

合肥野生动物园袋鼠口鼻腔带菌情况调查

张志忠¹,易刚¹,王根红¹,陈鹏²,王瑞²,周祺²,董靖²,王桂军²

(1. 合肥野生动物园,安徽合肥 230031; 2. 安徽农业大学动物科技学院,安徽合肥 230036)

摘要 [目的]对合肥野生动物园袋鼠口腔和鼻腔的带菌情况进行调查。[方法]从袋鼠口腔和鼻腔中分离致病菌,并采用细菌形态学和分子生物学方法对其进行鉴定。选用14种常用抗菌药物,采用纸片扩散法进行药敏试验。[结果]14份袋鼠口腔样本中均分离到革兰氏阳性球菌,其中12只袋鼠口腔分离到葡萄球菌,占85.7%;从4只袋鼠口腔分离到链球菌,占28.5%;从2只袋鼠口腔同时分离到葡萄球菌和链球菌,占14.3%。同时,从14只袋鼠鼻腔中均分离到葡萄球菌。药敏试验结果表明,ZS-1菌株对磺胺类、大环内酯类、喹诺酮类、头孢菌素类、磷霉素类、林可霉素类和四环素类药物敏感。鼻腔中细菌对磷霉素类、喹诺酮类和四环素类药物敏感。口腔中的细菌对14种常用抗菌药物均无耐药性,鼻腔中分离的细菌对卡那霉素、复方新诺明、强力霉素和阿莫西林耐药。[结论]研究结果可为袋鼠口腔和鼻腔细菌感染类疾病的有效防治提供科学依据。

关键词 袋鼠;口腔;鼻腔;致病菌;分离;鉴定;药敏试验

中图分类号 S851.34*7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)21-0103-03

Investigation on the Infection Situations of Bacteria in Oral Cavity and Nasal Cavity of Kangaroo

ZHANG Zhi-zhong, YI Gang, WANG Gen-hong et al (Hefei Wildlife Park, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] To investigate the infection situations of bacteria in oral cavity and nasal cavity of kangaroo. [Method] The pathogen were isolated from the oral cavity and nasal cavity of kangaroo and the isolated strains were identified by using the methods of bacterial morphology identification and molecular biology. 14 kinds of antibacterial drugs were used to make the drug sensitivity test by disk diffusion method. [Result] Gram-positive cocci were isolated from 14 oral cavity samples of kangaroo. Among them, staphylococcus were isolated from the oral cavity samples of 12 kangaroos, which took for 85.7%; streptococcus were isolated from the oral cavity samples of 4 kangaroos, which took for 28.5%. Staphylococcus and streptococcus were simultaneously isolated from the oral cavity samples of 2 kangaroos, which took for 14.3%. And staphylococcus were isolated from the nasal cavity of 14 kangaroos. The drug sensitivity results showed that ZS-1 strain was sensitive to sulfonamides, macrolides, quinolones, cephalosporins, fosfomycin, lincomycin and tetracycline. The isolated pathogen from the nasal cavity were sensitive to fosfomycin, quinolones and tetracycline. The isolated pathogen from the oral cavity had no tolerance to 14 kinds of common antibacterial drugs. The isolated pathogen from the nasal cavity were tolerant to kanamycin, sulfamethoxazole, doxycycline and amoxicillin. [Conclusion] The research results can provide scientific basis for effective prevention and control of bacteriosis in oral cavity and nasal cavity of kangaroo.

