

宋 健, 高建鹏, 龚子桓, 等. 致犊牛脑炎 β -溶血性牛链球菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(2): 106-108.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.02.029

致犊牛脑炎 β -溶血性牛链球菌的分离鉴定及药敏试验

宋 健, 高建鹏, 龚子桓, 王蒙蒙, 齐亚银
(石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832000)

摘要: 为确定导致初生犊牛脑炎的主要病原菌及治疗方案, 采用常规微生物学方法, 从病牛脑、肝脏和淋巴结等组织中分离可疑菌, 然后对分离株的形态学特征、培养特性、生化特性、溶血性以及药物敏感性进行检测。结果表明, 分离株为 β -溶血性牛链球菌, 对青霉素、万古霉素、阿奇霉素、阿莫西林、环丙沙星、恩诺沙星和罗红霉素敏感, 对四环素、卡那霉素和庆大霉素耐受。

关键词: 犊牛脑炎; β -溶血性; 链球菌; 分离鉴定; 药敏试验; 生物学方法; 形态学特征; 培养特性; 生化特性

中图分类号: S858.230.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)02-0106-02

链球菌属 (*Streptococcus*) 是一群触酶试验阴性、呈链状排列的革兰氏阳性菌, 该菌属种类繁多, 目前临床上仍沿用 Lancefield 血清学方法进行分群 (A、B、C、D、F、G 等 18 个群) 或根据溶血现象 (β 溶血、 α 溶血或草绿色溶血、 γ 溶血或不溶血) 进行分类, 近年来链球菌属的分类发生了一些变化, 提出了新的菌群划分概念。医学上重要的链球菌主要有化脓性链球菌、草绿色链球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、牛链球菌等, 是人类重要的病原之一, 可引起败血症、肺炎及脑膜炎等疾病, 同时也是其他多脊椎动物如猪、牛等重要病原菌之一。

2015 年初冬, 新疆奎屯某规模化牛场的部分犊牛发生了以脑炎为主的病例, 3~30 日龄发病不等, 发病犊牛表现体温升高、咳嗽、共济失调、头低耳耷、眼球严重外突、拱背、精神沉郁、消瘦、抗生素治疗效果不佳。剖检濒死期犊牛发现, 脑膜严重化脓 (图 1), 肺脏出血且有肉变, 肾盂出血, 小肠严重出血, 肠黏膜脱落, 肠系膜淋巴结肿大。

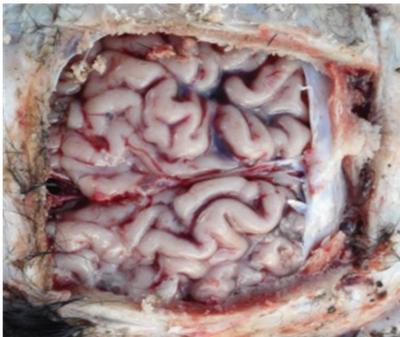


图1 剖检病犊牛脑组织

为查明导致该病发生的主要致病菌, 笔者为牛场提供了科学合理的治疗方案, 即采用常规微生物学手段和方法, 对患脑炎的犊牛进行病原菌的分离和鉴定, 并对分离株溶血性及药物敏感性进行测定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 培养基与生化试剂 LB 肉汤培养基, 普通琼脂培养基, 链球菌肉汤培养基, 10% 灭活绵羊血琼脂培养基、链球菌选择培养基。各种生化试验用培养基等参照文献 [1] 配制, 4℃ 冰箱保存备用; 细菌微量发酵管购自于浙江省杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.2 主要器械 超净工作台, 上海鸿都电子科技有限公司; 隔水式恒温培养箱, 北京市永光明医疗仪器厂; 4℃ 冰箱, 海信容声冰箱有限公司。

1.1.3 药敏试验 万古霉素、阿奇霉素、四环素、青霉素、阿莫西林、环丙沙星、恩诺沙星、罗红霉素、卡那霉素、庆大霉素等药敏纸片为浙江省杭州天和微生物试剂有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 样品来源 无菌采集新疆奎屯某发病牛场的犊牛肝脏、肠系膜淋巴结、脾脏、心血、肺脏、脑等共 6 份, 分别放入灭菌的培养皿内, 然后在放入带有冰块泡沫箱内密封并尽快带回实验室。

