

李淑红,王京仁,洪冬胜,等.犬腹泻病原菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J].江苏农业科学,2014,42(4):170-172.

犬腹泻病原菌的分离鉴定及药物敏感性分析

李淑红¹,王京仁¹,洪冬胜²,刘媛媛¹,陆西¹

(1. 湖南文理学院生命科学学院,湖南常德 415000; 2. 湖南省常德市城西动物医院,湖南常德 415000)

摘要:对湖南常德地区 5 例犬腹泻病直肠粪便采样,进行细菌分离鉴定;用世界卫生组织(WHO)推荐的 Kirby-Bauer 氏法对分离菌株进行药敏试验,筛选抗致病菌的敏感药物。结果表明,5 例样本中分离鉴定出 4 株沙门氏菌、5 株大肠埃希菌,分离率分别为 44.44%、55.56%。分离株沙门氏菌对新霉素、卡那霉素、妥布霉素、复方新诺明、庆大霉素等 5 种药物敏感,对多黏菌素 B、四环素 2 种药物中介,对其余 10 种药物耐药;分离株大肠埃希菌对红霉素、妥布霉素、复方新诺明 3 种药物敏感,对卡那霉素、呋喃妥因、多黏菌素 B、庆大霉素 4 种药物中介,对其余 10 种药物耐药。

关键词:犬;大肠埃希菌;沙门氏菌;分离;药敏试验

中图分类号:S858.292.51 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)04-0170-02

腹泻是临床上多种疾病经过中表现的主要症状之一,是具有腹泻症状疾病的统称,可导致犬营养不良、生长发育障碍和工作能力丧失,幼龄犬发生率和死亡率均很高^[1]。病犬表现排便次数明显增多,粪便稀薄如水样或稀粥样。由细菌引起犬腹泻较常见,犬的肠道内有大量潜在的致病菌,但不是每种细菌都与临床疾病有明确的联系。引起犬肠道感染的致病菌包括肠致病性大肠埃希菌、无致病性大肠埃希菌、沙门氏菌属病菌、小肠结肠炎耶尔森菌、弯曲菌属病菌、毛状芽孢杆菌、梭菌属病菌、葡萄球菌和志贺菌属病菌^[2]。其中,以大肠埃希菌最常见,其次为犬沙门氏菌,沙门氏菌病别称副伤寒,是由沙门氏菌属细菌引起的人畜共患病^[3]。本试验通过对 5 例犬腹泻病粪便进行采样、分离鉴定、革兰氏染色镜检、生化试验,并对分离株进行药敏试验,筛选抗致病菌的敏感药物,为临床用药和治疗犬腹泻病提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂、氢氧化钠、蒸馏水、无菌水;结晶紫、番红、碘液、香柏油、二甲苯、95%乙醇等。11 种肠埃希菌属细菌生化编码鉴定管由浙江省杭州微生物试剂有限公司生产。营养琼脂(NA)、麦康凯培养基(MAC)、伊红-美蓝培养基(EMB)、SS 琼脂培养基、亚硫酸铋琼脂(BS)成品均由浙江省杭州天和微生物试剂有限公司生产;营养肉汤(NB)、革兰氏染色试剂由微生物实验室配制。

1.1.2 药敏纸片 药敏纸片为浙江省杭州天和微生物试剂有限公司采用美国 NCCLS 最新药敏试验法规制备的标准厚

纸片,直径 6.35 mm,纸片含药量符合标准。本试验共选用 17 种药物敏感试纸,包括新霉素(新)、羧苄青霉素(羧)、氨苄青霉素(氨)、头孢拉定(VI)、卡那霉素(卡)、先锋霉素 V(V)、阿莫西林(莫)、四环素(四)、红霉素(红)、万古霉素(万)、妥布霉素(妥)、复方新诺明(复)、呋喃妥因(呋)、萘啶酸(萘)、链霉素(链)、庆大霉素(庆)、多黏菌素 B(多)。

1.1.3 主要仪器 电子天平、生物显微镜、恒温培养箱、立式压力蒸汽灭菌器、干燥箱、无菌操作台、微量移液器等。

1.1.4 病料来源 湖南省常德市城西宠物医院提供 5 只腹泻犬,其中有 3 只丝毛犬、1 只中华田园犬、1 只小型猎犬。

1.2 方法

1.2.1 培养基配制 营养肉汤的配制:称量 10 g 蛋白胨、5 g 牛肉膏、5 g 氯化钠,混合溶解于 1 000 mL 蒸馏水中并煮沸,校正 pH 值至 7.0~7.2,装于锥形瓶中经 121 ℃灭菌 15 min,冷藏备用^[4]。营养琼脂(NA)、麦康凯培养基(MAC)、伊红-美蓝培养基(EMB)、SS 琼脂培养基、亚硫酸铋琼脂(BS)成品按说明配制,备用。

