

葛爱民. 犬源金黄色葡萄球菌临床分离株的耐药性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 219-221.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.072

犬源金黄色葡萄球菌临床分离株的耐药性

葛爱民

(山东畜牧兽医职业学院, 山东潍坊 261061)

摘要:对宠物门诊分离得到的25株金黄色葡萄球菌进行耐药性分析与 β -内酰胺酶测定,以了解近3年来潍坊地区犬源金黄色葡萄球菌的耐药性及其是否产生 β -内酰胺酶,以期为临床上致病性金黄色葡萄球菌感染的有效控制提供依据。使用纸片扩散法进行药敏试验;使用碘量法、酚红法测定 β -内酰胺酶的产生。25株金黄色葡萄球菌对替考拉宁、利福平、万古霉素十分敏感,对其他25种药物呈现一定耐药性,并对大多数 β -内酰胺类抗生素呈现很高的耐药性。碘量法、酚红法测得产 β -内酰胺酶的菌株分别为18、17株。产 β -内酰胺酶的菌株对万古霉素、利福平、替考拉宁不具有耐药性,对 β -内酰胺类抗生素基本具有耐药性;不产酶的菌株对 β -内酰胺类抗生素的耐药性低于产酶菌株。可见, β -内酰胺酶的产生是金黄色葡萄球菌对 β -内酰胺类抗生素具有耐药性的主要原因。

关键词:犬;金黄色葡萄球菌;耐药性; β -内酰胺酶

中图分类号: S858.292 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0219-02

犬源金黄色葡萄球菌感染可导致脓皮病、外耳炎、角膜炎、关节炎、败血症等^[1],是较为常见的宠物犬临床细菌感染。由于近年来抗生素的过度使用,金黄色葡萄球菌耐药性的问题始终困扰着临床用药。为了解犬源致病性金黄色葡萄球菌在潍坊地区的耐药特性,对近3年宠物门诊分离得到的25株致病性金黄色葡萄球菌进行耐药性研究,为临床医师合理选用抗生素提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 25株致病性金黄色葡萄球菌分离自山东畜牧兽医职业学院及周边宠物门诊的犬临床病例。

1.1.2 试剂 牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂、氢氧化钠、淀粉购自北京奥博星生物技术有限公司;常用药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司;碘、碘化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠购自西陇化工股份有限公司;酚红购自天津科密欧化学试剂有限公司;注射用青霉素钠购自山东鲁抗医药股份有限公司。按常规方法自制培养基、碘液、酚红溶液(5 g/L)指示剂、PBS缓冲液。

1.1.3 仪器 电热恒温培养箱购自山东潍坊精鹰医疗器械有限公司;电热恒温水浴锅购自江苏省医疗器械厂;电子万用炉购自天津市泰斯特仪器有限公司;恒温培养振荡器购自上海智城分析仪器制造有限公司;磁力搅拌器购自常州翔天实验仪器厂。

1.2 方 法

1.2.1 金黄色葡萄球菌菌种的制备 配制普通肉汤琼脂培养基,制作斜面25个,用接种环取已保藏的25株金黄色葡萄

球菌分别接种在斜面上,“之”字形划线,37℃培养24~48 h。

1.2.2 金黄色葡萄球菌菌悬液的制备 配制普通肉汤培养基,经高温灭菌后倒在25支试管中(每支试管约2 mL),待液体冷却后,用灭菌的接种环在斜面上取少量金黄色葡萄球菌接种至试管内,于摇床中37℃培养24 h。

1.2.3 药敏试验 吸取100 μ L菌液至普通营养琼脂平板上,将菌液均匀涂抹在培养基表面,每株金黄色葡萄球菌对应4块平板,用镊子将药敏纸片放置于涂抹好菌液的平板上,每块平板均匀放置7种药敏纸片,于37℃恒温培养18 h,培养完成后用卡尺测量各药敏纸片的抑菌圈直径,记录试验结果。药敏试验判定标准:抑菌圈直径 ≥ 23 mm为高敏,抑菌圈直径在18~22 mm为敏感,抑菌圈直径在15~17 mm为中敏,抑菌圈直径在13~14 mm为低敏,抑菌圈直径 ≤ 12 mm为耐药。

