

鸡疑似克雷伯氏杆菌病的诊断与药敏试验

胡晓苗, 张丹俊*, 戴银, 赵瑞宏, 潘孝成, 周学利, 侯宏艳, 沈学怀, 朱传明

(安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 安徽合肥 230031)

摘要 [目的] 诊断疑似患有克雷伯氏杆菌病的发病鸡群。[方法] 通过采取病鸡肝脏和脑组织, 接种于胰蛋白胍琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基、SS 琼脂培养基、兔血琼脂培养基, 培养出疑似克雷伯氏杆菌菌落, 革兰氏染色发现该菌属于革兰氏阴性菌, 将菌落进行溶血试验和生化试验。[结果] 初步判断该菌为克雷伯氏杆菌。药敏试验中发现该菌对庆大霉素、妥布霉素、恩诺沙星、阿米卡星表现较敏感; 对阿莫西林、卡那霉素、氯苄西林、头孢噻肟、头孢曲松、多黏菌素、四环素有极强的耐药性; 对于红霉素、新霉素的敏感性介于两者之间。[结论] 药敏试验为治疗该菌提供了大致方向, 同时提醒抗生素类药物切不可滥用, 以免产生耐药性。

关键词 克雷伯氏杆菌; 生化试验; 药敏

中图分类号 S855 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)34-0092-03

Diagnosis and Drug Sensitivity Test of Suspected Avian *Klebsiella brucellosis*

HU Xiao-miao, ZHANG Dan-jun*, DAI Yin et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] To diagnose the chickens suspected of having *Klebsiella brucellosis*. [Method] By using the liver and brain tissue of the diseased chicken, we inoculated in tryptone agar medium, MacConkey agar medium, SS agar medium and rabbit blood agar medium to culture the suspected *Klebsiella brucellosis* colony. Gram stain found that the strain belonged to Gram-negative bacteria, the colony was subjected to hemolysis and biochemical tests. [Result] The results preliminarily reflected the suspected bacteria was *Klebsiella brucellosis*. The drug sensitivity test showed that the bacteria had strong drug resistance to amoxicillin, kanamycin, ampicillin, cefotaxime, ceftriaxone, polymyxin and tetracycline, more sensitivity to gentamicin, tobramycin, enrofloxacin, amikacin, and erythromycin, neomycin between them. [Conclusion] Drug sensitive test provides direction for treatment of the bacteria, but also reminds drugs must not be abused in order to avoid drug resistance.

Key words *Klebsiella brucellosis*; Biochemical tests; Drug sensitivity

鸡克雷伯氏杆菌病是由克雷伯氏杆菌引起的一类以消化道或呼吸道疾病为主的传染性疾病。该病可通过消化道感染家禽使其发病, 导致畜禽发生化脓性炎症, 更甚者暴发败血症, 引起小鸡一侧性或两侧性眼睑肿胀与视力障碍, 发病率为 38%~46%, 死亡率达 32%。该病的发生和鸡舍卫生环境不良有很大关系。该研究病鸡临床表现主要为腿关节肿胀, 通过对该鸡的病样进行细菌分离与鉴定, 结果初步判断该病鸡为克雷伯氏杆菌感染。

1 材料与方

1.1 材料 组织病样为病鸡气囊、肝脏和支气管堵塞物等。培养基: 胰蛋白胍琼脂培养基; SS 琼脂培养基; 麦康凯琼脂培养基; 兔血琼脂培养基; 三糖铁琼脂斜面培养基。主要试剂: 革兰氏染色试剂; 药敏纸片为庆大霉素等 13 种兽医常用抗生素 (购自杭州微生物试剂有限公司); 细菌微量生化反应管 (购自杭州滨和生物科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 临床症状。 病鸡呆立, 羽毛疏松零乱且毫无光泽感, 排稀粪。眼睛流泪, 低头缩颈。眼部有黏液脓性分泌物流出, 一侧眼睑肿胀, 甚至完全闭眼。一侧腿关节肿胀, 瘫痪向一侧。

