

三黄鸡卵黄性腹膜炎病原菌的分离鉴定与药敏试验

曹 刚 陈林文 张文波 李 欢 高 蕊 周亚南 戚 伟 朱芝秀*

江西农业大学动物科学技术学院,南昌 330045

摘要 某蛋鸡场产蛋率持续下降,为了找到防治方法,对死亡鸡进行细菌分离鉴定及药敏试验。试验结果显示,获得 5 株分离菌;分离菌 L-s-1、L-s-2 与沙门氏菌的生化特性一致,分离菌 L-d-1、L-d-2、L-d-3 与大肠杆菌的生化特性一致;分离菌均对青霉素类、四环素类药物耐药,对氨基糖苷类、头孢菌素类药物敏感。从而得出:分离菌 L-s-1、L-s-2 为沙门氏菌,L-d-1、L-d-2 和 L-d-3 为大肠杆菌;大肠杆菌与沙门氏菌混合感染引起卵黄性腹膜炎,导致产蛋率持续下降;分离菌高敏药物为庆大霉素、环丙沙星、头孢哌酮等。

关键词 三黄鸡;卵黄性腹膜炎;分离鉴定;药敏试验

卵黄性腹膜炎是产蛋鸡的一种常见疾病,其危害性呈现越来越严重的趋势^[1-3]。因长期滥用同种抗生素,造成了细菌的普遍耐药性^[4-5],寻找高敏药物交叉使用迫在眉睫^[6]。2019 年 12 月中旬,九江某养鸡场 8 000 只蛋鸡产蛋率下降 20%。采集死亡鸡的肝脏和液化的卵黄,进行细菌分离鉴定及药敏试验,旨在找到高敏药物防治该病。

1 材料与方法

1.1 材 料

1)试验动物。病死鸡:江西九江某养鸡场;试验小白鼠:(20 g 左右)购自南昌大学动物试验中心。

2)药品及试剂。麦康凯培养基、ss 琼脂培养基、ss 琼脂斜面、伊红美蓝培养基:购自北京奥博星生物技术有限公司;革兰氏染色试剂、药敏试纸、微量发酵管:购自杭州天和微生物有限公司。

3)主要仪器。电热恒温培养箱:购自上海跃进科学仪器厂;光学显微镜:购自重庆光学仪器厂;电

热压力蒸汽灭菌器:购自上海申安医疗器械厂;超净工作台:购自苏净集团安泰公司。

1.2 试验方法

1)病理解剖。将死亡鸡进行病理解剖,观察各器官的病理变化并取样。

2)病原菌的分离培养。将死亡鸡肝脏、卵黄无菌操作,分别接种于普通琼脂培养基、麦康凯培养基、伊红美蓝培养基、ss 琼脂培养基及 ss 琼脂斜面,观察记录菌落形态变化,挑取单个菌落革兰氏染色镜检并进行纯培养。

3)分离菌的生化特性。将分离菌接种于葡萄糖、靛基质、硫化氢等微量生化反应管中,置灭菌平皿内 37 ℃恒温培养 24 h,观察记录细菌的生长特性及指示剂的变化,操作方法按照微量生化反应管说明书进行。

4)分离菌的药敏试验。按照纸片法^[7],用无菌棉签均匀涂抹分离菌于普通琼脂培养基,待培养基水分完全吸收后,按梅花状贴药敏试纸,37 ℃恒温培

收稿日期:2020-02-08

基金项目:江西省教育厅项目(GJJ150416);江西省科技厅项目(20122BBF60082);江西农业大学大学生创新创业项目(201910410076);江西农业大学大学生创新创业项目(201910410158)

* 通讯作者

曹 刚,男,1998 年生,本科在读。

养 24 h 后,测量其抑菌圈直径。

5)分离菌致病性试验。将性状一致的小鼠随机分为试验组和对照组(5 只/组),试验组分别腹腔注射分离菌培养液(0.5 mL/只),对照组腹腔注射 0.85%生理盐水(0.5 mL/只),观察小白鼠的发病情况,将死亡小鼠剖检分菌,染色镜检。

