

家禽病例中马链球菌兽疫亚种的分离鉴定及致病性观察

刘爱晶 许古明 潘青 何诚*

(中国农业大学 动物医学院,北京 100193)

摘要 为研究马链球菌兽疫亚种对家禽的致病性,采集流行地区发病鸡和鸽的肺脏,分离了8株链球菌,并利用染色镜检、生化试验和PCR方法进行鉴定,结果为3株属马链球菌兽疫亚种,5株属粪肠球菌。在此基础上,选择1株马链球菌兽疫亚种内蒙分离株,经腹腔注射途径人工感染SPF(Specific pathogen free chicken)鸡和肉鸡,攻毒后死亡率分别为40%和80%。剖检观察到出血性肺炎、气囊炎和心包炎,尤其是肉鸡出现60%的支气管栓塞病变,这与临床病理学变化相似。此外,采用微量肉汤测定法测定8个临床分离菌株测定对15种药物的最小抑菌浓度(Minimum inhibition concentration, MIC),结果显示10株链球菌对于氟苯尼考、莫西沙星、甲磺酸加替沙星、乳酸环丙沙星及强力霉素高度敏感, MIC值均小于7.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分离株对于泰乐菌素、磷霉素钠、螺旋霉素和阿莫西林高度耐药, MIC值大于250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。试验提示马链球菌兽疫亚种可能是家禽气囊炎一个重要的病原之一,临床防治中应使用敏感性高的抗菌素。

关键词 家禽; 马链球菌兽疫亚种; 分离; 鉴定; 致病性; 耐药性

中图分类号 S 852.6

文章编号 1007-4333(2013)05-0122-07

文献标志码 A

Isolation, identification of *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* and the determination of minimum inhibition concentration

LIU Ai-jing, XU Gu-ming, PAN Qing, HE Cheng*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The purpose of this experiment is to seek the probable pathogenicity of the *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* in poultry and to find the proper medical treatment for the disease caused by the pathogen. Eight isolates were isolated from the lungs of broilers and laying hens in Liaoning, Inner Mongolia, Hebei, Shandong and Beijing, which were suffered from the severe pneumonia. Three of the isolates were identified as *S. equi* subsp. *zoepidemicus* and five were identified as *S. faecalis* by using Gram-stain, biochemical test and PCR methods. Subsequently, specific pathogen free chicken (SPF) chicken and commercial broilers were administered intraperitoneally with *S. equi* subsp. *zoepidemicus*, which was isolated from Inner Mongolia, and the post mortality was 40% and 80% for SPF chicken and commercial broilers, respectively. Typically bronchial obstruction was found except for hemorrhagic pneumonia, air sacculitis and pericarditis, which corresponded with the clinical observation. Based on the identification, minimum inhibition concentrations (MIC) of eight isolates and two reference strains were determined post incubation with the different antibiotics. Ten *Streptococcus* strains were more sensitive to florfenicol, moxifloxacin, gatifloxacin, ciprofloxacin and doxycycline, the MIC of them is less than 7.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Two isolates were found with higher antibiotic resistance to the specific medications, such as amoxicillin, tylosin, fosfomycin sodium and spiramycin, whose MIC is more than 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Taken together, *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* infection might be one of the main pathogens and contributes to severe avian pneumonia. Highly sensitive antibiotics should be implemented against *S. equi* subsp. *zoepidemicus* infection.

收稿日期: 2013-02-22

基金项目: 中国农业大学动物医学院2012年北京市大学生创业计划资助

第一作者: 刘爱晶, E-mail: laj_91@126.com

通讯作者: 何诚, 教授, 主要从事畜禽疾病研究, E-mail: hecheng@cau.edu.cn

Key words chicken; *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*; isolation; identification; pathogenicity; antibiotic resistance

