

腹泻犊牛大肠埃希菌的分离鉴定与药敏试验

张 成

山东省邹平市长山镇畜牧兽医站, 山东滨州 256207

摘要 试验选择 2020 年 3 月 25 日某养殖场内发病犊牛尸体组织为病原来源, 开展流行病学调查、病料采集镜检、大肠埃希菌分离以及培养、细菌纯化、生化鉴定、药敏试验、动物试验以及溶血试验。试验结果显示: 该养殖场内犊牛死亡原因为大肠杆菌感染所致, 大肠杆菌菌株对于各类药物敏感性存在较大差异。其对庆大霉素以及硫酸链霉素敏感性强, 对四环素以及新霉素耐药。大肠杆菌为导致犊牛腹泻的常见致病菌, 其表现出了对部分抗生素耐药的現象。有必要定期轮换用药, 最好是先实施药敏试验择取敏感药物开展有效治疗, 同时做好疾病预防工作。

关键词 犊牛; 腹泻; 大肠埃希菌; 分离鉴定; 药敏试验

犊牛大肠杆菌性腹泻为一类兽医临床中较为常见的疾病, 半月以内的新生犊牛为发生此病的主要群体, 春冬季为好发季节, 死亡率高、发病急、病程短。依照犊牛的具体临床表现可分为 3 个类型, 即肠炎型、肠毒血型 and 败血型。如果未能及时对犊牛开展治疗, 数日内即可死亡。

很多犊牛于 10~14 日龄后发生疾病, 患病后体温会升高到 40~41 °C, 24 h 后会排出胶冻样黄色粪便, 内部含有大量血丝以及黏液。在病程延长时, 病畜可继发性出现腕关节和副关节肿大, 有的病畜还会表现出肺炎以及支气管炎的症状^[1]。

1 材料与方法

1.1 材 料

1) 试验选择 2020 年 3 月 25 日某养殖场内发病犊牛尸体组织为病原来源, 取其淋巴结、脾脏、肝脏、心脏组织以及血液。

2) 培养菌种类为生化鉴定培养基、鲜血平板、三糖铁琼脂培养基、SS 培养基与 LB 以及麦康凯培养基。

3) 生化试剂种类: 革兰氏染色剂中包含碘片、浓度为 95% 乙醇、结晶分析纯化学试剂、草酸铵、碱性复红以及碘化钾。

4) 生化鉴定试剂: 硫化氢、无水乙醇、甲基红、氢氧化钾、硫酸钠、硫化亚铁、 α -萘酚、靛基质、蔗糖、甘露醇、麦芽乳糖以及葡萄糖。

5) 药敏试验: 药敏纸片具体为土霉素、恩诺沙星、硫酸链霉素、卡那霉素、庆大霉素等。

6) 试验动物: 10 只雄性小白鼠, 体重为 18~20 g。

1.2 研究方法

1) 流行病学调查。工作人员全面探究饲养场当前管理情况、消毒情况、当地天气、疾病具体发病过程、犊牛死亡情况、发病情况、具体症状以及解剖学病理改变, 目的在于深度了解疾病的发生特点。

2) 病料具体采集过程以及镜检过程。依照无菌操作原则, 收集病牛尸体淋巴结、脾脏、肝脏、心血组织, 同时完成涂片工作。在此之后实施染色以及镜检。

3) 大肠埃希菌分离以及培养。将以上组织分别接种在 LB 肉汤内实现培养, 环境温度为 37 °C, 接种时间为 24 h, 然后实施革兰氏染色与镜检观察。

4) 大肠埃希菌纯化。开展细菌分离培养工作, 把脾脏、肝脏等组织分别接种在新鲜兔血营养琼脂平板中, 每类脏器接种平板为 4 份。其中, 2 份实施普通需氧菌培养, 另外 2 份实施厌氧菌培养, 将其

放入温度为 37 ℃ 的恒温箱中 24 h 查看结果。针对于分离出的细菌开展革兰氏染色与镜检,然后将细菌进行纯培养,将纯培养物接种在麦康凯培养基、三铁斜面穿刺培养基以及 LB 培养基内,于 37 ℃ 环境下需氧培养 24 h,在此之后查看最终结果。

