

# 广东地区鸭疫里默氏杆菌与大肠杆菌混合感染病例病原药敏试验

黄淑坚

雷清福

曾小娜

曾庆云

王永鯤

梁祥解

王伟芳

梁小英

(佛山科学技术学院生命科学学院)

广东佛山

528231

中图分类号: S858.3 文献标识码: A 文章编号: 1008-3847(2005)04-0008-04

摘要:从广东广州、佛山、肇庆、清远、湛江、韶关、汕头、惠州等地区8个鸭群中选择具有典型纤维素性心包炎、肝周炎、脑膜炎、肠炎的病死鸭,无菌操作将其肝脏和脑实质内分离到15株细菌。通过细菌培养特性、染色特性、形态观察、生化试验,其中8株为鸭疫里默氏杆菌,7株为大肠杆菌。以分离菌株的液体培养物人工接种14日龄易感雏鸭均能复制出典型的病例。病原菌药敏试验结果表明,鸭疫里默氏杆菌大部分菌株对红霉素、头孢唑啉、氨苄青霉素、阿莫西林、环丙沙星、氧氟沙星、庆大霉素、丁胺卡那霉素等高度敏感,鸭大肠杆菌大部分菌株对庆大霉素、丁胺卡那霉素及新霉素高度敏感。

关键词:鸭疫里默氏杆菌 鸭大肠杆菌 混合感染 药敏试验

鸭疫里默氏杆菌病又名鸭传染性浆膜炎,是由鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer RA*)引起鸭的一种急性或慢性、接触性、败血性传染病。鸭大肠杆菌病,是由致病性大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)引起鸭的一种急性、出血性、渗出性、败血性传染病。两病均能使不同品种、日龄及性别的鸭感染发病,并以纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎和脑膜炎为特征性病理变化,临床诊断很难将两者区分开来<sup>[1-3]</sup>。这两种疫病每次的混合感染均会导致鸭的大批死亡,给养殖户造成严重的经济损失,是目前危害养鸭业健康发展两种重要传染病。近年来,广东省养鸭较发达的珠江三角洲地区中的一些鸭场也常见本病发生与流行,尤其以北京白鸭、番鸭、樱桃谷鸭、野水鸭等肉鸭发病居多。本研究从广东省8个地区选择具有典型纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎以及肠炎的病死鸭进行病原的分离与鉴定,并对病原菌进行药物敏感试验,为有效地防制鸭里默氏杆菌与大肠杆菌混合感染病例筛选敏感药物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病料来源

从广东的广州、佛山、肇庆、清远、湛江、韶关、汕头、惠州等地区8个鸭群中选择具有典型纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎以及肠炎的病死鸭,无菌操作采取患鸭的肝脏与脑组织。

#### 1.1.2 培养基

普通营养琼脂、麦康凯琼脂、营养肉汤培养基,均为广东省环凯微生物科技公司产品。普通琼脂平板、麦康凯琼脂平板、血液琼脂平板、营养肉汤按常规方法制作。

#### 1.1.3 生化反应管

葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、木糖、果糖、棉子糖、甘露醇、硫化氢、尿素酶试验、甲基红试验、靛基质试验、枸橼酸盐试验和硝酸盐还原试验微量生化发酵管,为上海医学化验所试剂厂产品。

#### 1.1.4 药敏纸片

先锋霉素(V(CZ))和氨苄青霉素(AM)、阿莫西林(CB)、红霉素(E)、丁胺卡那霉素(AN)、新霉素(N)、庆大霉素(GM)、卡那霉素(K)、链霉素(S)、氟哌酸(NOR)、氧氟沙星(OFL)、环丙沙星(CIP)、痢特灵(FR)、氯霉素(C)、磺胺甲基异噁唑(SMX)15种药物为北京天坛生物制品检定所产品。

#### 1.1.5 非免疫雏鸭

1日龄仙湖三号鸭,由本校科研禽场提供。未经任何免疫,常规饲养14天,未发现任何异常。供病原致病性试验使用。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌的分离与纯化

