

# 一株肉种鸡大肠杆菌的分离与鉴定

隋慧 (辽宁医学院畜牧兽医学院 121001) 赵建国 (华南热带农业大学农学院 835200)

杨金声 (吉林省兽医研究所 130062) 葛俊红 (天津市津南区兽医站 300300)

**摘要:** 大连市某肉种鸡场产蛋鸡在 30 周龄产蛋高峰期, 个别鸡只出现异常, 疑似大肠杆菌病例。经过病原菌的分离、鉴定、生化试验、致病性的检测和药敏实验检测, 符合大肠杆菌的生物学特性, 血清型鉴定为 O<sub>78</sub>。

**关键词:** 大肠杆菌; 分离鉴定; 致病性; 药敏试验

2007 年 1 月大连市庄河某肉种鸡场鸡只在 30 周龄初期, 个别鸡出现精神萎顿, 食欲废绝, 排出绿色和黄绿色稀便, 在对其进行人工受精过程中, 见其输卵管膨大、变薄并有萎缩现象, 产畸形蛋数量有所增多, 有的鸡甚至产卵停止, 如蛋黄破于腹腔, 常见肛门周围羽毛粘有蛋白或蛋黄样物, 排泄物中含有蛋白状粘性物和白色或黄色的凝块。遂投服流感克星、诺氟沙星等, 效果不佳。先后剖检濒死、死亡鸡只 10 余只, 发现十二指肠、回肠苍白, 充气, 肠壁变薄, 肠粘膜脱落, 直肠壁卡他性炎症, 盲肠扁桃体肿胀, 切面有出血点, 且有少量液体流出, 脾肿大, 质软如泥, 呈紫红色, 肝肿大, 纤维蛋白渗出性肝周炎、心包炎, 心包膜肥厚、混浊, 胸腔与心肌粘连, 腹腔中见有蛋黄液分布于肠道表面, 稍慢死亡的鸡腹腔内有大量纤维素样物粘在肠道和肠系膜上, 腹膜粗糙发炎, 有的可见肠粘连, 输卵管膨大, 管壁变薄, 管内有索状干酪样物。无菌操作采取病料, 进行实验室诊断, 结果表明该细菌为大肠杆菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病料来源

大连市庄河某肉种鸡场。

#### 1.1.2 各种试剂及实验动物

普通营养肉汤、普通营养琼脂平板、兔鲜血营养琼脂平板、麦康凯琼脂平板、伊红美兰琼脂平板、三糖铁琼脂斜面、半固体营养琼脂均自行配制。各种生物化学试剂, 药物敏感纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。小白鼠由辽宁医学院实验动物中心提供, 每只体重约 20g, 31 周龄罗斯 308 肉种鸡由大连市庄河金泉种禽繁育有限公司提供, 每只体重约

3kg。

## 1.2 方法

### 1.2.1 病料的采集

在剖检病鸡时无菌取病鸡的心、肝、脾、肾等实质脏器 3 份, 置冰箱 4℃ 保存, 备用。

### 1.2.2 细菌的分离培养与纯化

无菌条件下将病料分别接种于普通肉汤 37℃ 培养 24h 后, 接种于麦康凯琼脂平板, 继续培养 24h。观察麦康凯琼脂平板上分离培养的菌落, 选纯红色典型菌落, 接种营养肉汤进行纯培养, 24h 后接种普通营养琼脂斜面, 进一步接种伊红美兰琼脂、SS 琼脂、血液琼脂平板 37℃ 培养 24h。

### 1.2.3 细菌的形态学观察

取麦康凯培养基上生长的红色菌落, 常规方法进行革兰氏染色, 观察结果。

### 1.2.4 生化试验

取细菌纯培养物接种五碳糖类微量发酵管 (葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖发酵管), 置 37℃ 培养 48h 后进行观察。并按常规方法接种三糖铁琼脂斜面和进行吲哚试验、M-R 试验、V-P 试验、半固体营养琼脂穿刺试验并观察试验结果。

### 1.2.5 药物敏感试验

无菌条件下, 用灭菌尖头镊子夹取各种抗菌药药敏纸片, 按一定密度分别贴到已涂布细菌的普通培养基表面, 置 37℃ 恒温箱内培养 18h, 取出观察, 记录结果。

### 1.2.6 细菌的致病性试验

将纯培养的细菌接种于普通营养肉汤内, 37℃ 培养 24h, 供接种小白鼠和回归本动物接种用。

接种试验组小白鼠 10 只, 每只腹腔注射上述细菌肉汤培养液 0.5mL。另设对照组小白鼠 10 只, 每只腹腔注射无菌普通营养肉汤 0.5mL。接种试验组 30 周龄健康罗斯 308 肉种鸡 8 只, 每只肌肉注射上述细菌营养肉汤培养液 0.5mL, 对照组 30 周龄健康罗斯 308 肉种鸡 8 只, 每只肌肉注射无菌