2009年以来,我国北方地区家禽呼吸道疾病一直困扰着养禽业,表现为鸡和肉鸽严重的气囊炎和支气管栓塞,临床死亡率高达20%~35%。由于其发病病原和致病机制不明,严重阻碍了该病的防治。链球菌在自然界广泛存在于畜禽体表、消化道、呼吸道和泌尿生殖道等部位及乳汁中。根据多糖抗原的不同将链球菌分成20个群,其中C、D、F及I群可感染猪、牛、羊和犬,A群主要引起人的疾病,而C群马链球菌兽疫亚种主要引起成年禽发病,D群的粪肠球菌主要引起雏禽发病^[1-2]。从家禽中分离到的链球菌常见有马链球菌兽疫亚种、鸟类链球菌、停乳链球菌、变形链球菌和猪链球菌^[3]。家禽链球菌病从发病特点及临床表现上与其他细菌性疾病相似,尤其容易与大肠杆菌病、禽霍乱等疾病混淆^[4-5]。马链球菌兽疫亚种在临床上可导致严重的呼吸道疾病,是一种重要的人畜共患病病原。1968年丹麦出现了第一例人感染链球菌的病例。近年来,相继有报道链球菌与多种动物的呼吸道疾病有关,包括鸡、鸭、狗、马和人^[6]。马链球菌兽疫亚种导致大量家养犬的死亡,病死犬的剖检呈现严重的纤维素性渗出以及出血性肺炎^[6]。但是,马链球菌兽疫亚种引起家禽呼吸道疾病和相关危害,未见有报道。

本试验主要研究马链球菌兽疫亚种对家禽的致病性,并在此基础上进行药物筛选,旨在为临床防治链球菌病提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂及菌株

营养肉汤培养基和麦康凯培养基;无支原体优级胎牛血清,购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

细菌微量生化反应管,购自杭州天和微生物试剂有限公司及北京奥博星公司;5%绵羊血琼脂平板,购自北京奥博星公司;PCR引物合成由北京三博远志生物技术有限责任公司完成;血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒,2×Taq PCR Master Mix,D2000 DNA Marker,购自天根生化科技(北京)有限公司。

测试药品:氯霉素类、喹诺酮类、大环内酯类、四

环素类、头孢菌素类、青霉素类和其他类等15种药物,购自中国药品生物制品检定所。

标准菌株:马链球菌兽疫亚种(2006年北京分离株,菌株保藏编号为NATSEL0119)和粪肠球菌(2006年北京分离株,菌株保藏编号为NATSEL0118),由中国农业大学赵德明教授惠赠。

1.2 病料及试验动物

发病家禽肺脏组织来源于北京、内蒙古、辽宁、河北以及山东等地的肉鸡和肉鸽饲养场。

试验动物:21日龄SPF鸡,20只,雄性,购自北京梅里亚维通实验动物有限公司。22日龄AA肉鸡,雌雄各半,购自河北美客多集团。肉鸡和SPF鸡饲养在正压隔离器中,饲料和饮水均消毒后喂服。

1.3 细菌的分离与纯化

肺脏细菌培养^[7]。无菌采集出现临床症状的病鸡肺脏,挑取少量组织接种于绵羊血琼脂平板上,置37℃厌氧培养48h。取单菌落进行革兰氏染色镜检,将形态可疑的单菌落接种于5%的绵羊血琼脂平板上进行2~3代纯化,备用。

1.4 细菌鉴定

1)革兰染色镜检。无菌条件下,挑取已纯化的单个菌落,火焰固定后,革兰氏染色,1000倍油镜下观察细菌形态。

2)生化试验^[8-9]。用接种针蘸取部分单菌落分别接种于葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、果糖、甘露糖、甘露醇、麦芽糖、山梨醇、阿拉伯糖、pH 9.6肉汤、6.5% NaCl肉汤和马尿酸钠生化管中,置37℃厌氧培养48h后观察结果。

3)PCR鉴定^[10]。对待测菌株采用16S rRNA序列分析法进行鉴定。16S rRNA引物序列如下:primer1 5'-GTA CAG TTG CTT CAG GAC GTA TC-3', primer2 5'-ACG TTC GAT TTC ATC ACG TTG-3',目的片段大小为197 bp。提取分离菌株的总DNA后,按以下反应条件扩增并设DSM 20727菌株DNA阳性对照和空白对照。

PCR扩增反应体系为40 μL反应体系:DNA MIX酶20 μL;上游引物(10 pmol/μL) 1.5 μL;下游引物(10 pmol/μL) 1.5 μL;模板4 μL;ddH₂O 13