1.2.2 病料的采集 用无菌棉拭子插入病犬直肠,旋转取其粪便,迅速放入装有灭菌营养肉汤的 5 支试管内,封盖贴标签,放入 37 ℃恒温箱中增菌培养 18~24 h。

1.2.3 细菌的分离培养 取少量用肉汤培养基培养 24 h 的菌液,在 NA 培养基上划线分离,置于 37 ℃恒温箱中培养 18~24 h,再挑取单菌落在普通琼脂培养基上划线分离、培养。如此反复,直到培养基上的菌落特征相同时,再挑取单个菌落涂片,染色并镜检^[5],观察菌体大小、染色特征;并分别接种于 EMB、MAC、SS、BS 培养基上,观察菌落生长、形态、颜色、色泽、大小等。

1.2.4 生化试验 将疑似大肠埃希菌和沙门氏菌的细菌接种到细菌生化测定成套试剂微量管中,37 ℃恒温箱培养 18~24 h,观察并记录结果。

1.2.5 药敏试验 选用 17 种药物敏感试纸,采用目前各实验室广泛采用的世界卫生组织推荐的纸片琼脂扩散法(disc agar diffusion)即 Kirby-Barere 法,挑取 1/2 个已分离鉴定的菌落接种于含 5 mL 营养肉汤的试管中,置 37 ℃恒温箱中培养 18~24 h,取出,与麦氏标准管进行比较。若肉汤浊度不

收稿日期:2013-07-19

基金项目:湖南省高校重点实验室项目(编号:2008);2011 年湖南省“十二五”重点建设学科项目(编号:2011);湖南省高校创新平台开放基金(编号:10K043);湖南省重点实验室项目(编号:2012);湖南省科学技术厅计划项目(编号:2013FJ3018);湖南省常德市科技局项目(编号:2013NK02)。

作者简介:李淑红(1964—),女,山东禹城人,硕士,教授,从事动物科学专业教学与研究。E-mail:wangren6332@163.com。

够,则继续培养;若肉汤浊度过高,则用灭菌生理盐水稀释调节至与 0.5 麦氏标准管浊度相同。取直径 90 mm 的平皿,琼脂厚度约 4 mm,用移液枪取菌液 200 μL 于营养琼脂培养基中心,用刮铲从中心开始推平菌液,使菌液遍布培养皿的每个角落,用镊子夹取药敏纸片,每隔 2 cm 轻贴于培养基上,完成后于 37 ℃ 恒温箱中培养 18 ~ 24 h,用游标卡尺测量抑菌圈直径,重复 3 次,记录结果^[6]。根据被测药物按常用剂量、给药时间在体内能达到的血药浓度将敏感性标准分为 3 级:敏感(S)、中介(I)和耐药(R)。抗菌药纸片种类、含药量及判定标准参照文献^[7](表 1)。

2 结果与分析

2.1 犬腹泻病肠道细菌分离鉴定结果

自 5 只病犬分离的细菌在 NA、EMB、MAC、SS、BS 培养基上的菌落形态特征及涂片染色镜检结果见表 2。

将分离的菌株按常规方法分别接种于葡萄糖、赖氨酸、鸟氨酸、硫化氢、靛基质、乳糖、卫矛醇、苯丙氨酸、尿素、氨对微量生化管中,于 37 ℃ 培养 18 ~ 24 h,观察并记录生化反应结果(表 3)。

表 2 菌落形态特征及镜检特征

细菌	NA 培养基	MAC 培养基	EMB 培养基	BS 培养基	SS 培养基	镜检特征 (10 × 100)
沙门氏菌	光滑、凸起、湿润、灰白色、中等大小的菌落	圆形、光滑、无色透明的小菌落	圆形、光滑、无色透明的小菌落	灰黑色、灰绿色菌落	细小、无色透明、光滑、圆整的菌落,多数中心黑色	革兰氏阴性(G ⁻)、短小杆、无荚膜、无芽孢
大肠埃希菌	灰白色、透明、凸起、湿润、直径 2 mm 的小菌落	红色、直径 1 mm 左右的小菌落	黑色带金属光泽的菌落,直径 2 mm 左右	-	红色、直径 1 mm 左右的菌落	革兰氏阴性(G ⁻)、短杆状、无芽孢

注:“-”表示无菌落生长。

表 3 分离菌株的生化试验结果

分离菌株	葡萄糖	赖氨酸	鸟氨酸	硫化氢	靛基质	乳糖	卫矛醇	苯丙氨酸	尿素	氨对
沙门氏菌	⊕	+	-	+	-	-	+	-	-	-
大肠埃希菌	+	+	+	-	+	⊕	+	-	-	+

