌生长情况,并根据菌落形态取数量上具有优势的代表性菌落进行革兰氏染色镜检和培养特性分析。最后,根据培养特性和镜检情况确定疑似菌种,采用特异性引物进行 PCR 鉴定,引物参照文献 [5],上游引物为 F 5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGG-3',下游引物为

收稿日期:2020-01-13

基金项目:国家重点研发项目(2017YFD0500102)

* 通讯作者

廖华媛,女,1994 年生,硕士研究生在读。

R 5'-GGTTTATGCAGCAACGAGACGTC-3'。

1.4 分离菌的药物敏感性检测

取分离的优势菌株混合,用纸片法进行药物敏感性检测,并参照药敏纸片说明书进行结果的判定。

1.5 商品化兽药对分离菌的抑制试验

1)用 BHI 培养基将鸡场现有兽药阿莫西林克拉维酸钾粉、硫酸庆大霉素粉、硫酸新霉素粉、来自 2 个不同厂家的头孢噻呋钠粉、硫酸阿米卡星粉(各产品说明标注使用浓度为 0.1~0.5 g 粉末/L 水或 kg 饲料)均按 0.1 g/mL 稀释。

2)于 96 孔细胞培养板第 1~6 行的第 1 孔分别加稀释好的不同药液 200 μ L/孔,然后每一行的第 2~12 孔分别加 BHI 培养基 100 μ L/孔。

3)分别从各行的第 1 孔取 100 μ L 至第 2 孔混匀,再取 100 μ L 加入第 3 孔依次加至第 12 列后弃掉 100 μ L,将药液梯度稀释。

4)将分离菌培养液调至 0.5 麦氏单位浓度,然后每孔加入 30 μ L,各行的第 12 孔不加菌液,作为是否存在操作污染对照孔。

5)将培养板盖好放入 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育,0、6、24 h 各测定 1 次 OD₆₀₀ 值。

1.6 防控方案的制定

根据临床情况结合实验室诊断结果,采取针对性措施,然后进行防控效果的评估。

2 结果与分析

2.1 临床解剖观察

临床观察发病鸡表现呆立、精神沉郁(图 1),解



图 1 病鸡呆立精神沉郁

剖 3 只死亡病鸡,2 只可见干酪样物质包心、包肝(图 2),肺脏有出血和干酪样物质黏附(图 3),1 只病鸡肝脏有白色坏死点(图 4),3 只病鸡腹腔均有干酪样物质存在。

2.2 细菌分离培养鉴定

无菌操作取 3 只病死鸡肝脏组织划线接种巧克力营养琼脂,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。结果发现 3 个巧克力营养琼脂均长满灰白色、菌落形态一致的细菌,代表性结果见图 5。从 3 个巧克力营养琼脂中分别随机挑选 6 个单菌落,共 18 个菌落划线接种麦康凯营养琼脂,结果 18 个菌落来源的细菌均长成粉红色菌苔。取菌苔液体增菌培养后革兰氏染色镜检可见红色杆状细菌(图 6)。采用大肠杆菌鉴定引物进行 PCR 扩增,结果均扩增出了预期大小的特异性条带(图 7)。

2.3 分离菌药物敏感性检测

取分离菌的不同菌落混合后调整菌液浓度至 0.5 麦氏单位浓度,然后采用纸片法进行药物敏感性检测,结果见表 1。由表 1 可知,分离菌对新霉素、多粘菌素 B、庆大霉素、阿米卡星、头孢曲松、头孢噻肟、呋喃唑酮比较敏感,但对恩诺沙星、氟苯尼考、阿莫西林等耐药。

2.4 鸡场兽药抑菌效果评价试验

用鸡场提供的兽药,稀释至最高浓度 100 g/L、最低浓度为 0.001 μ g/L,然后进行分离菌的培养,结果见表 2。由表 2 可知,培养板各行的对照孔(第 12 孔)均没有细菌生长,说明不存在操作污染的影响;A、B、C、E、F 号药物所有稀释度均能有效抑制分离菌的生长,在培养 24 h 后,各培养孔均没有出现