1.2.2 分离培养 无菌采集濒死期及死亡的犊牛的肝脏、心血、肺脏、脑, 接种于 LB 肉汤培养基, 置 37℃ 恒温箱中增菌培养 24 h 后, 革兰染色镜检, 初步筛选出革兰阳性球菌, 再通过四区划线法将培养物转接于普通琼脂平板上, 37℃ 恒温培养 24 h。观察菌落形态并染色镜检, 挑选可疑革兰阳性球菌的单个菌落接种于链球菌肉汤培养基内, 置于 37℃ 恒温培养箱 24 h 后, 染色镜检。随后将菌液接种于链球菌选择性培养基上, 置于含体积分数为 5% 的 CO₂ 恒温 (37℃) 培养箱中进行分离纯化, 培养 12 h 后挑选单个菌落, 接于 10% 灭活绵羊鲜血 LB 平板上, 置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h, 观察细菌

收稿日期: 2016-09-03

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31260610, 31160507); 新疆生产建设兵团重大科技项目 (编号: 2013AA003-3)。

作者简介: 宋 健 (1991-), 男, 吉林白城人, 硕士研究生, 研究方向为兽医学。E-mail: 1012166670@qq.com。

通信作者: 齐亚银, 博士, 副教授, 主要从事动物传染病诊断与防治。E-mail: qiyayin@163.com。

菌落形态和溶血情况。

1.2.3 生化鉴定 分离菌的生化鉴定,参照文献[2-3]的方法进行。将分离菌株分别接种于含甘露醇、山梨醇、马尿酸钠、甘油、海藻糖、蔗糖、果糖、七叶苷、阿拉伯糖、菊糖、棉子糖、鼠李糖等微量生化反应管中,37℃培养24 h,观察其生化反应特性。

1.2.4 药敏试验 采用K-B纸片扩散法进行药敏试验,参照赵占峰等根据NCCLS(美国临床实验室标准化委员会)标准判定试验结果^[4]。将所保存的纯化菌株分别在37℃营养肉汤中培养18~24 h,用无菌生理盐水将菌液稀释至浓度约为 2×10^6 个/mL,用无菌棉拭子蘸取菌液,均匀涂布于营养琼脂平板。每个平板贴6张药敏纸片为宜,2张纸片相距25 mm,纸片与平板边缘10~15 mm,并轻按纸片中心,使其附着严密,37℃恒温培养24 h。测量抑菌圈直径,判定链球菌对药敏纸片的敏感性,判定标准见表1。

表1 药敏试验判定标准

药物	纸片含量 (μg)	抑菌环直径(mm)		
		R	I	S
青霉素	10	≤ 14		≥ 15
阿奇霉素	15	≤ 13	14~17	≥ 18
链霉素	10	6	7~9	≥ 10
罗红霉素	15	≤ 15	16~20	≥ 21
万古霉素	30	≤ 14	15~16	≥ 17
卡那霉素	30	≤ 12	13~14	≥ 15
庆大霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15
四环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19
恩诺沙星	10	≤ 19	20~27	≥ 28
环丙沙星	5	≤ 15	16~20	≥ 21
呋喃妥因	300	≤ 14	15~16	≥ 17

注:“R”为耐药;“I”为中度敏感;“S”为高度敏感。

2 结果与分析

2.1 细菌形态观察

病死犊牛的肺脏,肝脏和心血抹片瑞氏染色镜检,均有球菌,脑组织抹片瑞士染色镜检,可见短链和成对排列的球菌(图2)。病死犊牛脑组织分离培养物革兰染色呈链状排列的革兰氏阳性球菌(图3)。

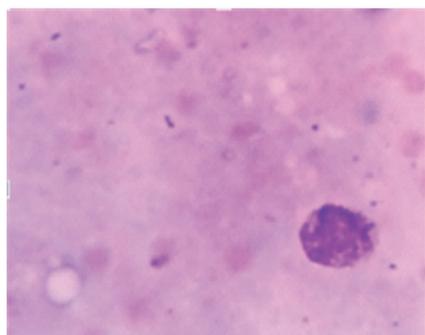


图2 脑组织涂片瑞氏染色(100 \times)

