

临床抗菌药对兔源沙门氏菌的体外抑菌效果

明月月, 吴群, 牛金利, 丁月霞* (广东海洋大学农学院, 广东湛江 524088)

摘要 为了解临床常用抗菌药对兔源沙门氏菌的体外抑菌效果, 采用微量肉汤二倍稀释法测定临床常用 8 种抗菌药物对病原菌的最小抑菌浓度(MIC), 采用棋盘稀释法进行体外联合药敏试验测定病原菌部分的抑菌浓度指数(FIC)。结果表明, 分离鉴定病原菌为沙门氏菌; 庆大霉素的抑菌效果最强(0.125 $\mu\text{g/mL}$), 其次为氧氟沙星(0.250 $\mu\text{g/mL}$)、恩诺沙星(0.500 $\mu\text{g/mL}$)、磺胺嘧啶钠(8.000 $\mu\text{g/mL}$)、磺胺间甲氧嘧啶与阿米卡星(均为 16.000 $\mu\text{g/mL}$) 抑菌效果较差, 而阿莫西林与青霉素的抑菌效果最差(均为 128.000 $\mu\text{g/mL}$)。联合药敏试验结果表明, 阿莫西林与氧氟沙星、庆大霉素与氧氟沙星联用呈协同作用, 阿米卡星与磺胺嘧啶钠、阿米卡星与磺胺间甲氧嘧啶、恩诺沙星与阿米卡星联用呈无关作用, 氧氟沙星与磺胺间甲氧嘧啶、青霉素与阿米卡星、庆大霉素与磺胺嘧啶钠联用呈拮抗作用。

关键词 兔源沙门氏菌; 抗菌药; 最小抑菌浓度(MIC); 联合药敏试验

中图分类号 S855.1 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)06-0074-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.06.021



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Antimicrobial Effects of Clinical Antibacterial Drugs on Salmonella from Rabbit *in vitro*

MING Yue-yue, WU Qun, NIU Jin-li et al (Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract In order to understand antimicrobial effect of the clinical commonly used antimicrobial agents on salmonella from rabbit *in vitro*, we used eight kinds of antimicrobial drugs against pathogens to investigate the minimum inhibitory concentration (MIC) of the clinical commonly, and the fractional inhibitory concentration (FIC index) of some antimicrobial agents against pathogens was determined by the chessboard dilution method of microbroth. The results showed that the isolated and identified pathogenic was *Salmonella* sp.. And antibacterial drugs of gentamicin performed well with MIC of 0.125 $\mu\text{g/mL}$; followed by ofloxacin (0.250 $\mu\text{g/mL}$) and enrofloxacin (0.500 $\mu\text{g/mL}$), the sulfadiazine sodium (8.000 $\mu\text{g/mL}$), sulfamonomethoxine and amikacin (both 16.000 $\mu\text{g/mL}$) have even lower antimicrobial effect; amoxicillin and penicillin showed the worst antimicrobial effect, with MIC both of 128.000 $\mu\text{g/mL}$. By combining with drug sensitive test results, the combination of amoxicillin and ofloxacin, gentamicin and ofloxacin showed a synergy effect. But the combination of amikacin and sulfadiazine sodium, amikacin and sulfamonomethoxine, enrofloxacin and amikacin showed no correlation. Penicillin and amikacin, gentamicin and sulfadiazine sodium had a combination role in antagonism. The combination of ofloxacin and sulfamonomethoxine, penicillin and amikacin, gentamicin and sulfadiazine sodium showed antagonism.

Key words Salmonella from rabbit; Antibiotics; Minimum inhibitory concentration (MIC); Combined drug sensitiveness test