1.2.2 病理剖解。 对病禽进行剖解, 可观察到关节局部肿胀, 剪开有可见关节化脓; 气囊炎浑浊; 肠道出血, 有脓性炎

症分泌物; 肝脏有小白点样物质; 支气管有干酪样堵塞物 (图 1~3)。



图 1 支气管堵塞

Fig.1 Bronchus occlusion



图 2 关节肿胀

Fig.2 Joint swelling

基金项目 安徽省农业科学院学科建设项目(16A0411); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-40)。

作者简介 胡晓苗(1971—), 男, 安徽望江人, 助理研究员, 博士, 从事兽医微生物与免疫学研究。* 通讯作者, 研究员, 从事畜禽传染病研究。

收稿日期 2017-10-24

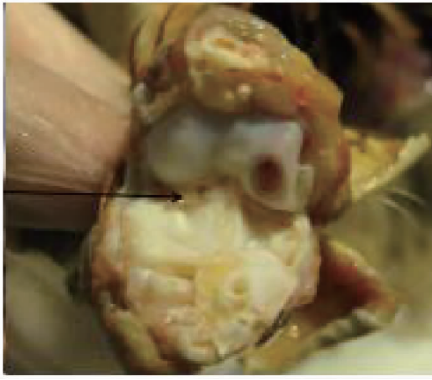


图3 关节腔内浓汁

Fig. 3 Joint cavity hydrocele

1.2.3 细菌的分离。无菌取自然病死的鸡支气管堵塞物接种于胰蛋白胨琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基、SS 琼脂培养基、兔血琼脂培养基上,37 °C 培养 24 h 后,察看细菌生长情况,再挑取单个有特征性的菌落接种于胰蛋白大豆肉汤液体培养基上进行纯培养,然后进行涂片镜检和生化鉴定^[1-2]。

1.2.4 溶血试验。用接种环挑取一环菌液在血平板上四区划线后,放入恒温箱 37 °C 培养 24 h 后,察看其溶血现象。

1.2.5 生化试验。在超净台上接种细菌微量生化反应管(乳糖、棉籽糖、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、阿拉伯糖、木糖、硫化氢、甘露醇、尿素、山梨醇、七叶苷、精氨酸双水解酶、西蒙氏枸橼酸盐、氨基酸对照管),放进恒温箱中 37 °C 培养 6 ~ 48 h,观察结果。

三糖铁琼脂试验:用接种针挑取可疑菌落穿刺接种于该培养基底部,但不要刺穿并在斜面表面画 S 形曲线涂布整个斜面,将该培养基放入恒温箱中 37 °C 培养 18 ~ 24 h 后,取出观察结果。

1.2.5 药敏试验。按常规圆纸片扩散法进行药敏试验。取经过验证的克雷伯氏杆菌菌落,均匀涂布于该培养基上。用无菌镊子将临床上常用的 13 种药敏纸片均匀贴于琼脂表面并轻压,使药敏纸片能够与琼脂表面完全接触,接触后不要移动,放入恒温箱 37 °C 培养 16 ~ 18 h 后察看结果,并量出抑菌圈直径,做好记录^[3-4]。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离结果 该菌在胰蛋白大豆肉汤琼脂培养基、兔血琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基以及 SS 琼脂培养基上都可以生长。胰蛋白胨液体培养基中可见白色黏稠状沉淀,摇晃后呈均匀浑浊。在胰蛋白胨琼脂培养基上,菌落呈灰白色圆粒状凸起,边缘光滑整齐、闪亮、浓厚、湿润、黏稠,用接种环挑起易拉丝。在麦康凯琼脂培养基上形成粉红色黏稠菌落,有扩散性,表面湿润;在 SS 琼脂培养基上,37 °C 培养 24 h 后培养基变成粉红色,形成粉红色黏稠菌落。该菌经过革兰氏染色在显微镜下表现为红色杆状菌,属于革兰氏阴性菌。

