

DOI:10.16515/j.cnki.32-1722/n.2018.03.021

一例导致蛋鸡肝脏肿大病原的分离与鉴定

张玉红, 杜改梅, 陈晓建

(金陵科技学院动物科学与技术学院, 江苏 南京 210038)

摘要:为查明在某养鸡场的散养鸡群中,出现小部分产蛋鸡不产蛋、消瘦、肝脏肿大的原因,利用染病鸡的病料进行细菌抹片镜检、分离、培养,细菌微量生化反应管鉴定法对分离菌株进行生化鉴定,利用 PCR 法进行分子生物学鉴定,利用 K-B 药敏纸片法进行药物敏感性试验。结果显示,致病菌为金黄色葡萄球菌。药敏试验表明,在 35 种药物中,所分离的金黄色葡萄球菌对红霉素、青霉素 G、庆大霉素、万古霉素、克拉霉素、头孢噻吩、头孢唑啉、克林霉素敏感。

关键词:细菌感染;金黄色葡萄球菌;肝脏肿大;分子生物学诊断;PCR 鉴定;药敏试验

中图分类号:S858

文献标识码:A

文章编号:1672-755X(2018)03-0088-05

Isolation and Identification of a Pathogen Causing Liver Swelling in Laying Hens

ZHANG Yu-hong, DU Gai-mei, CHEN Xiao-jian

(Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

Abstract: In order to find out the reasons why a small part of laying hens did not lay eggs, gain weight loss and liver enlargement in a henery, bacterial smear microscopy, isolation and culture were carried out using disease infected chicken materials. The bacterial isolation were biochemically identified by microbiochemical reaction tube. Analysis of molecular biologic by PCR identification, K-B susceptibility test was used to test the drug sensitivity. The results showed that the pathogenic bacteria were *Staphylococcus aureus*. Drug sensitivity tests showed that in the 35 drugs, the isolated *Staphylococcus aureus* was sensitive to erythromycin, penicillin G, gentamicin, vancomycin, clarith, cephalothiophene, cephalosporins and clindamycin.

Key words: bacterial infection; *Staphylococcus aureus*; liver enlargement; molecular biological diagnosis; PCR identification; drug sensitivity test

在养禽业中,多种疾病都会引起禽类的肝脏病变,大致可以分为两类,一类是因管理过失与营养失衡导致的营养代谢病,例如脂肪性肝出血综合征、脂肪性肝肾综合征、中毒性肝肿大及肝硬化等;另一类是因传染源引起的肝脏病变,因传染源的不同,具体的病变表现也会有不同。在家禽养殖中,养鸡占有相当大的比重。目前养鸡的形式大致可分为笼养鸡与散养鸡两种,在笼养鸡中,如果管理科学,一般传染性疾病的发病率较低,出现鸡肝脏病变的原因大多与营养失衡有关;散养鸡中,出现肝脏病变大多与传染性病原有关,常有散养鸡出现肝脏肿大的症状。鸡的肝脏肿大是由细菌、真菌等多种微生物引起的化脓性或者非化脓性肝病,如果不及时治疗,死亡率可高达 10%~30%,这将会对养殖业造成重大的损失。除了败血症能导致化脓性肝病外,细菌性肝脓肿也可由腹腔感染直接传播引起脓肿,它还可通过感染脐静脉和门静

收稿日期:2018-09-26

基金项目:江苏省“青蓝工程”资助项目

作者简介:张玉红(1970—),女,黑龙江大庆人,讲师,硕士,主要从事动物疫病的防治方面的研究。

脉,使得细菌进入肝脏,引起肝脓肿。在能引起肝脓肿的细菌中,金黄色葡萄球菌是常见的致病菌^[1]。本研究是基于散养鸡中出现偶发性蛋鸡停止产蛋,消瘦,偶尔有腹泻症状,鸡冠浅粉色,却没有明显精神症状。鉴于蛋鸡出现上述症状,采取处死一只进行剖检的方法,对病因进行探查,并根据探查结果找到有效的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 菌株与病料来源

质控菌株:金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003(批号 A1005B)和大肠埃希氏菌 ATCC25922(批号 A1016B)均购自上海鲁微科技有限公司。

病料来源:南京某散养鸡场中发病鸡剖检的病料(肝脏、脾脏、部分肠管)