沙门氏菌是肠杆菌科中最常见的病原菌之一, 为两端钝圆、无荚膜、无芽孢、周身鞭毛、大部分都具有菌毛的革兰氏阴性胞内寄生短肠杆菌^[1]。沙门氏菌在自然界中广泛分布, 至今已检测出血清型 2 500 余种, 我国已有 292 个血清型的报道^[2], 能引起畜禽、犬猫等多种动物感染疾病, 也可导致人类食物中毒, 具有广泛的致病性^[3]。据调查, 我国由沙门氏菌引起的食源性疾病占 70%~80%, 有相当一部分人感染沙门氏菌与食用沙门氏菌污染的动物性食品有关^[4]。兔副伤寒病, 即兔沙门氏菌病, 是由鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌这两种病原菌引起的兔消化道疾病。虽然兔子不是沙门氏菌的主要宿主, 且关于家兔感染沙门氏菌的报道较少, 但我国是世界上兔肉生产和出口大国^[5], 兔肉品质、卫生以及安全显得格外重要。在实际生产中, 沙门氏菌病可用抗生素治疗, 但不合理使用会产生耐药性^[6]等问题。如今耐药菌株的不断出现, 曾经高效的抗菌药现已逐渐落下帷幕, 而合理的联合用药可扩大抗菌谱, 增强疗效减少用量, 延缓或降低耐药性的产生。为减少生产中沙门氏菌所带来的经济损失, 如何有效合理利用抗菌药控制沙门氏菌成为当前讨论的热点。笔者通过微量肉汤二倍稀释法测定 8 种抗生素对分离

鉴定的兔源沙门氏菌的 MIC 值, 采用棋盘稀释法进行体外联合药敏试验, 测定其对兔源沙门氏菌的部分抑菌浓度指数(FIC), 旨在为临床上更有效地联合使用抗菌药物, 防治沙门氏菌病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与药物。 菌株由广东海洋大学动物医院就诊病例垂耳兔肛门拭子分离。

恩诺沙星(批号为 170524), 购自广东海康兽药有限公司; 磺胺间甲氧嘧啶磺胺(批号为 20180120)、磺胺嘧啶钠(批号为 20180210)均购自上海骑骠动物保健品有限公司; 阿米卡星(批号为 180101)和庆大霉素(批号为 180170)购自南海海灵化学制药有限公司; 阿莫西林(批号为 20131108), 购自四川鼎尖动物药业有限责任公司; 青霉素(批号为 131105), 购自华北制药股份有限公司; 氧氟沙星(批号为 20150213), 购自鹤山市南华动物药业有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器。 营养肉汤和营养琼脂, 均购自北京陆桥技术有限责任公司; 革兰氏染色液和麦康凯琼脂均购自广东环凯微生物科技有限公司; 细菌微量生化鉴定盒购自杭州滨和微生物试剂有限公司; 干燥箱、生化培养箱、压力蒸汽灭菌器、博迅蒸馏水器、电子分析天平、超净工作台等主要仪器。

1.2 方法

1.2.1 药液的制备。 用无菌生理盐水配制抗生素药液, 初始浓度为 1 280 $\mu\text{g/mL}$ (磺胺类抗生素为 2 560 $\mu\text{g/mL}$), 溶解

基金项目 广东海洋大学创新强校工程项目(Q18290); 广东海洋大学科研启动项目(R17020)。

作者简介 明月月(1993—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 畜牧。
* 通信作者, 讲师, 博士, 从事病原菌耐药性研究。

收稿日期 2019-09-17

后置于 4 ℃ 下保存备用。

1.2.2 致病菌鉴定及菌液制备。将病料接种于灭菌营养肉汤中 37 ℃ 下培养 24 h 后,在营养琼脂平板上划线 37 ℃ 下培养 24 h,挑单个菌落于麦康凯琼脂平板培养基上 37 ℃ 下培养 24 h,挑取透明或半透明的白色单个菌落革兰氏染色并镜检,观察其形态特征,并与沙门氏菌形态特征进行对比。挑选疑似菌株,活化后取 20 μL 菌液加入微量生化管中封闭。在相应温度培养 24~48 h 后,观察培养结果并对照《肠杆菌科细菌生化鉴定编码册》确定菌株菌属。无菌挑取已分离鉴定的单个菌落于营养肉汤中 37 ℃ 下培养 24 h 后,在营养琼脂平板上划线37 ℃ 下培养 24 h;挑取单个菌落接种于 2 mL 营养肉汤中,37 ℃ 下培养 24 h 后,吸取 0.5 mL 菌液,将菌液用肉汤按 0.1 倍梯度稀释至细菌含量为 1×10⁵ CFU/mL(与 0.5 麦氏比浊管的浑浊度对比),备用。