2.2 溶血试验结果 该菌株在兔血琼脂培养基中培养后观察,菌落周围可见完全通透的溶血环,为 β 溶血^[5]。说明该菌有极强的致病性。

2.3 细菌生化试验结果 观察细菌微量生化反应管,可见反应管颜色基本都发生变化(表 1)。观察培养后的三糖铁琼脂斜面培养基,可见其底部产生气体,培养基的颜色由粉红色变成黄色,没有产生黑色物质。说明该菌能分解乳糖类产酸,分解葡萄糖产酸产气,不产生 H₂S^[6]。综合上述各项结果初步判断其为克雷伯氏杆菌。

表 1 细菌微量生化反应管结果

Table 1 Test results of bacteria microscale biochemistry reactor

序号 No.	生化反应管或培养基 Biochemistry reactor or culture medium	颜色变化 Color change	符号 Code
1	三糖铁培养基	黄色,底部产气,不变黑色	A
2	枸橼酸盐	兰绿色	V
3	葡萄糖	黄色	V
4	乳糖	黄色	V
5	麦芽糖	黄色	+
6	甘露糖	黄色	+
7	硫化氢	不变黑色	-
8	尿素	变黄	V
9	阿拉伯糖	变黄	+
10	山梨醇	变黄	V
11	棉籽糖	变黄	+
12	木糖	变黄	+
13	七叶苷	变棕	+
14	精氨酸双水解酶	变黄	-

注: + 为阳性, - 为阴性; V, 种间有不同反应; A 为产酸。

Note: + : positive, - : negative, V: different reaction among species, A: producing acid

2.4 药敏试验结果 根据药物纸片周围的抑菌圈直径大小,判断该菌对 13 种抗生素药片的敏感程度,可分为敏感、中介和耐药^[7-8],结果见表 2。

表 2 药敏试验结果

Table 2 Test results of drug sensitivity

序号 No.	抗生素类别 Antibiotic type	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter // cm	敏感性 Sensitivity
1	庆大霉素	1.8	敏感
2	妥布霉素	1.9	敏感
3	恩诺沙星	1.9	敏感
4	阿莫西林	0	耐药
5	卡那霉素	0	耐药
6	阿米卡星	1.8	敏感
7	氨苄西林	0	耐药
8	头孢噻肟	1	耐药
9	头孢曲松	1	耐药
10	多黏霉素	1	耐药
11	四环素	0	耐药
12	红霉素	1.3	中介
13	新霉素	1.2	中介

3 结论与讨论

克雷伯氏菌属的细菌多感染免疫力较为低下的家禽,安徽省在我国中部,夏季高温多雨,冬季天气寒冷,季节交替时温度变化快,这种季节变化使家禽应激反应剧烈,从而导致家禽免疫力下降,为各种动物源性微生物的生长提供了有利的条件,导致该病发生较为普遍^[9]。

该次药敏试验结果表明,克雷伯氏杆菌对阿莫西林、卡那霉素、氨苄西林、四环素已产生高度耐药性,这种现象的出现很有可能是因为养殖户在饲养过程中滥用兽药导致,故这

类药物已经不适合临床上用于克雷伯氏杆菌感染的经验性治疗。克雷伯氏杆菌对庆大霉素、妥布霉素、恩诺沙星、阿米卡星比较敏感,临床上可选用这类药治疗因克雷伯氏杆菌感染的疾病。另外,该菌对头孢噻肟、头孢曲松、多黏霉素、红霉素、新霉素的敏感性一般,可选择性适量用药,以避免日后该菌对这类药物也产生耐药性。药敏试验结果提醒畜主对药物切不可滥用,以免产生耐药性,最好通过药敏试验来筛选最敏感药物进行治疗。

参考文献

- [1] 黄新新,陆承平. 迟缓爱德华菌的外膜蛋白图谱及耐药性分析[J]. 微生物学报,2001,41(5):630-631.

