

规模化猪场猪霍乱沙门氏菌的 分离鉴定与药敏试验

刘俊伟¹, 张海棠¹, 张志鹏², 赵彩丽², 申红艳¹, 王自良¹

(1. 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003; 2. 获嘉县畜牧局, 河南 获嘉 453800)

摘要: 采集新乡市某规模化猪场疑似猪沙门氏菌病的病料, 通过细菌分离培养、生化鉴定、动物试验和药敏试验, 分离到 1 株革兰氏阴性小杆菌, 该菌在麦康凯琼脂平板上呈细小、无色半透明、光滑、圆整的菌落, 对葡萄糖、木糖醇、赖氨酸、甘露醇、蔗糖、果糖和山梨醇反应阳性, 对甘露糖、硫化氢、苯丙氨酸、尿素酶反应呈阴性, 可致死小白鼠, 确定所分离的细菌为猪霍乱沙门氏菌。该菌对头孢噻唑、左旋氧氟沙星等敏感, 对诺氟沙星和新霉素中介, 对氟苯尼考、氯霉素、庆大霉素等耐药。该研究为猪沙门氏菌病的防治提供理论依据。

关键词: 猪霍乱沙门氏菌; 分离鉴定; 药敏试验

中图分类号: S852.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)04-0146-03

Identification and Drug Sensitivity Test of *Salmonella choleraesuis* Isolated from the Scale Pig Farm

LIU Jun-wei¹, ZHANG Hai-tang¹, ZHANG Zhi-peng², ZHAO Cai-li²,
SHEN Hong-yan¹, WANG Zi-liang¹

(1. College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;

2. Animal Husbandary Bureau of Huojia County, Huojia 453800, China)

Abstract: Some organic and tissue samples of the diseased pigs of suspected swine salmonellosis were collected from a scale pig farm in Xinxiang city. Bacterial isolating culture, biochemical identification, animal experiments and drug sensitivity were performed. The results showed that one small Gram-negative bacillus which represented the needle-shape, colourless transparent, smooth and circular on the Macconkey medium was isolated. Positive reactions to glucose, xylitol, lysine, mannitol, sugar, fruit sugar and sorbitol rather than mannose, hydrogen sulphide, phenylalanine, urease were observed. The bacillus can cause death in little white mouse. This indicates that the bacteria presently isolated were *Salmonella choleraesuis*. The bacterium was sensitive to ceftiofur sodium and levofloxacin, intermediate to norfloxacin and neomycin, but resistant to florfenicol, ampicillin and gentamicin. The data provided some theoretic guidance for the prevention and treatment of swine salmonellosis.

Key words: *Salmonella choleraesuis*; Isolation and identification; Drug sensitivity test

猪沙门氏菌病 (swine salmonellosis) 又称猪副伤寒 (paratyphus suum), 是由沙门氏菌属细菌引起的仔猪的一种传染病, 致病菌主要是猪霍乱沙门氏菌、猪伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌等^[1]。该病可

使猪只发生败血症、小肠结肠炎、肺炎、肝炎、脑膜脑炎和流产, 沙门氏菌的许多血清型还可使人食物中毒和产生败血症等²⁻³。当前控制该病过分依赖抗菌药物, 使该类细菌的耐药性日趋严重。因此, 正确

收稿日期: 2010-10-13

基金项目: 河南省高校科技创新人才支持计划资助项目(2010HASTIT026)

作者简介: 刘俊伟 (1975-), 男, 河南内黄人, 讲师, 硕士, 主要从事临床兽医学的教学和科研工作。E-mail: LS@hist.edu.cn

诊断与防治猪沙门氏菌病对养猪业的健康发展、动物性食品安全和公共卫生有重要意义。鉴于此,本研究通过对细菌进行初步分离和鉴定,确定所分离的细菌为耐药性猪霍乱沙门氏菌,旨在为该病的防治和进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料 2009年5月,新乡市某规模化猪场的120头仔猪转入保育舍1周开始出现以体温升高、腹泻、脱水、结肠、盲肠出现糠麸样病变、肝脏有细小灰黄色坏死点为特征的传染病。用庆大霉素、氟苯尼考等治疗效果不佳,遂送至河南科技学院兽医院就诊。分别采集病猪心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肠系膜淋巴结、病变肠管及粪便,并迅速送至实验室进行细菌分离鉴定。

1.1.2 药品试剂与实验动物 麦康凯培养基、营养琼脂培养基,购自北京奥博星生物技术有限公司;Mueller-Hinton 琼脂、细菌微量生化反应管,购自杭州天河微生物试剂有限公司,培养基按照说明书规定方法制备;肉汤培养基、体质量20g左右的小白鼠等来自河南科技学院预防兽医学实验室。药敏纸片按文献[4]中的方法制备。菌株大肠埃希氏菌ATCC25922购自中国兽医监察所。