Key words Kangaroo; Oral cavity; Nasal cavity; Pathogen; Isolation; Identification; Drug sensitivity test

袋鼠隶属有袋目袋鼠科哺乳动物,原产于澳大利亚,主要以矮小灌木嫩枝叶、柔软植物和青草为食。袋鼠因其较高的观赏性而深受大众喜爱,且养殖相对简单。随着动物园袋鼠养殖基地的发展,袋鼠的饲养数量越来越多,袋鼠相关疾病的防治就变得越来越重要。

在动物园的袋鼠养殖过程中,以口腔、鼻腔和肠道疾病多发。口腔和鼻腔疾病是一种常见的发病率和复发率均高、死亡率偏高的病症。国内大部分动物园圈养的袋鼠都存在这类疾病,给动物园的袋鼠养殖带来较大的危害。关于袋鼠的口腔和鼻腔疾病,国内多个省份都有相关报道。2003年6月四川成都野生动物园的袋鼠群中流行一种以颌部肿胀、牙齿松动、脱落、牙龈糜烂或溃疡为主要特征的口腔炎综合征,发病袋鼠不分性别、品种和年龄,病程往往呈慢性经过,发病率为40%~60%,死亡率为60%~100%^[1]。

袋鼠属于野生动物,保定困难,口腔和鼻腔疾病的发病部位主要在面部,靠近牙齿,给保定工作人员造成了一定的威胁。对于口腔和鼻腔的局部炎症,抗菌药物全身给药方式的疗效不佳,发病后采用口腔和鼻腔局部直接给药方式的药物刺激过大,超过动物的耐受能力,可能给药几天后发生死

亡,同时极易造成异物性肺炎,难以达到理想的治疗效果^[2]。对于袋鼠的口腔和鼻腔类疾病,预防是重中之重,对袋鼠进行常规的口腔和鼻腔菌群检测,掌握口腔和鼻腔菌群情况,定期监测口腔和鼻腔的健康状况是很有必要的^[3]。笔者对合肥野生动物园袋鼠养殖基地14只健康袋鼠进行口腔和鼻腔细菌的分离、鉴定及药敏试验,旨在为合肥野生动物园袋鼠牙病的预防和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物 以合肥野生动物园袋鼠养殖基地14只袋鼠为试验动物,年龄为1~8岁。通过观察袋鼠的精神状况、食欲、牙齿松动情况及口腔内部、鼻腔内部破损情况,确定14只袋鼠健康状况均良好,袋鼠基本情况见表1。

表1 袋鼠基本情况

Table 1 The basic situations of kangaroo

编号 No.	年龄 Age//岁	性别 Sex	编号 No.	年龄 Age//岁	性别 Sex
1	1	母	8	8	公
2	1	母	9	5	母
3	1	公	10	4	母
4	3	母	11	5	公
5	5	公	12	5	母
6	7	母	13	6	公
7	6	公	14	5	母

1.2 试剂 革兰氏染色液,购自北京索莱宝科技有限公司;

基金项目 合肥野生动物园科研专项。
作者简介 张志忠(1973—),男,安徽来安人,高级兽医师,从事野生动物疾病防治工作。
收稿日期 2017-06-20

PBS 缓冲液、血琼脂平板培养基、辅酶琼脂平板培养基、普通营养琼脂平板培养基、LB 液体培养基均由安徽农业大学预防兽医学实验室配制;氧氟沙星、卡那霉素、新霉素等抗菌药物药敏纸片,均购自杭州微生物有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集。用灭菌 PBS 缓冲液浸润过的灭菌棉拭子,采集袋鼠口腔、鼻腔拭子,口腔拭子依次编号为 K1 ~ K14,鼻腔拭子依次编号为 B1 ~ B14,将棉拭子置于灭菌 EP 管内,冰盒保存带回实验室。

