

猪沙门氏菌的分离鉴定及药敏试验

魏静萍

云南省红河州蒙自市芷村镇农业综合服务中心,云南芷村 661102

摘要 从猪粪中分离引起仔猪副伤寒的病原菌并对该病原菌进行鉴定和药物敏感性测定。通过细菌培养、形态鉴定、生理生化试验、糖发酵试验,并参照《常见细菌系统鉴定手册》鉴定得到引起仔猪副伤寒的病原菌为甲型副伤寒沙门氏菌。通过药敏试验,得到该分离菌对头孢噻吩(抑菌圈 24 mm)和头孢唑啉(抑菌圈 18 mm)敏感性最强;最不敏感的是诺氟沙星(抑菌圈为 3 mm)。

关键词 甲型副伤寒沙门氏菌;分离鉴定;药敏试验

沙门氏菌广泛分布于自然界中,常可在各种动物,如猪、牛、羊、马等家畜及鸡、鸭、鹅等家禽,飞鸟鼠类等野生动物的肠道中发现。鸡是沙门氏菌最大的储存宿主,各种年龄的畜禽均可感染,但幼年畜禽较易感。如猪以 1~4 月龄仔猪发病较多,羊以断乳或断乳不久羊最易感,感染的孕畜多发生流产^[1]。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

病料采自蒙自市芷村镇某规模化养殖场。将发病猪只的粪便无菌采集后带回实验室保存在 4 ℃ 的冰箱中备用。

1.2 培养基

1)普通培养基。牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,水 1 000 mL,pH 7.1~7.4。

2)三糖铁培养基。蛋白胨 20 g,牛肉浸粉 5 g,氯化钠 5 g,乳糖 10 g,葡萄糖 1 g,蔗糖 10 g,酚红 0.025 g,硫酸亚铁 0.2 g,硫代硫酸钠 0.2 g,琼脂 12 g。

3)明胶液化培养基。蛋白胨 5 g,明胶 100~150 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2~7.4。

4)柠檬酸盐培养基。柠檬酸钠 0.2 g,K₂HPO₄ 0.05 g,NH₄NO₃ 0.2 g,琼脂 1.5~2.0 g,1%酒精溶液,水 100 mL。

1.3 主要试剂

1)结晶紫。溶液 A:结晶紫 2.5 g,95%乙醇 25 mL。溶液 B:草酸铵 1.0 g,蒸馏水 100 mL。

将结晶紫研细后,加入 95%乙醇使之溶解,配成 A 液;将草酸铵溶于蒸馏水配成 B 液,两液混合即成。

2)卢哥氏碘液。碘 1.0 g,碘化钾 2.0 g,蒸馏水 300 mL。

先将碘化钾溶解在一小部分的蒸馏水中,再将碘溶解在碘化钾溶液中,然后加入其余的蒸馏水即成。

3)番红染色液。番红 2.0 g,蒸馏水 100 mL。

4)甲基红指示剂。甲基红 0.02 g,95%乙醇 60 mL,水 40 mL。配时先将甲基红溶于乙醇后再加水。

1.4 试验方法

1.4.1 细菌分离培养及纯化

先将采来的病料涂片,革兰氏染色后,初步检验是否有沙门氏菌。再进行前增菌和选择性增菌,

收稿日期:2015-01-12

魏静萍,女,1978 年生,兽医师。



定牛奶中的诺氟沙星和氧氟沙星残留 [J]. 应用化工,2013(1): 169-173,178.
[5] 饶勇,曾振灵,杨桂香,等.液相色谱-质谱联用检测牛奶中氟喹诺酮类药物残留的确证方法 [J]. 中国农业科学,2007(5):

170-178.
[6] 诺氟沙星注射液说明书[Z],2014.
[7] 中华人民共和国药典[S].卫生部发布公告(2012 年第 12 号), 2012-07-05.