μL 。PCR 反应条件为 $95\text{ }^\circ\text{C}$, 4 min; 35 个循环 ($95\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; $59\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min); $72\text{ }^\circ\text{C}$, 5 min。凝胶电泳检测 制备一块质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶, 取扩增产物 $5\mu\text{L}$, 点样后电泳, EB 染色后于凝胶成像系统分析结果。

1.5 SPF 鸡及肉鸡人工感染试验^[11-12]

SPF 鸡模型: 将内蒙分离株 (S-NM) 接种 10% 血清肉汤培养基, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 增殖培养 48 h, 然后接种血液培养基进行菌落计数, 然后将菌液用肉汤进行 100 倍稀释。10 只 20 日龄 SPF 鸡经过腹腔注射含 2.49×10^8 CFU/mL 的菌液, 对照组腹腔注射 0.5 mL 灭菌生理盐水。攻毒后连续观察 14 d, 记录其发病数及死亡数, 第 14 天将存活鸡只实施安乐死, 剖检靶器官并观察其病理学变化。

肉鸡模型: 选择 10 只 22 日龄的 AA 肉鸡, 以同样方式进行接种, 重点观察支气管栓塞特点和气囊炎病变。对照组 10 只, 腹腔接种 0.5 mL 灭菌生理盐水。

1.6 MIC 测定方法^[13]

1.6.1 待测菌的准备

纯化后的分离株接种于 10 mL 血清肉汤培养基中, 160 r/min 震荡培养 48 h, 培养菌液 10 倍梯度稀释, 分别均匀涂布于 5% 的绵羊血液琼脂平板上, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养 48 h 后菌落计数, 计算各分离株菌落数, 并将各个分离株的菌液稀释到 2×10^5 CFU/mL 的菌液备用。

1.6.2 待测药物的准备

分别称取待测药物 3.60 g, 溶于 3 mL 溶剂中制备质量浓度为 1.20 g/mL 的母液。其中, 氟苯尼考、莫西沙星、甲磺酸加替沙星、司帕沙星、泰乐菌素、利福平、金霉素、四环素、强力霉素、阿莫西林和螺旋霉素的溶剂为 DMSO, 乳酸环丙沙星、左氧氟沙星、磷霉素钠和头孢噻肟钠的溶剂为肉汤。

1.6.3 MIC 的测定

96 孔细胞培养板中分别加入 100 μL 10% 血清肉汤, 将药物母液稀释至 4 mg/mL, 在培养板的第 1 孔中加入 100 μL 待测药液, 之后依次进行 2 倍稀释, 稀释后每孔加入 100 μL 含 2×10^5 CFU/mL 的菌液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养 24 h, 再向每孔中加入 5 μL 质量浓度为 5 g/L 的氯化三苯四氮唑 (TTC), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h 后观察颜色变化。细菌未生长的不变色, 细菌生

长呈红色。

2 结果与分析

2.1 细菌特征

$37\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养 48 h 后, 链球菌在含 5% 的绵羊血琼脂平板上出现灰白色、圆形突起、表面光滑、针尖大小, 有或无溶血现象的菌落。取单个菌落进行革兰氏染色, 显微镜下观察到革兰氏阳性链球菌 (图 1)。

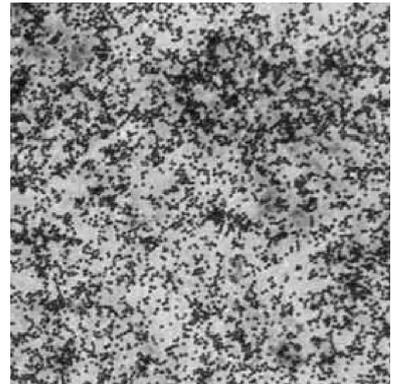


图 1 马链球菌兽疫亚种内蒙分离株革兰染色
Fig. 1 Gram strain of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* of Inner Mongolia isolate

