

# 一株鸡白痢沙门氏菌的分离与鉴定

吴旭锦, 朱小甫, 张文娟, 熊忙利, 邢 蕾

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 西咸新区 712046)

**摘要:**为调查陕西渭南某育成鸡场鸡群发病死亡原因, 采集组织病料, 进行细菌学检查, 用生化试验鉴定分离菌, 并进行动物回归试验与药敏试验, 对常见禽病毒性病原进行检测分析, 对鸡场水质进行了检测。结果分离到一种革兰氏阴性、两端钝圆、中等大小的杆菌, 生化试验证实分离到一株鸡白痢沙门氏菌。细菌纯培养物接种小白鼠12h全部死亡。药敏试验表明分离菌耐药性极强, 仅对米诺环素中度敏感。常见病毒性病原核酸检测均为阴性。鸡场水质检测发现细菌严重超标。结果证实本病例是由于水质污染导致的鸡白痢沙门氏菌病。

**关键词:** 鸡白痢; 沙门氏菌; 水质检测; 分离; 鉴定

**中图分类号:** S852.61

**文献标识码:** A

**文章编号:** 94047-(2019)01-043-036-04

鸡白痢(pullorum disease)是鸡群常见的一种重要细菌性传染病, 其病原为鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)<sup>[1]</sup>。临床上鸡白痢沙门氏菌主要侵害2~3周龄雏鸡, 引起腹泻下痢, 拉白色石灰水样稀粪或败血症, 死亡率较高; 成年鸡主要是隐性感染, 导致产蛋率和受精率下降, 鸡苗质量下降, 经济损失较大<sup>[2,3]</sup>。该病既能水平传播又能垂直传播, 是沙门氏菌病防控的难点之一。抗生素在沙门氏菌病的防控中起了重要作用, 但由于养殖过程中普遍存在滥用抗生素现象, 导致耐药性沙门氏菌越来越多, 抗生素治疗效果不佳, 给临床治疗带来了很大的困扰<sup>[4-6]</sup>。本研究从渭南市某育成鸡场发病鸡病料中分离和鉴定了一株耐药性鸡白痢沙门氏菌, 为该病的进一步防治奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病料来源** 2018年12月, 陕西渭南某2万规模的育成鸡场, 鸡群16日龄出现发病情况, 发病雏鸡精神不振, 缩颈闭眼, 食欲减退, 绒毛蓬松, 翅膀下垂, 拥挤打堆, 病鸡排白色浆糊状粪便, 肛门周围绒毛被粪便污染, 病雏叫声尖锐, 发病率约60%, 病死率约90%。剖检死亡雏鸡, 发现肺脏充

血出血, 心肌有少量白色结节, 肝脏有灰白色坏死灶, 胆囊充盈, 盲肠肿胀, 浆膜有白色结节, 肾脏输尿管充满尿酸盐呈花斑样外观。鸡场先后用庆大霉素、阿莫西林、阿米卡星和复方磺胺氯吡嗪钠等药物治疗, 但没有任何效果。无菌采集肝脏和脾脏, 备用。

**1.1.2 试剂** 营养琼脂粉、营养肉汤、麦康凯琼脂粉、SS琼脂粉、药敏纸片、M-R、V-P、靛基质、H<sub>2</sub>S、硝酸盐还原试验等微生物鉴定管, 均购自杭州滨河微生物试剂有限公司。其他化学试剂均为国产分析纯。分子生物学试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。

**1.1.3 实验动物** 35g左右的健康小白鼠10只, 购自西北农林科技大学实验动物中心。

### 1.2 方法

**1.2.1 细菌分离** 用肝脏平整的切面制作触片, 干燥后用革兰氏染液进行染色, 显微镜油镜观察<sup>[7]</sup>。无菌法取组织样品, 划线法接种营养琼脂平板、麦康凯琼脂平板和SS平板, 37℃有氧条件培养12h, 待形成形态典型的菌落时挑菌接种于普通肉汤, 于37℃、200r/min条件下在空气浴摇床摇动培养。将肉汤培养物再划线于琼脂平板上, 培养后挑取单个菌落, 经染色镜检证实为纯培养物后, 第二次接种

收稿日期: 2019-02-20

基金项目: 咸阳市科学技术研究计划项目(2018k02-56)

