

· 论 著 ·

人-猪链球菌感染性综合征的病原分离与鉴定

杨华富, 朱凤才, 史智扬, 庄菱, 顾玲, 郭喜玲, 张春元, 陈太基

(江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

【摘要】 目的: 分离和鉴定猪链球菌, 为诊断和治疗提供科学依据。方法: 用 3 种增菌液和 7 种培养基对病人血液、脑脊液培养和病死猪的内脏培养, 并对分离到的病原体进行染色形态观察、API Strep 20 生化及其它生化试验、血清凝集试验。结果: 从 4 例病人血液、1 例脑脊液和 7 例病死猪中分离到 12 株病原菌, 经鉴定 9 株编码为 0641453, 2 株为 0640453, 1 株为 1641453, 12 株菌均与猪链球菌 2 型血清凝集。结论: 12 株细菌均为猪链球菌 2 型。

【关键词】 猪链球菌; API 生化试验; 凝集试验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1006-9070(2001)04-0009-02

Isolation and identification of streptococcus suis

YIN G H u a - f u, ZHU F e n g - c a i, S H I Z h i - y a n g, et al

(Jiangsu Province Center for prevention and Disease Control, Nanjing 210009, China)

【Abstract】 Objective: Isolation and identification of streptococcus suis. Methods: The blood and cerebrospinal fluid (CSF) were taken from infected people, who detected by blood nutrient agar medium, and causative organism were observed by the sharp of the organism, API Strep biochemical tests and reference serum coagulate tests. Results: 12 strains of streptococcus were isolated from 4 sera and 1 CSF of the infected men, and 7 viscous samples were isolated from pig ill-death. By API 20 Strep test, the code of 9 strains was 0641453, the another two code of strain was 0640453, all the 12 strains were coagulated with the reference sera of S. suis. Conclusion 12 strains of Streptococcus were S. suis.

【Key Words】 S. suis; API biochemical test; serum coagulate test

1998 年 7 月下旬, 江苏某地发生了几十例原因不明的急性中毒性休克综合征病人, 死亡 14 例。与之同时, 当地也发生了数万头生猪死亡。病人病情发展快, 病死率高。鉴于病原体的检出结果对疾病预防控制的重要性, 我们选用了多种培养基对病人的血液和脑脊液及病死猪的内脏标本进行了病原体分离。分离到的病原体染色形态多变, 为此采用了人工生化、API 20 strept 生化条、和血清凝集试验进行菌种鉴定, 从中找到了一种可靠的生化鉴定猪链球菌的方法, 报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 医院临床病人的血液、脑脊液和病死猪的内脏(肝、脾、肺、淋巴结)。

1.2 分离培养方法 将无菌操作采集的血液、脑脊液和病死猪的内脏标本接种到肉汤增菌液、L 型肉汤增菌液、碱性蛋白胨水、MAC 琼脂培养基、SS 琼脂培养基、山梨醇 MAC 琼脂培养基、TCBS 琼脂培养基、L 型琼脂培养基、含 8% 小牛血清营养琼脂培养基、含 8% 脱纤维羊血清营养琼脂培养基, 放入 37 培养箱 24~48 小时, 挑取菌落进行革兰染色并在显微镜下观察细菌形

态。

1.3 细菌生化鉴定 挑取单个菌落转 8% 小牛血清营养琼脂平板, 37 培养 24 小时, 刮取菌苔制备菌液(浓度为麦氏 4 度)供 API 20 Strep 生化条及其他生化试验用。

(1) 人工生化试验: 生化试验管购自浙江省军区后勤部卫生防疫检疫所(批号 971106-980704); 将菌液加入各生化管, 每管加 20~30 μ l 菌液, 37 培养 24~72 小时加入相应试剂并观察结果。

(2) API 生化试验: API 20 Strep 生化系统购自法国生物-梅里埃公司(批号 728619201), 将菌液加入到 VP 精氨酸 ADH 管中, 每孔加 150 μ l 菌液, 另取 0.5ml 菌液加入到 APIA-TREP 培养基中, 均匀后吸取 170 μ l 加入到核糖 RB 糖原 GLYP 管中, 并用无菌石蜡覆盖 ADH 到 ALYP 管上, 形成一个凸面, 放在含有 5ml 水的培养盒内, 37 培养 4 小时, 加入相应试剂, 10 分钟后观察结果。24 小时观察糖发酵试验结果, 根据结果进行编码, 查 API 20 Strep 生化系统编码表。

1.4 血清凝集试验 标准猪链球菌 1 型和 2 型血清来自荷兰

收稿日期: 2001-07-05

作者简介: 杨华富(1964-), 男, 江苏高淳人, 主管技师。



DLO- Institute for Animal Health and Science², 猪链球菌 2 型 (SS2) 参考菌株来自德国吉森大学, 均由南京农业大学国家重点微生物实验室提供。将培养 24 小时的细菌制备成浓菌悬液, 加一滴菌液和一滴血清于玻片上混匀, 1 分钟内观察结果。同时设生理盐水对照。

2 结果

2.1 菌株的分离及特性 从 4 例病人血液, 1 例病人脑脊液和 7 头病死猪内脏标本中分离到 12 株细菌。该菌在肉汤培养基中浑浊生长, 底部有沉淀, 8% 小牛血清营养琼脂和 8% 脱纤维羊血清营养琼脂生长良好, MAC、SS、山梨醇 MAC、TBCS 和 L 型琼脂培养基不生长。