2.2 生化试验结果

将 8 株临床分离菌和 2 株赠送菌分别接种到葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、果糖、甘露糖、甘露醇、麦芽糖、山梨醇、阿拉伯糖、pH 9.6 肉汤、6.5% NaCl 肉汤、马尿酸钠生化管及麦康凯和血琼脂培养基中, 结果见表 1。10 株链球菌的阿拉伯糖发酵及马尿酸钠均为阴性, 其余糖发酵试验均为阳性, 不产气。其中 S-LNSY、S-HBHJ、S-HBLF、S-HBCD 和 S-LNLY 与粪肠球菌除溶血性不完全一致外, 其余生化指标均相同。S-NM、S-LNSY、S-HBHJ、S-HBCD、S-LNLY 和马链球菌兽疫亚种的山梨醇发酵为阳性, 除 S-NM、S-SD 和马链球菌兽疫亚种外, 其余菌株 pH 9.6 肉汤和麦康凯为阳性。只有 S-NM、S-BJ 和马链球菌兽疫亚种不可在 6.5% NaCl 肉汤中生长。S-NM、S-BJ 和马链球菌兽疫亚种在血平板上为 β 溶血, 粪肠球菌、S-LNSY、S-HBLF、S-HBCD 和 S-SD 在血平板上为 α 溶血, S-HBHJ 和 S-LNLY 为 γ 溶血 (不溶血)。根据对照菌株的生化结果可初步鉴定 S-NM、S-BJ 以及 S-SD 为马链球菌兽疫亚种, 其余 5 株分离株为粪肠球菌。

表 1 10 株链球菌分离株生化检测
Table 1 Biochemical properties of 10 isolates of *Streptococcus*

指 标 Index	S-NM	S-BJ	S-LNSY	S-HBHJ	S-HBLF	S-HBCD	S-LNLY	S-SD	<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	<i>S. faecalis</i>
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
果糖 Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露糖 Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
阿拉伯糖 A Arabinose A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 9.6 肉汤 pH 9.6 broth	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
6.5% NaCl 肉汤 6.5% NaCl broth	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
马尿酸钠 Sodium hippurate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
麦康凯 Maconkey agar	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
溶血类型 Hemolytic type	β	β	α	γ	α	α	γ	α	β	α

注：+为阳性，-为阴性。α为甲型溶血，β为乙型溶血，γ为丙型溶血。S-NM 分离自内蒙古自治区，S-BJ 分离自北京，S-LNSY 分离自辽宁沈阳，S-HBHJ 分离自河北河间，S-HBLF 分离自河北廊坊，S-HBCD 分离自河北承德，S-LNSY 分离自辽宁辽阳，S-SD 分离自山东。*S. equi subsp. Zooepidemicus* 为马链球菌兽疫亚种。*S. faecalis* 为粪肠球菌。

Notes: + and - present positive and negative reactions, respectively. α, β represent alpha and beta hemolysis and γ represents C hemolysis. S-NM is isolated from Inner Mongolia and S-BJ is from Beijing. S-LNSY is from Shenyang, Liaoning Province. S-HBHJ is from Hejian, Hebei Province. S-HBLF is from Langfang, Hebei Province. S-HBCD is from Chengde, Hebei Province. S-LNSY is from Shenyang, Liaoning Province. S-SD is from Shandong Province. *S. equi subsp. Zooepidemicus* is *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*. *S. faecalis* is *Streptococcus faecalis*.

2.3 PCR 结果

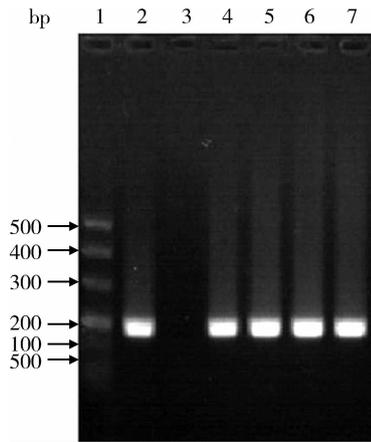
分别提取 2 株赠送菌株(粪肠球菌、马链球菌兽疫亚种)和 8 株临床分离菌株的全基因组 DNA，进行 PCR 扩增，得到菌株的 16S rRNA 的 PCR 扩增片段，大小为 197 bp，部分电泳结果见图 2。

2.4 SPF 鸡和肉鸡人工感染试验结果

SPF 鸡攻毒后观察临床症状主要为张口喘气和精神萎靡，14 d 后试验组死亡 4 只，成活率为

60%。死亡后的鸡进行剖检，剖检可见明显的气囊炎、心包炎、肝周炎的症状及肺脏出血渗出的现象，3 只鸡支气管末端出现干酪样渗出物。

肉鸡攻毒后，死亡率达到 80%，显著高于 SPF 鸡。剖检主要症状为气囊、心包和肝周有大量纤维蛋白渗出，出现纤维素性炎症；6 只肉鸡的支气管出现栓塞，从感染 SPF 鸡和肉鸡的肝脏中 100% 分离出马链球菌兽疫亚种。具体结果见表 2。



