

鹅源2型鸭疫里氏杆菌的分离鉴定及药敏试验

王金合¹, 邓代君², 江青东², 陈益² (1. 郑州牧业工程高等专科学校动物医药系, 河南郑州450011; 2. 新疆轻工职业技术学院, 新疆乌鲁木齐830021)

摘要 [目的] 确诊以肝包炎、心包炎、气囊炎为特征的鹅病, 分离鉴定致病菌和血清型, 并筛选敏感药物。[方法] 无菌采集病鹅心血、肝脏、脾脏等病料, 分离菌株, 进行了病原分离鉴定、血清型鉴定、动物回归试验及药敏试验。[结果] 通过对分离菌株鉴定, 确诊为鸭疫里氏杆菌感染, 血清型为2型, 且对头孢曲松、复方新诺明、头孢呋喃高度敏感。[结论] 2型鸭疫里氏杆菌与多种致病菌引起的症状相似, 只有通过实验室分离鉴定才能确诊, 临床可选用头孢曲松、复方新诺明等敏感药物来防治该病。

关键词 鹅; 2型鸭疫里氏杆菌; 分离鉴定; 药敏试验

中图分类号 S834 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)12-05510-02

Isolation and Identification and Drug Sensitivity Test of *Reimerella anatipestifer* Serotype 2 from Geese

WANG Jin-he et al (Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450011)

Abstract [Objective] This research was aimed at diagnosis of liver inflammation, pericarditis, airbag inflammation by goose disease, identification of pathogens and serotypes, and screening sensitive drug. [Methods] Pathological findings, including sick goose blood, livers, spleen, were sterile collected, and then separation and identification of a pathogen, serotype identification, animal regression test and drug sensitivity test were performed successively. [Results] The results showed that the pathogen was the RA, Serotype of Type 2, and highly sensitive to ceftriaxone, cotrimoxazole, ceftiofur. [Conclusion] The clinical symptoms caused by RA were quite similar with other pathogens, only by isolation and identification can be confirmed. Ceftriaxone, cotrimoxazole, ceftiofur were useful for prevention and cure of RA.

Key words Goose; Type 2 RA; Isolation and identification; Drug sensitivity test

鸭疫里氏杆菌(*Reimerella anatipestifer*, RA)是鸭传染性浆膜炎的病原, 主要引雏鸭的一种急性或慢性败血性传染病, 被称为鸭疫里氏杆菌感染或鸭传染性浆膜炎。RA除了感染家鸭引起严重损失外, 还可感染火鸡、野鸭、鹅、鸽等^[1]。我国自1982年郭玉璞首次在北京确诊鸭群中存在RA感染以来, 广东、上海、广西、浙江、四川和重庆等地相继出现该病的报道^[2-6]。2008年4月中旬, 河南信阳地区一些养鹅场, 雏鹅大批发病, 临床症状主要表现为流泪, 鼻腔流出大量脓性浆液性鼻液, 频频甩头, 拉黄白色稀粪, 严重病例濒死前, 病鹅急剧抽搐, 有明显的神经症状。病理剖检发现病鹅脾脏高度肿大, 有明显的纤维素性心包炎、肝周炎和气囊炎, 这与鹅大肠杆菌病极为相似, 按大肠杆菌治疗却无效果。笔者以患病鹅的肝脏、脑组织等为材料, 在实验室进行了病原分离鉴定、血清型鉴定和药物敏感试验, 以期确诊致病菌和敏感药物, 有效防治该病。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料。河南信阳某养鹅场送检的临床剖检以纤维素性心包炎、肝周炎和气囊炎为特征的15日龄病死鹅5只, 发病鹅7只。无菌采集病死雏鹅的心血、肝脏、脑组织作为病原分离材料。

1.1.2 试验动物。未接种过RA疫苗的7日龄健康雏鹅25羽, 由郑州牧专试验动物中心提供。

1.1.3 培养基。绵羊血琼脂平板、普通营养琼脂、含血清的肉汤培养基由郑州牧专微生物实验室自制; 巧克力琼脂平板、胰酪胨大豆琼脂(TSA)、麦糠凯营养琼脂购自杭州天和微生物试剂有限公司, 使用时按说明配制。微量生化反应管购自杭州天和微生物试剂有限公司, 部分生化反应管微生物实

验室自制。

1.1.4 药敏试纸。13种常用药物的药敏试纸, 购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.5 标准阳性血清。兔抗鸭疫里氏杆菌1、2型阳性血清, 由华中农业大学李兆周博士馈赠。