无菌操作将病死鸭的肝脏和脑组织均划线接种于麦康凯琼脂平板和鲜血琼脂平板上,分别在37℃恒温箱和57℃烛缸中培养24h,观察菌落形态,并挑取单个典

型菌落涂片染色镜检,然后再挑选单个典型菌落作进一步划线纯培养。

1.2.2 生化试验

从分离纯化的菌株纯培养物中挑取单个典型菌落分别接种到微量生化发酵管进行细菌生化试验,置37℃恒温箱中培养24h后观察结果。

1.2.3 药敏试验

采用药敏试纸片法,按常规进行药敏试验。RA-1~8菌株接种在血液琼脂平板上,置37℃烛缸中培养24~48h;*E.coli*-1~7菌株在普通琼脂平板上培养,置37℃恒温箱中培养24h,观察结果。判定标准:抑菌圈直径大于15mm判为高度敏感,15~10mm判为中度敏感,小于10mm判为不敏感。

1.2.4 致病性试验

将RA-1~8菌株分别接种于含10%犊牛血清的营养肉汤中,置37℃烛缸中培养36h,含菌量为 $8.5 \times 10^8$ CFU/ml。*E.coli*-1~7菌株分别接种于含5%犊牛血清的营养肉汤中,置37℃恒温箱中培养16h,含菌量为 $10.3 \times 10^8$ CFU/ml。取15株细菌的上述培养物分别各接种5只2周龄的未经免疫的仙湖三号鸭,颈部皮下注射0.2ml/只,隔离饲养,观察2周。

2 结果

2.1 细菌的分离与鉴定

从临床剖检表现为典型纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎以及肠炎的病死鸭中,将脑组织、肝脏均接种于麦康凯琼脂平板和血液琼脂平板上,麦康凯琼脂平板在37℃恒温箱中培养24h,在麦康凯平板上有粉红色菌落形成。这些菌落为圆形、边缘整齐、隆起、光滑、湿润、大小2~3mm,经涂片革兰氏染色镜检均为革兰氏阴性的粗短杆菌,单个存在,无芽孢。鲜血琼脂平板在37℃烛缸中培养24h后,从肝脏接种的鲜血琼脂平板上有大、小2种菌落,都不产生溶血,从脑组织接种的鲜血琼脂鲜血琼脂平板上只有1种小菌落。大菌落为圆形、边缘整齐、隆起、光滑、湿润、大小2~3mm、灰白色,经涂片革兰氏染色镜检为革兰氏阴性粗短杆菌,单个存在,无芽孢;小菌落为圆形、光滑、湿润、微隆起、半透明露珠状,直径0.5~1mm,经涂片革兰氏染色镜检为革兰氏阴性细小杆菌,多为单个排列有的呈长丝状,无芽孢,瑞氏染色部分菌呈两

极着色。挑选两种典型菌落分别接种普通琼脂平板和麦康凯平板在37℃恒温箱中培养24h,只有大菌落接种后长出菌落,并在麦康凯上形成红色菌落,而小菌落接种后无细菌生长。然后,分别挑选单个典型菌落作进一步划线纯培养。我们将以典型病鸭分离到的细小杆菌命名为RA-1~8,大杆菌命名为*E.coli*-1~7。

2.2 生化试验

2.2.1 鸭疫里默氏菌生化试验

RA-1、RA-2、RA-3、RA-4、RA-5、RA-6、RA-7、和RA-8菌株均不发酵葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、木糖、果糖、棉子糖、甘露醇等糖类,甲基红试验、靛基质试验、尿素酶试验、枸橼酸盐试验和硝酸盐还原试验均为阴性,不产生硫化氢。这些生化特性与鸭疫里默氏杆菌相似(结果见表1)。

2.2.2 鸭大肠杆菌生化试验

*E.coli*-1、*E.coli*-2、*E.coli*-3、*E.coli*-4、*E.coli*-5、*E.coli*-6、*E.coli*-6、和*E.coli*-7菌株可发酵葡萄糖、麦芽糖、乳糖、木糖、甘露醇等多种糖类,产酸产气,不分解蔗糖和棉子糖,甲基红试验试验阳性,靛基质试验阳性,枸橼酸盐试验和尿素酶试验阴性,不产生硫化氢,这些生化特性与大肠杆菌相似(结果见表2)。

