

1 例种鹅大肠杆菌病病原的分离与鉴定

刘明生, 甘辉群, 袁橙, 郝福星, 康金龙, 周国栋 (江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要 从江苏兴化市某种鹅场有疑似大肠杆菌病的病死鹅中, 通过细菌分离培养、形态学观察、生化试验、血清型鉴定, 分离鉴定出鹅大肠杆菌, 其血清型为 O11; 通过动物致病性试验, 该菌株致病性中等毒力; 药敏试验结果表明, 所分离的大肠杆菌对氟甲喹、硫酸粘菌素、庆大霉素、阿米卡星高度敏感, 这为临床防治鹅大肠杆菌病提供实验依据, 并为制备鹅大肠杆菌自家苗奠定基础。

关键词 种鹅; 大肠杆菌; 分离鉴定; 血清型; 药敏试验

中图分类号 S858.33 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)31-0069-02

Separation and Identification of a Case of *Escherichia coli* Disease in Breeding Geese

LIU Ming-sheng, GAN Hui-qun, YUAN Cheng et al (Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou, Jiangsu 225300)

Abstract The *Escherichia coli* was isolated and identified from a goose farm in Xinghua City, Jiangsu Province, by bacteria isolation and culture, morphological observation, biochemical test, serotype identification, and the serotype of *E. coli* was O11. The pathogenicity of the strain was moderately virulent by animal pathogenicity test. The results of drug sensitivity test showed that the isolated *E. coli* was highly sensitive to flumequine, colistin sulphate, gentamicin and amikacin, which provided the experimental basis for clinical prevention and treatment of goose *E. coli* and laid a foundation for the preparation of goose *E. coli* vaccine.

Key words Breeding geese; *Escherichia coli*; Separation and identification; Serotype; Drug sensitive test

鹅大肠杆菌病为危害养鹅业的主要传染病之一, 是由致病性埃希大肠杆菌所引起的, 临床表现为心包炎、肝周炎、气囊炎、关节炎以及脑炎等, 成年种鹅感染本病, 可引起输卵管炎、卵黄性腹膜炎, 俗称“蛋子瘟”, 导致种鹅繁殖机能降低, 甚至引发死亡, 给种鹅养殖户带来较大的经济损失。笔者在社会服务过程中, 多次遇到本病, 现介绍一例种鹅大肠杆菌病病原的分离与鉴定过程, 为鹅大肠杆菌病防治提供参考。

1 材料

1.1 病例介绍 2018年3月, 位于江苏省兴化市的某一种鹅养殖场饲养的约2000只种鹅反复发病。据主诉, 种鹅2~3岁, 排稀软的水样粪便, 逐渐消瘦, 最后死亡; 产蛋率下降, 蛋的质量也下降, 蛋壳粗糙, 产软壳蛋, 受精蛋率降低, 出雏率降低; 发病期间先后投喂过氟苯尼考、恩诺沙星、多西环素等抗菌药物, 投药期间症状有所改善, 但不能完全控制, 仍有零星发病和死亡, 造成很大的经济损失。

临床检查, 发病母鹅表现精神差, 羽毛乱, 缩头闭眼, 产蛋下降, 产薄壳蛋、软壳蛋; 食欲不振或者废绝, 腹部膨大, 且明显下垂甚至着地, 运动缓慢, 严重时如同企鹅姿势。多数病鹅排白色或黄白色稀便, 肛门周围有粪便污染, 脱水明显。发病公鹅症状主要表现在外生殖器上, 如阴茎潮红、肿胀, 严重者有坏死、溃疡和结节, 影响交配。

病理变化, 先后挑取病死鹅4只进行解剖, 见病鹅消瘦, 腹部膨大; 切开腹部, 可见腹腔内积聚大量淡黄色、浑浊的体液, 混有破碎的卵黄。肝脏肿大, 表面有淡黄色凝固的纤维素性渗出物覆盖, 掀去覆盖物, 见肝表面有针尖大出血点及灰黄色坏死点。肠系膜充血、出血, 有的发生粘连。卵巢变