作者简介: 吴旭锦(1979—), 女, 陕西西安人, 博士, 教授, 主要从事纳米药物开发和动物疫病分子病原学研究工作。

于肉汤培养基中, 获得细菌纯培养物。

1.2.2 生化试验 在生物安全柜中将待检菌纯培养物分别接种于蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇和乳糖微量发酵管, 37℃培养24h后观察发酵情况。穿刺接种待检菌于硫酸亚铁培养基, 37℃培养4d, 每天观察穿刺线周围是否变黑, 变黑为硫化氢阳性反应<sup>[8]</sup>。待检菌接种于葡萄糖蛋白胨水培养基中进行甲基红(M.R)试验, 在37℃培养3d后于培养物中加入几滴试剂, 变红者为阳性反应。接种待检细菌于邓亨氏蛋白胨溶液中, 在37℃培养3d, 于培养液中加入二甲苯3mL, 摇匀, 静置片刻后, 沿试管壁加入试剂2mL, 在二甲苯下面的液体变红色者为靛基质试验阳性反应<sup>[9]</sup>。

1.2.3 动物致病性试验 取健康小鼠10只, 随机分为试验组和对照组, 每组5只, 将经生化试验鉴定的细菌纯培养物腹腔注射0.2 mL/只, 对照组腹腔注射灭菌生理盐水0.2mL/只, 观察记录小鼠发病及死亡情况。

1.2.4 药敏试验 药敏试验采用纸片扩散法。取灭菌棉签, 无菌操作从细菌肉汤培养物中蘸取菌液, 均匀涂布在营养琼脂平板上, 涂布完毕静置数分钟直至菌液吸收, 琼脂表面无明显液体时贴药敏纸片。药敏纸片按照梅花状分布, 各平板可贴9种药敏纸片, 纸片距平板边缘15mm, 完成后37℃培12h后观察结果, 用直尺测定抑菌环直径并记录数据。

1.2.5 病毒RT-PCR检测 按照RNAiso Reagent提取

RNA操作方法, 提取组织病料中的总RNA, 采用咸阳职业技术学院动物疫病分子生物学诊断实验室建立的病原RT-PCR诊断方法, 检测禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒和传染性法氏囊炎病毒<sup>[10,11]</sup>。

1.2.6 鸡场水质检测 水样为鸡场送检的窖藏水, 按照中华人民共和国农业行业标准NY5027-2008进行。将水样作5倍系列稀释, 选用普通营养琼脂平板培养计数。另外将水样接种于SS琼脂平板, 37℃培12h后观察。

## 2 结果

### 2.1 细菌分离培养结果

组织触片染色发现多量革兰氏阴性小杆菌。在营养琼脂平板、麦康凯平板和SS平板上均有细菌生长, 在营养琼脂平板和麦康凯平板上均形成直径1-3mm左右大小的灰白色半透明样菌落, 在SS平板上形成直径1-3mm左右大小的顶端黑色菌落。挑取典型黑色菌落, 染色镜检可见形态一致的革兰氏阴性中等大小的杆菌。

### 2.2 生化试验结果

分离菌能发酵葡萄糖、麦芽糖产酸产气, 能发酵鼠李糖、甘露醇和甘露糖产酸, 不发酵乳糖和蔗糖, 柠檬酸盐利用、MR、H<sub>2</sub>S试验呈阳性, VP、靛基质试验呈阴性(表1)。试验结果符合鸡白痢沙门氏菌的生化特征。

表1 分离菌生化鉴定结果

项目	柠檬酸盐利用	MR	VP	靛基质	H <sub>2</sub> S	葡萄糖
结果	+	+	-	-	+	⊕
项目	乳糖	麦芽糖	鼠李糖	蔗糖	甘露醇	甘露糖
结果	-	⊕	+	-	+	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性, “⊕”表示产酸产气。

### 2.3 动物致病性试验

将纯培养菌接种小鼠腹腔, 12h内全部死亡。剖检死亡小白鼠可见肠道炎症表现明显, 肠管粘膜发红, 充血或出血, 肠系膜淋巴结肿胀, 呈浅红色, 肝脏有白色小坏死点, 对照组小鼠全部健活,