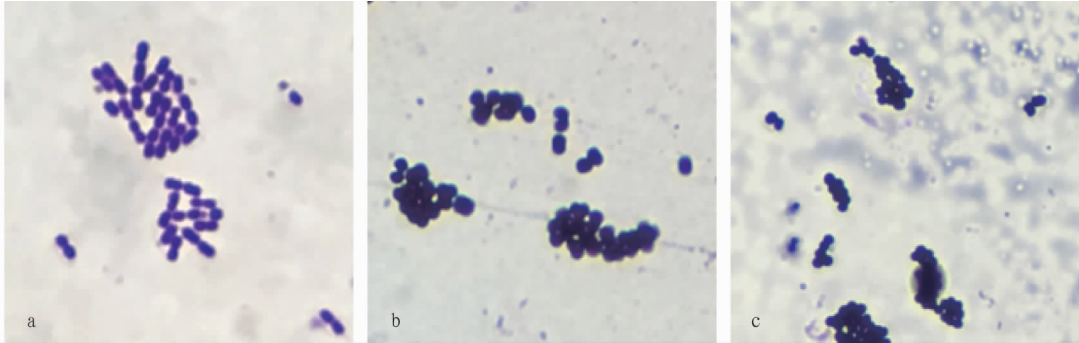
1.3.2 细菌的分离与鉴定。无菌条件下,将 EP 管内棉拭子取出,涂于辅酶板表面,用灭菌接种环 4 区划线,37 ℃ 下培养 16 h 后,观察菌落生长情况。对培养的菌落进行纯化、染色并镜检,置于显微镜下观察其形态。对纯化的菌株进行 16S rDNA 检测,设计了 1 对 16S rDNA 通用引物:AGAGTTT-

GATCCTGGCTCAG (F) 和 ACGGCTACCTTGTTACGACTT (R),目的条带大小为 1 500 bp。对纯化的细菌进行细菌 16S PCR 检测,将检测样品送交上海桑尼深生物公司测序,将测序结果与 NCBI 网站参考序列进行同源性比对分析。

1.3.3 药敏试验。在琼脂培养基上用灭菌接种环致密划线法接种病原菌,然后将 14 种常见抗菌药物药敏纸片紧贴于培养基上,37 ℃ 下培养 16 h 后测定抑菌圈直径^[4]。

2 结果与分析

2.1 口腔鼻腔带菌情况 从 14 只袋鼠口腔均分离到革兰氏阳性球菌,经初步鉴定 14 份袋鼠口腔样本中均分离到革兰氏阳性球菌。其中,从 12 只袋鼠口腔分离到葡萄球菌,占 85.7%;从 4 只袋鼠口腔分离到链球菌,占 28.5%;从 2 只袋鼠口腔同时分离到葡萄球菌和链球菌,占 14.3%;同时,从 14 只袋鼠鼻腔中均分离到葡萄球菌(图 1)。



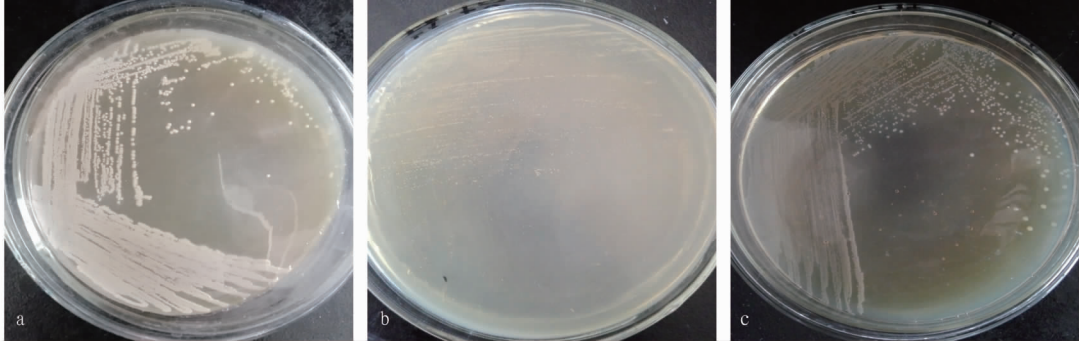
注:a. 从口腔分离的链球菌;b. 从口腔分离的葡萄球菌;c. 从鼻腔分离的葡萄球菌
Note:a. Streptococcus isolated from oral cavity;b. Staphylococcus isolated from oral cavity;c. Staphylococcus isolated from nasal cavity