2 结果与分析

2.1 解剖结果

肝脏点状出血;心冠脂肪出血;卵泡破裂和液化。

2.2 分离菌培养特性

得到 L-d-1、L-d-2、L-d-3、L-s-1 和 L-s-2 共 5 株分离菌。麦康凯培养基:L-d-1、L-d-2 和 L-d-3 呈红色不透明(图 1),L-s-1 和 L-s-2 呈无色透明(图 2);伊红美蓝培养基:L-d-1、L-d-2 和 L-d-3 呈金属光泽(图 3),L-s-1 和 L-s-2 为无色透明(图 4);ss 培养基:L-d-1、L-d-2 和 L-d-3 呈粉红色(图 5),L-s-1 和 L-s-2 呈黑色单个菌落(图 6);三糖铁琼脂斜面培养基:L-d-1、L-d-2 和 L-d-3 斜面呈黄色(图 7),L-s-1 和 L-s-2 斜面变黄,穿刺处出现黑色沉淀,试管底部有气泡(图 8)。5 株分离菌革兰氏染色镜检,均为 G-短杆菌,两端钝圆,散在或成对出现(图 9)。

2.3 分离菌生化特性

1)糖发酵试验:L-s-1 和 L-s-2 不发酵乳糖及蔗糖,L-d-1、L-d-2 和 L-d-3 发酵大部分糖类。

2)硫化氢试验:L-s-1 和 L-s-2 产生黑色沉淀,L-d-1、L-d-2 和 L-d-3 没有变化。

3)枸橼酸盐试验:L-s-1 和 L-s-2 由绿变蓝色,L-d-1、L-d-2 和 L-d-3 没有变化(表 1)。

2.4 分离菌药敏试验

分离菌对青霉素类、四环素类等药物产生耐药,对氨基糖苷类、头孢菌素类等药物敏感(表 2)。

2.5 分离菌致病性试验

死亡小鼠没有明显外伤,触摸无硬块。对其由腹部向颈部进行剖检,发现有腹水;对病死鼠取样分菌,分离到原病原菌(表 3)。

3 讨论

3.1 分离菌的种属

根据临床解剖特征、分离菌培养和生化特性,比对《伯杰氏细菌分离鉴定手册》^[8],得知 L-s-1 和

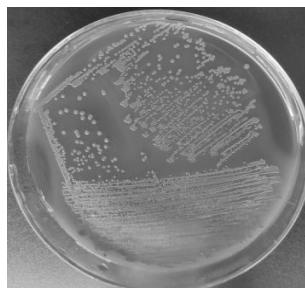


图 1 红色不透明菌落

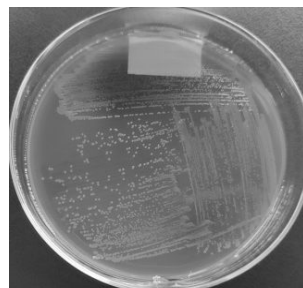


图 2 麦康凯透明菌落

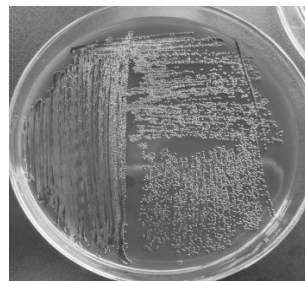


图 3 金属光泽

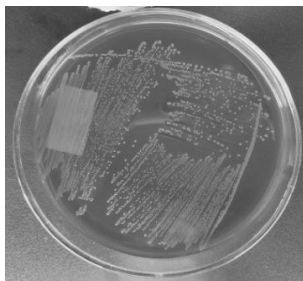


图 4 伊红美蓝透明菌落

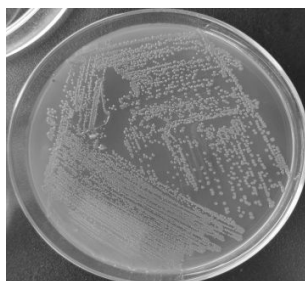


图 5 粉红色菌落

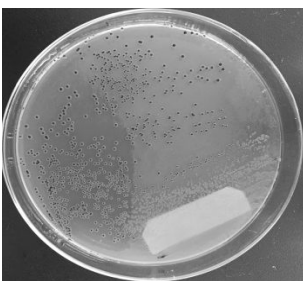


图 6 黑色单个菌落

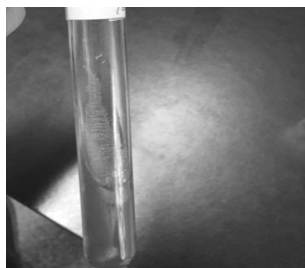


图 7 黄色斜面

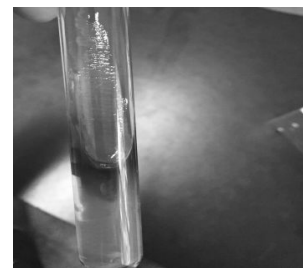


图 8 产生黑色沉淀

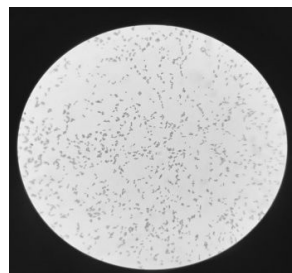


图 9 G-短杆菌

L-s-2 生化特性与沙门氏菌一致,确定为沙门氏菌;L-d-1、L-d-2、L-d-3 生化特性与大肠杆菌一致,确定为大肠杆菌;大肠杆菌与沙门氏菌混合感染引起

卵黄性腹膜炎。

3.2 分离菌的生化特性

L-s-1、L-s-2 的生化特性与武志强^[9]、黄世娟等^[10]报道中的糖类、蛋白胨水、枸橼酸盐等生化试验结果均一致,而在硫化氢、尿素的结果上存在差异,可能是菌株不同造成;L-d-1、L-d-2、L-d-3 生化鉴定

结果与李娟娟等^[11]试验结果一致。

