

兔葡萄球菌的分离与鉴定

陈艳会¹ 李旭² 胡昭伟¹

1. 辽宁省锦州市太和区营盘动物卫生监督所, 辽宁锦州 121000;

2. 辽宁省营口市鲅鱼圈区动物卫生监督所, 辽宁营口 115007

摘要 本试验采集 10 只临床型病死兔的病料, 采用常规微生物学方法进行病原菌的分离与鉴定, 10 个病样分离得到 8 株金黄色葡萄球菌, 同时对分离的 8 株金黄色葡萄球菌进行了药物敏感性试验。

关键词 兔; 化脓性; 葡萄球菌; 分离与鉴定; 药敏试验

兔对金黄色葡萄球菌极易感, 可通过皮肤损伤或经毛囊、汗腺感染, 可引起转移性脓毒血症; 仔兔可经脐带损伤而感染; 饲养条件较差, 潮湿, 通风、光照不足, 由飞沫、尘埃经呼吸道也可感染; 仔兔吃病兔的乳汁亦可感染发病等。金黄色葡萄球菌也是临床上最难治疗、造成经济损失最大的致病菌。根据兔感染部位和致病菌在体内扩散的情况不同, 而表现不同的病型。如脓肿型、脚皮炎型、乳房炎型、呼吸道感染、仔兔急性肠炎等, 给兔养殖业带来了严重的经济损失。2016 年 10 月, 辽西某兔场兔在分娩 2~5 d 后出现体温升高、食欲和饮欲废绝, 乳房肿胀、发红, 甚至呈紫色, 乳汁中有脓液或带状血丝。有的乳房皮下或实质形成大小不一、界限明显的坚硬结节, 结节逐渐软化在皮肤上变为栗粒大的脓肿, 病情严重的成兔死亡 5 只。吮吮母兔乳汁的仔兔, 全窝发病, 死亡率高, 急性肠炎症状。根据临床症状采集病兔和死兔病料样品共 10 份, 分别对其病原进行分离与鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 病料来源与采集。从辽西某规模化发病兔场选取临床型乳房炎病兔和肠炎型病兔病例 10 只, 采样前先用温水清洗乳房, 然后用 75% 酒精棉消毒乳头, 再用消毒纱布擦干。采样乳区弃去前几下乳, 严格按照无菌操作规程方法采集患病兔奶样 10 mL, 装

入经高压灭菌的采样用三角烧瓶中, 病死兔无菌采集心包液及腹腔积液于经高压灭菌的采样用三角烧瓶中, 分别置于 0~4 ℃ 的冰箱中保存备用, 36 h 内进行细菌的分离培养。

2) 主要仪器设备。生物安全柜、显微镜、恒温培养箱、高压蒸汽灭菌器等。

3) 试剂及培养基。生化试剂: 甘露醇、过氧化氢酶、兔血浆; 培养基: 普通肉汤培养基、普通琼脂培养基、鲜血琼脂平板培养基、三糖铁琼脂培养基; 药敏试验药品: 新型青霉素、异噁唑类青霉素、环丙沙星、氟苯尼考、林可霉素、红霉素、氧氟沙星、卡那霉素、庆大霉素、磺胺嘧啶钠、头孢噻肟钠、头孢拉定共 12 种药物。

1.2 方法

1) 细菌的分离培养。

① 分离培养。将被检样品摇匀, 无菌条件下分别接种于普通肉汤培养基中, 之后置于恒温培养箱中, 37 ℃ 培养 24~48 h; 取培养后普通肉汤培养物进行观察, 并记录结果, 同时分别划线接种于鲜血琼脂平板培养基、普通琼脂培养基, 将接种后的平板培养基置于培养箱中, 37 ℃ 培养 24~48 h。

② 染色镜检。挑取金黄色、溶血或甘露醇阳性菌, 涂片, 革兰氏染色, 在光学显微镜下观察细菌的形态及染色特点。依据细菌形态、排列、菌落特点、是否溶血及染色特性初步判别细菌类属, 同时根据初步结果进行相应的纯化培养。