1.2 方法

1.2.1 分离培养 在无菌条件下,将采集的病料接种于营养琼脂平板上,置于37℃条件下培养24h,观察其生长情况,然后从平板上挑取单个可疑菌落接种于麦康凯琼脂平板上,于37℃条件下培养24h,观察结果,对可疑菌落进行涂片,革兰氏染色后镜检^[3]。

1.2.2 生化试验 将分离纯化的细菌在无菌条件下,接种在细菌微量生化微反应管中,然后放入恒温箱中,在37℃下培养24~48h,观察结果^[3]。

1.2.3 动物试验 将分离菌株活化后接种于5mL的营养肉汤中,37℃培养18~20h,用麦氏标准比浊管比浊法稀释至菌密度为 1.5×10^8 cfu/mL。取健康小白鼠8只,随机分成2组,试验组用细菌培养营养肉汤每只腹腔注射0.2mL。对照组用无菌营养肉汤每只腹腔注射0.2mL。隔离饲养观察7d,记录结果。采取试验组小鼠的心血、肝和脾进行涂片、染色、镜检,并进行细菌分离培养^[5-7]。

1.2.4 药敏试验 采用琼脂纸片扩增法,质控菌株为大肠埃希氏菌ATCC 25922。用灭菌棉拭子蘸取细菌密度为 1.5×10^8 cfu/mL的菌液,在Mueller-Hinton 琼脂平板上均匀涂布,将药敏纸片贴到培养基表

面,37℃条件下培养16~18h,观察记录结果^[4,6]。

2 结果与分析

2.1 分离培养特性

在普通营养琼脂平板上,可见微小圆形、透明而略带灰白、微微隆起、湿润、表面光滑、边缘整齐、针尖大的露滴样菌落,在麦康凯琼脂平板上呈细小、无色半透明、光滑、圆整菌落(图1),与猪沙门氏菌的培养特性相符。取分离菌纯培养物涂片,革兰氏染色,可见呈集簇状,两端钝圆,无荚膜和芽孢的革兰氏阴性小杆菌,与沙门氏菌染色特性相符^[5]。



图1 猪霍乱沙门氏菌菌落形态

2.2 生化试验结果

生化试验结果表明,分离菌葡萄糖、木糖醇、赖氨酸、甘露醇、蔗糖、果糖、山梨醇反应为阳性,甘露糖、硫化氢、苯丙氨酸、尿素酶反应呈阴性,与猪霍乱沙门氏菌的生化特性一致。

2.3 动物试验结果

试验组小白鼠全部死亡,剖检肺脏出血、有坏死点,肝脏肿大、出血,脾脏高度肿大、充血,肾脏肿大、充血、出血,十二指肠充满黄色水样内容物、肠黏膜出血,肠系膜淋巴结水肿。革兰氏染色及分离培养结果表明,此菌与接种细菌为同种细菌。对照组小白鼠饲养7d后全部存活,剖检未见病变。证明所分离的沙门氏菌具有致病性。

2.4 药敏试验结果

分离出的猪霍乱沙门氏菌对18种抗菌药的敏感性试验结果见表1^[4-6]。由表1可知,猪霍乱沙门氏菌对磷霉素钠、头孢噻唑、左旋氧氟沙星敏感,对诺氟沙星和新霉素中介,对头孢拉定、利福平、头孢唑林、环丙沙星、卡那霉素、磺胺间甲氧嘧啶、氟苯尼考、复方新诺明、氨苄西林、庆大霉素、阿莫西林、阿米卡星、恩诺沙星等耐药。

3 结论与讨论

3.1 诊断

诊断该病主要根据断奶仔猪初期体温升高,腹泻,粪便呈黄色糊状或水样,消瘦、脱水,耳部、胸腹部皮肤出现紫红色斑块,剖检脾脏肿大,肝脏有细小

表 1 猪霍乱沙门氏菌对 18 种抗菌药的抑菌圈直径及敏感性 mm

药物名称	含药量/(μ g/片)	判断标准			抑菌圈直径	敏感性
		敏感(S)	中介(I)	耐药(R)		
磷霉素钠	200	≥ 16	13~15	≤ 12	35	敏感
头孢噻吩	5	≥ 19	16~18	≤ 15	28	敏感
左旋氧氟沙星	5	≥ 17	14~16	≤ 13	22	敏感
诺氟沙星	10	≥ 1	713~16	≤ 12	16	中介
新霉素	30	≥ 17	13~16	≤ 12	16	中介
头孢拉定	30	≥ 18	15~17	≤ 14	14	耐药
利福平	5	≥ 20	17~19	≤ 16	14	耐药
头孢唑林	30	≥ 18	15~17	≤ 14	12	耐药
环丙沙星	5	≥ 21	16~20	≤ 15	11	耐药
卡那霉素	30	≥ 18	14~17	≤ 13	10	耐药
左旋氧氟沙星	250	≥ 17	13~16	≤ 12	10	耐药
复方新诺明	23.75	≥ 16	11~15	≤ 10	9	耐药
氯苄西林	10	≥ 17	14~16	≤ 13	9	耐药
庆大霉素	10	≥ 15	13~14	≤ 12	9	耐药
阿莫西林	10	≥ 17	14~16	≤ 13	8	耐药
氟苯尼考	30	≥ 18	13~17	≤ 12	8	耐药
阿米卡星	30	≥ 17	15~16	≤ 14	8	耐药
恩诺沙星	5	≥ 21	16~20	≤ 15	0	耐药