结果表明分离到了一株致病性强的菌株。

### 2.4 药敏试验结果

药敏试验结果表明, 35种抗生素中, 仅有米诺环素有抑菌环, 且为中度敏感, 其他34种抗生素均无抑菌环, 提示分离菌耐药性极强(表2)。

表2 药敏试验结果统计

药物名称	抑菌环直径 (mm)	判定标准 (mm)			结果	药物名称	抑菌环直径 (mm)	判定标准 (mm)			结果
		R	I	S				R	I	S	
氨苄西林	0	≤18	19-25	≥26	耐药	大观霉素	0	≤14	15-17	≥18	耐药
头孢唑林	0	≤14	15-17	≥18	耐药	妥布霉素	0	≤12	13-14	≥15	耐药
氨基南	0	≤15	16-21	≥22	耐药	红霉素	0	≤15	16-20	≥21	耐药
头孢呋辛	0	≤14	15-17	≥18	耐药	麦迪霉素	0	≤15	16-20	≥21	耐药
头孢曲松	0	≤13	14-20	≥21	耐药	克拉霉素	0	≤16	17-20	≥21	耐药
青霉素 G	0	≤19	20-27	≥28	耐药	四环素	0	≤18	19-22	≥23	耐药
头孢吡肟	0	≤14	15-17	≥18	耐药	米诺环素	16	≤14	15-18	≥19	中敏
头孢他啶	0	≤14	15-17	≥18	耐药	左氟沙星	0	≤13	14-26	≥17	耐药
头孢哌酮	0	≤15	16-20	≥21	耐药	环丙沙星	0	≤15	16-20	≥21	耐药
头孢西丁	0	≤14	15-17	≥18	耐药	诺氟沙星	0	≤12	13-16	≥17	耐药
苯唑西林	0	≤10	11-12	≥13	耐药	氧氟沙星	0	≤12	13-16	≥17	耐药
哌拉西林	0	≤17	18-20	≥21	耐药	复方新诺明	0	≤10	11-15	≥16	耐药
头孢噻肟	0	≤14	15-22	≥23	耐药	克林霉素	0	≤14	15-20	≥21	耐药
头孢噻吩	0	≤14	15-22	≥23	耐药	呋喃妥因	0	≤14	15-16	≥17	耐药
阿米卡星	0	≤14	15-16	≥17	耐药	多粘菌素 B	0	≤8	9-11	≥12	耐药
卡那霉素	0	≤13	14-17	≥18	耐药	氯霉素	0	≤12	13-17	≥18	耐药
链霉素	0	≤11	12-14	≥15	耐药	万古霉素	0	≤14	15-16	≥17	耐药
庆大霉素	0	≤12	13-14	≥15	耐药						

注: R为耐药, I为中敏, S为高敏。

## 2.5 病毒RT-PCR检测结果

经过RT-PCR检测, 禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒和传染性法氏囊炎病毒核酸均为阴性, 提示鸡群发病与这4种病毒感染无关。

## 2.6 水质检测结果

在5倍稀释的水样中, 细菌分布符合标准规范, 进行计数。结果表明, 送检水样细菌总数为1005个/mL。而标准规定畜禽饮用水总菌群成年家畜不超过100个/mL, 幼龄家畜不超过10个/mL。送检水细菌总数严重超标。为确定水中细菌种类, 将水样接种在SS平板上, 结果在SS平板上生长出密布的顶端黑色中等大小菌落, 染色镜检发现细菌为革兰氏阴性中等大小杆菌, 符合沙门氏菌特征。

## 3 讨论

随着我国蛋鸡养殖水平的不断提高, 鸡场一般比较重视沙门氏菌的净化工作, 鸡白痢在规模鸡场很少发生。但在本病例中, 通过RT-PCR检测, 排除了危害性大的4种病毒性传染病, 即禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒和传染性法

氏囊炎病毒感染。在细菌分离时我们发现, 病死仔鸡肝脏中存在大量单一细菌, 不存在其他细菌感染现象。细菌分离鉴定发现分离菌符合鸡白痢沙门氏菌的生化特征, 动物回归试验表明分离菌致病性很强, 确定了鸡白痢沙门氏菌是本次发病的病原。药敏试验结果发现, 35种标准抗生素中, 仅有米诺环素1种抗生素中度敏感, 其他34种均严重耐药, 无任何抑菌环, 细菌耐药性极强, 十分罕见, 这也是鸡场多次更换抗生素仍然效果不佳的主要原因。为阐明感染来源, 通过对送检水样检测发现, 鸡群饮用的窖藏水细菌严重超标, 为标准的10倍左右。分离细菌发现, 水中主要存在沙门氏菌污染, 提示鸡群发病和水质不洁密切相关, 鸡群饮用水被沙门氏菌严重污染是鸡群发病的根本原因。明晰病因后, 通过严格的饮水消毒和使用敏感药物, 鸡群死亡得到了控制, 随后建议鸡场弃用窖藏水, 改用自来水, 并定期检测水质和消毒, 鸡场未再出现鸡白痢病例。