3.3 分离菌的耐药性

分离菌的耐药性与林安等^[12]报道中的头孢唑啉、庆大霉素等的试验结果一致,与阿莫西林、氨苄西林、链霉素等的试验结果存在差异。这可能由于用药习惯、地域差异导致。

表 1 病原菌生化特性

项目	L-s-1	L-s-2	L-d-1	L-d-2	L-d-3
葡萄糖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
麦芽糖	⊕	⊕	⊕	+	+
乳糖	-	-	⊕	⊕	+
蔗糖	-	-	⊕	+	⊕
甘露醇	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
蛋白胨水	-	-	-	+	+
硝酸盐	+	+	+	+	+
枸橼酸盐	+	+	-	-	-
硫化氢	+	+	-	-	-
尿素	-	-	-	-	-
七叶苷	-	-	-	-	-
精氨酸双水解酶	+	+	-	-	-
棉子糖	-	-	⊕	+	+
山梨醇	⊕	⊕	⊕	⊕	+
侧金盏花醇	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-

注:“⊕”表示产酸产气,“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应。

表 2 药敏试验结果

mm

药品名称	药敏片含量/(μg/片)	R	I	S	L-s-1	L-s-2	L-d-1	L-d-2	L-d-3
阿莫西林	20	≤13	14~17	≥18	16.40(I)	18.85(S)	12.94(R)	9.15(R)	11.53(R)
氨苄西林	10	≤11	12~14	≥15	15.28(S)	19.90(S)	14.44(I)	11.30(I)	20.76(S)
罗红霉素	15	≤13	14~22	≥23	0.00(R)	0.00(R)	0.00(R)	0.00(R)	0.00(R)
链霉素	10	≤11	12~14	≥15	12.88(I)	13.55(I)	18.21(S)	17.11(S)	14.85(I)
庆大霉素	10	≤12	13~14	≥15	17.42(S)	20.11(S)	18.85(S)	18.24(S)	17.71(S)
头孢他啶	30	≤14	15~17	≥18	16.14(I)	18.65(S)	23.36(S)	22.63(S)	22.32(S)
利福平	5	≤16	17~19	≥20	0.00(R)	0.00(R)	13.94(R)	12.29(R)	11.51(R)
丁胺卡那	30	≤14	15~16	≥17	21.37(S)	23.24(S)	16.94(S)	22.00(S)	15.34(I)
环丙沙星	5	≤15	16~20	≥21	35.52(S)	34.94(S)	27.20(S)	27.18(S)	27.74(S)
头孢哌酮	75	≤15	16~20	≥21	24.96(S)	23.32(S)	27.14(S)	27.05(S)	26.98(S)
呋喃唑酮	300	≤14	15~16	≥17	19.98(S)	23.11(S)	22.06(S)	20.99(S)	20.44(S)
四环素	30	≤14	15~18	≥19	14.93(I)	17.49(I)	0.00(R)	0.00(R)	0.00(R)
多粘菌素	300	≤8	9~11	≥12	8.99(I)	13.01(S)	11.62(I)	12.02(S)	12.92(S)
头孢唑啉	30	≤14	15~17	≥18	26.78(S)	27.15(S)	24.14(S)	23.62(S)	23.35(S)