1.2 方法

1.2.1 直接涂片镜检。无菌采集心血、肝脏、脑组织等病料直接涂片、触片, 革兰氏及瑞氏染色、镜检。

1.2.2 细菌分离与培养。无菌采集心血、肝、脑组织, 分别在血琼脂、TSA琼脂、巧克力琼脂、麦糠凯营养琼脂平板上蛇形划线、接种并标记。采用烛缸法^[7]置细菌恒温培养箱中, 37℃培养24~48h, 然后检查细菌菌落特征。选择疑似菌落1/3染色镜检, 符合鸭疫里氏杆菌特征后, 其余2/3分别接种普通营养琼脂斜面及含血清的肉汤培养基, 进行纯培养, 并进行活菌计数。

1.2.3 生化试验。无菌钓取细菌的纯培养物, 按文献[7]的方法, 进行糖发酵试验、靛基质试验、尿素酶试验、接触酶试验、硝酸盐还原、甲基红试验、枸橼酸盐利用试验。

1.2.4 动物回归试验。将7日龄健康雏鹅饲养到15日龄, 然后选择健康雏鹅20羽, 随机分为试验和对照两组, 每组10羽。试验组每羽皮下接种细菌的纯培养菌液0.2ml(活菌量 2×10^8 CFU/ml), 对照组每羽皮下接种无菌生理盐水0.2ml, 隔离饲养, 逐日观察并记录其临床症状和死亡情况, 连续观察10d。对发病死亡雏鹅进行剖检、涂片镜检、细菌分离鉴定。

1.2.5 血清型鉴定。按常规玻片凝集试验方法, 用兔抗RA阳性血清鉴定分离菌株的血清型。出现颗粒状凝集物, 凝集物周围液滴澄清为阳性反应; 未出现颗粒状凝集物, 液滴浑浊为阴性反应^[7]。

1.2.6 药敏试验。采用纸片扩散法和文献[8]中判定标准, 将肉汤培养基分离菌的纯培养物, 均匀涂布接种于巧克力琼脂平板表面, 37℃烛缸培养24h后, 测量抑菌圈直径。判断

作者简介 王金合(1971-), 男, 河南南阳人, 讲师, 从事预防兽医教学和科研工作。

收稿日期 2009-02-09

标准为:抑菌圈直径小于10 mm的为不敏感,10~15 mm的为中度敏感,15 mm的为高度敏感。

2 结果与分析

2.1 分离菌形态染色特征 革兰氏染色呈阴性,菌体呈杆状或椭圆形的小杆状,多单个,少数成双或短链排列,不形成芽胞;瑞氏染色镜检可见大量两极浓染的短小杆菌。

2.2 分离菌培养特性 病料接种培养基培养24 h后,在血琼脂平板长出透明、光滑、露珠样小菌落,不溶血;在TSA琼脂平板上生长旺盛,菌落特征为无色、呈圆形、微突起、表面光滑、半透明、泛蓝色荧光、直径约1~2 mm的小菌落;在巧克力营养琼脂平生长良好,菌落特征为圆形、微隆起、表面光滑呈奶油状的菌落,直径约1~2 mm;在麦康凯琼脂平板上未见生长;在含血清肉汤培养基中培养48 h后呈现上下一致轻度混浊,试管底部少许沉淀。

2.3 生化特性 由表1可知,两株分离菌几乎不发酵糖类和醇类;靛基质试验、硝酸盐还原、甲基红试验、枸橼酸盐利用实验均为阴性;尿素酶和过氧化氢酶试验为阳性。根据分离菌的生化特性,结合其形态染色特征和菌落特征,可以确定该分离菌为RA。

表1 分离菌生化试验结果

Table 1 Biochemical test results of isolated bacteria

葡萄糖Glucose -	麦芽糖Maltose -	尿素酶Urease +
甘露醇Mannitol -	木糖Xylose -	过氧化氢酶Catalase +
蔗糖Sucrose -	乳糖Lactose -	甲基红试验MR -
果糖Fructose -	棉子糖Raffinose -	阿拉伯糖arabinose -
枸橼酸盐利用	硝酸盐还原	靛基质试验
Nitrate use -	Nitrate reduction -	Indole test -

注:+ 为不分解 阳性;- 为不分解 阴性。

Nte :+ means decomposition/ positive; - means non-decomposition/ negative.