2.2 病原菌分离培养及溶血特性

病变组织无菌接入肉汤培养基中培养24 h后,溶液变浑浊。在普通琼脂上生长贫瘠且缓慢;在链球菌选择培养基上为白色隆起,边缘整齐的针尖大小菌落;在体积分数为5% CO_2 中生长良好。分离菌在10%灭活绵羊血琼脂平板上菌

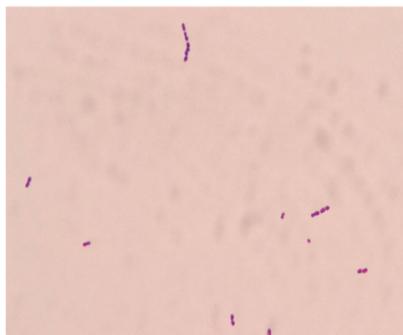


图3 纯培养细菌革兰氏染色(100 \times)

落灰白色、半透明、表面光滑、圆形、边缘整齐,有溶血现象,直径为2.20~2.41 mm,呈现 β 溶血(图4)。



图4 分离株在绵羊血平板中的 β -溶血现象

2.3 生化特性

分离菌触酶试验为阴性,在pH值9.6、6.5% NaCl中不生长,在温度为10、45℃时不生长;在400 mL/L甘露醇、山梨醇、马尿酸钠、甘油、海藻糖、蔗糖、果糖、七叶苷中生长;不能利用阿拉伯糖、菊糖、棉籽糖和鼠李糖。结果表明,分离株符合牛链球菌的生化特性。生化特性鉴定结果见表2。

表2 分离株的生化反应结果

项目	菌株	项目	菌株
甘露醇	+	果糖	+
山梨醇	+	七叶苷	+
马尿酸钠	+	阿拉伯糖	-
甘油	+	菊糖	-
海藻糖	+	棉籽糖	-
蔗糖	+	鼠李糖	-

注:“+”为产酸不产气/阳性;“-”为不产酸不产气/阴性。

2.4 药敏试验

对分离培养获得的纯化菌株进行药敏试验,结果见表3。

表3 分离株的药敏试验结果

药物	抑菌圈直径(mm)	药物	抑菌圈直径(mm)
环丙沙星	22	阿奇霉素	25
四环素	9	恩诺沙星	23
青霉素	21	罗红霉素	21
阿莫西林	21	卡那霉素	10
万古霉素	22	庆大霉素	9

3 讨论与结论

目前,能够引起动物脑炎的病原有细菌、病毒、真菌、立克

吕孙建,刘莉,曹铮,等.一株中华鳖气单胞菌噬菌体的分离及功能鉴定[J].江苏农业科学,2018,46(2):108-111.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.02.030

一株中华鳖气单胞菌噬菌体的分离及功能鉴定

吕孙建,刘莉,曹铮,卢淑娟,林锋

(农业部淡水渔业健康养殖重点实验室/浙江省鱼类健康与营养重点实验室/浙江省淡水水产研究所,浙江湖州 313001)

摘要:中华鳖是我国主要的名优淡水养殖品种,但病害频发严重影响了鳖养殖业的可持续发展。特别是滥用抗生素造成食品安全和生态安全问题,已引起人们高度关注,寻找替代抗生素对中华鳖疾病进行预防及治疗迫在眉睫。从中华鳖养殖塘中分离得到气单胞菌噬菌体1株,经透射电子显微镜观察确定为肌尾噬菌体科噬菌体。该噬菌体为宽噬菌体,对中华鳖及对虾发病养殖塘中分离得到的嗜水气单胞菌及副溶血弧菌均有明显的抑制效果,该噬菌体浸染的细菌培养基能形成明显的噬菌斑。此外,经体外试验,发现该噬菌体能够有效治疗中华鳖的腐皮病。本研究分离得到的噬菌体能够有效抑制水产常见致病菌,为后续抗生素代替治疗方法的研发提供了一定理论依据。