2.2 菌落形态及生长试验特性 该菌在血平板上呈细小菌落, 无色, 半透明, 直径 0.5~1mm, 边缘整齐, 凸起, 光滑, α 溶血。革兰阳性链状球菌, 无芽胞, 无荚膜。该菌 10 培养不生长,

45 培养生长, 60~30 分钟试验不生长, pH 9.6 肉汤生长, 1%

美兰牛乳, 40% 胆汁肉汤和 6.5% 氯化钠肉汤不生长。

2.3 微量生化试验 水解七叶苷、淀粉和精氨酸, 不水解马尿酸盐和明胶。分解乳糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和甘露糖, 不分解阿拉伯糖、鼠李糖、山梨醇和甘露醇。

2.4 API 生化生化试验 12 株链球菌 API 20 Strep 生化结果经编码 9 株为 0641453, 2 株为 0640453, 1 株为 1641453。查编码表 12 株细菌均为猪链球菌 2 型。其中编码 0641453 猪链球菌 2 型的鉴定百分率为 99.9%, 编码 0640453 猪链球菌 2 型鉴定百分率为 99.8%, 编码 4641453 猪链球菌 2 型的鉴定百分率为 99.9%, 猪链球菌 2 型参考菌株 SS2 的编码为 4640473, 鉴定百分率为 99.9%。API 生化结果详见附表。

2.5 血清凝集试验 12 株细菌和猪链球菌 SS2 参考菌株均与猪链球菌 2 型参考血清凝集, 与猪链球菌 1 型参考血清不凝集, 生理盐水对照阴性。

附表 分离菌株 API 链球菌系统检测结果

生化试验	菌株				生化试验	菌株			
	A	B	C	SS2		A	B	C	SS2
1. VP	-	-	-	-	12 阿拉伯糖	-	-	-	-
2 马尿酸盐	-	-	-	-	13 甘露醇	-	-	-	-
3 七叶灵	-	-	+	+	14 山梨醇	-	-	-	-
4 吡咯酮基芳胺酶	-	-	-	-	15 乳糖	+	+	+	+
5 α-半乳糖酶	+	+	+	+	16 海藻糖	+	+	+	+
6 β-葡萄糖醛酸酶	+	+	+	+	17 菊根粉	-	-	-	+
7 β-半乳糖酶	-	-	-	-	18 棉子糖	+	+	+	+
8 碱性磷酸酶	-	-	-	-	19 淀粉	+	+	+	+
9 亮氨酸芳胺酶	+	+	+	+	20 糖原	+	+	+	+
10 精氨酸双水解酶	+	-	+	-	21 β-溶血	-	-	-	-
11 核糖	-	-	-	-					

3 讨论

猪链球菌可引起人和动物多种疾病, 人感染链球菌严重者可导致中毒休克综合征并引起死亡, 国外已有报道^[1-3]。这次江苏某地发生的猪链球菌中毒性休克综合征病人病情凶恶, 潜伏期短, 病程快, 病死率高。早期临床诊断凝为: 炭疽病、流行性出血热、钩体病、链球菌引起的猪肺疫及 O157:H7 出血性大肠杆菌等细菌性病原体引起的疾病。因此病原体的分离和鉴定对疾病的确诊、预防和控制十分重要。

本次分离的猪链球菌, 刚分离时细菌形态为典型的革兰阳性链球菌, 链长达二十多个, 二代培养后细菌染色形态发生变化, 多为革兰阴性球杆菌, 不成链, 给细菌鉴定带来一定困难。因此刚分离到的细菌形态观察对细菌鉴定十分重要。

链球菌血清群繁多, 其感染宿主和致病力也不相同, 因此链球菌的型别鉴定十分重要。我们根据伯杰细菌鉴定手册, 选择了 24 个生化指标对本次分离的菌株进行鉴定, 由于链球菌属内的各型链球菌间的生化结果差异不大, 结果未能定种, 用 MAS-300 微生物自动生化分析仪, 也由于机内贮存标准菌有限, 未能定种。API 20 Strep 生化系统将该菌鉴定, 结果鉴定率

大于 99.8%, 均为猪链球菌 2 型。血清凝集试验结果也证实了菌株为猪链球菌 2 型。因此 API 20 Strep 生化系统可作为生化鉴定猪链球菌的一个快速方法。

不同的生化试验方法, 少许生化结果不一样, 这可能与接种的菌量有一定的关系。水解七叶苷可因方法的相异而不同。

由于链球菌的生化特性变化较大, 从菌体形态和常规生化试验难以进行菌种的鉴定。用 API 20 Strep 生化系统对本次分离到的链球菌进行了种的鉴定, 取得了满意的结果, 这对以后同类细菌鉴定提供了可借鉴的经验。

[参考文献]

[1] 姜淑贤, 尚德秋. 链球菌中毒休克综合征和超抗原[J]. 中国公共卫生, 1996, 12(2): 92-94.
 [2] Weiss KA. Group A Streptococci invasive infections: a review [J]. Can J Surg, 1997, 40: 18-25.
 [3] 阎世德, 姜淑贤, 陆桂珍. 国外 A 群链球菌病的流行病学研究[J]. 疾病监测, 1996, 11: 26-31.