5)生化鉴定步骤。糖分解试验:取用分离菌 24 h 纯培养物,接种在麦芽甘露醇培养基、乳糖培养基、葡萄糖培养基中,培养处理 24 h,温度为 37 ℃,查看结果。MR/VP 试验过程择取分离菌培养物,将其接种到葡萄糖蛋白胨水溶液内,培养处理 24~48 h,温度为 37 ℃,并在其中添加指示剂^[2]。

6)硝酸盐还原。试验取用分离纯培养物质接种到硝酸盐培养基内,培养处理 24 h,环境温度为 37 ℃,加入试剂乙以及试剂甲。如果在 0.5 min 内转为红色,即可视为阳性;如果没有颜色,则应增加少量锌粒,若出现红色为阴性试验。

7)药敏试验。本试验应用药敏纸片法开展药敏试验工作,常用种类为四环素类以及青霉素类药物。

8)动物试验。本试验实施动物致病性试验,将分离取得的大肠杆菌接种自营养肉汤内,培养 10 h,温度环境设定为 37 ℃。取用培养液接种试验动物,同时设立对照组。

9)溶血试验。本试验应用平板法对分离溶血的特性加以测定,工作人员把大肠杆菌菌种接种到浓度为 5% LB 平板内培养处理 48 h,温度设定为 37 ℃,查看溶血情况,若菌落四周出现溶血圈,则判定为阳性结果。

2 结果与分析

通过开展动物试验病原菌分离鉴定试验,观察病理改变、查看临床症状以及实施流行病学调查,结果表明:该养殖场内犊牛死亡原因为大肠杆菌感染所致。

经药敏试验结果证实:大肠杆菌菌株针对于各类药物敏感性存在较大差异。其对于庆大霉素以及硫酸链霉素敏感性强,对于四环素以及新霉素耐药^[3]。

3 讨论

当前,学术界已确定共计 3 类大肠杆菌会导致犊牛腹泻。

1)产热较为稳定或者热不稳定的肠毒素大肠杆菌,其也被称为产肠毒素性大肠杆菌。

2)大肠杆菌定植于小肠黏膜,但不会生成复杂肠毒素。上述菌株能以特异性的方式吸附于动物肠腔表面肠细胞中,常于杯状凹陷内或者胞浆突起之上。大肠埃希菌吸附于肠上皮表面,经常引发微绒毛脱落。学术界将此类病变称之为吸附脱落病理改变。

3)大肠杆菌定植于动物大肠表面所引发的轻微痢疾,这种情况也会导致 AE 病变。上述菌株会引发大肠出血,所以其也被称为肠出血性大肠杆菌。某些肠出血性大肠杆菌和肠致病性大肠杆菌会产生一类毒素,能够消灭体外培养的 Vero 细胞,其可被称为类志贺毒素或者 Vero 细胞毒素。这种毒素不会引发 AE 病变,但会参加到相关致病过程中。

如果犊牛便内带血,尤其是便内无分离的沙门氏菌以及隐孢子虫状况下,若发现大肠以及小肠黏膜有关大肠杆菌,就可以推断其为肠致病性大肠杆菌。

本组试验结果表明:该养殖场内犊牛死亡原因为大肠杆菌感染所致。药敏试验结果证实:菌株对于庆大霉素以及硫酸链霉素敏感性强,对四环素和新霉素耐药,出现这一情况的原因和长期盲目用药有关。基于此,建议相关人员在治疗犊牛大肠杆菌病过程中,有必要定期轮换用药,最好是先实施药敏试验,择取敏感药物开展有效治疗,以免造成经济损失。

要想预防此类疾病发生,务必要做好综合化防治举措,降低各类应激因素出现率。强化对于牛犊的饲养管理力度,做好牛舍通风,落实各项卫生保健举措。另外值得说明的是,饲养主也有必要增加清洗犊牛饮奶器具的频次。

参 考 文 献

- [1] 王丹阳,王旭荣,张康,等.牛病毒性腹泻病毒、大肠杆菌和奇异变形杆菌混合感染致犊牛腹泻的研究[J].中国畜牧兽医,2018,45(1):189-195.
- [2] 李岩,刘云.犊牛大肠杆菌病的病因、症状、类症鉴别和防控措施[J].现代畜牧科技,2017(8):105.
- [3] 张光明.中西医结合治疗犊牛大肠杆菌性腹泻[J].中国畜牧业,2017(14):86.