### 参考文献

[1]董萌萌, 王晓斐, 徐彦召, 等. 1例鸡白痢沙门氏菌的分离

- 鉴定与耐药性分析[J].中国畜牧兽医,2018,45(9):2637-2644.
- [2]温海燕.鸡白痢沙门氏菌的分离鉴定及耐药性分析[J].河南农业科学,2014,43(8):130-132.
- [3]史瑞雅,马邯生,刘彦威,等.邯郸地区鸡白痢沙门氏菌的分离鉴定与耐药性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2018,(3):169-172,259.
- [4]刘志科,杨宁宁,徐锦凤,等.鸡白痢沙门氏菌病原的分离鉴定及耐药性分析[J].中国畜牧兽医,2017,44(9):2792-2800.
- [5]廖成水,程相朝,张春杰,等.鸡源致病性沙门氏菌新近分离株的耐药性与耐药基因[J].中国兽医科学,2011,(7):751-755.
- [6]任灵芝,江涛,高彩霞,等.豫南地区1例鸡白痢沙门菌的分离鉴定与药敏试验[J].畜牧与兽医,2014,46(2):63-65.
- [7]李志红.鸡白痢沙门氏菌病原分离与鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2016,(4):125-127.
- [8]王晓枫,王勇,胡新波,等.大理州部分鸡场鸡白痢沙门氏菌病的流行病学调查[J].中兽医学杂志,2016,(3):91-92.
- [9]施开创,李凤梅,邹联斌,等.鸡源致病性沙门氏菌的分离鉴定及血清型和药物敏感性分析[J].中国畜牧兽医,2015,42(8):2160-2168.
- [10]朱小甫,杨萍,吴旭锦. H9亚型禽流感病毒DJ15株的分离与鉴定[J]. 陕西农业科学,2016,62(5):66-67.
- [11]朱小甫,吴旭锦.利用M基因鉴别新城疫病毒中强毒株与弱毒株RT-nPCR方法的建立[J].中国动物传染病学报,2017,25(5):21-25.

[责任编辑:王军利]

## ON the Isolation and Identification of a Salmonella Typhimurium

WU Xu-jin, ZHU Xiao-fu, ZHANG Wen-juan, XIONG Mang-li, XING Lei

(Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

**Abstract:** In order to investigate the causes of death in a chicken farm in Weinan, Shaanxi province, the research collects tissue materials for bacteriological examination, identifies isolates by biochemical tests, and conducts animal regression test and drug sensitivity test to carry out common avian viral pathogens. The water quality of the chicken farm is also tested in the experiment. As a result, a Gram-negative, blunt-ended, medium-sized bacillus is isolated, and a biochemical test confirms the isolation of a Salmonella pullorum. Pure bacterial cultures were inoculated into mice all died in 12 hours. The susceptibility test shows that the isolate was highly resistant and only moderately sensitive to minocycline. Common viral pathogen nucleic acid tests are negative. The chicken farm water quality test tells us that the bacteria were seriously exceeded. The results confirms that the case was due to water pollution caused by chicken salmonellosis.

**Key words:** Pullorum, Salmonella, Water quality testing, Separation, identification

(上接第12页)

好的满足消费者日益增长的食物消费需求、实现跨越式发展,任重而道远!

### 参考文献

- [1]袁庭攀,袁珊.陕西省安康市有机农业发展的SWOT分析[J].北京农业.2015(31):156-157
- [2]李育江.陕西省多措并举推进农业产业化发展[J].农业工程技术.2015(17):53-55
- [3]时冬梅,员立亭.基于SWOT分析的陕西省农业信息服务发展策略研究[J].山西农业科学.2017(9):1368-1369
- [4]马金海,石瑞丽.探析我国农村电商发展现状与对策[J].求知导刊.2016(4):48
- [5]陕西农业发展情况分析.陕西省统计局.2017.3.
- [6]陕西省“十三五”现代农业发展规划(2016—2020).

[责任编辑:梁晶]