然后将选择性增菌的菌液划线接种到分离培养基中进行培养,挑取可疑菌落进行革兰氏染色,染色后挑取革兰氏染色为红色、短杆状的菌落进行纯化培养。重复上述步骤,直至革兰氏染色镜检细菌形态一致。

1.4.2 细菌形态鉴定

1)革兰氏染色。首先图片固定:在载玻片上制薄的涂面,让涂片自然晾干或通过火焰 2~3 次固定;其次结晶紫染色:将玻片置于废液缸玻片搁架上,加适量(以盖满细菌涂面)的结晶紫染色液染色 1 min,倾去染色液,用水小心地冲洗;再次媒染:滴加革兰氏碘液,媒染 1 min 后用水洗去碘液,再将玻片倾斜,连续滴加 95%乙醇通过涂面脱色 20~25 s 至流出液无色,立即水洗;最后复染:滴加番红复染 3~5 min,用水洗去涂片上的番红染色液,将染好的涂片放空气中晾干或用吸水纸吸干即可。

2)镜检。挑选形态典型的单个菌落,进行革兰氏染色,放到显微镜下观察,菌体被革兰氏染色染成紫色的为阳性,染成红色的为阴性。

1.4.3 生理生化鉴定

将分离得到的革兰氏染色为阴性细菌做各种糖发酵试验。再进一步做生化试验,如过氧化氢试验、柠檬酸盐试验、产硫化氢试验、明胶液化试验、乙酰甲基醇试验、苯丙氨酸试验等。根据《常见细菌系统鉴定手册》来确定所属的种。

1.4.4 药敏试验

将培养好的细菌用涂布法涂在培养皿上,并把各种药敏片做标记后放在该培养皿中,待培养 24 h 之后观察结果。观察抑菌圈的大小,用抑菌圈大小判定各种药敏片对细菌的敏感程度。

1.4.5 菌种保存鉴定

将分离到的甲型副伤寒沙门氏菌球菌,经普通的液体培养基培养后,按菌液:20%甘油=1:1 的比例混合,置于 -20 ℃ 的冰箱中。

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态特征

在煌绿磺胺嘧啶培养基上,菌落为圆形,平板

形成湿润、表面光滑、边缘整齐、呈淡黄色透明的、中央有凸起的菌落,同时在培养过程中培养基的颜色由红色变成了黄色(图 1)。沙门氏菌在显微镜下一般观察到的是呈杆状的,两端成椭圆形的,经革兰氏染色后为红色,是革兰氏阴性(图 2)。



图 1 甲型副伤寒沙门氏菌体菌落图

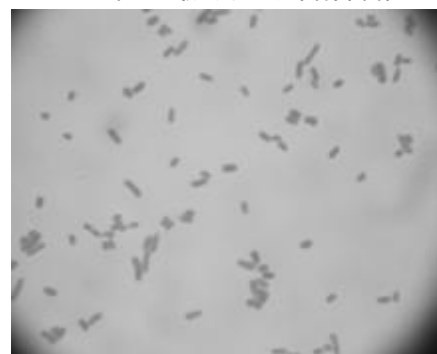


图 2 甲型副伤寒沙门氏菌体形态图

所分离沙门氏菌的形态特征:菌落直径约在 0.5~1.5 mm 之间,凸起,圆形,光滑,淡黄色,细菌为圆形,通常都以周身鞭毛运动、无芽孢、无荚膜的直杆菌。

2.2 病原菌属特性的分析与鉴定

对从猪粪中分离得到的病原菌进行属的鉴定,由表 1 可以看出,过氧化氢酶试验为阳性,革兰氏染色试验、柠檬酸盐试验、产硫化氢试验、明胶液化试验、乙酰甲基醇试验、本丙氨酸试验等均为阴性,根据形态特征和常规的生理生化鉴定结果,试验分离出的细菌确定为沙门氏菌属。

2.3 病原菌发酵特性的分析

将分离得到的沙门氏菌属的菌株,做进一步的糖发酵试验,试验结果如表 2,参照《常见细菌系统鉴定手册》进行种的鉴定,可得出所分离的沙门氏菌是甲型副伤寒沙门氏菌。

表 1 分离细菌的生理生化试验结果

试验项目	革兰氏染色	过氧化氢酶试验	乙酰甲基醇试验	本丙氨酸试验	柠檬酸盐试验	产硫化氢试验	明胶液化试验
MZ-1	-	+	-	-	-	-	-

注:+ 为阳性反应,- 为阴性反应,下同。

表 2 分离株的糖发酵试验结果

试验项目	葡萄糖	甘露醇	山梨醇	阿拉伯糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖
MZ-1	+	+	+	+	+	-	-