2.4 动物回归试验 试验组健康鹅,在接种次日,陆续出现精神萎靡、流泪,并开始拉少量黄白色稀粪。接种后第3天,病症显著加重,有3只病鹅死亡,7 d内全部死亡。病鹅临床症状,为流出大量浆液性鼻液,频频摇头,扭头向身背部擦拭眼泪,拉大量黄白色稀粪,食欲基本废绝。病理剖解发现,有严重的肝包炎、心包炎,表面均被覆纤维素性渗出物,脾脏明显肿大。肝脏、心血的革兰氏及瑞氏染色,得到和上述染色结果一致的革兰氏阴性、两极浓染的小杆菌。而试验组除2只有腹泻症状外,其余正常。

2.5 血清型鉴定 分离菌株与2型RA标准阳性血清混合后不到1 min,玻片上出现颗粒状凝集,凝集物周围液滴澄清,为100%阳性,而分离菌菌株与1型RA标准阳性血清混合后5 min内未出现颗粒状凝集,液滴浑浊,为阴性。血清型鉴定结果表明该分离菌株为2型RA。

2.6 药敏试验 用丁胺卡那霉素、卡那霉素等13种药物对2株分离细菌进行了药敏试验。由表2可知,分离菌株对头孢曲松、复方新诺明、头孢呋高度敏感;对庆大霉素、丁胺卡那、红霉素、四环素、氯霉素、强力霉素中度敏感;对青霉

素、阿莫西林、恩诺沙星、氟苯尼考不敏感。

表2 药敏试验结果

Table 1 The results of drug sensitivity test mm

药物 Drug	抑菌环直径 Antibacterial annulus diameter	药物 Drug	抑菌环直径 Antibacterial annulus diameter
头孢呋 Ceftriaxone	18	头孢曲松 Ceftriaxone	29
庆大霉素 Gentamycin	14	氟苯尼考 Florfenicol	9
阿莫西林 Amoxicillin	9	四环素 Tetracycline	12
强力霉素 doxycycline	10	青霉素 Penicillin	7
丁胺卡那 Amikacin	13	氯霉素 Chloramphenicol	11
恩诺沙星 Enrofloxacin	5	复方新诺明	28
红霉素 Erythromycin	15	Cotrimoxazole	

3 结论与讨论

(1) 笔者从肝包炎、心包炎及脾脏肿大为特征的病鹅内脏器官中,分离得到2株细菌,经细菌病原学鉴定,为2型RA。动物回归试验得到和自然病鹅一致的临床症状和病理变化,同时细菌检查也得到一致结果。可见2型RA是引起鹅场雏鹅大批发病的主要致病菌。

(2) 本病临床症状与大肠杆菌、和沙门氏菌等感染引起的病变相似,并且临床上常与大肠杆菌混合感染,而单从腹泻症状观察,极易与小鹅瘟及鹅新型病毒性肠炎等混淆。因此,病原菌的分离和鉴定对该病的确诊、预防、治疗以及控制非常重要。

(3) 药敏试验结果表明,分离菌株仅对头孢曲松、复方新诺明、头孢呋高度敏感,推荐首先这些药物来控制雏鹅鸭疫里氏杆菌病;为了防止产生耐药性,在选择敏感药物治疗该病时,应注意交替用药,按疗程投药,这样才能收到较好的治疗效果^[9]。

(4) 对于鹅里氏杆菌病的防治,首先应改善幼鹅的饲养条件,尤其是注意通风、干燥、勤换垫料、减少饲养密度和施行“全进全出”的饲养管理制度;其次通过药敏试验筛选敏感药物,进行药物治疗;最后也可以采用鸭用里氏杆菌灭活疫苗进行预防。目前,已有人研制出了铝胶灭活苗,用于鸭传染性浆膜炎的预防^[10]。

参考文献

- [1] 胡清海,刘晓文,苗晋锋,等.一株鹅源鸭疫里氏杆菌与鸭源分离株的致病性比较[J].畜牧与兽医,2002,34(9):3-4.
- [2] 李继祥,徐刚,王孝友,等.重庆地区鸭传染性浆膜炎病原分离鉴定[J].中国预防兽医学报,2000,22(6):420-422.
- [3] 鲍国连,佟承刚,韦强,等.鸭传染性浆膜炎流行病学与病原特性研究[J].浙江农业学报,1997,9(3):161-164.
- [4] 陈安春.现代禽病诊断及防治全书[M].成都:四川大学出版社,1997:198-203.
- [5] 胡清海,刘晓文,苗晋锋,等.鹅2型鸭疫里氏杆菌的分离鉴定及药敏试验[J].四川畜牧兽医,2008(7):41-42.
- [6] 程龙飞,李文杨,傅光华,等.鹅源2型鸭疫里氏杆菌的分离与鉴定[J].中国兽医科技,2003,11(33):36-38.
- [7] 姚火春.兽医微生物学试验指导[M].2版.北京:中国农业出版社,2002:35-37.
- [8] 廖延雄.兽医微生物实验诊断手册[M].北京:中国农业大学出版社,1995:81-114.
- [9] 杨小林,刘国平,龚大春,等.鸭里氏杆菌的分离鉴定及生物学特性[J].湖北农业科学,2006,45(5):650-652.
- [10] 苏小运,蔡家利,潘国庆,等.鸭传染性浆膜炎铝胶疫苗研究[J].中国家禽,2001,23(23):24-25.