图1 袋鼠口腔鼻腔带菌情况

Fig.1 The infection situations of bacteria in the oral cavity and nasal cavity of kangaroo

2.2 细菌纯化培养 ①口腔分离的 G⁺ 球菌,命名为 ZS - 1,纯化后辅酶板上可见圆形凸起、边缘整齐、表面光滑、湿润、不透明、奶油闪光的菌落,结合镜检结果,疑似葡萄球菌(图 2a)。②口腔分离的 G⁺ 链状菌,命名为 ZS - 2,纯化后辅酶板上可见圆形凸起、边缘整齐、表面光滑、湿润、不透明、奶油

闪光针尖大的细小菌落,结合镜检结果,疑似链球菌(图 2b)。③鼻腔分离的 G⁺ 球菌,命名为 ZS - 3,纯化后辅酶板上可见圆形凸起、边缘整齐、表面光滑、湿润、不透明、奶油闪光的菌落,结合镜检结果,疑似葡萄球菌(图 2c)。



注:a. 菌株 ZS - 1;b. 菌株 ZS - 2;c. 菌株 ZS - 3
Note:a. ZS - 1 strain;b. ZS - 2 strain;c. ZS - 3 strain

图2 分离菌株的纯化培养

Fig.2 The purification and culture of isolated strains

2.3 细菌 16S rDNA 鉴定 3 个菌株分别通过 16S rDNA 通用引物进行特异性 PCR 扩增后,进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果发现 3 个菌株的 DNA 大小均约为 1 500 bp。将测

得的序列与 NCBI 网站上公布的链球菌、葡萄球菌参考菌株的 16S rDNA 基因序列进行同源性比对,比对结果见表 2 ~ 4。

由表 2~4 可知,ZS-2 菌株与已公布的多株链球菌具有高度同源性,ZS-1 菌株与已公布的多株葡萄球菌具有高度同源性,ZS-3 菌株与已公布的多株葡萄球菌具有高度同源性。

表 2 ZS-1 菌株 16S rDNA 与参考菌株的同源性比对结果
Table 2 The homology analysis results of 16S rDNA between ZS-1 strain and reference strains

菌株 Strains	NCBI 登录号 NCBI accession number	分离日期 Isolation date	同源性 Homology // %
OS-58	AM237362.1	2010-01-05	99
H8h3	NR044926.1	2011-08-08	99
R16086	NR029056.1	2009-10-06	99
TM4-2	DQ279392.1	2002-06-10	99

表 3 ZS-2 菌株 16S rDNA 与参考菌株的同源性比对结果
Table 3 The homology analysis results of 16S rDNA between ZS-2 strain and reference strains

菌株 Strains	NCBI 登录号 NCBI accession number	分离日期 Isolation date	同源性 Homology // %
ATCC 33477	NR115276.1	2014-04-23	99
8S1	NR036845.1	2010-10-26	99
8S1	NR114852.1	2001-11-16	99
HD3	AJ420196.1	2002-11-07	99

表 4 ZS-3 菌株 16S rDNA 与参考菌株的同源性比对结果
Table 4 The homology analysis results of 16S rDNA between ZS-3 strain and reference strains

菌株 Strains	NCBI 登录号 NCBI accession number	分离日期 Isolation date	同源性 Homology // %
LD33	CP014949.1	2016-03-28	99
976-B12	KU644546.1	2016-01-30	99
939-B6	KU644510.1	2012-09-04	99
Fbe-8	KJ888119.1	2014-05-26	99

2.4 药敏试验 药敏试验结果表明,分离菌株对 14 种抗菌药物有不同程度的耐药性(表 5)。

3 讨论

袋鼠口腔与鼻腔的细菌主要侵害袋鼠的头部软组织和骨组织以及下颌等面部组织器官,袋鼠面部的管道、开孔较多,口腔和鼻腔一旦发病,极易扩散,可能会危及整个面部,甚至是脑组织。病原寄居于袋鼠口腔和鼻腔,是条件性致病菌,当口腔内牙龈、舌或鼻腔出现创伤时即会感染发病;发病无年龄和性别差异,一年四季都可发病。