2) 细菌的生化试验。将纯培养后无杂菌者保存于普通琼脂斜面培养基内, 并通过生化试验进一步鉴定细菌类属。将纯化的菌种分别接种于甘露醇发酵试管中, 置于 37 °C 培养 24 h, 观察分解甘露醇的情况; 同时分别接种三糖铁琼脂斜面培养基, 置于 37 °C 培养 24 ~ 48 h, 然后进行生化鉴定; 并进行过氧化氢酶试验, 将 1 mL 3% 过氧化氢倾注于普通琼脂平板上生长的菌落中, 观察有无气泡产生, 出现气泡为阳性。

3) 试管法血浆凝固酶试验。将 1 : 10 的兔血浆或羊血浆 1 mL, 置于清洁的小试管中, 加入 5 ~ 10 滴肉汤培养物或细菌悬液, 摇匀, 置 37 °C, 定时观察 6 h, 如呈现胶冻样则为阳性。

4) 细菌的药物敏感性试验。将经过以上鉴定为金黄色葡萄球菌的菌株, 用普通肉汤培养基增菌培养 16 h 后, 在无菌条件下, 均匀接种于营养琼脂平板培养基上, 用镊子将药敏纸片放置于接种后的营养琼脂培养基表面, 之后置于恒温培养箱, 37 °C 培养 24 h 后进行观察, 同时测量抑菌圈直径并记录抑菌结果。

2 结果与分析

1) 细菌分离培养结果。普通琼脂平板形成湿润、光滑、隆起的圆形菌落。直径 1 ~ 2 mm, 菌落颜色初呈灰白色, 之后变成金黄色、白色或柠檬色。血琼脂平板形成的菌落较大, 菌落周围形成明显的 β 溶血环。普通肉汤中生长迅速, 开始浑浊, 继而形成沉淀, 培养 2 ~ 3 d 后在管壁形成薄菌环。挑取培养物或典型菌落涂片、革兰染色镜检, 在光学显微镜视野中可见革兰氏阳性球菌, 无鞭毛、芽孢和荚膜, 单个、成对或葡萄串状排列。

2) 生化试验结果。对采集的 10 份被检病样进行细菌分离培养和鉴定, 检出 8 个菌株分解甘露醇产酸, 并且过氧化氢酶试验出现气泡, 故判为阳性。这 8 个菌株的生化特性符合金黄色葡萄球菌的特性, 故判定为金黄色葡萄球菌。

3) 3 种葡萄球菌的鉴别。多数致病性金黄色葡萄球菌的主要特点是产生金黄色色素, 过氧化氢酶及凝固酶试验为阳性, 有溶血性, 发酵甘露醇产酸不产气(表 1)。

表 1 3 种葡萄球菌的鉴别

菌种	过氧化氢酶试验	三糖铁培养基		
		底部变黄	有氧条件下	厌氧条件下
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+
表皮葡萄球菌	-	+	±	-
腐生葡萄球菌	-	-	±	-

注: ± 表示有些菌株为阳性, 有些菌株为阴性。

4) 药物敏感性试验结果。本试验采用 12 种药物对经分离鉴定得到的 8 株菌株进行药物敏感性试验, 分离的金黄色葡萄球菌对大多数药物呈现不同程度的耐药性, 对常用的环丙沙星、庆大霉素、磺胺嘧啶钠耐药严重, 但新型青霉素、异噁唑类青霉素、林可霉素、头孢噻肟钠对分离菌株具有良好的抑菌作用, 其他试验药物抑菌圈直径也较小, 属于中度敏感。

3 防治方法

由于葡萄球菌广泛存在于自然界, 动物的带菌率很高, 所以养殖场要加强饲养管理, 经常对兔笼、

兔舍进行清洗消毒, 同时保持运动场的清洁卫生, 清除一切锋利物品如钉子、木屑、尖刺等, 避免兔体创伤。一旦发现创伤, 及时进行外科处理。加强饲养管理, 注重隔离分群, 防止拥挤, 把喜咬好斗的兔分开饲养。母兔笼内要用柔软、清洁、干燥的垫草, 以免擦伤新生仔兔的皮肤, 发现创伤及时消毒处理, 认真做好新生仔兔的脐带消毒。

抗菌疗法: 新型青霉素、异噁唑类青霉素、林可霉素、头孢噻肟钠任选 1 种, 也可二者配合使用, 10 ~ 15 mg/kg, 肌肉注射, 每日 2 次, 连用 4 d。局部脓肿与溃疡进行外科处理, 涂擦 5% 碘酊。