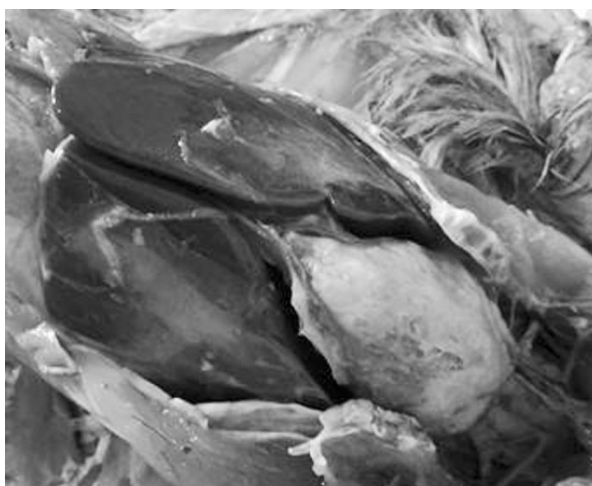


图 2 心脏、肝脏布满黄色干酪样物质



图 3 肺脏出血、附有干酪样物质

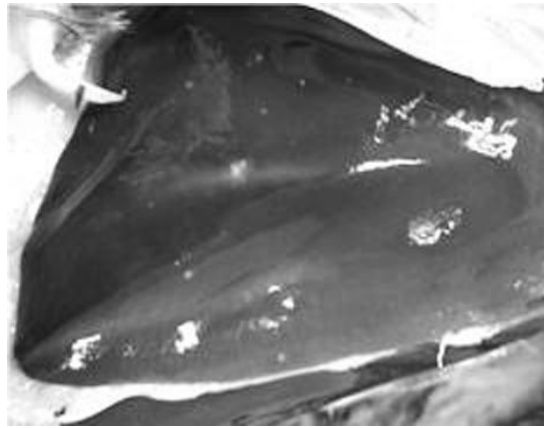


图 4 肝脏有白色坏死点

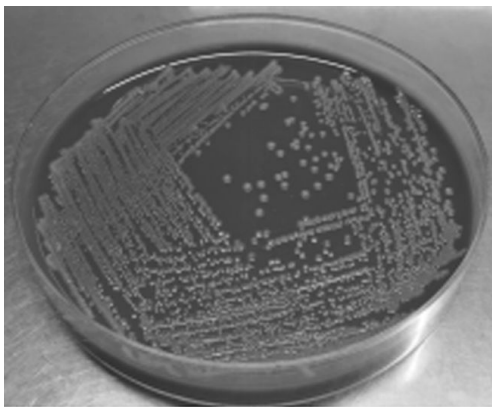


图 5 肝脏组织细菌分离结果

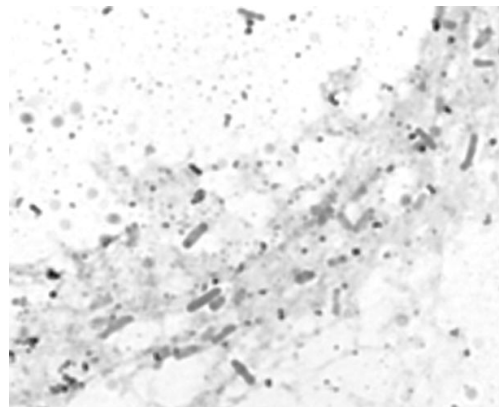
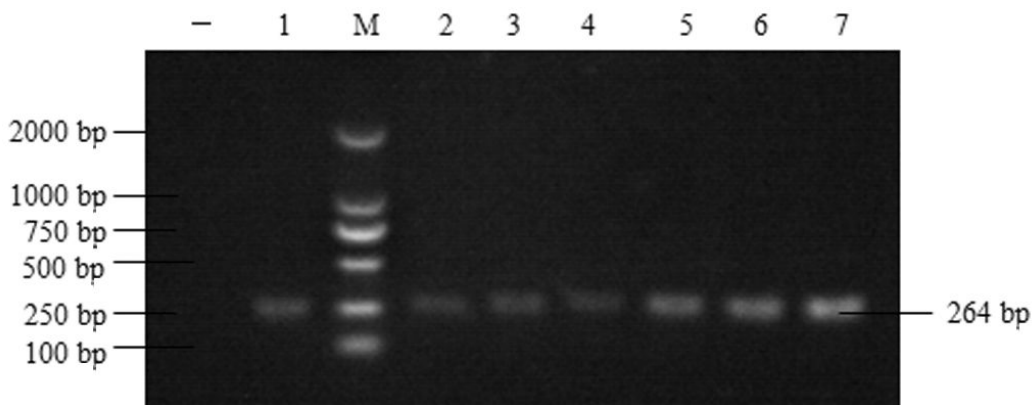