注:⊕表示产酸产气, + 表示产酸, - 表示不产酸不产气。

从表 3 可见,从 5 例病犬肠道中共分离到 9 株细菌,其中 4 株菌菌落生长形态、涂片镜检及生化特性与沙门氏杆菌特征相符^[5],初步确定为沙门氏菌,分离率为 44.44%;5 株菌菌落生长形态、涂片镜检及生化特性与大肠埃希菌特征相符^[5],初步确定为大肠埃希菌,分离率为 55.56%。

2.2 药敏试验结果

用 17 种药物敏感试纸对分离菌株进行药敏试验,根据抑菌圈直径的大小来判定各细菌的耐药性,判断标准见表 1,试验结果见表 4。结果表明,沙门氏菌对新霉素、卡那霉素、妥布霉素、复方新诺明、庆大霉素 5 种药物敏感,对多黏菌素 B、四环素 2 种药物中介,对其余 10 种药物耐药。大肠埃希菌对红霉素、妥布霉素、复方新诺明 3 种药物敏感,对卡那霉素、呋喃妥因、多黏菌素 B、庆大霉素 4 种药物中介,对其余 10 种药物耐药。

3 结论与讨论

犬腹泻病可由病毒、细菌、中毒等多种病因引起,其中在细菌性腹泻中多以大肠埃希菌和沙门氏菌较常见。通过对湖

表 1 抗生素抑菌能力判断标准^[7]

药名	抑菌圈直径(mm)		
	R	I	S
新霉素	≤12	13 ~ 16	≥17
羧苄青霉素	≤17	18 ~ 22	≥23
氨苄青霉素	≤11	12 ~ 13	≥14
头孢拉定	≤14	15 ~ 17	≥18
卡那霉素	≤13	14 ~ 17	≥18
先锋 V	≤14	15 ~ 17	≥18
阿莫西林	≤14(13)	(14)15 ~ 17	≥18
四环素	≤14	15 ~ 18	≥19
红霉素	≤13	14 ~ 17	≥18
万古霉素	≤9	10 ~ 11	≥12
妥布霉素	≤12	13 ~ 14	≥15
复方新诺明	≤10	11 ~ 15	≥16
呋喃妥因	≤14	15 ~ 16	≥17
萘啶酸	≤18	19 ~ 21	≥21
链霉素	≤11	12 ~ 14	≥15
庆大霉素	≤12	13 ~ 14	≥15
多黏菌素 B	≤8	8 ~ 11	≥12

表 4 分离菌株对 17 种药物的药敏试验结果

药物	抑菌圈直径(mm)	
	沙门氏菌	大肠埃希菌
新 30 μg/片	24	8
羧 100 μg/片	—	—
氨 10 μg/片	—	8
VI30 μg/片	8	—
卡 30 μg/片	18	15
V 30 μg/片	—	12
莫 30 μg/片	—	—
四 30 μg/片	18	—
红 15 μg/片	—	18
万 30 μg/片	—	—
妥 10 μg/片	20	16
复 1.25/23.75 μg/片	36	18
呋 300 μg/片	12	16
萘 30 μg/片	18	—
链 10 μg/片	—	10
庆 10 μg/片	17	14
多 30 μg/片	9	9

注:“—”表示无抑菌圈。

王东升, 张世栋, 李宏胜, 等. 大肠杆菌感染对猪血液生化指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 172-174.

大肠杆菌感染对猪血液生化指标的影响

王东升¹, 张世栋¹, 李宏胜¹, 李世宏¹, 李锦宇¹, 荔霞¹, 龚成珍², 严作廷¹

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽药创制重点实验室/甘肃省中兽药工程技术研究中心/甘肃省新兽药工程重点实验室, 甘肃兰州 730050; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

摘要:为了研究大肠杆菌感染对猪血液生化指标的影响, 将 16 头 1 月龄的仔猪随机分为对照组和试验组, 分别肌肉注射 0.045 mL/kg 生理盐水和 4.5 亿 CFU/kg 大肠杆菌, 并于接种后第 24 小时从猪前腔静脉采血, 分离血清, 用全自动生化分析仪测定血清生化指标。结果可以看出, 与对照组猪相比, 试验组猪血清中 AST、 γ -GT、ALP、GLB 和 LDH 含量显著升高 ($P < 0.05$), CREA 极显著升高 ($P < 0.01$), 而 ALB 含量和 A/G 极显著降低 ($P < 0.01$), 钙含量、LT/ST 和钙/磷的值显著减小 ($P < 0.05$)。说明大肠杆菌感染可引起猪肝、肾和心功能的异常。