形萎缩, 呈灰色、褐色等。输卵管内见淡黄色或黄白色的纤维素性分泌物。

1.2 主要试剂 培养基: 葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、硫化氢、柠檬酸盐、尿素、靛基质、M.R、V-P等生化发酵培养基, 以及麦康凯培养基粉、普通营养肉汤培养基粉、营养琼脂培养基粉, 均购自青岛日水生物技术有限公司。

大肠杆菌标准抗O血清及阴性血清: 购自天津生物芯片技术有限责任公司。

药敏纸片: 氟甲喹、庆大霉素、阿米卡星、多西环素、阿莫西林、新霉素、大观霉素、恩诺沙星、硫酸粘菌素、头孢噻唑、磺胺氯噻唑、氟苯尼考等药敏纸片, 根据参考文献^[1], 按要求自己制备。

1.3 试验动物 由兴化市宇鹏鹅业养殖有限公司提供10日龄健康雏鹅20只, 按正常免疫程序免疫, 即雏鹅1日龄、7日龄分别皮下注射小鹅瘟抗血清0.5 mL, 不使用任何抗菌药物。

2 方法

2.1 细菌分离培养 无菌取病死鹅的肝、脾、卵黄、输卵管分泌物等, 分别划线接种于普通营养琼脂及麦康凯琼脂平板培养基上, 置37℃培养箱, 培养18~24 h, 观察菌落特征。然后, 选取在麦康凯琼脂平板上生长良好的粉红色或红色菌落, 继续接种于营养琼脂斜面上, 置37℃培养箱, 培养18~24 h, 进行纯培养, 备用。

2.2 形态学观察 对分离的菌株进行革兰氏染色, 镜检, 观察细菌形态特征。

2.3 生化鉴定 按文献^[2]介绍方法, 取纯培养后的细菌进行常规生化试验。

2.4 血清型鉴定 参考文献^[3], 制备大肠杆菌O抗原, 并对分离菌株进行血清型鉴定。

2.4.1 菌株O抗原的制备: 用0.5%石炭酸生理盐水适量, 将上述营养琼脂斜面上的纯培养物洗下, 制成浓稠菌悬液, 细菌浓度约 1×10^{10} 个/mL, 集于小瓶中, 于高压灭菌器中作用2 h, 以破坏其K、H抗原, 制成O抗原, 保存于4℃冰箱。

基金项目 江苏农牧科技职业学院自然科学基金项目(NSFPT201705; NSF201605)

作者简介 刘明生(1976—), 男, 副教授, 博士, 主要从事畜禽疫病防控技术研究。

收稿日期 2018-06-26

2.4.2 菌株 O 抗原的鉴定:先用玻板凝集试验,初步筛选可能的 O 血清型,然后通过试管凝集反应对 O 血清型进行鉴定,定型标准为血清试管凝集价不低于 1:640。

2.5 致病性试验 另用生理盐水将营养琼脂斜面上菌苔洗下,以平板计数法计算活菌数,再用生理盐水调整细菌数,使浓度约为 1×10^9 个/mL。将 20 只 10 日龄雏鹅随机分成 2 组,每组 10 只,第 1 组为试验组,每只皮下注射菌悬液 0.5 mL,第 2 组为对照组,每只皮下注射生理盐水 0.5 mL。注射后继续饲养,48 h 内观察临床症状,并记录死亡数。之后,无菌操作取病死鹅的心血、肝划线接种于麦康凯琼脂平板上,并对分离出的菌株进行进一步鉴定。

2.6 药敏试验 选取 12 种药敏纸片,氟甲喹、硫酸粘菌素、庆大霉素、阿米卡星、氟苯尼考、磺胺氯哒嗪、多西环素、阿莫西林、新霉素、大观霉素、头孢噻吩、恩诺沙星,按 K-B 纸片扩散法^[1]进行药敏试验。判定标准:抑菌圈直径大于 15.1 mm 为高度敏感,直径在 10.1~15 mm 为中度敏感,小于 10 mm 为低度敏感或耐药。