注:“S”表示高度敏感,“I”表示中度敏感,“R”表示耐药。

表 3 致病性试验结果

组别	死亡率(24 h)	死亡率(48 h)
L-s-1	0	0
L-s-2	0	0
L-d-1	3/5	5/5
L-d-2	1/5	4/5
L-d-3	0	2/5
混合	1/5	5/5

试验结果表明,分离菌对多种药物产生耐药,因此必须在药敏试验后对症治疗,避免盲目治疗加重损失^[13]。在实际治疗中,要选择合适的给药方式,轮换或交替使用不同的高敏药物^[14],而乳酸菌、枯草芽孢杆菌等益生菌作为抗生素的替代品越来越受到重视^[15],可辅助治疗,防止病原菌过快产生耐药性。

3.4 分离菌的致病性

动物试验结果说明,大肠杆菌致病性大于沙门氏菌,单一的沙门氏菌致病性弱,只有与大肠杆菌混合感染才引发卵黄性腹膜炎,导致产蛋率下降。

3.5 分离菌的防治

平时要加强饲养管理,做到舍内彻底消毒,改善饲养环境,定期用药物预防。饲料中添加适量维生素,提高鸡的抗病能力^[16-17],做到及时发现问题,寻找解决方案,避免进一步扩大损失。

参 考 文 献

- [1] 张召兴,李佩国,李蕴玉,等.致蛋鸡卵黄性腹膜炎大肠杆菌分子分群、耐药表型及耐药基因型检测与分析[J].中国预防兽医学报,2019,41(9):885-890.
- [2] 王丽娜,张瑞峰,周慧玲.浅析蛋鸡卵黄性腹膜炎的病理变化和防治措施[J].中国家禽,2010,32(23):53,56.
- [3] 杨日恒,黄岩.肉种鸡卵黄性腹膜炎的防控措施[J].现代畜牧兽医,2008(6):30-31.
- [4] 刁有祥,李久芹,陈庆普.山东省鸡大肠杆菌的分离鉴定[J].中国预防兽医学报,2002(1):23-25.
- [5] 张召兴,李蕴玉,吴同奎,等.邢台地区致鸡卵黄性腹膜炎大肠杆菌血清型鉴定、毒力基因检测及耐药性分析[J].中国预防兽医学报,2017,39(3):191-195.
- [6] 佟荟全,李绮华,贾俊静,等.蛋鸡卵黄性腹膜炎病因分析与防治[J].黑龙江畜牧兽医,2014(12):86-87.
- [7] 美国临床实验室标准化委员会(NCCLS).抗菌药物敏感试验执行标准第十九版信息增刊(MI00-S19)[S].张长贵,译.美国:美国临床和实验室标准化研究所(CLSI),2009.
- [8] 布坎南 RE,吉本斯 NE,等.伯杰细菌鉴定手册[M].8版.北京:科学出版社,1984.
- [9] 武志强.粤北地区鸡沙门氏菌分离株的生化反应特性[J].中国预防兽医学报,2009,31(5):406-408.
- [10] 黄世娟,陈进喜,彭定兵,等.鸡沙门氏菌的分离鉴定及药敏试验[J].广西畜牧兽医,2011,27(4):213-215.
- [11] 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.
- [12] 林安,喻元,胡岚岚,等.鸭源大肠杆菌和沙门菌混合感染的分离鉴定及药敏试验[J].中国兽医杂志,2012,48(4):45-47.
- [13] 阎玉霞.浅谈禽大肠杆菌病常见混合感染的类型及诊疗[J].现代畜牧兽医,2008(11):41-42.
- [14] 高舒榭.鸡大肠杆菌病的综合防治[J].家禽科学,2019(11):40-41.
- [15] 王勤.枯草芽孢杆菌在家禽养殖的应用与展望[J].家禽科学,2019(10):48-52.
- [16] 杨稀云.鸡大肠杆菌与沙门菌混合感染的诊治[J].畜禽业,2015(4):79-80.
- [17] 郭吉利,郭占达.一例鸡大肠杆菌与沙门氏菌混合感染的诊断与防控[J].河南畜牧兽医:综合版,2018,39(12):48-49.

【责任编辑:胡 敏】