2.3 药敏试验

2.3.1 鸭疫里默氏菌药敏试验

RA-1、RA-2、RA-3、RA-4、RA-5、RA-6、RA-7和RA-8菌株对红霉素、阿莫西林均为高度敏感;大部分菌株对环丙沙星(除RA-5株外)、丁胺卡那霉素(除RA-7株外)、氧氟沙星(除RA-6株外)、头孢唑啉(除RA-3株及RA-7株外)、氨基青霉素(除RA-3株及RA-5株外)高度敏感;大部分菌株对新霉素、卡那霉素、氯霉素中度敏感;大部分菌株对磺胺甲基噁唑不敏感(结果见表3)。

2.3.2 鸭大肠杆菌药敏试验

*E.coli*-1、*E.coli*-2、*E.coli*-3、*E.coli*-4、*E.coli*-5、*E.coli*-6、和*E.coli*-7菌株对丁胺卡那霉素为高度敏感;大部分菌株对庆大霉素(除*E.coli*-1株外)、新霉素(除*E.coli*-1及*E.coli*-7株外)、卡那霉素(除*E.coli*-3及*E.coli*-6株外)、氯霉素(除*E.coli*-3、*E.coli*-6及*E.coli*-7株外)、头孢唑啉(除*E.coli*-1、*E.coli*-6及*E.coli*-7株外)为高度敏感;大部分菌株对环丙沙星、氧

表1 鸭疫里默氏杆菌的生化试验结果

菌株号	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖	木糖	果糖	甘露醇	棉子糖	硫化氢	尿素酶试验	甲基红试验	靛基质试验	枸橼酸盐	硝酸盐还原
-----	-----	-----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-------	-------	-------	------	-------

RA-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

氟沙星、氟哌酸、链霉素为中度敏感;大部分菌株对痢特灵、氨苄青霉素、阿莫西林、磺胺甲基异噁唑不敏感(结果见表4)。

2.4 致病性试验

2.4.1 鸭疫里默氏杆菌致病性试验

用鸭疫里默氏杆菌的培养肉汤人工攻毒后48h,雏鸭相继发病。病鸭眼、鼻流出浆液性分泌物;粪便稀薄,呈黄绿色;闭目昏睡、缩颈摇头,多数出现共济失调,不能站立,倒地后不能翻起;少数病鸭一侧或

两侧鼻窦明显肿大,刺破时可挤出大量豆腐渣样渗出物;濒死前出现神经症状,如痉挛、摇头、点头、背脖和两腿伸张呈角弓反张。剖检病死鸭,心包腔内、气囊内和肝脏表面覆盖一层灰白色纤维素性膜,厚薄均一,半透明极易剥离;腹腔积液,十二指肠浆膜和黏膜充血、出血;肺瘀血水肿;鼻窦腔内有灰白色豆腐渣样渗出物;多数病例的脑膜充血、出血,脑实质郁血。

2.4.2 鸭大肠杆菌致病性试验

用大肠杆菌的培养肉汤人工攻毒后24h,雏鸭相

表2 大肠杆菌的生化试验结果

菌株号	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖	木糖	甘露醇	棉子糖	硫化氢	尿素酶试验	甲基红试验	靛基质试验	枸橼酸盐
<i>E.coli-1</i>	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	+	+	-
<i>E.coli-2</i>	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	+	+	-
<i>E.coli-3</i>	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	+	+	-
<i>E.coli-4</i>	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	+	+	-
<i>E.coli-5</i>	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	+	+	-
<i>E.coli-6</i>	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	+	+	-
<i>E.coli-7</i>	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	+	+	-

"⊕"为产酸产气 "+"为产酸不产气 "-"为阴性(不产酸不产气)

表3 鸭大肠杆菌对化学药物的敏感性 (抑菌圈直径 mm)