1. D2000 Marker; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照; 4. S-BJ 菌株(北京分离株); 5. S-NM 菌株(内蒙分离株); 6. 马链球菌兽疫亚种; 7. 粪肠球菌。

1. D2000 Marker; 2. positive control; 3. negative control; 4. S-BJ strain(strain isolated from Beijing); 5. S-NM strain(strain isolated from Inner Mongolia); 6. *S. equi subsp. zooepidemicus*; 7. *S. faecalis*.

图2 临床分离株 16S rRNA 的 PCR 扩增片段

Fig. 2 PCR detection of the clinical strains based on 16S rRNA target gene of *Streptococcus*

2.5 分离株的最低抑菌浓度测定(MIC)

10 株链球菌菌株对 12 种药物的 MIC 测定结果见表 3。其中 2 株赠送株为 2006 年分离株,对喹诺酮类药物、四环素类药物以及氟苯尼考敏感性高, MIC 值均小于 $7.813 \mu\text{g/mL}$ 。阿莫西林 MIC 分别为 250 及 $500 \mu\text{g/mL}$ 。

S-NM 和 S-BJ 为 2011 年分离株,对氟苯尼考、莫西沙星、甲磺酸加替沙星、强力霉素和头孢噻肟钠较敏感, MIC 值小于 $3.907 \mu\text{g/mL}$ 。泰乐菌素、阿莫西林、磷霉素钠和螺旋霉素 MIC 值均大于 $250 \mu\text{g/mL}$ 。S-BJ 与 S-NM 相比,乳酸环丙沙星和斯帕沙星,最小抑菌浓度分别为 15.625 和 $31.25 \mu\text{g/mL}$,显示对乳酸环丙沙星和斯帕沙星已经产生耐药。

S-LNSY、S-HBHJ、S-HBLF、S-HBCD、S-LNLY 和 S-SD 为 2012 年分离株,对所测药物的 MIC 均出现不同程度的差异。6 株 2012 年分离株均对莫西沙星、甲磺酸加替沙星较敏感,强力霉素、乳酸环丙沙星、左氧氟沙星和司帕沙星次之。除 S-LNSY 外,5 株均对于利福平敏感性较强。大部分菌株对泰乐菌素、头孢噻肟钠、阿莫西林、磷霉素钠、螺旋霉素、金霉素和四环素产生了耐药。

表 2 马链球菌兽疫亚种人工感染 SPF 鸡和肉鸡发病结果

Table 2 Clinical performance post challenge with *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* isolate in SPF chickens and broilers

分组 Groups	数量/只 Amount	死亡数/只 Mortality	死亡率/% Mortality rate	细菌分离/只 isolation of bacteria
SPF 鸡 SPF chicken	10	4	40.0	10
肉鸡 Poultry	10	8	80.0	10
SPF 鸡空白对照组 Control group of SPF chicken	10	0	0.0	0
肉鸡空白对照组 Control group of poultry	10	0	0.0	0

表 3 10 个链球菌菌株的 MIC 测定结果

Table 3 MIC determination of eight isolates and two reference strains

测试药物 Tested antibiotics	S-NM	S-BJ	S-LNSY	S-HBHJ	S-HBLF	S-HBCD	S-LNLY	S-SD	<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	<i>S. faecalis</i>
氟苯尼考 Florfenicol	15.625	15.625	3.907	31.250	125.000	125.000	7.813	1.953	7.813	7.813
莫西沙星 Moxifloxacin	7.813	7.813	62.500	0.977	0.977	7.813	15.625	7.813	<0.488	<0.488
甲磺酸加替沙星 Gatifloxacin mesylate	3.907	7.813	31.250	1.953	0.977	15.625	15.625	7.813	<0.488	<0.488

