

1 株羊链球菌的分离鉴定及药敏试验

马文学

青海省大通县城关镇畜牧兽医站,青海大通 810102

摘要 从青海省大通县城关镇某羊场病死羊肺脏、脾脏、肝脏等病料中分离得到 1 株细菌,经对分离菌的形态、培养特性和菌株革兰氏染色观察以及生化试验鉴定,结合发病羊临床症状、病理剖检变化,判定该分离菌为链球菌。通过 K-B 药敏纸片法进行病原菌耐药性检测,结果表明该病原菌对头孢噻吩、头孢他定、阿奇霉素以及磺胺间甲氧嘧啶高度敏感,对其他药物表现出不同程度的耐药性。

关键词 羊;链球菌;病原菌分离;生化鉴定;药敏试验

链球菌广泛分布于自然界,革兰氏染色阳性,临床上可分为 α 型、 β 型溶血链球菌和 γ 型链球菌 3 种^[1],该菌能够感染人和多种动物,羊链球菌病是由溶血性链球菌引起的一种以病羊高热、下颌淋巴结和咽喉肿胀、全身性出血性败血症为主要特征的急性、热性传染病。近些年,在西宁地区由溶血性链球菌引起羊只发病的情况呈多发趋势,尤以青饲料缺乏、羊只抵抗力下降的冬春寒冷季节高发,呈地方性流行或散发^[2]。本试验对大通县城关镇某羊场病死羊采样进行病原菌的分离培养与鉴定以及药敏试验研究,现报告如下。

1 发病情况

2020 年 3 月,西宁市大通县城关镇某羊场 2 月龄山羊突然发病,患病羊发热、不食,咽喉部肿胀、呼吸急促、眼结膜充血,鼻腔有脓性分泌物流出,60 只山羊中死亡 3 只,对病死羊剖检发现以败血性病变为主,主要脏器广泛性出血,颌下淋巴结水肿、咽喉部水肿,胆囊肿大,肝脏、脾脏和肾脏有出血点,肺实质出血,纤维性肺炎。取病死羊肺脏、肾脏、淋巴结等作病料进行病原分离鉴定与药敏试验。

2 材料与方法

2.1 材料

1)病料。无菌采取大通县城关镇某羊场病死羊

肺脏、脾脏、肝脏、淋巴结等病变器官和组织作病料。

2)主要试剂。鲜血营养琼脂平板(本试验自制);麦康凯培养基(购自青岛海博生物技术有限公司);革兰氏染液、微量生化反应管以及药敏纸片(购自杭州滨和微生物试剂有限公司)。

2.2 方法

1)菌株的分离培养。将病料接种在鲜血营养琼脂平板上,37 °C 恒温培养 24 h,观察菌落形态和培养特性,并挑取单个菌落接种于麦康凯培养基上进行纯化培养(37 °C 培养 24 h),观察菌株生长情况,同时将纯培养物涂片,革兰氏染色镜检。

2)生化鉴定。将分离出的菌株接种于细菌微量生化反应管中,37 °C 恒温培养 24~36 h,观察菌株生化试验结果。

3)药敏试验。参照美国临床实验室标准化委员会(NC-CLS),通过 K-B 纸片扩散法^[3]对病原菌进行药物敏感性试验和结果判定。在血平板上均匀涂布培养过夜的菌液,再贴上药敏纸片,经 37 °C 培养 48 h 后测量抑菌圈直径(Φ)。 $\Phi > 15$ mm:高度敏感(S), $\Phi < 10$ mm:耐药(R), 10 mm $\leq \Phi \leq 15$ mm:中度敏感(I)。

3 结果

1)病原菌培养特性和革兰氏染色结果。病料在

收稿日期:2020-11-19

马文学,男,1963 年生,兽医师。

鲜血营养琼脂平板培养 24 h 后出现边缘整齐的小菌落呈露珠样,有明显 α 溶血,菌株在麦康凯培养基上不生长,培养物经革兰氏染色镜检可见短链状排列的圆形或卵圆形革兰氏阳性球菌。