1.2 主要试剂

营养琼脂、营养肉汤培养基、甘露醇氯化钠琼脂培养基、K-B药敏片、球菌属细菌微量生化鉴定管均购于杭州滨和微生物制剂有限公司;革兰氏染液试剂盒购于济南百博生物技术有限公司;DL 2000 DNA Marker 购于北京博迈德生物试剂公司;2×PCR Mix 试剂和 6×DNA 上样缓冲液购于西安赫特生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌的分离与培养 无菌取肝脏、脾脏与肠管各一小块,制作细菌抹片,革兰氏染色后进行显微镜下检查。根据初步结果判断,上述脏器无菌取小块进行研磨,用无菌生理盐水进行匀浆,以 1:10 加入 7.5%氯化钠营养肉汤进行 37℃ 增菌过夜。将培养好的菌液划线接种到血平板上,37℃ 过夜培养。观察菌落形态,挑取单菌落接种到甘露醇氯化钠琼脂培养基上进行纯化培养;纯化后的菌落接种到营养肉汤中,放入恒温摇床中进行振荡培养过夜,用于进行细菌的生化试验鉴定等后续试验。

1.3.2 生化试验鉴定 将分离纯化的可疑菌落纯培养悬液,无菌环境接种到球菌属细菌微量生化鉴定管内,用封口膜封好,37℃ 隔夜培养,观察生化鉴定管内的变化情况,根据反应结果进行判定。

1.3.3 动物致病性试验 将 40 只 16~18 g 健康、清洁级小鼠随机平均分为 4 组,其中一组为空白对照组,腹腔接种 50 μL 无菌生理盐水;试验组三组,分别腹腔接种鉴定菌浓度为 10⁴、10⁵、10⁶ cfu·mL⁻¹ 的菌液 50 μL,正常饲喂,观察小鼠生存情况,如果出现小鼠死亡现象,及时进行尸体剖检、观察腹腔脏器情况,制作肝脏、脾脏、肠管的细菌抹片,进行细菌的分离、鉴定,记录结果;第三天每组处死 3 只小鼠,进行剖检,观察腹腔脏器情况,摘取肝脏、脾脏、肠管做细菌抹片,进行细菌的分离、鉴定,记录结果;第七天处死剩余所有小鼠,重复上述工作,记录结果。

1.3.4 分子生物学鉴定 1)DNA 提取。取上述 1.3.1 中的培养菌液,根据 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 5.0 提取试剂盒的操作步骤提取细菌基因组 DNA。同时分别提取质控菌株,试验室留存的枯草芽孢杆菌的 DNA 作为对照。2)金黄色葡萄球菌的 PCR 鉴定。金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶编码基因(*nuc* 基因)是特有的编码毒力因子的基因,保守性强,特异性好,可用来作为特异性检测基因。因此,在此次试验中,选取该基因作为检测基因,设计的引物序列如下。上游引物(F):5'-GCTTGCTATGATTGTGGTAGCC-3'。下游引物(R):5'-CTCTAGCAAGTCCCTTTCCAC-3'。预期扩增片段大小为 422 bp。利用 PCR 技术,对分离到的菌株进行 *nuc* 基因特异性扩增,基因片段为 422 bp,引物由南京金斯瑞公司合成。以细菌基因组 DNA 为模板,按照 PCR 试剂盒的操作程序进行 PCR 扩增。反应程序为:95℃ 5 min;94℃ 50 s,56℃ 50 s,72℃ 2 min,进行 35 个循环;72℃ 10 min。将扩增产物经 15 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测,观察、拍照。

1.4 药敏试验

采用 K-B 纸片扩散法,将 1.3 中的细菌培养液用灭菌的细菌涂布棒在均匀无菌环境下,涂布在普通

的营养琼脂培养基上,静置 5 min 后,用无菌镊子将 34 种药敏纸片贴在含菌营养琼脂表面,纸片相互间距离不少于 24 mm,室温放置 15 min,然后倒置于 37 ℃ 恒温恒湿培养箱中,培养 18 h,根据美国临床实验室标准协会(CLSI)2013 年药敏判定标准对结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 细菌分离、培养

将有患病症状的鸡剖检后发现肝脏异常肿大,胆囊机化,脾脏有稍许肿大,肠道未见明显炎性反应。将肝脏、脾脏、肠管无菌取一小块,制作细菌抹片,革兰氏染色后镜检,观察到肝脏内有大量 G^+ 球菌,脾脏也有 G^+ 球菌,但数量较肝脏中少,肠管中未发现 G^+ 球菌。在血平板上培养后,发现菌落呈现金黄色,并且在菌落周围出现透明的溶血环即有 β 溶血现象。挑取有 β 溶血现象的菌落,用血平板传代两次,接种到甘露醇氯化钠琼脂培养基上,产生黄色带有黄晕的菌落,初步鉴定为致病性金黄色葡萄球菌。用甘露醇氯化钠琼脂培养基继续传两代,挑取特征菌落无菌接种在营养肉汤中,振荡培养,取一部分保留菌株,剩余的用于后续试验。