3 试验结果

3.1 细菌分离 病料在普通琼脂培养基上长出圆形、灰白色、光滑、湿润、边缘整齐的直径 1~2 mm 的不透明菌落;在麦康凯琼脂培养基上长出中等大小圆形、粉红色、表面光滑,湿润的菌落。

形态学观察,所分离的细菌为单个或成丛的革兰氏阴性短小杆菌,菌体两端钝圆,与大肠杆菌的形态特征相符。

3.2 生化鉴定 所分离的菌株可发酵麦芽糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇,均可产酸产气,大多数菌株不利于蔗糖,少数菌株缓慢发酵。枸橼酸盐试验和 V-P 试验结果均为阴性, M. R. 试验和吡啶试验均为阳性。

3.3 血清型鉴定结果 经过多因子和单因子鉴定,本次从该鹅场分离的菌株经血清型鉴定为 O11。

3.4 致病性试验结果 试验组于 48h 内出现排稀粪症状,精神稍差,采食减少,48 h 仅死亡 2 只,死亡鹅剖检具有典型的鹅大肠杆菌病变特征,其余鹅只剖检见气囊浑浊或无病变;而对照组无临床症状,全部存活。将试验组 2 只病死鹅解剖,无菌采集心脏或肝脏,划线接种于麦康凯琼脂平板,37 °C 培养箱培养 24 h,结果在麦康凯琼脂平板上生长为粉红色圆形菌落。

3.5 药敏试验结果 对该养殖场分离鉴定的大肠杆菌进行药敏试验,结果见表 1 所示。从表 1 可以看出,从该养殖场分离鉴定的大肠杆菌对氟甲喹、硫酸粘菌素、庆大霉素、阿米卡星高度敏感,抑菌圈直径 >15 mm;对氟苯尼考、磺胺氯哒嗪、多西环素中度敏感,抑菌圈直径为 12~13 mm;对阿莫西林、新霉素、大观霉素、头孢噻吩、恩诺沙星低度敏感或耐药,抑菌圈直径 <10 mm。

表 1 分离菌株药敏试验结果

Table 1 Results of drug sensitivity test of isolated strains

抗菌药物 Antibacterial drugs	抑菌圈直径 Bacteriostasis diameter/mm	结果判定 Result judgment	抗菌药物 Antibacterial drugs	抑菌圈直径 Bacteriostasis diameter/mm	结果判定 Result judgment
氟甲喹 Flumequine	23	高度敏感	多西环素	12	中度敏感
硫酸粘菌素 Colistin sulphate	19	高度敏感	阿莫西林	9	低度敏感
庆大霉素 Gentamicin	17	高度敏感	新霉素	8	低度敏感
阿米卡星 Amikacin	16	高度敏感	大观霉素	8	低度敏感
氟苯尼考 Florfenicol	13	中度敏感	头孢噻吩	5	低度敏感
磺胺氯哒嗪 Sulfachlorpyridazine	12	中度敏感	恩诺沙星	4	低度敏感

4 小结与讨论

4.1 大肠杆菌鉴定 对该种鹅场的发病,通过病史调查、临床症状、病理变化,初步诊断为大肠杆菌病;细菌培养特征、形态特征、生化特性及血清学结果表明,所分离的菌株为大肠杆菌,其血清型为 O11;小鹅的致病性试验结果表明,已鉴定的大肠杆菌血清型 O11,其致病力中等,但对种鹅却引起了排稀粪,产蛋下降,种蛋孵化率低下等症,造成养殖户重大经济损失。本实验血清型的鉴定,也为下一步制备大肠杆菌自家苗防治本病奠定了基础。

