

刘玉华,陈光明,方向红,等. 泰州地区鸭源大肠杆菌的分离鉴定与耐药性试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):260-262.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.090

泰州地区鸭源大肠杆菌的分离鉴定与耐药性试验

刘玉华, 陈光明, 方向红, 戴丽红
(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要:以泰州地区 15 羽临床疑似大肠杆菌病病死鸭为病料进行病原分离培养、革兰氏染色镜检、生化试验,分离鉴定出 13 株大肠杆菌。对分离菌进行药敏试验发现,13 株大肠杆菌对头孢噻吩的耐药率最低,对链霉素的耐药率最高。对氟苯尼考、阿米沙星、大观霉素的耐药率相对较低(分别为 15.4%、23.1%、30.8%),而对大多数抗菌药物则表现出较强的耐药性,大肠杆菌多重耐药现象非常普遍,大多数大肠杆菌都是 5 耐、6 耐、7 耐甚至 8 耐。

关键词:鸭;大肠杆菌;分离鉴定;耐药性试验

中图分类号: S859.7;S855.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0260-02

人和动物肠道内均有大肠杆菌存在,正常条件下大多数大肠杆菌是不致病的共栖菌,在特定条件下可致病。少数大肠杆菌与人、动物的大肠杆菌病密切相关^[1]。致病性大肠杆菌的许多血清型可引起家畜、家禽发病^[2]。近年来,随着江苏省泰州地区养鸭业的快速发展,鸭大肠杆菌病也愈来愈常见,临床上主要应用抗菌药物来预防、治疗鸭大肠杆菌病,但大肠杆菌易产生耐药性,加上养殖户盲目选用抗菌药物,造成大肠杆菌耐药性逐年严重,给养鸭业造成严重损失。本研究选择泰州地区临床疑似大肠杆菌病的病死鸭进行大肠杆菌病的分离鉴定及耐药性试验,旨在为选择有效的抗菌药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

泰州地区临床疑似大肠杆菌病的病死鸭 15 羽。培养基:麦康凯琼脂、营养琼脂、水解酪蛋白琼脂(MH 琼脂)均由杭州天和微生物试剂有限公司生产。葡萄糖、乳糖、甘露糖、麦芽糖、尿素、柠檬酸盐、蛋白胨水、硫化氢等生化微量鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司),甲基红试验、吲哚试验、V-P 试验等试验所用试剂均为自制。药敏纸片:四环素、氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、氧氟沙星、环丙沙星、氟苯尼考、磺胺异噁唑、链霉素等 9 种药敏纸片均由杭州天和微生物试剂有限公司生产。头孢噻吩、大观霉素、阿米卡星(广州市辉康生物科技有限公司)。大肠杆菌(ATCC25922)购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 方法

对 15 羽临床疑似大肠杆菌病死鸭剖检,从肝脏无菌取病料,划线接种于麦康凯琼脂平板,37℃培养 18 h,挑取粉红色、边缘光滑的可疑菌落,用麦康凯琼脂进行纯化,观察平板上的菌落特征,并挑取红色菌落涂片、革兰氏染色、镜检。纯化后可疑菌落接种营养琼脂平板进行纯化,37℃培养 18 h,用于生化试验、药敏试验。

1.2.1 生化试验 取琼脂平板上的菌落按常规方法进行吲哚、甲基红、V-P、柠檬酸盐、葡萄糖、乳糖、甘露糖、麦芽糖、尿素酶、硫化氢等生化试验,观察并记录结果。

1.2.2 药敏试验 以大肠杆菌(ATCC25922)为标准菌株,采用纸片扩散法(K-B 法)测试大肠杆菌对氨苄西林、阿莫西林、头孢噻吩、庆大霉素、大观霉素、阿米沙星、链霉素、四环素、氟苯尼考、磺胺异噁唑、环丙沙星、氧氟沙星等 12 种抗菌药物的敏感程度。用接种环挑取纯培养的大肠杆菌单菌落 4~5 个,置于灭菌生理盐水管中,校正菌悬液的浓度至 0.5 麦氏比浊单位(相当于 1.5×10^8 CFU/mL)。用灭菌棉拭子蘸取少量悬液,在 MH 琼脂表面均匀涂抹接种 3 次,每次使平板旋转 60°,最后沿平板内缘涂抹 1 圈。盖上平板,室温静置 3~5 min,镊子灼烧灭菌后夹取药敏纸片贴于 MH 琼脂表面。每个平板贴 6 片药敏纸片,各药敏纸片间距离不少于 24 mm,置于 35℃恒温箱中培养 18 h。观察药敏纸片周围有无抑菌圈形成,测量抑菌圈直径(表 1)。