2.2 生化试验鉴定结果

利用球菌属细菌生化反应鉴定管,对分离菌株进行细菌生化反应鉴定,结果见表 1。根据生化鉴定管的比对标准,符合金黄色葡萄球菌的生化特性。

表 1 细菌微量生化管鉴定法对分离菌株生化反应的鉴定结果

项目	检测株	标准株	项目	检测株	标准株	项目	检测株	标准株
尿素	+	+	蔗糖	+	+	精水	-	-
木糖	+	+	乳糖	+	+	甘糖	+	+
木醇	-	-	麦芽糖	+	-	蕈糖	-	-
甘露醇	+	+	N-乙酰葡胺	-	-	硝酸盐	+	-
蜜二糖	+	+	果糖	+	+	葡磷胨水	-	-
山梨醇	+	+	甲基红	+	+	V-P 反应	弱	弱
明胶	液化	液化	葡萄糖	+	+	精氨酸	+	+

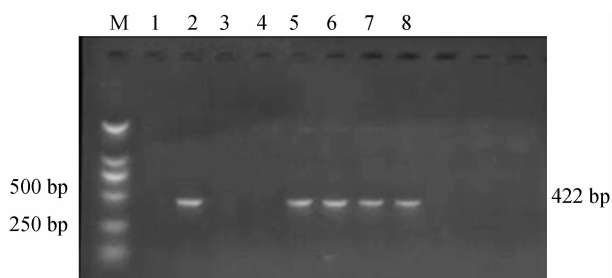
注: + 代表结果为阳性; - 代表结果为阴性。

2.3 动物致病性试验结果

观察分别接种分离菌株的小鼠与生理盐水的小鼠,发现对照组在接种后的整个饲养期间,无任何异常现象。接种菌株的小鼠,第二天出现部分小鼠精神萎靡、食欲下降、毛松乱现象,接种 10^6 cfu · mL⁻¹ 组小鼠出现死亡(死亡 2 只),剖检发现肝脏肿大,有脓肿,脾脏肿大,未见肠道炎性反应。取病料进行细菌的分离、鉴定结果是 G^+ 球菌。第三天,每组处死三只,对照组没有发现细菌,肝脏、脾脏等各脏器正常,其余三组接种分离菌株的小鼠肝脏与脾脏都发生不同程度的肿大,都发现 G^+ 球菌,鉴定后与接种的分离细菌一致。此后没有小鼠死亡现象出现,第七天,将所有的小鼠处死,空白对照组小鼠体内各脏器均正常,没有任何细菌被检出。接种细菌的三组实验组都发生不同程度的肝脏、脾脏肿大,都检出 G^+ 球菌。将所有检测到的球菌进行 PCR 鉴定,结果发现与分离菌株一致,说明引起小鼠肝脏肿大与接种分离到的菌株呈正相关。接种菌量与肝脏、脾脏肿大的关系另文叙述。

2.4 分子生物学鉴定结果

从图 1 中可以看出,鉴定菌株与金黄色葡萄球菌标准株有相同的基因扩增条带;空白对照与大肠埃希氏菌标准株、实验室留存的枯草芽孢杆菌菌株都没有特征性扩增条带出现,证明从鸡病料中分离到的鉴定菌株是金黄色葡萄球菌,小鼠体内引起肝脏肿大的接种细菌也是金黄色葡萄球菌。



M:DL 2 000 DNA Marker;1:空模板对照;2:金黄色葡萄球菌标准菌株;3:大肠埃希氏菌标准菌株;4:实验室存留的枯草芽孢杆菌菌株;5:鸡病料中分离到的鉴定菌株;6~8:小鼠接种鉴定菌株后分离到的菌株。

图1 分子生物学鉴定结果

2.5 药物敏感性试验结果

利用 K-B 纸片法进行药敏试验的结果显示,金黄色葡萄球菌对不同的抗生素的敏感性有很大的差异,如表 2 所示,在所用的 34 种药物中,对 8 种抗生素非常敏感。它们是红霉素、青霉素 G、庆大霉素、万古霉素、头孢噻吩、头孢唑啉、克林霉素、克拉霉素。因此,在实际生产中,按照国家关于兽药管理的相关法律法规,可以选择对金黄色葡萄球菌敏感的药物来治疗金黄色葡萄球菌病。本次试验后,给出建议是选用头孢噻吩进行治疗。