图 6 分离菌革兰氏染色镜检结果



注：-：阴性对照，1~7：分离菌，M：DM 2000 Marker。

图 7 分离菌 PCR 鉴定结果

OD₆₀₀ 值的变化；D 号药物庆大霉素，所有孔均出现 OD₆₀₀ 数值的增加，说明该药物对分离菌没有抑制作用（为确定各药物检测结果，进行了再一次重复试验，结果仍然相同）。

2.5 防控措施

根据药物敏感性检测结果，给鸡群采用饲料中添加阿莫西林克拉维酸钾、饮水中添加新霉素，连

用 4 d，结果该鸡场 3 栋鸡舍中的 1 栋鸡舍很快控制了疫情，但另外 2 栋未能达到理想的防控效果。调查原因可能为另外 2 栋鸡舍装有水帘、水帘上缝隙未进行密封，鸡舍温度较低，且该 2 栋鸡舍在转群时谷壳垫料较薄。后来将水帘进行密封，并更换垫料，同时增加垫料的厚度，再采用硫酸粘杆菌素拌料、头孢噻唑钠可溶性粉末饮水饲喂 3~4 d，鸡群

表 1 分离菌药物敏感性检测结果

药名	抑菌圈直径/mm	结果判定	药名	抑菌圈直径/mm	结果判定
阿米卡星	17	S	氟苯尼考	0	R
复方新诺明	0	R	头孢噻肟	22	S
头孢曲松	20	S	链霉素	0	R
多西环素	9	R	多粘菌素 B	16	S
阿莫西林	0	R	新霉素	17	S
恩诺沙星	0	R	庆大霉素	17	S
呋喃唑酮	18	S	氨基西林	0	R

注:S:对抗生素敏感,R:对抗生素耐受。

表 2 培养 24 h 后各药物对分离菌的抑制情况

药品 编号	不同药物稀释度											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: A: 头孢噻唑钠(a), B: 头孢噻唑钠(b), C: 阿莫西林克拉维酸钾, D: 硫酸庆大霉素, E: 阿米卡星, F: 新霉素; 1-12: 代表药物的不同稀释度, 1 号孔药物浓度最高(100 g/L), 11 号孔最低(0.001 μg/L); -: 代表培养液在孵育 24 h 后 OD 值没有出现升高, +: 代表 OD 值有明显升高。

逐渐康复。

3 讨论

本文对某鸡场出现鸡群精神沉郁、拉稀, 死亡的病例进行了临床分析以及细菌分离鉴定, 结果证实鸡群存在大肠杆菌感染。通过采用商品化药敏纸片进行分离菌的药物敏感性检测, 发现分离菌存在较强的耐药性, 仅对庆大霉素、多粘菌素 B、阿米卡星、新霉素、头孢曲松等比较敏感。此外, 本文采用鸡场购买的兽药进行分离菌药物敏感性分析发现, 阿莫西林克拉维酸钾、头孢噻唑钠、阿米卡星、新霉素均比较有效, 但庆大霉素完全没有效果, 这与商品化药敏纸片得到的结果存在差异。至于为什么不同来源相同成分药物对同一株细菌抑制效果有差异, 不排除存在某些药物成分含量不够或实际成分与标识有差异的可能。因此, 鸡场在进行细菌药敏检测时, 选用购买的兽药进行敏感性检测对于保证用药效果有时具有非常重要的作用。

本文根据药敏检测结果, 选用敏感药物进行防控, 结果条件较好的鸡舍取得了预期效果, 而环境

条件差的鸡舍未能取得理想效果, 直到将水帘密封、提高鸡舍温度、更换垫料并增加其厚度、降低环境中病原含量、提高垫料保暖效果, 才控制好发病情况。可见, 鸡群大肠杆菌感染除采用敏感药物进行防治外, 环境改善同样是不可缺少的重要措施。

参考文献

- [1] 陈博言. 猪群常见细菌性疫病的分离鉴定与流行病学调查[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [2] 李娟娟, 魏恒. 渭南地区鸡大肠杆菌的分离鉴定与耐药性检测[J]. 陕西农业科学, 2019, 65(7): 22-24.
- [3] 卞红春, 杨凌, 韩昆鹏, 等. 盐城地区蛋鸡源大肠杆菌的分离与耐药性分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019, 222(2): 47-48.
- [4] 王佳, 于杰, 邹玲, 等. 潍坊某鸡场大肠杆菌耐药性及血清型检测[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(22): 105-107.
- [5] 郭龙, 汤细彪, 刘田, 等. 2014 年猪群常见细菌性疫病的分离鉴定与流行病学调查[J]. 养殖与饲料, 2015(10): 1-3.

【责任编辑: 胡 敏】