营养肉汤 0.5mL。分开饲养,观察 1 周。

### 1.2.7 血清型鉴定

取分离到的细菌纯培养物用生理盐水 3000r/min 离心 15min 洗涤 2 次,稀释成 100 亿/ml 菌液,用电热恒温水浴锅隔水加热煮沸 2h,破坏其菌毛抗原,用下面 4 种标准大肠杆菌 O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>36</sub>、O<sub>78</sub> 抗原因子诊断血清分别与上述菌液作玻片凝集试验,鉴定 O 抗原种类。

## 2 结果

### 2.1 细菌分离培养

在营养琼脂上 37℃ 培养 24h~48h 后,形成中等大小、圆形微凸起、表面光滑湿润、半透明灰白色菌落;在麦康凯琼脂上形成中等大小,表面光滑湿润的砖红色菌落;在伊红美蓝琼脂上形成紫黑色带金属光泽的菌落;在 SS 琼脂上生长较差呈红色;在血液琼脂平板上呈完全溶血;分离菌在肉汤中培养 18h~24h,呈均匀混浊,管底有粘性沉淀,部分菌株可在肉汤表面形成菌环。

### 2.2 细菌形态学观察

病鸡心、肝肾等组织培养物涂片、染色、镜检,均可见两端钝圆,多数散在排列,偶尔有 2~3 个连在一起的革兰氏阴性短杆菌。

### 2.3 生物化学试验

详见表 1。

表 1 生物化学试验结果

生化试剂	结果	生化试剂	结果
三糖铁培养基	斜面 +	MR 试验	+
	底层 ⊕	靛基质试验	+
	H <sub>2</sub> S -	V-P 试验	-
糖发酵	葡萄糖 ⊕	枸橼酸盐利用试验	-
	乳糖 ⊕	运动性试验	+
	麦芽糖 ⊕		
	甘露醇 ⊕		
	蔗糖 ⊕		

### 2.4 药敏试验

详见表 2。

### 2.5 致病性试验

接种小白鼠 1h 后出现运动减慢、呼吸加快、闭眼、蜷伏等症状,最早 10h 死亡,18h 全部死亡,对照组无异常。从死亡小白鼠心血和肝脏分离出同一细菌,对照组小白鼠实质脏器中不能分离到细菌。回归试验组 72h 后 8 只鸡全部精神沉郁,翅膀下垂,鸡冠发紫,拉黄白色稀粪,120h 8 只鸡全部死亡,无菌操作取肝脏、心血接种麦康凯琼脂平板 8 只

表 2 抗菌药的抑菌圈直径 (mm)

药物名称	抑菌圈直径 (mm)	药物名称	抑菌圈直径 (mm)
卡那霉素	19	诺氟沙星	3
庆大霉素	17	土霉素	5
头孢唑啉钠	0	新霉素	15
环丙沙星	13	红霉素	0
阿米卡星	22	恩诺沙星	23
沙拉沙星	11	阿莫西林	12
新诺明	0	氨苄西林	0
氟苯尼考	17		

鸡均分离到同一菌株,对照组 8 只鸡健康活泼无异常。

### 2.6 血清型鉴定

经玻片凝集试验结果表明,该株鸡大肠杆菌血清型为 O<sub>78</sub>。

## 3 讨论

本次试验从肉鸡体内分离到大肠杆菌,实验室诊断结果表明所分离到的细菌符合大肠杆菌的结构特征。病例初步诊断为输卵管炎型大肠杆菌和肠炎型大肠杆菌混合感染,是由致病性埃希氏大肠杆菌引起的传染病。本病一般在产蛋鸡产蛋高峰期和高峰过后的这一时间段多发。该鸡场对疾病发现较早,但在治疗时,未进行药敏试验,没有对药物进行较好的选择,使鸡群产生耐药性,给后续的治疗选药带来很多的困难。因此有条件的养殖场必须进行药敏试验,选择敏感药物,而没有条件的养殖场应选用本场过去少用的药物进行全群给药,方可收到满意的治疗效果。

从本次产蛋鸡大肠杆菌病的流行特点看,本病的发生是由冬季不注意鸡舍的通风和消毒,粪便未及时清扫导致,并且对种蛋的调查中发现孵化率降低,出现了较多的弱雏和大肠杆菌性败血症的病雏,造成雏鸡在孵出时或孵出后就死亡。为此,建议父母代种鸡场要加强鸡群的饲养管理、鸡舍的消毒和通风,降低饲养密度。种蛋收集、贮存过程中要及时进行熏蒸消毒,孵化室也要定期消毒,杜绝因种蛋带来的污染。

大肠杆菌是条件性致病菌,防治该病的关键在于加强饲养管理,做好各个环节的卫生消毒,消除各种发病诱因。日常要提供全价优质饲料,并补充足量的维生素和电解质;夏季还要注意防暑;应添加饲料添加剂,如碳酸氢钠、杆菌肽锌、维生素 C 等;严格执行卫生防疫措施,创造一个良好的饲养环境。由于各地大肠杆菌的血清型,特别是优势血清型存在差异,有效而通用的菌苗尚未出现,因此筛选地区性免疫原性优良的大肠杆菌菌株制作菌苗,乃是防治鸡大肠杆菌免疫预防的基础。建议有条件的肉种鸡场,最好采用自家灭活苗,这样效果可靠,更适用于血清型复杂的地区。