

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.04

雏鹅大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验

黄宇翔, 张 军, 李洪彬, 邹 跃, 杨旭东, 王志强, 刘力威

(黑龙江省兽医科学研究所, 黑龙江齐齐哈尔 161005)

[收稿日期] 2017-01-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0022-04 [中图分类号] S858.3

[摘 要] 为有效防治雏鹅大肠杆菌病, 无菌采集疑似大肠杆菌病例雏鹅的肝、脾等组织, 进行病原菌的分离培养, 经过培养特性、形态染色、生化特性以及致病性试验, 鉴定为大肠杆菌。选用 7 种临床常用抗菌药物进行药敏试验, 药敏试验结果表明, 分离菌株对庆大霉素、阿莫西林、氧氟沙星、头孢唑啉产生耐药性, 对丁安卡娜高度敏感。

[关键词] 雏鹅; 大肠杆菌; 分离鉴定; 药敏试验

Isolation, Identification and Drug Sensitivity Test of *Escherichia coli* from Gosling

HUANG Yu-xiang, ZHANG Jun, LI Hong-bin, ZOU Yue, YANG Xu-dong, WANG Zhi-qiang, LIU Li-wei

(Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China)

Abstract: In order to effectively prevent and control colibacillosis of gosling, sterile collection of gosling of suspected *E.coli* liver and spleen tissues were bacteria isolated and cultured. The strain was identified based on

作者简介: 黄宇翔, 高级兽医师, 从事畜禽传染病防治的研究。E-mail: huangyuxiang-2007@163.com

Cheng Y, Bai L, Dong L G, *et al.* Prediction and preliminary evaluation of B-cell linear epitopes in the L7/L12 protein of *Brucella suis* S2 [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2015, 10 (3): 206-210.

[15] 张双翔, 程振涛, 唐 宇, 等. 绵羊肺炎支原体热休克蛋白 Hsp70 的生物信息学分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(7): 74-80.

Zhang S X, Cheng Z T, Tang Y, *et al.* Bioinformatics analysis of Hsp70 gene of *Mycoplasma ovipneumoniae* [J]. *China Animal Husbandry Veterinary Medicine*, 2014, 41(7): 74-80.

[16] 唐 媛, 李春花, 张 瑗, 等. 蛋白质的二级结构预测研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(26): 5180-5182.

Tang Y, Li C H, Zhang Y, *et al.* Advanced studies on protein secondary structure prediction [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13 (26): 5180-5182.

[17] Saha S, Raghava G P S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 65(1): 40-48.

[18] 杨 羽, 吴清民. 羊布鲁氏菌 16M 基因组分泌蛋白的生物信息学分析[J]. *畜牧兽医学报* 2009 40(7): 1059-1062.

Yang Y, Wu Q M. Analysis of the secreted protein encoding genes in genome of *Brucella melitensis* 16M [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(7): 1059-1062.

[19] 孙 伟, 李 达, 苏 锐, 等. 绵羊 YAP1 基因全长 cDNA 克隆及生物信息学分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(8): 1725-1735.

Sun W, Li D, Su R, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of full-length cDNA sequence of YAP1 gene in sheep [J]. *China Agriculture Science*, 2013, 46(8): 1725-1735.

(编辑: 李文平)

culture characteristics dyeing and biochemical characteristics of morphology and pathogenicity test. The results showed that there was *E.coli* strain. Choose seven kinds of clinical commonly used antimicrobial susceptibility test. Drug-sensitivity tests showed that isolated strain developed resistance to gentamicin, amoxicillin, ofloxacin and cefazolin, But the isolated strain was highly sensitive to amikacin. Test results provided the basis for clinical treatment.

Key words: gosling; *E.coli*; separation and identification; drug sensitive test

鹅大肠杆菌病 (goose *E.coli* disease, GED) 是由致病性大肠杆菌所引起的局部或全身性感染的细菌性疾病, 各种年龄的鹅均可感染, 感染率达 5%~30%, 病死率在 90% 以上, 主要危害产蛋鹅群和幼龄鹅群。产蛋鹅群发病常表现为拉灰白色稀粪, 产蛋率下降; 剖检发现卵黄性腹膜炎病变; 幼鹅发病多成败血性传染, 剖检病变主要表现为心包炎、肝周炎和气囊炎等症状, 严重的引起大量死亡^[1]。近年来, 雏鹅的发病率和死亡率有上升趋势, 危害极大, 给养鹅业造成了严重的经济损失^[2]。本研究结果以期临床中鹅大肠杆菌的预防和治疗以及制备鹅大肠杆菌灭活苗提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 来源于黑龙江地区某鹅场专业户送检 30 日龄病鹅, 临床表现为关节肿胀, 跛行, 排黄白色稀粪, 零星死亡, 剖解有心包炎、肝周炎等病变的鹅肝脏、脾。

1.1.2 试剂 尿素酶、VP、MR、吡啶、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、麦康凯、伊红美蓝琼脂培养基等。生化试剂购自北京奥博星生物技术有限公司。药敏片购自杭州滨和微生物试剂有限公司。