药敏纸片	<i>E.coli-1</i>	<i>E.coli-2</i>	<i>E.coli-3</i>	<i>E.coli-4</i>	<i>E.coli-5</i>	<i>E.coli-6</i>	<i>E.coli-7</i>
丁胺卡那霉素(AN)	18	25	21	20	21	16	17
庆大霉素(GM)	12	23	19	20	21	15	20
新霉素(N)	11	23	15	20	18	15	11
卡那霉素(K)	19	24	11	17	20	12	18
氯霉素(C)	24	28	0	25	20	11	0
环丙沙星(CIP)	7	9	15	28	26	13	21
氧氟沙星(OFL)	10	12	11	26	25	9	15
氟哌酸(NOR)	7	12	12	26	27	10	19
头孢唑啉(CZ)	0	21	15	20	20	0	9
链霉素(S)	15	19	0	13	14	0	8
痢特灵(FR)	10	12	9	8	8	7	7
氨苄青霉素(AM)	0	0	0	13	14	0	0
阿莫西林(CB)	0	0	0	21	17	0	0
磺胺甲基异噁唑(SMX)	12	25	0	0	0	0	0

表4 鸭疫里默氏杆菌对化学药物的敏感性 (抑菌圈直径 mm)

药敏纸片	RA-1	RA-2	RA-3	RA-4	RA-5	RA-6	RA-7	RA-8
红霉素(E)	38	30	34	28	37	40	24	36
阿莫西林(CB)	31	19	24	27	30	30	32	36
环丙沙星(CIP)	21	23	19	19	14	17	20	18
丁胺卡那霉素(AN)	21	15	17	30	18	22	13	15
氧氟沙星(OFL)	22	19	17	16	15	13	18	17
头孢唑啉(CZ)	28	15	14	32	32	34	13	40
氨苄青霉素(AM)	35	17	0	31	14	22	20	29
新霉素(N)	20	18	11	26	18	13	14	10
卡那霉素(K)	20	11	18	17	12	10	13	12
氯霉素(C)	14	9	12	12	11	16	16	10
磺胺甲基异噁唑(SMX)	10	10	0	10	12	14	14	14

继发病。病鸭精神沉郁,不愿行动,食欲减少或废绝;鼻窦腔有多量黏液;腹泻,粪便呈黄绿色或灰白色。剖检病死鸭,全身表现为败血症;眼结膜充血,鼻窦黏膜充血,有多量黏液,气管有多量黏液;气囊变厚有混浊,有少量黄色干酪样物;肝脏肿胀,有出血斑点,表面覆盖一层浅黄色或乳白色纤维性渗出物,极易剥离;心包腔积液,心外膜有斑点状出血,心包膜增厚,并以多量纤维性渗出物与心外膜黏连,呈乳白色絮状,不透明;胰脏有出血斑点;口腔至食道有多量黏液,整个肠道浆膜、黏膜充血出血,从腺胃至泄殖腔卡他性炎症;肾脏出血,肾小管尿酸盐沉积;有很浓的粪臭味。

## 2.5 分离细菌回归试验

无菌操作从人工攻毒病死鸭的肝脏和脑组织均划线接种于麦康凯琼脂平板和鲜血琼脂平板上,分别在37℃恒温箱和37℃烛缸中培养24h,观察菌落形态,并挑取单个典型菌落涂片染色镜检,同时挑取单个典型菌落接种于微量生化发酵管进行细菌生化试验,经鉴定均回收得到非常纯的与接种相同的细菌。

## 3 讨论与小结

3.1 从临床剖检表现为典型纤维性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎以及肠炎的病死鸭中,以无菌操作从其肝脏和脑组织均划线接种于麦康凯琼脂平板和鲜血琼脂平板上,分别在37℃恒温箱和37℃烛缸中培养24h,分离到15株细菌。根据细菌培养特性、形态特征、生化试验及致病力试验结果表明,RA-1、RA-2、RA-3、RA-4、RA-5、RA-6、RA-7、和RA-8菌株为鸭疫里默氏杆菌(*E.coli-1*、*E.coli-2*、*E.coli-3*、*E.coli-4*、*E.coli-5*、*E.coli-6*、*E.coli-6*、和*E.coli-7*菌株为大肠杆菌。由此表明,临床剖检表现为典型病变的患鸭为混合感染了鸭疫里默氏杆菌和大肠杆菌。

3.2 鸭疫里默氏杆菌在脑实质内最易分离到病原菌,其次是肝脏。初次分离需要在血液琼脂平板和有5%~10%CO<sub>2</sub>条件下才能成功分离培养,在麦康凯琼脂平板上不能生长,不能发酵糖类。鸭大肠杆菌在脑实质和肝脏中均易分离到病原菌,在麦康凯琼脂平板上长成红色菌落,能发酵多数糖类(或醇类),产酸产气。