灰黄色坏死点, 结肠、盲肠出现糠麸样病变等可作出临床诊断, 确诊依赖于细菌的培养分离和生化鉴定等^[2]。本研究从具有猪沙门氏菌病典型症状和病变的病猪中分离出了在麦康凯琼脂平板上呈细小、无色半透明、光滑、圆整的菌落, 革兰氏染色呈两端钝圆的革兰氏阴性小杆菌, 并通过生化试验, 确定该菌为猪霍乱沙门氏菌。

3.2 药敏试验与治疗

本次药敏试验结果与王俊红等^[7]、周宗清等^[8]报道的耐药状况基本一致。所分离的猪霍乱沙门氏菌对临床常用的氟苯尼考、氯苄西林、庆大霉素、阿莫西林、阿米卡星、环丙沙星、恩诺沙星等 13 种药物具有耐药性, 说明当前规模化猪场细菌耐药性非常严重, 在临床诊疗中应引起重视。在 3 种敏感药物中, 食品动物禁用的磷霉素钠敏感性最高, 说明当前磷霉素在猪场的违法应用较少; 头孢噻吩在兽医临床应用时间短, 敏感性次之, 但价格较高, 应作为备用药物。在 1994 年张梓英等^[9]报道的豫南地区仔猪大肠杆菌的药敏试验中, 诺氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、新霉素和卡那霉素的敏感率分别为 100%、100%、89%、90%和 89%, 本次药敏试验中诺氟沙星和新霉素保持中介, 其余的则严重耐药, 从中可以看出, 猪场对某些抗菌药物的偏爱程度和使用频率。

猪肌肉注射头孢噻吩的剂量为 3~5 mg/kg 体质量, 本试验头孢噻吩药敏纸片的含药量为 5 μ g/片, 头孢噻吩的临床治疗剂量与同类药物头孢克肟接近, 故其药物敏感性判断标准选用了头孢克肟的判断标准^[4]。本次治疗选用左旋氧氟沙星注射液, 按 5 mg/kg 体质量, 全群肌肉注射, 2 次/d, 连用 5 d, 同时用新霉素 10 mg/kg 体质量, 颠茄酊 0.3 mL/头, 白

头翁散 15 g/头, 拌料, 2 次/d, 连用 5 d, 配合口服补液盐饮水, 很快控制了疫情。

3.3 预防

该病的发生与猪场卫生状况、应激因素、饲养因素和猪群的免疫力水平有关。猪舍每次进猪前应彻底清扫、冲洗和消毒, 空圈消毒可采用 2%~3%火碱液、复合酚或戊二醛液消毒, 或采用火焰消毒和甲醛熏蒸。带猪消毒可定期用复合酚、戊二醛液等进行, 发病时猪体消毒可用 0.1%高锰酸钾液喷雾, 如腹泻严重, 可在圈舍内撒布湿的生石灰粉。猪舍应做好防暑和保暖工作, 降低饲养密度, 注意通风, 转群时同圈猪转在一起, 并做到全进全出。仔猪在 35 日龄肌肉注射仔猪副伤寒弱毒冻干苗 1 头份, 必要时间隔 3~4 周加强 1 次, 可有效预防该病的发生^[1-3]。

参考文献:

[1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2006: 119-127.
[2] 薛俊龙, 田林君, 张国权, 等. 山西省沙门氏菌病流行病学调查分析[J]. 山西农业科学, 2010 38(9): 60-64.
[3] 邢涛. 家畜常见的沙门氏菌简介[J]. 现代农业科技, 2008 (23): 284-287.
[4] 中华人民共和国卫生部. WS/T 125-1999 纸片法抗菌药物敏感试验标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
[5] 倪宏波, 何宏轩, 乔军. 预防兽医学检验技术[M]. 吉林人民出版社, 2002: 61-65, 259-263.
[6] 姚火春. 兽医微生物学实验指导[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 66-69.
[7] 王俊红. 山东省猪源致病性沙门氏菌的分离鉴定与耐药性分析[D]. 山东农业大学, 2008.
[8] 周宗清, 邹勇, 敖仁华. 八株猪霍乱沙门氏菌的分离鉴定及豚鼠免疫模型的建立[J]. 猪业科学, 2008(12): 67-70.
[9] 张梓英, 孔德修, 孙永红, 等. 仔猪腹泻大肠杆菌的药敏试验研究[J]. 河南农业科学, 1994(5): 36-37.