表 1 纸片法药敏试验判定标准

药物	纸片药物含量 (μg/片)	抑菌圈直径(mm)		
		耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
氨苄西林	10	≤13	14~16	≥17
阿莫西林	10	≤13	14~17	≥18
头孢噻吩	30	≤12	13~14	≥15
庆大霉素	10	≤12	13~14	≥15
大观霉素	10	≤10	11~15	≥16
阿米卡星	30	≤14	15~16	≥17
链霉素	10	≤12	13~17	≥18
四环素	30	≤14	15~18	≥19
氟苯尼考	30	≤11	12~17	≥18
磺胺异噁唑	300	≤10	11~15	≥16
氧氟沙星	5	≤12	13~15	≥16
环丙沙星	5	≤15	16~20	≥21

2 结果与分析

2.1 分离培养

麦康凯琼脂平板上出现圆形、扁平、光滑的红色菌落。分

收稿日期:2014-06-05

作者简介:刘玉华(1979—),女,安徽淮北人,硕士,讲师,从事动物医学教学及科研工作。E-mail:yuhua-2004@163.com。

离菌株进行革兰氏染色、镜检,视野中可见中等大小、无芽孢的革兰氏阴性直杆菌。共有 13 株细菌菌落特征、形态特征、染色特性符合大肠杆菌的特性,结合临床表现,初步鉴定为大肠杆菌。

2.2 生化试验

对分离菌进行生化试验,结果显示,吡哌、甲基红试验阳性;V-P、柠檬酸盐利用试验阴性;13 株细菌中除 2 株细菌外均能发酵乳糖,均不产生硫化氢,不分解尿素。13 株分离菌(TZY1~TZY13)被鉴定为大肠杆菌(表 2)。

表 2 分离菌株生化试验结果

菌株	吡哌	甲基红	V-P	柠檬酸盐利用	葡萄糖产气	乳糖	甘露糖	麦芽糖	尿素酶	硫化氢
TZY1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY2	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY3	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
TZY4	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY4	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY5	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY6	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
TZY7	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY8	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY9	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY10	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY11	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY12	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TZY13	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-

注:“+”表示 90%~100% 阳性;“-”表示 0~10% 阳性。

2.3 药敏试验结果

标准菌株大肠杆菌(ATCC25922)的抑菌圈直径在预期

范围内,说明检测过程正确,可以进行结果判定。

2.3.1 13 株大肠杆菌对 12 种抗菌药物的耐药率 由表 3 可知,13 株大肠杆菌对头孢噻吩的耐药率最低,为 0,对链霉素的耐药率最高,为 92.3%。对氟苯尼考、阿米卡星、大观霉素的耐药率相对较低,对大多数抗菌药物表现出较强的耐药性,对阿莫西林、氧氟沙星、环丙沙星、四环素、庆大霉素、氨苄西林、磺胺异噁唑耐药率分别达 46.2%、53.8%、61.5%、69.2%、69.2%、76.9%、84.6%。

表 3 13 株大肠杆菌对 12 种抗菌药物的耐药率

抗菌药物	菌株数(株)			耐药率(%)
	耐药	中介	敏感	
氨苄西林	10	3	0	76.9
阿莫西林	6	3	4	46.2
头孢噻吩	0	1	12	0
庆大霉素	9	1	3	69.2
大观霉素	4	1	8	30.8
阿米卡星	3	2	8	23.1
链霉素	12	1	0	92.3
四环素	9	2	2	69.2
氟苯尼考	2	2	9	15.4
磺胺异噁唑	11	1	1	84.6
环丙沙星	8	2	3	61.5
氧氟沙星	7	2	4	53.8