关键词:猪; 大肠杆菌; 血液生化指标

中图分类号: S858.285.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0172-03

仔猪大肠杆菌病是由大肠杆菌引起的仔猪肠道感染的传染性疾病, 由发病日龄和临床症状的差异可将该病分为仔猪黄痢、仔猪白痢和猪水肿病 3 种, 以发生肠炎、肠毒血症为特征^[1]。这些疾病在世界各地均有发生, 常常造成新生仔猪的死亡或生长发育不良, 从而严重阻碍养猪业的发展。目前对大肠杆菌 C83-1 的研究主要集中在体外抑菌^[2]、药物对其杀灭作用^[3]及疫苗开发研究^[4]等方面, 但尚未见关于该菌感染后猪血液生化指标变化的报道。血液通过在机体的循

环参与机体营养物质和氧气的运输, 从而将代谢废物转运至排泄器官或移除, 此外还参与抵抗细菌、病毒等病原微生物的感染等多种功能活动, 对维持动物机体的正常新陈代谢发挥重要作用。血液生化指标是动物机体新陈代谢过程的内在反映, 也是研究动物病理学、生理学、毒理学和探讨疾病发病机理的重要参考指标, 可以作为判断动物机体健康状况的重要依据^[5]。因此通过研究大肠杆菌感染后猪血液相关生化指标的变化, 可以为临床诊断和治疗该病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌种

大肠杆菌 C83-1, 购自中国兽医药品监察所。攻毒前接种于普通肉汤管中, 37℃ 下培养 18~20 h 后镜检, 纯种后吸取 0.5 mL 接种于营养琼脂平板上, 使平板全部浸润后置于

收稿日期: 2013-08-23

基金项目: 国家科技支撑计划(编号: 2008BADB4B01-2)。

作者简介: 王东升(1979—), 男, 甘肃临洮人, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药药理与奶牛疾病的研究。E-mail: lzmyswds@126.com。

通信作者: 严作廷, 博士, 研究员。E-mail: yanzuoting@caas.cn。

南省常德地区城西宠物医院 5 例有腹泻症状的病犬肠道细菌进行分离鉴定, 共分离到 9 株菌, 其中 4 株为沙门氏菌, 5 株为大肠埃希菌, 分离率分别为 44.44%、55.56%; 4 例病犬分离出大肠埃希菌和沙门氏菌 2 种菌, 1 例病犬只分离出大肠埃希菌。由于实验室条件限制, 未进行血清学鉴定。

药敏试验结果表明, 在 17 种抗菌药物中, 沙门氏菌对新霉素、卡那霉素、妥布霉素、复方新诺明、庆大霉素 5 种药物敏感, 对多黏菌素 B、四环素 2 种药物中介, 对其他 10 种药物耐药。大肠埃希菌对红霉素、妥布霉素、复方新诺明 3 种药物敏感, 对卡那霉素、呋喃妥因、多黏菌素 B、庆大霉素 4 种药物中介, 对其他 10 种药物产生了耐药性。犬沙门氏菌和大肠埃希菌产生广泛的耐药不敏感现象, 可能与近几年抗生素药物在临床上的广泛应用有关, 导致细菌遗传性状变异, 产生耐药质粒。在疾病治疗中, 按规定剂量、规定方法和疗程用药, 切勿乱用药, 这是避免耐药菌株继续增多的根本方法^[8]。因此, 在临床选药治疗犬病时, 应根据病情结合药敏试验结果合理选药。根据本次细菌分离及药敏试验结果在临床治疗常德地区大肠埃希菌和沙门氏杆菌引起的犬腹泻病时, 可首选妥布霉素药、复方新诺明、卡那霉素、茶啶酸、庆大霉素、新霉素、红

霉素等对细菌敏感性高的药物, 以提高疗效, 降低细菌对抗生素耐药性的产生。

参考文献:

- [1] 王代宾, 张艳丽, 王立芬. 犬腹泻病的危害及其诊治[J]. 养殖技术顾问, 2011(10): 138-138.
- [2] 张丽, 肖啸, 沈学文. 犬细菌性腹泻的细菌分离培养与鉴定[J]. 山东畜牧兽医, 2012, 33(6): 1-4.
- [3] 武守艳, 韩一超, 陈剑波, 等. 犬沙门氏菌病的诊治[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(6): 18.
- [4] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [5] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 223-225, 215-216.
- [6] 倪语星. 细菌耐药性监测与抗感染治疗[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002.
- [7] M100-S14 抗微生物药物敏感性试验执行标准: 第 14 版信息增刊[S]. 华盛顿: 美国临床和实验室标准协会, 2004.
- [8] 朱忠珂, 范国英, 钟华. 犬大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 8(16): 93-94.