1.1.3 试验动物 20 日龄小白鼠 10 只, 体重 18~20 g, 购自齐齐哈尔医学院; 10 日龄左右雏鹅 10 只由齐富区某养殖场提供。

1.2 方法

1.2.1 病原分离培养 取病死雏鹅的肝脏、脾脏, 接种于营养琼脂麦康凯和伊红美蓝琼脂平板上, 37℃ 培养 24 h, 观察细菌的培养特性, 并进行涂片, 革兰氏染色镜检, 观察其形态。再挑取单个典型菌接种普通肉汤 4℃ 保存。

1.2.2 分离菌株鉴定 镜检: 将无菌采取的病料直接接触片, 进行革兰氏染色, 镜检。生化试验: 糖发酵试验、尿素酶试验、VP 试验、MR 试验、吡啶试验。

1.2.3 致病性试验 小白鼠致病性试验: 取健康小白鼠 10 只, 随机分成 2 组, 每组 5 只, 试验组分别用鉴定的 24 h 试验菌株静置肉汤培养物进行腹腔注射, 0.1 mL/只 (大肠杆菌浓度为 2.5×10^9 CFU/mL), 对照组注射相同剂量的灭菌生理盐水, 接种后观察, 记录发病情况及死亡时间, 并取接种小鼠的肝脏及心血进行病原的再分离。雏鹅致病性试验: 分组和细菌准备同小白鼠, 每只雏鹅皮下接种上述细菌 0.3 mL (大肠杆菌浓度为 2.5×10^9 CFU/mL), 对照组每只接种生理盐水 0.3 mL, 观察细菌致病性方法同上。

1.2.4 药敏试验 将稀释好的菌液每个平板接种 0.1 mL, 用灭菌玻璃棒涂匀整个平板表面, 用无菌镊子取各种药敏纸片贴于平板上, 每个平板贴 3~5 张纸片, 相隔不少于 3 cm, 将上述平板置 37℃ 温箱内, 24 h 后观察结果并测量各纸片周围抑菌圈直径^[3]。

2 结果与分析

2.1 培养特性 在麦康凯琼脂培养基上均呈亮红色、光滑湿润、边缘整齐的菌落; 在普通琼脂培养基上呈灰白色、圆形、整齐、隆起、光滑湿润的菌落。

2.2 染色镜检 分离菌株革兰氏染色为阴性小杆菌, 两端钝圆, 多单个存在, 与大肠杆菌染色特性相符。

2.3 生化试验鉴定 分离菌株能发酵乳糖, 约半数细菌不分解蔗糖, 大多数菌株能发酵葡萄糖产酸产气, 发酵麦芽糖、甘露醇, 吡啶试验为阳性, VP 试验为阴性, 尿素酶阴性, MR 试验阳性, 与大肠杆菌生化特性相符 (表 1)。

表 1 分离细菌生化试验结果

Tab 1 The results of bacterial biochemical separation

试验 test	反应模式 Reaction mode	试验 test	反应模式 Reaction mode
尿素酶	-	麦芽糖	⊕
VP	-	蔗糖	-
吡啶	+	甘露醇	⊕
葡萄糖	⊕	MR	+
乳糖	⊕		

“+”表示阳性,“-”表示阴性,“⊕”表示产酸产气

"+" means positive, "-" means negative, "⊕" means acid producing gas

表 2 分离菌株药敏试验结果

Tab 2 The results of isolated strains susceptibility test

抗菌药物 Antimicrobials	抑菌圈直径/mm Bacteria ring diameter (mm)	结果判定 Result
丁安卡娜	25	高度敏感
多粘菌素	16	低度敏感
庆大霉素	3	无效
阿莫西林	0	无效
氧氟沙星	0	无效
头孢唑啉	0	无效
红霉素	0	无效

2.4 致病性试验结果

2.4.1 小鼠致病性试验 小白鼠在细菌接种后 12 h 左右开始出现不同程度的症状,表现为精神沉郁,腹围增大,48 h 内死亡 2 只,剖检死亡小白鼠发现腹腔有黄色纤维素性渗出物,心外膜出血,肝肿胀、发黑或出血。

2.4.2 雏鹅致病性试验 雏鹅接种后 12 h 全部开始发病,出现腹泻症状,肝门周围有污秽物,48 h 内全部死亡。对死亡的雏鹅立即进行剖解,发现雏鹅心包积液,腹腔有纤维素性渗出物;肝脏肿胀,有出血点及出血斑,质地变脆;心包积液,心脏表面有出血点;腺胃乳头出血;肠道充血,尤其是十二指肠更严重。从死亡小白鼠和雏鹅的肝脏和心血中,均分离到了所接种的细菌;而对照组无异常表现。

2.5 药敏试验结果 对已鉴定出的大肠杆菌进行药敏试验,结果见表 2。药敏试验结果显示,本次分离鉴定出的大肠杆菌对丁安卡娜敏感性较高,多粘菌素次之。

3 讨论与小结

细菌的培养特性、形态学特征、生化试验证明,从鹅场的病仔鹅中分离到的菌株为大肠杆菌,通过动物试验,证明该菌具有致病性。从药敏试验结果可以看出,丁安卡娜、多粘菌素对该鹅场大肠杆菌有效强的抑制作用,而该鹅场大肠杆菌对庆大霉素、阿莫西林、氧氟沙星、头孢唑啉、红霉素这些临床上常用药已经产生了耐药性,这为该病的预防和治疗提供了理论依据。大肠杆菌对抗菌素产生耐