4.2 药物敏感试验 我们对该养殖场分离的菌株用临床常用的 12 种抗菌药物进行药敏试验,结果表明,本次分离菌株对氟甲喹、硫酸粘菌素、庆大霉素、阿米卡星高度敏感,而对氟苯尼考、多西环素、阿莫西林、头孢噻吩等抗菌药物的敏感性降低,这可能跟该养殖场的用药习惯有关。据了解,该养殖场未曾使用过氟甲喹、硫酸粘菌素、庆大霉素、阿米卡星,而氟苯尼考、阿莫西林、头孢噻吩等却频繁使用,这与宦海

霞^[4]、植婵萍^[5]等报道的基本一致。

4.3 鹅大肠杆菌病防治 第一,要加强生物安全管理,对鹅舍和场地进行定期喷洒消毒,种蛋进行浸泡或熏蒸消毒;必须严格控制进出饲养场的人员、车辆、设备、用具等流动,定期灭蚊,灭蝇,灭鼠;要减少配种传播,公鹅在配种前应逐只检查,凡外生殖器有潮红、肿胀、坏死、溃疡等病变的一律淘汰,不能留着种用^[6-7]。

第二,对本病的治疗,选用高敏药物治疗,如 10% 氟甲喹可溶性粉 500 g,对水 2 000 kg,全天集中 1 次饮服,连用 4 d。随后可改用中草药制剂,如黄芩解毒散 300 g,拌料 1 000 kg,再连用 4 d,取得了很好的治疗效果。

第三,对本病的预防,除了加强饲养管理外,有条件的最好做自家灭活苗,对鹅群进行免疫接种,能有效保护鹅群健康,降低致病性大肠杆菌的传播。之后定期用微生态制剂或黄芩解毒散等中草药添加剂拌料,调节肠道菌群平衡,维护

1.7 育肥期管理 养成期结束后,及时分池,采用一分二,放养密度为 500 尾/ m^2 。该阶段为 28~42 d,根据水质变化规律,以 14 d 为一个管理周期。水质管理、投喂和保健管理同上,重点做好预防藻类大量死亡、保持水质良好、预防空肠空胃、甲壳溃疡、黑鳃。12 周龄,体长 8 cm,体重 7 g,规格 120 尾/kg,根据市场情况可以上市。15 周龄,无论规格大小,清池上市。

2 结果与分析

2.1 养殖效果 各期结束后,采样并计算成活率,淡化标粗期、养成期和育肥期南美白对虾的成活率分别为 85.6%、80.3%、75.7%。该研究中南美白对虾的淡化存活率比李艳和等^[4]在安徽进行的试验结果要高,可能与后者是从盐度 15‰ 开始淡化有关。

从 90 d 开始卖虾,105 d(15 周)结束。12 月下旬至 1 月上旬收虾。总计销售对虾 5 749 kg,其中规格 40、60、80、100 尾/kg 的收获量分别为 1 061、2 685、1 241、762 kg,单价分别为 84、78、72、64 元/kg。平均产量 5.8 kg/ m^2 。该研究中南美白对虾的单产比曲卫光^[5]报道的 10 kg/ m^2 低,但比蒲利云等^[3]报道的 3.21 kg/ m^2 高。很多养殖户盲目追求单产,反而后期养殖水环境压力大,因此需要及时捕大留小,降低密度和水体压力。

2.2 效益分析 该试验总投入成本 193 900 元,虾苗成本 17 500 元、饲料成本 93 828 元、保健品成本 18 667 元、电费 15 120 元、固定投入折算 6 667 元、工资 32 000 元、其他费用 10 118 元;成虾销售额共计 436 661 元,总利润 242 761 元。

一栋 1 000 m^3 的大棚,20 个 50 m^2 的水泥池,在 120 d(其中 15 d 准备期,105 d 养殖期)的生产周期中,净利润 24.28 万元。平均利润 243 元/ m^2 ,与赵丽瑾等^[6]的报道结果相一致。由于南美白对虾的季节性价格波动很大,因此反季节养殖应算好投苗时间,才能在价格最高的春节前后上市^[5,7]。