1.2.3 单药 MIC 测定与结果判定。采用微量肉汤法二倍稀释法,在 96 孔板上添加供试菌液:第 1 列均添加 180 μL,其余各孔均添加 100 μL 至第 11 孔,第 12 孔作为空白对照(即阴性对照)。取 20 μL 对应供试药物分别加入相应药物的 1 号孔,用移液枪吹吸混匀后吸出 100 μL 加至 2 号孔,同理按顺序稀释至 11 号孔,弃去 100 μL。1~12 号孔的药物含量依次为 128.000、64.000、32.000、16.000、8.000、4.000、2.000、1.000、0.500、0.250、0.125、0 μg/mL。每种药物进行 2 组平行对照。稀释结束将 96 孔板置于生化恒温箱 37 ℃ 培养 24 h 后观察结果。结果判断标准如下:孔内肉汤呈明显混浊判为阳性,肉汤呈清亮无菌生长的最低浓度即为最小抑菌浓度。

1.2.4 联合药敏试验测 FIC 指数与结果判定。采用棋盘稀释法进行体外联合药敏试验,测定 FIC 指数,以单药对供试菌 MIC 值为中心浓度,对其 16.00 倍、8.00 倍、4.00 倍、2.00 倍、1.00 倍、0.50 倍、0.25 倍浓度分别进行联合,并设置甲药、乙药的单药对照及菌液阳性对照和肉汤阴性对照。采用二倍稀释法制备 A、B 抗生素菌药液,在试管架上摆 2 排 7 支试管,第 1 排稀释 A 抗生素、第 2 排稀释 B 抗生素。将第 1 排每个试管中分别加入 2 mL 标准菌液后,在第 1 管加入 2 mL 32.00 MIC 的 A 药液,混匀后吸取 2 mL 到第 2 管,依次稀释至第 7 管,最后 1 管弃去 2 mL;按上述方法所得 1~7 号孔的 A 药物浓度依次为 16.00 MIC、8.00 MIC、4.00 MIC、2.00 MIC、1.00 MIC、0.50 MIC、0.25 MIC。按此方法配制 B 抗生素菌药液。在 96 孔板上,将 1~7 号 A 菌药液管分别依次加入 100 μL 于 1~7 排的前 8 个孔,将 1~7 号 B 菌药液管分别依次加 100 μL 于 1~7 列的前 8 个孔;其第 8 排作为 B 药单药对照,第 8 列作为 A 药单药对照,第 8 排的第 8 列孔中加 200 μL 菌液作为阳性对照,试验设置阴性对照。结果判断如下:底部对光观察,肉汤浑浊为阳性,否则为阴性;以 FIC 值为判断依据:FIC = 甲药单药 MIC/甲药单药 MIC + 乙药单药 MIC/乙药单药 MIC,若 FIC ≤ 0.5,则为协同作用;若 0.5 < FIC ≤ 1.0,则为相加作用;若 1.0 < FIC ≤ 2.0,则为无关作用;若 FIC > 2.0,则为拮抗作用。

2 结果与分析

2.1 致病菌鉴定

2.1.1 菌落形态观察。在麦康凯琼脂平板上,菌落呈白色凸起,边缘圆润。挑单个菌落革兰氏染色并镜检,呈现红色短杆菌。

2.1.2 微量生化管鉴定。将生化鉴定结果对照《肠杆菌科细菌生化鉴定编码册》进行编码,得出编码结果为 611,见表 1,结果显示该菌种为沙门氏菌。

表 1 生化管结果
Table 1 Biochemical tube test results

组别 Group	生化项目 Biochemical items	代号 Code	试验结果 Result	各阳性指标 结果累计数值 Cumulative value of each positive result
①	葡萄糖	A/G	A	A
②	赖氨酸脱羧酶	4	+	6
	鸟氨酸脱羧酶	2	+	
	硫化氢	1	-	
③	靛基质	4	-	1
	乳糖	2	-	
	卫毛醇	1	+	
④	苯丙氨酸脱羧酶	4	-	1
	尿素	2	-	
	枸橼酸	1	+	

2.2 单药最小抑菌浓度(MIC) 由表 2 可知,庆大霉素的抑菌效果最强(0.125 μg/mL),而氧氟沙星(0.250 μg/mL)、恩诺沙星(0.500 μg/mL)、磺胺嘧啶钠(8.000 μg/mL)、磺胺间甲氧嘧啶与阿米卡星(均为 16.000 μg/mL)抑菌效果较差,而阿莫西林与青霉素的抑菌效果最差(均为 128.000 μg/mL)。

表 2 单药最小抑菌浓度(MIC)
Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of single drugs