3.3 鸭疫里默氏杆菌感染的病鸭常有神经症状,头颈痉挛;心、肝、气囊被覆纤维性渗出物形成薄膜,透明而干燥,无臭味;肺瘀血水肿;鼻窦腔内有灰白色豆腐渣样渗出物;多数病例的脑膜充血、出血,脑实质瘀血。大肠杆菌感染的病鸭一般无神经症状,全身表现为败血症;心、肝、气囊被覆粗糙、厚且湿润纤维性渗出物,呈凝乳状,气味恶臭难闻;严重的呈出血性、卡他性肠炎。上述两种疫病的症状和病理变化可作为初步鉴别诊断的依据,但由于鸭疫里默氏杆菌病和大肠杆菌病的病理变化极为相似,而且往往这两种疫病混合感染,难以区分,必须通过病原菌分离

及鉴定进行确诊<sup>[4-5]</sup>。

3.4 药敏试验结果表明,鸭疫里默氏杆菌对红霉素、先锋霉素类、青霉素类、环丙沙星、氧氟沙星和丁胺卡那霉素高敏,大肠杆菌对氨基苷类抗生素高敏,这两种菌株对抗菌药的敏感性并不完全一致。这提示我们在以临床剖检表现为典型纤维性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎以及肠炎为病理特征的患病鸭群进行药物治疗时,最好先对分离鉴定病原菌进行药敏试验,然后筛选敏感药物进行治疗,才能获得有效的治疗效果。

3.5 近年来,珠江三角洲地区的一些鸭场的北京鸭、番鸭、樱桃谷鸭,在1~5周龄左右常发生一种发病快、发病率和死亡率高的急性传染病,其病变特征为典型纤维性心包炎、气囊炎和肝周炎。人们常误诊为单纯的大肠杆菌病,但用防治大肠杆菌病的药物常不能有效控制疾病的死亡。我们对多起病例采集病料进行细菌分离鉴定,认为病鸭的这种病症多数为鸭疫里默氏杆菌与致病性大肠杆菌混合感染,这与张大丙等<sup>[6]</sup>的报道一致。

3.6 鸭疫里默氏杆菌病和鸭大肠杆菌病往往在同一个鸭群中混合感染,且两者从临床症状与剖检病变上难以区分。由于鸭疫里默氏杆菌的血清型众多,并且日趋复杂,现已报道除I型外,还发现有2、6、10、14型,且各血清型之间无交叉保护力,同时致病性大肠杆菌血清型也较多,因而从本地区发病鸭群中分离鸭疫里默氏杆菌和鸭大肠杆菌,经分离、纯化、增菌培养、甲醛灭活、一定比例混合后加入佐剂(油乳佐剂或蜂胶或铝胶)制成二联自家灭活苗,对种鸭及雏鸭进行免疫接种,是目前控制这两种疫病发生与蔓延最为有效方法之一<sup>[7]</sup>。

## 参考文献

- [1] 张大丙,郭玉璞. 1999.北京地区鸭传染性浆膜炎的流行病学调查. 中国预防兽医学报, 21(4):260~263.
- [2] 甘孟侯主编. 2000.中国禽病学. 北京:中国农业出版社, 167~174, 195~199.
- [3] 辛朝安主编. 2003.禽病学. 北京:中国农业出版社, 76~79, 96~101.
- [4] 吕敏娜,黄承锋,张健. 1996.鸭传染性浆膜炎的病原分离与鉴定. 广东畜牧兽医科技, 21(4):20~21.
- [5] 林毅,张道永,杨晓梅等. 2001.幼肉鸭混合感染鸭疫里默氏菌和大肠杆菌的诊断与防治. 中国兽医杂志, 37(1):23~24.
- [6] 张大丙,郭玉璞. 1999.不同血清型鸭疫里氏杆菌分离株的部分特性比较. 中国兽医杂志, 10:13~15.
- [7] 黄承锋,吕敏娜,张玉团等. 2000.鸭疫里默氏杆菌和大肠杆菌双联灭活蜂胶疫苗研制及应用. 广东畜牧兽医科技, 22(2):34~35.

责任编辑:任涛