药性是随着临床药物的广泛应用而产生的,并能通过耐药质粒的转移而使耐药菌株不断蔓延扩大,致使一些鹅场从未使用过的某些药物也失去效用^[4],因此,临床施药前必须进行药敏试验,从而提高治疗效果,降低由施用无效药物所造成的鹅业经济损失。

大肠杆菌是鹅肠道内的常在细菌,正常鹅体内的大肠杆菌是潜在的致病性大肠杆菌,在正常情况下,健康禽类具有完整的防御系统,足以抵抗大肠杆菌甚至致病性菌株的自然感染。当鹅的皮肤或黏膜的防御屏障遭到破坏时,就很容易被感染。凡能引起机体抵抗力降低的各种因素,都可以诱发大肠杆菌病。因此,大肠杆菌病应以预防为主,加强鹅场的饲养管理和饮水卫生,有发病史的鹅场,可以根据流行病学调查和药敏试验结果选用相应的疫苗^[5]及药物预防本病;正在发病的鹅场,根据药敏试验结果选用高敏药物进行治疗,基本控制病情后,改用中药方剂^[6-7]维持药效和提高鹅体抵抗力,切记不可长期使用一种药物,以防止耐药菌株的出现^[8-9]。由于大多数大肠杆菌病多继发于其他因素^[10-11],所以必须控制促发因素才能使疾病得到有效的控制。

参考文献:

- [1] 严玉霖,雷华,杨尚斌,等.鹅大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J].中国畜牧兽医,2011,38(10):160-162.

- Yan Y L, Lei H, Yang S B, *et al.* Separation, Identification and Drug Sensitive Test of *Escherichia coli* from Goose [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(10): 160-162.
- [2] 谢永平, 杨威. 雏鹅大肠杆菌病的诊治 [J]. 广西畜牧兽医, 2009, (2): 21-22.
- Xie Y P, Yang W. Diagnosis and treatment of ghetto colibacillosis [J]. Guangxi Animal Science And Veterinary Medicine, 2009, (2): 21-22.
- [3] 姚火春. 兽医微生物学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002; 33-41.
- Yao H C. Veterinary Microbiology Experimental Guidance [M]. Beijing: China agriculture press, 2002; 33-41.
- [4] 王影, 李欣南, 韩鏊竹, 等. 大肠杆菌耐药性产生与传播机制的研究现状 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, (1): 32-34.
- Wang Y, Li X N, Han X Z, *et al.* Research on the Generating and Spreading mechanism of Drug Resistance of *Escherichia coli* [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, (1): 32-34.
- [5] 马兴树. 禽大肠杆菌病疫苗研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(1): 234-244.
- Mang X S. Research Progress on Vaccines of Avian Colibacillosis [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(1): 234-244.
- [6] 毛伟斌, 刘长忠, 姜金庆, 等. 中药组方治疗大肠杆菌病 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, (9 下): 166-168.
- Mao W B, Liu C Z, Jiang J Q, *et al.* Treatment of *Escherichia coli* Disease by Traditional Chinese Medicine [J]. Heilongjiang Animal Science And Veterinary Medicine, 2016, (9 Down): 166-168.
- [7] 葛冰, 刘澜, 李复煌, 等. 复方白头翁颗粒对人工感染鸡大肠杆菌疗效试验 [J]. 中国兽医杂志, 2016; 52(7): 111-113.
- Ge B, Liu L, Li F H, *et al.* Effect of CPCG on artificial infected chicken *Escherichia coli* disease [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016; 52(7): 111-113.
- [8] 植焯萍, 贺丹, 陈孝生. 种鹅大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9): 245-248.
- Zhi C P, He D, Chen X S. Isolation, Identification and Antibiotic Resistance Analysis of *Escherichia coli* from Breeding Geese [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(9): 245-248.
- [9] 赵阳. 黑龙江省部分地区鹅大肠杆菌的分离鉴定 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- Zhao Y. Isolation and Identification of Goose *Escherichia coli* in some Areas of Heilongjiang Province [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011.
- [10] 李伟娟, 王丹, 熊向前. 朗德鹅副黏病毒及大肠杆菌病混合感染的诊治 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, (5): 84-86.
- Li W J, Wang D, Xiong X Q. Diagnosis and treatment of mixed infection of Langer's goose paramyxovirus and *Escherichia coli* [J]. Heilongjiang Animal Science And Veterinary Medicine, 2014, (5): 84-86.
- [11] 王永丰, 曾献涛, 薛春霞. 鹅大肠杆菌与曲霉菌混合感染的诊治 [J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 29(1): 206-207.
- Wang Y F, Zeng X T, Xue C X. Diagnosis and treatment of mixed infection of goose and *Aspergillus* [J]. Chinese Abstracts of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 29(1): 206-207.

(编辑: 侯向辉)