1.2.4 碘量法检测 β -内酰胺酶的产生 采用点种法将斜面上的25株金黄色葡萄球菌分别接种于普通肉汤琼脂培养基(固体)平板(每块平板点种4株不同的金黄色葡萄球菌),于37℃恒温过夜。将淀粉琼脂上层培养基分装于试管中,每支9 mL,置于55℃恒温水浴锅。将1瓶注射用青霉素钠(800 000 U)溶于40 mL无菌水中,配成青霉素含量为20 000 U/mL的溶液。向每支装有淀粉琼脂上层培养基的试管中加入1 mL配好的青霉素溶液,混匀后立即倾注于培养好的平板上,铺平待凝。吸取碘液铺满平板表面,用滴管吸去多余碘液,于37℃培养箱中倒置10~15 min后,观察菌的周围是否出现无色透明圈,记录试验结果。

1.2.5 酚红法检测 β -内酰胺酶的产生 配制普通肉汤培养基(液体)并分装于25支试管中,每支试管4 mL。将斜面上的25株金黄色葡萄球菌分别接种在25支试管中,于摇床中37℃恒温培养24 h。向1瓶注射用青霉素钠(800 000 U)中加入1 mL配好的酚红溶液并混匀。用移液枪分别吸取0.2 mL青霉素酚红溶液加入每支待测菌液试管中,混匀后于37℃恒温培养10~15 min,观察溶液是否由红色变为黄色,记录试验结果。

收稿日期:2015-03-13

作者简介:葛爱民(1972—),男,河北滦县人,讲师,主要从事动物疫病防治与动物检疫的研究。Tel:(0536)3086419;E-mail:sdmxgam@163.com。

2 结果与分析

2.1 药敏试验

25株金黄色葡萄球菌的药敏试验结果显示,大多数菌株对壮观霉素、青霉素G、羧苄青霉素耐药,对万古霉素、利福平、替考拉宁敏感,对呋喃妥因、克林霉素、红霉素相对较为敏感,对其他各种药物均有很大程度的耐药性(表1)。

表1 25株金黄色葡萄球菌药敏试验结果

抗菌药物	耐药菌株数	耐药率(%)	抗菌药物	耐药菌株数	耐药率(%)
头孢噻肟	21	84	链霉素	23	92
万古霉素	3	12	呋喃妥因	12	48
壮观霉素	25	100	利福平	5	20
诺氟沙星	22	88	克林霉素	14	56
氯霉素	18	72	替考拉宁	4	16
头孢他啶	20	80	头孢西丁	23	92
头孢哌酮	23	92	利奈唑胺	14	56
头孢曲松	23	92	庆大霉素	20	80
阿米卡星	21	84	头孢唑啉	21	84
红霉素	15	60	羧苄青霉素	24	96
恩诺沙星	19	76	复方新诺明	24	96
青霉素G	23	92	左旋氧氟沙星	20	80
四环素	20	80	氨苄青霉素	18	72
环丙沙星	21	84	磺胺甲噁唑	22	88

2.2 碘量法检测 β -内酰胺酶的产生

采用碘量法检测 β -内酰胺酶的产生,有透明圈则表明有 β -内酰胺酶产生。结果显示,25株金黄色葡萄球菌中有18株可以产生 β -内酰胺酶,产酶率为72%(表2)。

表2 碘量法检测 β -内酰胺酶的产生结果

菌株编号	透明圈	菌株编号	透明圈	菌株编号	透明圈
1	-	10	+	18	+
2	-	11	+	19	+
3	-	12	+	20	+
4	-	13	+	21	+
5	-	14	+	22	+
6	+	15	+	23	-
7	+	16	+	24	-
8	+	17	+	25	+
9	+				

注:“+”为有透明圈,“-”为无透明圈。

2.3 酚红法检测 β -内酰胺酶的产生

采用酚红法检测 β -内酰胺酶的产生,溶液由红色变为黄色则表明有 β -内酰胺酶产生。结果显示,25株金黄色葡萄球菌中有17株可以产生 β -内酰胺酶,产酶率为68%(表3)。

表3 酚红法检测 β -内酰胺酶的产生结果

菌株编号	透明圈	菌株编号	透明圈	菌株编号	透明圈
1	-	10	-	18	+
2	-	11	+	19	+
3	-	12	+	20	+
4	-	13	+	21	+
5	-	14	+	22	+
6	+	15	+	23	-
7	+	16	+	24	-
8	+	17	+	25	+
9	+				