表 2 K-B 法药物敏感性试验结果

药名	抑菌圈直径/mm	药名	抑菌圈直径/mm	药名	抑菌圈直径/mm	药名	抑菌圈直径/mm	药名	抑菌圈直径/mm
氨苄西林	10	头孢吡肟	14	哌拉西林	14	氯霉素	10	复方新诺明	0
氨曲南	0	头孢他啶	0	左氟沙星	16	阿米卡星	14	呋喃妥因	18
头孢唑林	33	诺氟沙星	15	克拉霉素	32	四环素	0	庆大霉素	35
头孢噻吩	36	链霉素	14	头孢哌酮	16	米诺环素	15	红霉素	35
头孢呋辛	15	妥布霉素	14	大观霉素	16	环丙沙星	16	万古霉素	32
头孢噻肟	10	卡那霉素	12	青霉素 G	31	头孢曲松	12	头孢西丁	10
苯唑西林	17	麦迪霉素	14	克林霉素	31	多粘菌素 B	9		

注:0 mm 为不敏,10 mm 以下为低敏,10~14 mm 为中敏,15~20 mm 为高敏,20 mm 以上为极敏。

3 结论与讨论

在家鸡的养殖过程中出现病害现象在所难免,因致病微生物引起的肝脏肿大中,由于金黄色葡萄球菌感染引起的肝脏肿大、坏死占有一定的比例。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)广泛分布于自然界,也存在于人和动物的体表、鼻腔和消化道等部位,是一类共生的人兽共患条件致病菌^[2],在兽医临床上可广泛引起疾病,降低动物生产力,严重危害家畜、家禽健康。金黄色葡萄球菌的致病力主要取决于其产生的毒素和侵袭性酶。其中,溶血毒素能损伤血小板,破坏溶酶体,引起肌体局部缺血和坏死,属于外毒素。金黄色葡萄球菌还能产生数种引起急性胃肠炎的蛋白质性肠毒素,分为 A、B、C1、C2、C3、D、E 及 F 八种血清型。肠毒素可耐受 100 ℃ 煮沸 30 min 而不被破坏,它引起的食物中毒症状是呕吐和腹泻。此外,金黄色葡萄球菌还产生溶表皮素、明胶酶、蛋白酶、脂肪酶、肽酶等,引起脓肿^[3]。据美国疾病预防控制中心报告,金黄色葡萄菌引起的食物中毒事件在细菌性食物中毒事件中高达 33%,仅次于大肠杆菌,而在加拿大此比例可高达 45%。在我国,细菌性食物中毒主要由沙门氏菌和副溶血性弧菌引起,金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件仅次于前两者位居第三^[4]。如果活鸡因感染了金黄色葡萄球菌而发病,没有及时得到有效控制,会造成金黄色葡萄球菌污染鸡胴体、鸡蛋等制品,引发食品安全隐患。

本次试验中,经剖检、病料分离鉴定后,确定引起产蛋鸡肝脏肿大的原因是感染了金黄色葡萄球菌。此次的感染仅是在肝脏部位出现肿大,未见脓液,其余脏器未见炎症反应,有腹泻现象,剖检却未见肠炎症

状。将其余有类似症状的患病鸡隔离笼养,饲料中拌料添加头孢噻吩 2%,在连续给药一周后,患病鸡体重分别有不同程度的增加,有部分开始恢复产蛋。10 d 后停药继续笼养,在饲料中添加蒲公英与紫花地丁等青饲,13 d 后,饮水中加入有抑制金黄色葡萄球菌的益生菌,使用益生菌一周后,患病鸡体重全部有不同程度的增加,大部分恢复产蛋,放开进行散养。

在养殖过程中,不建议频繁、大剂量使用抗生素,否则容易形成耐药菌株,影响公共安全。在生产实践中,建议采用生物综合防治方法。有关报道显示^[5],枯草芽孢杆菌与乳酸杆菌对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用,适量在饮水及粉料中添加益生菌,调节鸡体内菌群的平衡,减少细菌感染和降低发病率。改善管理条件,及时清理周边环境,杜绝鸡饮水污染,添加有助于提高鸡群免疫力的植物添加剂等防治措施,提高鸡群的整体抗病、防病能力。

参考文献:

- [1] 蔺军. 各种常见鸡病肝脏的病理变化及鉴别诊断[J]. 兽医临床, 2015(10): 64 - 65
- [2] Smith T C, Gebreyes W A, Abley M J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63704
- [3] 姚蕾, 徐元宏. 金黄色葡萄球菌致病毒素的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 22(34): 3080 - 3082
- [4] 王璇, 王婷, 葛毅强, 等. 食品中金黄色葡萄球菌致病性研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(6): 553 - 557
- [5] 王廷鸿. 常见鸡葡萄球菌病的诊断及防治研究[J]. 农业与技术, 2016, 36(8): 99

(责任编辑: 湛江)