表 3 药敏试验抑菌圈的平均直径

mm

试验项目	头孢唑啉	头孢噻吩	万古霉素	红霉素	氯霉素	青霉素	四环素	苯唑西林	甲氧苄啶	若氟沙星
MZ-1	18.0	24.0	6.5	7.6	8.0	7.3	8.3	12.5	10.4	3.0

表 4 药敏试验敏感度分析

试验项目	头孢唑啉	头孢噻吩	万古霉素	红霉素	氯霉素	青霉素	四环素	苯唑西林	甲氧苄啶	若氟沙星
MZ-1	+++	+++	+	+	+	+	+	++	++	-

2.4 病原菌药敏试验结果

参照美国临床实验室标准委员会 1994 年制定的抗生素敏感度判断标准(NCCLS1994)判断抑菌结果。抑菌圈直径 >15 mm 为高敏感度抑菌作用,用“+++”表示;10 mm< 抑菌圈直径 <15 mm 为中敏感度抑菌作用,用“++”表示;抑菌圈直径 <10 mm 为低敏感度抑菌作用,用“+”表示;抑菌圈直径 <5 mm 的为无抑菌作用,用“-”表示。

由表 3 可知,分离的到的沙门氏菌对头孢唑啉和头孢噻吩敏感度高,对苯唑西林和甲氧苄啶中度敏感,对于四环素、红霉素、氯霉素、青霉素和万古霉素敏感度低,而对于若氟沙星不敏感。评估结果见表 4。

3 讨论

3.1 分离培养基的选择

从不同的基质中分离沙门氏菌时,据沙门氏菌的生长环境条件以及它在不同培养基上生长的情况进行培养基各种组分的选择。对于沙门氏菌的分离,较多的人是选择麦康凯琼脂培养基、SS 营养琼脂培养基和伊红美蓝营养琼脂培养基培养细菌^[2]。在 SS 琼脂平板培养基上可观察到无色半透明菌落,部分菌落中间带黑色,在麦康凯培养基上观察到菌落呈透明无色、圆形凸起、湿润的菌落。本试验所用的培养基是煌绿磺胺嘧啶琼脂培养基,在培养基上可以观察到表面光滑、边缘整齐、呈淡黄色透明的、中央有凸起的菌落,最主要的是在培养过程中培养基的颜色由红色变成了黄色,这是沙门氏菌培养最显著的特点。

3.2 细菌的分离鉴定

细菌的分离鉴定方法很多,可以是常规的细菌分离鉴定,也可以是分子生物学的鉴定,包括 DNA 测定、PCR 技术、血清鉴定等现代技术。较多的人是

采用分子鉴定方法,PCR 技术对检测猪沙门氏菌具有特异性高、灵敏、快速等特点,适用于快速、准确地检测猪伤寒沙门氏菌,是一种快速简便、灵敏特异检测沙门氏菌的方法^[3]。用 PCR 技术检测猪个体中的伤寒沙门氏菌,结果具有高度的特异性和敏感性。但唯一的缺点是得不到纯培养的细菌^[4]。本试验是用常规细菌分离鉴定方法,这一方法包括了前增菌、选择性增菌、分离培养、纯化培养、生化试验和糖发酵试验 6 个步骤。该方法是目前世界各国普遍接受的标准方法,鉴定结果准确可靠,同时得到纯培养的细菌。

3.3 分离菌的耐药性

甲型副伤寒沙门氏菌为临床常见致病菌,致病具有一定的流行性,一旦流行暴发,危害极大。目前抗菌药物种类繁多,使用量大,导致细菌的耐药性日趋严重。较多数人做的药敏试验是采用头孢噻肟、头孢他啶、环丙沙星、诺氟沙星、哌拉西林、氨苄西林、氯霉素、复方新诺明、氨苄西林、阿莫西林等。其结果是甲型副伤寒沙门菌对三代头孢菌素(头孢曲松、头孢他啶、头孢噻肟)100%敏感。对喹诺酮类(氧氟沙星、环丙沙星)100%敏感。对复方新诺明 93.6%敏感。对氯霉素和氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/棒酸等高度敏感^[5-7]。本研究主要是对头孢唑啉、头孢噻吩、苯唑西林、甲氧苄啶、四环素、红霉素、氯霉素、青霉素、万古霉素、若氟沙星等进行药敏试验。结果是分离得到的沙门氏菌对头孢唑啉和头孢噻吩敏感度高,对苯唑西林和甲氧苄啶为中度敏感,对于四环素、红霉素、氯霉素、青霉素和万古霉素敏感度低,而对诺氟沙星最不敏感。因此,临床医生在进行药物治疗前,应该根据本地区目前的药敏试验情况选用抗菌药物,应尽快采集标本作细菌培养及药敏试验,以便为治疗提供可靠依据。