注:“+”为溶液由红色变为黄色,“-”为溶液未变为黄色。

2.4 β -内酰胺酶阳性菌株与阴性菌株的耐药性

结果显示, β -内酰胺酶阳性菌株对 β -内酰胺类抗生素的耐药性均非常高,阴性菌株对 β -内酰胺类抗生素的耐药性则低一些;对利福平、万古霉素、替考拉宁耐药的菌株均产生了 β -内酰胺酶(表4)。

表4 β -内酰胺酶阳性菌株与阴性菌株的耐药性

抗菌药物	β -内酰胺酶阳性菌株		β -内酰胺酶阴性菌株	
	耐药菌株数	耐药率(%)	耐药菌株数	耐药率(%)
头孢噻肟	18	100	3	43
头孢他啶	18	100	2	29
头孢哌酮	18	100	5	71
头孢曲松	18	100	5	71
青霉素G	17	94	6	86
头孢西丁	17	94	6	86
头孢唑啉	15	83	6	86
羧苄青霉素	18	100	6	86
氨苄青霉素	13	72	5	71
壮观霉素	18	100	7	100
阿米卡星	18	100	3	43
链霉素	18	100	5	71
庆大霉素	15	83	5	71
万古霉素	3	17	0	0
替考拉宁	4	22	0	0
诺氟沙星	17	94	5	71
左旋氧氟沙星	15	83	5	71
恩诺沙星	15	83	4	57
环丙沙星	17	94	4	57
磺胺甲噁唑	16	89	6	86
复方新诺明	18	100	6	86
呋喃妥因	8	44	4	57
四环素	15	83	5	71
氯霉素	15	83	3	43
红霉素	11	61	4	57
利福平	5	28	0	0
克林霉素	10	56	4	57
利奈唑胺	14	78	0	0

3 结论与讨论

本试验的25株金黄色葡萄球菌中,对万古霉素、利福平、替考拉宁敏感的菌株较多,耐药率分别为12%、20%、16%,与相关文献的结论^[2-3]基本一致。除上述3种抗生素外,试验菌株对呋喃妥因、克林霉素、红霉素也较为敏感,耐药率分别为48%、56%、60%,与卜聰等的研究结果^[4]一致。试验菌株对青霉素类、头孢类、氨基糖苷类抗生素的耐药性均很高,这与分离自不同动物和人体的金黄色葡萄球菌的耐药性研究结果相符。

细菌通过产生 β -内酰胺酶来水解抗生素中的 β -内酰胺环,使抗生素对细菌失去治疗效果,这是细菌产生耐药性的方式之一。碘量法利用 β -内酰胺酶作用于青霉素,产生裂解酸与淀粉竞争游离碘,使蓝色的碘-淀粉复合物褪色,碘量法具有操作简单、反应迅速的优点^[5]。酚红法也是利用青霉素经 β -内酰胺酶的作用产生裂解酸,从而改变pH值,使指示剂的颜色发生变化^[6]。这2种方法均可定性鉴定 β -内酰胺酶的存在^[4],本试验碘量法中有72%的菌株产生 β -内酰胺酶,酚红法中则有68%的菌株产生 β -内酰胺酶,2种方法测得的结果基本相符。由于观察结果的时间、加入试剂的时

李波,陈雪梅,于海龙,等.混合盐碱胁迫对苜蓿种子萌发特性的影响[J].江苏农业科学,2015,43(8):221-225.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.073

混合盐碱胁迫对苜蓿种子萌发特性的影响

李波¹,陈雪梅¹,于海龙¹,李红²,李雪婷¹,杨翌²,杨伟光²

(1.齐齐哈尔大学生命科学与农林学院,黑龙江齐齐哈尔 161006; 2.黑龙江省畜牧研究所,黑龙江齐齐哈尔 161000)

摘要:以14个苜蓿品种的种子为试验材料,研究不同浓度混合盐碱胁迫对苜蓿种子萌发的影响。结果表明,各苜蓿种子的发芽率、发芽势、发芽指数、活力指数、胚根长度、胚芽长度、干质量、鲜质量均随着复合盐碱浓度的增大而呈下降趋势,其中E组的盐碱浓度对种子萌发的影响最大。利用隶属函数和权重系数方法综合评价14个苜蓿品种的种子抗盐碱能力为:农菁1号>和平>龙牧801>龙牧806>龙牧81>图牧2号>德宝>龙牧100>草原1号>敖汉>龙牧803>赛特>公农1号>FD₂。