2.3.2 13 株大肠杆菌的多重耐药结果 由表 4 可知,13 株大肠杆菌均产生多重耐药现象,其中 3 重耐药菌株 1 株,4 重耐药菌株 1 株,5 重耐药菌株 2 株,6 重耐药菌株 3 株,7 重耐药菌株 3 株,8 重耐药菌株 2 株,9 重耐药菌株 1 株。表明大肠杆菌多重耐药现象极其普遍,大多数大肠杆菌都是 5 耐、6 耐、7 耐甚至 8 耐。

表 4 13 株大肠杆菌的多重耐药结果

菌株	耐药种类
TZY1	链霉素、四环素、环丙沙星、氧氟沙星
TZY2	氨苄西林、阿莫西林、链霉素、四环素、环丙沙星、氧氟沙星
TZY3	氨苄西林、庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、磺胺异噁唑、环丙沙星
TZY4	氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、大观霉素、链霉素、四环素、氟苯尼考、磺胺异噁唑、环丙沙星
TZY5	氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、大观霉素、链霉素、四环素、磺胺异噁唑
TZY6	氨苄西林、庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、磺胺异噁唑、环丙沙星
TZY7	链霉素、四环素、磺胺异噁唑、环丙沙星、氧氟沙星
TZY8	氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、大观霉素、链霉素、四环素、磺胺异噁唑、环丙沙星
TZY9	氨苄西林、庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、氟苯尼考、磺胺异噁唑、氧氟沙星
TZY10	庆大霉素、大观霉素、链霉素、磺胺异噁唑、氧氟沙星、环丙沙星
TZY11	氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、链霉素、磺胺异噁唑、氧氟沙星
TZY12	氨苄西林、庆大霉素、链霉素、磺胺异噁唑、氧氟沙星
TZY13	氨苄西林、阿莫西林、磺胺异噁唑

3 结论与讨论

本研究对泰州地区 15 羽临床疑似大肠杆菌病病死鸭进行病原分离培养、革兰氏染色镜检、生化试验,分离鉴定出 13 株大肠杆菌。对分离菌进行药敏试验,结果表明,13 株大肠杆菌对头孢噻吩的耐药率最低,为 0,对链霉素的耐药率最高,为 92.3%。对氟苯尼考、阿米卡星、大观霉素的耐药率相对较低,对大多数抗菌药物则表现出较强的耐药性,对阿莫西

林、氧氟沙星、环丙沙星、四环素、庆大霉素、氨苄西林、磺胺异噁唑耐药率分别达到 46.2%、53.8%、61.5%、69.2%、69.2%、76.9%、84.6%。13 株大肠杆菌的多重耐药结果表明,大肠杆菌多重耐药现象非常普遍,大多数大肠杆菌都是 5 耐、6 耐、7 耐甚至 8 耐。由此可知,在泰州地区,治疗鸭大肠杆菌病应尽量选用大肠杆菌耐药率低的药物如头孢噻吩、氟苯尼考、阿米卡星等,尽量避免选用耐药率高的药物,如链霉素、磺胺异噁唑、氨苄西林等。由于大肠杆菌易产生耐药性,

赵莎莎,徐亚亚. 复方磺胺氯吡嗪钠-二甲氧苄啶混悬液对鸡的安全性试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):262-265.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.091

复方磺胺氯吡嗪钠-二甲氧苄啶混悬液对鸡的安全性试验

赵莎莎, 徐亚亚

(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要:选取 40 羽(雌雄各半)健康的 15 日龄扬州黄羽肉鸡,随机分成 4 组,每组 10 羽。试验鸡分别以 0 mg/kg、推荐剂量(300 mg/kg)、3 倍推荐剂量(900 mg/kg)、5 倍推荐剂量(1 500 mg/kg)的磺胺氯吡嗪钠、二甲氧苄啶混悬液连续给药 5 d,给药方式为自由饮水,5 d 后根据各组鸡平均增质量、血液学和血液生化学参数及组织病理学检查结果,评价磺胺氯吡嗪钠、二甲氧苄啶混悬液对鸡的安全性。