2.3 风险分析 南美白对虾养殖最近几年属于水产养殖中风险最大的产业,其首要原因是苗种质量问题,突出表现为淡化期和养殖前期的偷死。其次是水源问题。淡化过程中钙、镁、钠、钾的比例很重要^[8-9];最后在养殖的中后期,主要是水体中亚硝酸氮和氨氮超标后,对于空肠空胃、白便、细菌性黑鳃、甲壳溃疡等继发性疾病,务必定期采用中草药和有益微生物预防^[10]。

3 结语

养殖期 105 d,分 3 阶段养殖,平均产量 5.8 kg/ hm^2 ,平均利润 243 元/ m^2 。该试验是在总结前期多次失败经验的基础上开展的。关键问题包括 3 个方面:虾苗质量、水质管理和虾的保健。目前,工厂化养殖南美白对虾的技术仍处于探索阶段,特别是淡水工厂化养殖中还有不少问题尚未解决。特别是苗种健康问题形势严峻,建议不要盲目开展南美白对虾的工厂化淡水养殖。

参考文献

- [1] 刘瑞玉. 关于对虾类(属)学名的改变和统一问题[C]//中国甲壳动物学会甲壳动物学论文集. 青岛:中国科学院海洋研究所, 2002:106-124.
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2017:22-24.
- [3] 蒲利云,杨明秋,何玉贵,等. 南美白对虾工厂化循环水养殖技术[J]. 水产科技情报, 2016, 43(2): 75-78.
- [4] 李艳和,汪留全,胡长胜,等. 南美白对虾淡化培育研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(8): 1601-1602.
- [5] 曲卫光. 反季节工厂化南美白对虾高效养殖试验[J]. 科学养鱼, 2014(6): 31-32.
- [6] 赵丽瑾,尹向辉. 南美白对虾室内工厂化多茬生态养殖模式初探[J]. 科学养鱼, 2016(9): 30-31.
- [7] 宋学章,李春岭,王振怀,等. 南美白对虾育苗室反季高效可控工厂化养殖技术[J]. 河北渔业, 2014(11): 43-45, 74.
- [8] 朱春华,徐志标. 淡化养殖水体中 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 含量对南美白对虾生长的影响[J]. 淡水渔业, 2002, 32(6): 46-48.
- [9] 陈昌生,纪德华,王兴标,等. Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对凡纳滨对虾存活及生长的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(4): 413-418.
- [10] 黄永春,陈辉辉,涂晨凌,等. 5 种中草药对凡纳滨对虾生长和抗病力的影响[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(1): 86-90.

(上接第 70 页)

肠道健康。

参考文献

- [1] 马兴树. 禽传染病实验室诊断技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2006.
- [2] 白文彬,于康震. 动物传染病诊断学[M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
- [3] 刘明生,甘辉群,陆桂平,等. 海安县鸡大肠杆菌病病原的分离鉴定及多价灭活苗的研制[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(21): 98-100.

- [4] 宦海霞,苗晓青,周琼,等. 江苏省部分地区鹅源致病性大肠杆菌的分离、鉴定和耐药性分析[J]. 饲料工业, 2007, 28(15): 62-64.
- [5] 植婵萍,贺丹丹,陈孝杰,等. 种鹅大肠杆菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9): 245-249.
- [6] 张其升. 鹅大肠杆菌病的危害及防控[J]. 中国畜禽种业, 2016, 12(8): 151-152.
- [7] 许国平,顾旭萍. 鹅大肠杆菌病综合防治之我见[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2017, 33(12): 162, 227.

科技论文写作规范——结果

利用图、表及文字进行合乎逻辑的分析。务求精练通顺。不需在文字上重复图或表中所具有的数据,只需强调或阐述其重要发现及趋势。