关键词:苜蓿;盐碱胁迫;种子萌发;抗盐碱性;隶属函数;相关性

中图分类号:S551+.701 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)08-0221-05

苜蓿(*Medicago sativa* L.)是豆科多年生草本植物,是世界栽培面积最大的豆科牧草之一,具有改良土壤、耐瘠薄、抗逆性强等特点。大面积盐碱地限制了我国畜牧业的发展,苜蓿产业不仅能够促进畜牧业的发展,还能改善生态环境,但苜蓿品种间的耐盐碱性差异较大^[1-3]。种子萌发期往往是对盐碱胁迫十分敏感的时期,这一时期的特性决定了该植物在某一地区能否成功建苗^[4]。本研究通过对不同品种的苜蓿进行混合盐碱胁迫,旨在对苜蓿品种进行耐盐碱性早期鉴定,为筛选具有较高耐盐碱性的苜蓿品种提供试验依据。

收稿日期:2014-08-10

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2011BAD17B01-04);黑龙江省自然科学基金(编号:QC2014C025);黑龙江省教育厅科学技术研究(编号:12521610);黑龙江省齐齐哈尔市国际合作项目(编号:GJHZ-201202)。

作者简介:李波(1962—),女,辽宁鞍山人,教授,主要从事细胞生物学的教学和科研工作。E-mail:libo1962@163.com。

间、青霉素溶液配制的时间不同,导致指示剂浓度、待测菌液浓度有一定差别,使个别菌株出现不同检测方法的差异。

试验结果显示,采用碘量法和酚红法测得的产生了 β -内酰胺酶的菌株,对 β -内酰胺类抗生素、氨基糖苷类抗生素均有高度的耐药性;而药敏试验中对 β -内酰胺类抗生素具有耐药性的菌株中,也有部分菌株并未产生 β -内酰胺酶。可见,产生 β -内酰胺酶是细菌对 β -内酰胺类抗生素产生耐药性的主要原因,但造成细菌耐药性的原因有很多,不单局限于 β -内酰胺酶的产生,且试验中的操作失误也可能影响试验结果。试验结果还表明,产酶菌株对万古霉素、利福平、替考拉宁的敏感程度很高,不产酶菌株对这3种抗生素完全敏感,且不产酶菌株对利奈唑胺均无耐药性,这与刘小朵的研究结果^[7]一致。

近年来宠物市场发展迅猛,人们对宠物健康的重视程度非常高,要求门诊医师能够凭借经验和实验室检测及时解决致病性金黄色葡萄球菌等细菌感染问题;因此,研究细菌的耐药性对于临床合理使用抗生素具有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

14个苜蓿品种的种子由黑龙江省畜牧研究所提供,苜蓿品种相应的品种编号见表1。

表1 14个苜蓿品种的编号

编号	品种	编号	品种	编号	品种	编号	品种
1	龙牧801	5	赛特	9	龙牧81	13	公农1号
2	龙牧806	6	草原1号	10	农菁1号	14	FD ₂
3	龙牧803	7	德宝	11	敖汉		
4	图牧2号	8	龙牧100	12	和平		

1.2 试验方法

1.2.1 盐碱浓度梯度的设置 根据黑龙江省松嫩平原一些地区盐碱地的盐碱组成,选择氯化钠、硫酸钠、碳酸钠、碳酸氢钠4种盐按照一定比例复合,设置A、B、C、D、E随盐碱浓度递增的5组不同复合盐碱组别。盐碱梯度的配比见表2。

参考文献:

- [1]王彤光. 宠物疫病与防治技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2011:78.
- [2]邵士慧,李槿年,王评评,等. 猪源致病性金黄色葡萄球菌的分离鉴定及其耐药性分析[J]. 中国微生物学杂志, 2010, 22(4): 308-311.
- [3]赵永达,黄显会. 一例犬金黄色葡萄球菌病的诊断及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9): 225-226.
- [4]卞聪,李松. 215株金黄色葡萄球菌临床分布及耐药性分析[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(20): 3135-3136.
- [5]陈号,马文静,田晋红,等. 牛奶中非法添加 β -内酰胺酶的检测方法及研究现状[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(1): 67-69.
- [6]张鑫潇,谢岩黎,王金水,等. 牛乳中 β -内酰胺酶的检测方法研究进展[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(2): 45-47.
- [7]刘小朵. 产 β -内酰胺酶的金黄色葡萄球菌的耐药情况分析[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(21): 138.