- [2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 5版. 北京:中国农业出版社,2012:11.
 [3] 崔治中. 鸡病[M]. 北京:中国农业出版社,2009:68-69.
 [4] 李云章. 兽医专业毕业实习指导[M]. 北京:中国农业出版社,2013:73-74.
 [5] 翟小敏. A+OSA 污泥减量工艺微生物特性研究[D]. 重庆:重庆大学,2012.
 [6] 刘杰,赵满仓. 革兰染色的实验室质量管理及进展[J]. 解放军医药杂志,2013,25(5):83-86.
 [7] 周志坤. 沙门氏菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 现代农业,2015(9):94-95.
 [8] 毕水莲. 奇异变形杆菌可移动耐药基因岛研究[D]. 广州:华南理工大学,2011.
 [9] 龙海波. 小麦禾谷孢囊线虫 β -1,4-内切葡聚糖酶和细胞壁扩展蛋白基因的克隆及功能分析[D]. 北京:中国农业科学院,2012.

(上接第60页)

参考文献

- [1] 熊昌龙. 人工湿地填料基质对污水厂尾水深度处理研究:以锦江芦溪河人工湿地试验基质为例[D]. 成都:成都理工大学,2014.
 [2] 汤显强,黄少樑. 人工湿地去污机理及其国内外应用现状[J]. 水处理技术,2007,33(2):9-13.
 [3] 张依然,王仁卿,张建,等. 大型人工湿地生态可持续性评价[J]. 生态学报,2012,32(15):4803-4810.
 [4] TEE H C, LIM P E, SENG C E, et al. Newly developed baffled subsurface-flow constructed wetland for the enhancement of nitrogen removal [J]. Bioresource Technol, 2012, 104:235-242.
 [5] MATAMOROS V, SALVADÓ V. Evaluation of the seasonal performance of a water reclamation pond-constructed wetland system for removing emerging contaminants[J]. Chemosphere, 2012, 86(2):111-117.
 [6] 徐德福,李映雪,郑建伟,等. 不同基质对黄菖蒲光合特性及净化能力的影响[J]. 环境科学,2011,32(9):2576-2581.
 [7] 崔理华,游艳萍,张新明,等. 人工湿地磷吸附饱和和基质的化学再生研究[J]. 生态环境学报,2010,19(5):1221-1225.
 [8] GONG G Z, YE S F, TIAN Y J, et al. Preparation of a new sorbent with hydrated lime and blast furnace slag for phosphorus removal from aqueous solution[J]. Journal of hazardous materials, 2009, 166(2/3):714-719.
 [9] DEMIRAL H, GÜNÜZÜOĞLU G. Removal of nitrate from aqueous solutions by activated carbon prepared from sugar beet bagasse [J]. Bioresource technology, 2010, 101(6):1675-1680.
 [10] 陈威,胡学玉,张阳阳,等. 水稻秸秆热解生物炭固碳潜力估算[J]. 环境科学与技术,2015,38(11):265-270.
 [11] 马锋锋,赵保卫,刁静茹,等. 牛粪生物炭对水中氨氮的吸附特性[J]. 环境科学,2015,36(5):1678-1685.
 [12] 王旭峰,郑立安,刘毛,等. 改性玉米芯生物炭对废水中铜和氨氮的吸附[J]. 工业水处理,2017,37(1):37-41.
 [13] STEFANAKIS A I, AKRATOS C S, GIKAS G D, et al. Effluent quality improvement of two pilot-scale, horizontal subsurface flow constructed wetlands using natural zeolite (clinoptilolite) [J]. Micropor Mesopor Mat, 2009, 124(1/2/3):131-143.
 [14] YALCUK A, UGURLU A. Comparison of horizontal and vertical constructed wetland systems for landfill leachate treatment[J]. Bioresource Technol, 2009, 100(9):2521-2526.
 [15] 唐登勇,郑正,郭照冰,等. 改性沸石吸附低浓度氨氮废水及其脱附的研究[J]. 环境工程学报,2011,5(2):293-296.
 [16] 赵发敏,海热提,韩晓丽. 人工湿地填料去除氨氮优化配比及影响因素研究[J]. 环境科学与技术,2011,34(9):26-30.
 [17] 李琼辉,于伟鹏,李小荣,等. 6种人工湿地填料对氮·磷的吸附效果研究[J]. 安徽农业科学,2016,44(4):83-86.