关键词:中华鳖;气单胞菌噬菌体;副溶血弧菌;嗜水气单胞菌

中图分类号: S947.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)02-0108-04

中华鳖(*Trionyx sinensis*),肉质鲜美,具有较高的营养及药用价值,是东南亚国家的主要淡水水产养殖动物,在我国、日本等地区均有养殖,我国的中华鳖产量一直居世界产量之首^[1-3]。近年来,高密度养殖导致的药物滥用及养殖水质恶化等原因引起中华鳖疾病(细菌病及病毒病等)频发^[4],其中嗜水气单胞菌等细菌性病害最为常见,目前已知的中华鳖细菌性病害包括红脖子病、红底板病、白底板病、腐皮病、疔疮病、穿孔病、烂甲病等^[5]。

嗜水气单胞菌是水产养殖中最为常见的条件致病菌,在大部分水产养殖水体中均能检测到该细菌。该细菌为多致病

因素病原菌,具有较强的毒性,能够释放毒素(细胞毒性和细胞紧张性刺激物)、内毒素(脂多糖)、蛋白酶、溶血素、肠毒素和各种酶。此外,这些毒力因子释放还会引起宿主感染加重,从而加重疾病的爆发^[2]。

目前,中华鳖细菌性病害常用抗生素药物进行预防和治疗,但是抗生素药物的大量使用产生了一系列严重的问题,如病原菌产生抗药性、养殖水质恶化和药物残留等^[4]。近些年,这些药物的选用主要是套用鱼类用药的使用标准,效果往往不理想,且抗生素的使用正在逐步禁止及规范^[6],目前亟须研发一种新型、有效且环保的治疗制剂对中华鳖的疾病进行有效预防及治疗。

噬菌体(bacteriophage)是寄生于细菌、霉形体、螺旋体、放线菌以及蓝细菌等中的一类病毒,亦称细菌病毒^[7-8]。噬菌体以细菌作为宿主,可以特异性地杀灭相应的宿主菌,因此噬菌体是一种很有潜力的新型治疗制剂。目前,噬菌体的研究已经涉及医药、农业、食品加工、废水处理等行业,并获得了

收稿日期:2017-05-27

基金项目:浙江省科技计划(编号:2016F30016)。

作者简介:吕孙建(1988—),男,浙江温州人,博士,助理研究员,主要从事水产动物病害防治。E-mail:lvsunjian@163.com。

通信作者:刘莉,博士,研究员,主要从事水产动物病害防治。E-mail:liuli6655@hotmail.com。

次体、原虫等。其中,细菌主要有肺炎链球菌、肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、B族链球菌和奈瑟球菌等^[3-5]。病毒主要有单纯疱疹病毒、日本脑炎病毒、西尼罗脑炎病毒等约有100多种病毒可致人和动物得脑炎^[6]。根据菌株的培养特性、染色特点、形态观察及生化试验可知,导致此次犊牛脑炎的细菌为 β -溶血性牛链球菌。

药敏试验结果表明,分离株对青霉素、万古霉素、阿奇霉素、阿莫西林、环丙沙星、恩诺沙星、罗红霉素敏感,对四环素、卡那霉素、庆大霉素耐受,说明该菌株具有多重耐药性。链球菌是革兰阳性菌,理论上很多药物对其有疗效。但近年来由于抗生素的滥用,如在动物饲料中长期添加抗生素用于促进生长及预防和治疗疾病,发生疾病后未经兽医诊断就盲目大量使用多种抗生素等,不仅治疗成本提高,而且产生了大量耐药菌株,使得疾病难以控制。因此,牛场在防治链球菌病时,应对菌株进行药敏试验,用2~3种敏感药物按疗程和足够的剂量交替使用。

参考文献:

- [1] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [2] 王建永,张磊,赵月兰,等. 腹泻犊牛病原分离鉴定及药敏实验[J]. 动物医学进展,2010,31(5):118-121.
- [3] Metter K B, Lisbeth N P, Jens K M. Eight-plex PCR and liquidarray detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4):908-913.
- [4] 赵战峰,宋军科,于三科. 奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定[J]. 动物医学进展,2010,31(4):113-115.
- [5] 王慧敏,高云英,田飞鹏. 脑膜炎球菌外膜蛋白NhhA的表达及免疫效果评价[J]. 动物医学进展,2010,31(12):53-57.
- [6] Ye C T, Abraham S, Wu H Q, et al. Silencing early viral replication in macrophages and dendritic cells effectively suppresses flavivirus encephalitis[J]. PLoS One, 2011, 6(3):1-7.