续表

测试药物 Tested antibiotics	S-NM	S-BJ	S-LNSY	S-HBHJ	S-HBLF	S-HBCD	S-LNLY	S-SD	<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	<i>S. faecalis</i>
乳酸环丙沙星 Ciprofloxacin	3.907	15.625	125.000	15.625	1.953	31.250	62.500	7.813	<0.488	<0.488
司帕沙星 Sparfloxacin	3.907	31.250	125.000	3.907	<0.488	31.250	125.000	7.813	<0.488	<0.488
左氧氟沙星 Levofloxacin	31.250	62.500	125.000	7.813	0.977	15.625	62.500	15.625	<0.488	<0.488
泰乐菌素 Tylosin	250.000	500.000	500.000	500.000	500.000	500.000	500.000	250.000	15.625	15.625
利福平 Rifampicin	15.625	31.250	62.500	0.977	7.813	7.813	3.906	125.000	<0.488	62.500
金霉素 Aureomycin	31.250	31.250	250.000	125.000	250.000	62.500	250.000	125.000	7.813	7.813
四环素 Tetracycline	62.500	62.500	125.000	250.000	125.000	62.500	0.977	<0.488	0.977	1.954
强力霉素 Doxycycline	3.907	7.813	31.250	31.250	15.625	15.625	31.250	31.250	0.977	<0.488
头孢噻肟钠 Cefotaxime sodium	1.954	1.954	<0.488	1 000.000	250.000	>1 000.000	1 000.000	31.250	3.907	62.500
阿莫西林 Amoxicillin	250.000	500.000	1.953	<0.488	1.953	500.000	0.977	<0.488	250.000	500.000
磷霉素钠 Fosfomycin sodium	500.000	500.000	<0.488	>1 000.000	125.000	>1 000.000	250.000	500.000	15.625	31.250
螺旋霉素 Spiramycin	1 000.000	1 000.000	500.000	500.000	500.000	250.000	500.000	500.000	15.625	3.907

3 讨论

3.1 禽马链球菌兽疫亚种与家禽气囊炎发病之间的关系

对临床送检病料进行细菌的分离培养纯化,并利用革兰镜检、生化试验及 PCR 等方法对其进行鉴定,结果表明 8 个分离株为链球菌,其中 3 株属于马链球菌兽疫亚种,5 株属于粪肠球菌。通过人工感染试验证明分离株能造成典型病状和较高的死亡率。剖检可见明显的气囊炎、心包炎、肝周炎症状及肺脏出血渗出的现象,一些病鸡可见气管或支气管阻塞的症状。通过腹腔途径 SPF 鸡、肉鸡人工感染均可以发病,并从肺脏上分离到了该菌株。因此,依据科赫法则^[14]证明临床马链球菌兽疫亚种分离株可能是气囊炎的病原之一。

就单独攻毒引起的症状而言,链球菌与鼻气管炎鸟疫杆菌(另篇报道)均会引起家禽的气囊炎症状^[7]。链球菌侧重于引起肺脏支气管出血和渗

出性炎症,进一步继发栓塞,而鼻气管炎鸟疫杆菌则侧重于引起肺脏的出血性炎症。二者混合感染会加剧气囊炎的发病症状,导致死亡率升高。从发病主次上,鼻气管炎鸟疫杆菌属于原发性病原,链球菌属于继发性病原,感染后容易诱发渗出性炎症,如两侧支气管栓塞后导致病禽窒息死亡。马链球菌兽疫亚种发生及导致鸡群死亡的主要原因是:1)首先链球菌广泛存在于家禽的呼吸道中,是一种机会致病菌。各种不良因素导致群体免疫力下降,会导致菌群失调,从而使鸡群发病^[15];2)高度集约化饲养模式导致发病的家禽通过呼吸道途径,加速传播疾病^[2];3)鼻气管炎鸟疫杆菌感染后,也会加速链球菌、大肠杆菌、禽流感等其他病原混合感染,导致症状加重^[7]。