关键词:磺胺氯吡嗪钠;二甲氧苄啶混悬液;血液学;血液生化;安全性评价

中图分类号: S859.79⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0262-04

磺胺氯吡嗪属于磺胺类广谱抗菌药,临床主要用于治疗由艾美耳属球虫感染引起的鸡球虫病和特定的细菌性疾病。二甲氧苄啶为兽医专用抗菌增效剂,内服吸收很少,含 DVD 的复方制剂主用于防治禽、兔球虫病及畜禽肠道感染^[1]。本试验所用的复方磺胺氯吡嗪钠-二甲氧苄啶混悬液临床拟用于治疗由艾美耳属球虫感染引起的鸡球虫病,推荐的给药方案为 1 L 水加入本品 1~2 mL,连用 3~5 d^[2]。笔者参照美国 FDA《新兽药靶动物安全性试验指南》(Guideline No. 33)中禽的毒性研究内容,结合该药物拟推荐的临床使用剂量设计并进行了本次试验,以提供磺胺氯吡嗪钠、二甲氧苄啶混悬液在鸡的组织病理学和临床病理学方面的研究数据,了解该产品对拟用靶动物的安全性。

1 材料与方法

1.1 供试药品

收稿日期:2014-04-14

作者简介:赵莎莎(1979—),女,江苏徐州人,实验师,从事实验室教学工作。E-mail:157568300@qq.com。

用药前最好通过药敏试验筛选敏感药物以保证用药效果,同时也可减少耐药性的产生。李新宇报道了泰州地区大肠杆菌对氧氟沙星、头孢噻吩、头孢噻肟、阿米卡星、磺胺甲基异噁唑、氟苯尼考、安普霉素等药物敏感^[3]。陈志华等认为,14 株鸭大肠杆菌中,78.6% 的菌株对 10 种抗菌药物表现为多重耐药性^[4]。张俊丰等认为,34 株鸡肠道大肠杆菌均为多重耐药菌株,最少可对 5 种药物耐药,最多可对 8 种药物耐药^[5]。本研究中分离的 13 株大肠杆菌也产生多重耐药现象,表明大肠杆菌多重耐药现象已经非常普遍。张俊丰等认为,细菌耐药性监测固然重要,但对细菌耐药机制及耐药性扩散机制进行研究也同样重要^[5]。徐树强等研究发现,即便是同一血清型也存在药敏性差异,这说明耐药性与血清型无关,耐药性的产生主要是由于临床上长期盲目用药所导致的^[6]。陈文静等认为,导致鸭临床发病的大肠杆菌耐药性与血清型、毒力相关基因之间并无相关性^[7]。抗生素耐药性是抗生素应用的

磺胺氯吡嗪钠、二甲氧苄啶混悬液,含量 20.0% + 4.0%,规格为 200 mL,由中牧南京动物药业有限公司提供。

1.2 试验仪器与试剂

1.2.1 仪器及其他 OLYMPUS Au2700 全自动生化分析仪,生物显微镜,离心机;其他器具有血细胞计数板、离心管、载玻片、盖玻片等。

1.2.2 试剂 试验中所用试剂主要有瑞士染液、结晶紫染液、中性红染液等。

1.3 试验动物及饲养地点

1 日龄黄羽肉鸡 100 羽,购自国家禽研究所孵化场,每天由专人定时喂料不含任何药物的全价日粮(国家禽研究所提供),自由饮食。育雏及试验期间如需保温则采用油汀或白炽灯保温。

1.4 试验动物入选和剔除标准

入选的 15 日龄鸡在试验前 1 d 必须经兽医检查确认为临床健康。试验前处于濒死的鸡以及生病或受伤的鸡不得作为试验动物用于本次试验。

1.5 方法

1.5.1 试验分组与给药方案 试验前 1 d 从 100 羽饲养至

结果,禽类养殖中应合理使用抗生素。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2004:217.
- [2] 陈博言. 兽医传染病学[M]. 5 版. 北京:中国农业出版社,2006:111-112.
- [3] 李新宇. 泰州市部分乡镇鸡大肠杆菌的分离及药敏试验[J]. 中国动物保健,2011,13(6):20-22.
- [4] 陈志华,刘富来,缪小群,等. 鸭大肠杆菌的药物敏感性试验[J]. 中国兽药杂志,2004,38(12):23-25.
- [5] 张俊丰,黄东璋,陈琳,等. 鸡肠道大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(11):179-184.
- [6] 徐树强,杨安龙,吴兆林,等. 扬州地区鸡大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 江苏农业科学,2006(6):330-332.
- [7] 陈文静,韩先干,何亮,等. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报,2010,18(2):34-40.