4 结 论

4.1 沙门氏菌分离结果

本试验是采用传统的形态学和生理生化特点,根据《常见细菌系统鉴定手册》鉴定出从病料中分离出来的沙门氏菌,并根据各种生理生化试验鉴定出它是致病性甲型副伤寒沙门氏菌。

4.2 沙门氏菌的药敏试验结果

根据本试验的药敏片产生的抑菌圈的大小知道,头孢唑啉和头孢噻吩的抑菌圈最大,敏感度高;苯唑西林和甲氧苄啶的抑菌圈在 10~15 mm 之间,中度敏感;万古霉素、红霉素、青霉素、氯霉素、四环素的抑菌圈在 5~10 mm 之间,敏感度低;若氟沙星的抑菌圈在 5 mm 以下,最不敏感。

参 考 文 献

- [1] 金鑫,苏敬良.人兽共患病的现状与防制(十五)-沙门氏菌病[J].云南农业科学,2009,2(30):12-16.
- [2] 刘俊伟,张海棠,张志鹏,等.规模化猪场猪霍乱沙门氏菌的分离鉴定与药敏试验[J].河南农业科学,2011,40(4):146-148.
- [3] 徐景野,金春光,沈玄艺,等.多种方法同步检测海产品中甲型副伤寒沙门菌的应用 [J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(8):1465-1466.
- [4] 陈炜,屠传建,单平囡,等.甲型副伤寒沙门氏菌药物敏感试验及耐药性变迁[J].中国现代医学,2008,1(2):98-100.
- [5] 黄莓,赵道慧,黄国培,等.52 株甲型副伤寒杆菌对 9 种抗生素的药敏分析[J].儿科药理学杂志,2008,14(3):67-69.
- [6] 谢伟乾,梁汉钦.甲型副伤寒沙门氏菌耐药监测分析[J].广西医学,2008,30(2):32-33.
- [7] 尹建雯,高援,许闻,等.甲型副伤寒沙门氏菌 104 株药敏试验[J].预防医学情报杂志,2006,20(6):234-235.

科学选择抗寒饲料助生猪抵抗严寒

在低温季节,适当增喂一些抗寒饲料,可以加强生猪机体新陈代谢,增强体质,提高抗病力,缓解寒应激,从而促进猪的生长发育。常用的抗寒饲料有如下几种。

酒糟类。包括白酒糟和啤酒糟,除含有丰富的蛋白质和矿物质外,还含有一定数量的乙醇,热性大,通常称之为“火性饲料”,有改善消化功能、加强血液循环、扩张体表血管、产生温暖感觉等作用。冬季应用,抗寒应激作用明显。两者因对胎儿及雄性功能有不利影响,故不宜用于怀胎母畜及种公畜。

根皮类。蔬菜根皮中含有可产生御寒作用的矿物质,用作饲料时,可增强养殖动物的抗寒能力。芹菜根、芫荽根、菠菜根、白菜根等蔬菜下脚料,以及胡萝卜、马铃薯、甘薯等块根,都可以用作御寒饲料。使用这类饲料时,一定要注意保留其外皮。

粮食类。黄豆性温味甘,炒用性热,属暖性饲料,含粗蛋白质 37.90%,既是优良的植物蛋白饲料,又是抗寒保暖饲料。黑豆含粗蛋白质 36.68%,性平味甘,炒用性极热,是较好的抗寒保暖饲料。大麦性温味咸,属暖性饲料,熟用效果好。另外,稻谷、稻草也属于暖性饲料。

肉食类。羊肉和狗肉产热量高,是冬季肉食性和杂食性畜禽首选的保暖抗寒饲料。动物肝脏含铁较多(动物缺铁时特别怕冷),且易于吸收,冬季给畜禽适当增喂一些动物肝脏,可以补铁、御寒。淡水虾性温味甘,属高热量饲料,有补肾壮阳、强化雄性功能之效,适用于冬季体衰怕冷的动物,无盐鲜虾可直接应用,盐渍干虾需水浸去盐后应用。

来源:农民日报