本试验中从发病家禽肺脏中分离出 5 株粪肠球菌,其在家禽气囊炎中扮演何种角色,为原发感染还是继发感染,与鼻气管炎鸟疫杆菌混合感染机制如何?本课题组将进一步研究。

3.2 禽马链球菌兽疫亚种 MIC 测定和临床用药借鉴

试验显示 10 链球菌对于氟苯尼考、莫西沙星、甲磺酸加替沙星、乳酸环丙沙星及强力霉素高度敏感,大部分菌株对于利福平敏感。相比于早期分离株,2011 和 2012 年分离株对于泰乐菌素及螺旋霉素已经产生普遍耐药,部分菌株对于金霉素、磷霉素钠、阿莫西林和头孢噻肟钠产生了严重耐药,辽宁和河北的 5 个分离株产生耐药的种类明显多于其他分离株。这种差别可能与临床抗菌素滥用有关。国内其他文献报道链球菌对于利福平、青霉素、氨苄青霉素敏感^[4],对于阿莫西林等出现耐药,这与本试验结果部分相符,结果不同可能是与分离病原地区的用药有关。

试验结果表明 2011 年分离株对于泰乐菌素、磷霉素钠和螺旋霉素已经由敏感转为高度耐药,对于四环素和金霉素的耐药性也出现了明显提高。四株链球菌对阿莫西林均有较高耐药性,因此不建议临床使用。

4 结 论

本试验对临床有气囊炎症状的禽类,进行细菌的分离培养、生化实验和 PCR 鉴定,成功得到 8 株链球菌,其中 3 株属于马链球菌兽疫亚种,5 株属于粪肠球菌。并进一步通过发病试验证实马链球菌兽疫亚种在家禽气囊炎发病中起着重要的作用。针对临床分离株的 MIC 检测结果,推荐使用氟苯尼考、莫西沙星、甲磺酸加替沙星、乳酸环丙沙星、强力霉素和利福平治疗马链球菌兽疫亚种引起的疾病。

参 考 文 献

[1] 王琼秋,张凤英.红河地区雏鸡链球菌的分离与鉴定[J].云南畜牧兽医,2010(Z1):10-11

- [2] 赵翠燕,罗绿花,谭淑红.鸡源性链球菌的分离鉴定与药敏试验[J].甘肃农业科技,2009(2):15-17
- [3] Messier S, Quessy S, Robinson Y, et al. Focal dermatitis and cellulitis in broiler chickens: Bacteriological and pathological findings[J]. Avian Diseases, 1993, 37(3): 839-44
- [4] 邹玲,刘文华.一株鸭源链球菌的分离鉴定与药敏试验[J].山东畜牧兽医,2008,29(5):5-7
- [5] 朱会林,王德山.禽类链球菌 PCR 检测方法的建立[J].家禽科学,2010(6):16-17
- [6] Pesavento P A, Hurley K F, Bannasch M J, et al. A clonal outbreak of acute fatal hemorrhagic pneumonia in intensively housed (shelter) dogs caused by *Streptococcus equi* subsp *Zooepidemicus*[J]. Veterinary Pathology, 2008, 45: 51-53
- [7] 刘爱晶,潘青,田德雨,等.鼻气管鸟疫杆菌的分离鉴定及最低抑菌浓度测定[J].中国农业大学学报,2012,17(2):124-129
- [8] Chadfield M S, Christensen J P, Christensen H, et al. Characterization of streptococci and enterococci associated with septicaemia in broiler parents with a high prevalence of endocarditis[J]. Avian Pathology, 2004, 33(6): 610-617
- [9] 王艳丰,张丁华.肉鸡呼吸型链球菌病的诊治[J].中国家禽,2003,25(16):24
- [10] Francois J P, Danbing K, Dominique K B. Use of tuf sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species[J]. J Clin Microbiol, 2004(8): 3686-3695
- [11] 何诚,杨明,杨建民,等.中药制剂 SHY 对新城疫、禽流感 H9、H5 亚型病毒的抑制和攻毒保护效果[J].中国农业大学学报,2005,10(6):7-10
- [12] Qing Pan, Aijing Liu, Cheng He. Co-infection of *Ornithobacterium rhinotracheale* with *Streptococcus zooepidemicus* in chickens[J]. Avian Diseases, 2012, 56(4): 680-684
- [13] 陈慧.绵马贯众提取物的体外抑菌作用试验[D].保定:河北农业大学,2007
- [14] Koch R. About the current state of the bacteriological state of cholera[J]. J Hyg Inf, 1893, 14: 319-333
- [15] 王亚宾,陈丽颖,王自振,等.鸡链球菌病原分群鉴定[J].河南农业大学学报,2001,35(4):381-382

责任编辑:苏燕