袋鼠是动物园圈养的观赏性动物,在入园时若不适应环境,会造成自身的抵抗力降低,口腔和鼻腔中的菌群失调,条件性致病菌趁机而入,引发感染。袋鼠不能定期清理口腔,饲料中含有的糖分过高则极易形成龋齿,食物残渣进入龋齿后引发感染;日粮中摄入的钙不足,容易造成骨质疏松,会引起牙齿的松动脱落,牙齿间缝隙变大,食物残渣进入牙缝中后引起感染^[5]。若动物园不定期检查袋鼠口腔健康状况,则难以及时发现口腔和鼻腔疾病。

表 5 3 株分离菌株的药敏试验结果
Table 5 The drug sensitivity test results of three isolated strains

序号 No.	抗菌药物 Antibacterial drugs	分离菌株 Isolated strains		
		ZS-1	ZS-2	ZS-3
1	新霉素	H	M	L
2	复方新诺明	H	H	R
3	克林霉素	H	H	R
4	氧氟沙星	H	H	H
5	恩诺沙星	H	H	H
6	磷霉素	H	H	H
7	林可霉素	H	H	—
8	强力霉素	H	H	H
9	卡那霉素	M	R	R
10	万古霉素	M	H	L
11	青霉素	M	H	M
12	头孢曲松	M	H	M
13	头孢他啶	L	H	L
14	阿莫西林	L	L	R
15	强力霉素	—	—	R

注:H 表示高度敏感;M 表示中度敏感;L 表示低度敏感;R 表示耐药
Note:H stands for highly sensitive;M stands for moderately sensitive;L stands for lowly sensitive;R stands for resistant

发病袋鼠在疾病早期主要表现为局部性的炎症,如鼻炎、牙周炎、牙髓炎、上下颌及周围组织的巨灶性脓肿等,袋鼠口腔和鼻腔疾病在发病初期治疗效果明显,愈后良好。但随着病程的发展,动物采食困难,食欲饮欲废绝,机体营养衰竭,抵抗力持续下降。致病菌进一步扩散可转化为全身性败血症,表现为急性下颌淋巴结炎、急性脾炎、卡他性胃肠炎、急性肠炎、支气管炎、肺炎和肝、肾、心等实质性器官变性、坏死^[6],后期继发、并发其他感染,感染扩散,治疗困难,预后不良。

对于该病的预防应首先从饲养管理着手,注意新鲜草料和干硬饲料的合理搭配,防止口腔外伤,保证袋鼠的口腔健康。保证袋鼠圈舍的清洁卫生,定期消毒,消灭环境中的致病菌,创造一个舒适的生存环境。定期检查袋鼠的口腔和鼻腔健康状况,对于发病的袋鼠应尽早进行治疗,结合药敏试验选择高敏药物进行科学治疗。当疾病暴发时,可以针对致病菌对全种群进行药物免疫。

参考文献

[1] 耿毅,汪开毓,熊焰. 袋鼠口腔炎综合征的病理学观察[J]. 中国兽医杂志,2004,40(10):31.
[2] 谢建豪,沈志武,赖文凤. 尤氏袋鼠副鼻窦蓄脓的防治[J]. 中国兽医杂志,2009,45(12):53-54.
[3] 程家球,邓长林,陈楠,等. 袋鼠“粗颌病”及继发症的探讨[J]. 中国畜牧兽医文摘,2014,30(3):169.
[4] 黄钧,温华成,施金谷,等. 黄颡鱼体表溃疡病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报,2012,43(1):107-112.
[5] 邵俊峰. 袋鼠口腔疾病的诊治[J]. 动物医学进展,2008,29(S1):83-84.
[6] 黄勉,陈洪汉,蔡勤辉,等. 袋鼠口腔炎综合征的病原分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志,2001,37(1):25.