2) 菌株生化试验结果。由该分离菌株生化特性的鉴定结果(表 1)可知,在糖发酵试验中,该病原菌分解麦芽糖、葡萄糖,产酸产气(“+”表示产酸,“-”表示不产酸),分解乳糖、蔗糖、果糖,在其他生化试

验中,山梨醇试验、MR 试验和硝酸盐还原试验阳性(“+”表示阳性),甘露醇试验、V-P 试验等为阴性(“-”表示阴性),与链球菌的生化特性基本相符。

3) 药敏试验结果。通过对分离菌株进行药物敏感性试验(表 2)可知,分离菌株对头孢噻吩、头孢他定、阿奇霉素以及磺胺间甲氧嘧啶高度敏感,对庆大霉素、环丙沙星中度敏感,对青霉素、链霉素、氟苯尼考、诺氟沙星、阿莫西林、红霉素呈耐药性。

表 1 分离菌株生化鉴定结果

项目	结果	项目	结果	项目	结果
葡萄糖	+	乳糖	+	蔗糖	+
果糖	+	麦芽糖	+	山梨醇	+
七叶苷	-	甘露醇	-	精氨酸	-
V-P 试验	-	MR 试验	+	硝酸盐还原	+

表 2 分离菌株药敏试验结果

抗菌药物	抑菌圈直径/mm	敏感性	抗菌药物	抑菌圈直径/mm	敏感性
青霉素	5	R	链霉素	7	R
头孢噻吩	23	S	阿奇霉素	19	S
阿莫西林	6	R	庆大霉素	11	I
红霉素	9	R	磺胺间甲氧嘧啶	20	S
环丙沙星	12	I	诺氟沙星	9	R
四环素	5	R	头孢他定	21	S

4 讨 论

1) 通过对大通县城关镇某羊场病死羊进行细菌学检查初步诊断为链球菌感染,进一步对分离菌株进行生化试验鉴定,结果显示该病原菌与链球菌的生物学特性基本相符,结合发病羊临床症状、病理剖检变化,最终判定该分离菌为链球菌。通过药敏试验研究,结果显示链球菌对头孢噻吩、头孢他定、阿奇霉素以及磺胺间甲氧嘧啶高度敏感,为临床治疗用药提供了参考依据。

2) 该养殖场发生羊链球菌病与气候寒冷、青饲料缺乏、养殖环境恶劣等因素密切相关,尤其是羊只抵抗力下降时极易诱发本病,且病死率较高,为此在本病多发的冬春季节要改善羊群养殖环境,供给营养丰富的饲料,强化保暖措施,定期消毒并做好免疫接种工作,每年秋季,大小羊均皮下注射羊链球菌氢氧化铝甲醛灭活苗 3 mL/只,3 月龄内羔羊于 2 周后加强免疫 1 次^[4]。

3) 近些年,抗生素的大量使用致使链球菌耐药

种类与范围的扩增现象较为严重,这已被本次药敏试验所证实,通过对分离菌进行药物敏感性试验得知,菌株对本应高度敏感的青霉素等抗菌药物具有耐药性,为此养羊场(户)要摒弃凭借经验使用抗菌药物防治羊病的做法,严格遵守抗菌药物的用量,注意药物的轮换使用,从而最大限度延缓耐药菌的产生。同时,相关部门应加强抗生素类用药的管理,加大可取代抗生素的新型制剂的研发力度,成为今后高效防控羊链球菌病的重点工作任务。

参 考 文 献

[1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2013.
 [2] 麻文林. 青海高原地区羊链球菌病流行病学调查与综合防治[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2018, 34(6): 218.
 [3] 达热玛. 羊链球菌的鉴定与药敏试验 [J]. 中兽医学杂志, 2017 (6): 49.
 [4] 祝加红. 中西医结合治疗羊链球菌病 [J]. 兽药市场指南, 2020 (2): 36, 50.