- [18] 卢少勇,桂萌,余刚,等. 人工湿地中沸石和土壤的氮吸附与再生试验研究[J]. 农业工程学报,2006,22(11):64-68.
 [19] 黄忠良,胡曰利,吴晓芙,等. 人工湿地污水处理系统的蛭石缓冲单元及缓冲能力生物再生研究[J]. 环境科学学报,2007,27(12):2006-2013.
 [20] VYMAZAL J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands[J]. Science of the total environment, 2007, 380(1/2/3):48-65.
 [21] 刘静,彭剑峰,宋永会,等. 铵饱和和天然钙型沸石的化学再生效果[J]. 环境科学研究, 2009, 22(11):1341-1345.
 [22] 高红杰,彭剑峰,宋永会,等. 铵饱和和天然钙型沸石基质人工湿地对模拟养猪废水的处理效能[J]. 环境保护科学,2010,36(6):14-16.
 [23] SEMMENS M J, GOODRICH R R. Biological regeneration of ammonium-saturated clinoptilolite. I. Initial observations [J]. Environ Sci Technol, 1977, 11(3):255-259.
 [24] SEMMENS M J, WANG J T, BOOTH A C. Biological regeneration of ammonium-saturated clinoptilolite. II. Mechanism of regeneration and influence of salt concentration [J]. Environ Sci Technol, 1977, 11(3):260-265.
 [25] GREEN M, MELS A, LAHAV O. Biological-ion exchange process for ammonium removal from secondary effluent [J]. Water science and technology, 1996, 34(1/2):449-458.
 [26] LAHAV O, GREEN M. Ammonium removal using ion exchange and biological regeneration [J]. Water Res, 1998, 32(7):2019-2028.
 [27] 童君,张新颖,吴志超,等. 沸石生物联合吸附再生工艺中溶解性有机物的特性变化[J]. 环境工程学报,2011,5(6):1283-1288.
 [28] JUNG J Y, CHUNG Y C, SHIN H S, et al. Enhanced ammonia nitrogen removal using consistent biological regeneration and ammonium exchange of zeolite in modified SBR process [J]. Water Res, 2004, 38(2):347-354.
 [29] 温东辉,张曦,吴为中,等. 天然沸石对铵吸附能力的生物再生试验研究[J]. 北京大学学报(自然科学版),2003,39(4):494-500.
 [30] 张曦,吴为中,温东辉,等. 生物沸石床污水脱氮效果及机理[J]. 环境科学,2003,24(5):75-80.
 [31] 黄友谊,吴志超,陈和谦,等. 沸石生物联合吸附再生工艺及铵沸石再生[J]. 环境化学,2006,25(5):615-618.
 [32] WU Z C, AN Y, WANG Z W, et al. Study on zeolite enhanced contact-adsorption regeneration-stabilization process for nitrogen removal [J]. J Hazard Mater, 2008, 156(1/2/3):317-326.
 [33] 付融冰,杨海真,顾国维,等. 潜流水平沸石湿地系统的脱氮调节再生功能[J]. 同济大学学报(自然科学版),2006,34(4):523-527.
 [34] 付融冰,杨海真,顾国维. 人工湿地中沸石对铵吸附能力的生物再生研究[J]. 生态环境,2006,15(1):6-10.
 [35] WEN Y, XU C, LIU G, et al. Enhanced nitrogen removal reliability and efficiency in integrated constructed wetland microcosms using zeolite [J]. Front Environ Sci Engin China, 2011, 6(1):140-147.

本刊提示 文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年—),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。