抗生素 Antibiotics	MIC μg/mL	抗生素 Antibiotics	MIC μg/mL
庆大霉素	0.125	磺胺间甲氧嘧啶	16.000
氧氟沙星	0.250	阿米卡星	16.000
恩诺沙星	0.500	阿莫西林	128.000
磺胺嘧啶钠	8.000	青霉素	128.000

2.3 2 种抗生素的体外联合药敏试验结果 由表 3 可知,阿莫西林+氧氟沙星、庆大霉素+氧氟沙星呈协同作用,FIC 指数均大于等于 0.5;阿米卡星+磺胺嘧啶钠、阿米卡星+磺胺间甲氧嘧啶、恩诺沙星+阿米卡星呈无关作用,FIC 指数均介于 1.0~2.0(含 2.0);氧氟沙星+磺胺间甲氧嘧啶、青霉素+阿米卡星、庆大霉素+磺胺嘧啶钠呈拮抗作用,FIC 指数大于 2.0。

3 讨论

3.1 单药最小抑菌浓度(MIC) 该试验结果表明,各药物的抑菌效果从大到小依次为庆大霉素、氧氟沙星、恩诺沙星、磺胺嘧啶钠、磺胺间甲氧嘧啶、阿米卡星、阿莫西林、青霉素;8 种抗生素对分离菌株产生抑菌作用的程度差异可能是因为不同类抗生素作用机制不同^[7]、抑菌作用范围或菌株耐药程度不同。

庆大霉素与阿米卡星为氨基糖苷类抗生素(AGs),属于

广谱高效杀菌性抗生素,对需氧 G⁻杆菌抑菌效果好,对 G⁺效果较差,对厌氧菌无效。AGs 作用机制^[8]是抑制细菌蛋白质合成,迄今仍对革兰氏阴性菌感染起到良好效果,并在临床生产中广泛使用。刘振波等^[9]试验结果表明,庆大霉素对创伤弧菌敏感性较强。牛江婷等^[10]研究表明庆大霉素对兔支气管败血波氏杆菌有较强抑菌作用,并与该研究中庆大霉素的抑菌效果相符;阿米卡星效果比庆大霉素的效果差,可能该兔源沙门氏菌菌株已产生对阿米卡星的耐药性。氧氟沙星与恩诺沙星属于喹诺酮类抗生素,其是广谱、高效、杀菌力强的一类化学合成抗菌药物,抑制细菌 DNA 回旋酶,阻断 DNA

合成和复制致细菌死亡;在该试验中对沙门氏菌产生了一定的抑菌作用。磺胺嘧啶钠与磺胺间甲氧嘧啶属于磺胺类抗生素,是广谱、慢作用型抑菌药物,对大多数 G⁺菌和部分 G⁻菌有效,对沙门氏菌较为敏感;它们在该试验中抑菌效果较好,但抗菌活性较弱,与其他抗菌药物联合效果更好,其主要是干扰细菌叶酸代谢而抑制其生长繁殖。阿莫西林与青霉素属于 β-内酰胺类抗生素,杀菌力强,对 G⁺菌、部分 G⁻球菌及 G⁺球菌等高度敏感,毒性低,但细菌可产生相应的酶破坏 β-内酰胺环,是产生耐药性的主要原因。但这 2 种抗生素在该试验中效果并不理想。

表 3 联合用药试验结果
Table 3 The results of combined drug test

组别 Group	甲抗菌药+乙抗菌药 Antibacterial drug A+ Antibacterial drug B	甲抗菌药 Antibacterial drug A		乙抗菌药 Antibacterial drug B		FIC 指数 FIC index	联合结果 Combination results
		单药 MIC MIC of single drugs μg/mL	联合 MIC MIC of combined drugs μg/mL	单药 MIC MIC of single drugs μg/mL	联合 MIC MIC of combined drugs μg/mL		
①	氧氟沙星+磺胺间甲氧嘧啶	0.250	0.500	8.000	8.000	3.00	拮抗
②	阿米卡星+磺胺嘧啶钠	16.000	16.000	4.000	4.000	2.00	无关
③	青霉素+阿米卡星	128.000	256.000	16.000	64.000	6.00	拮抗
④	阿莫西林+氧氟沙星	128.000	32.000	0.250	0.063	0.50	协同
⑤	庆大霉素+磺胺嘧啶钠	256.000	4 096.000	4.000	64.000	32.00	拮抗
⑥	阿米卡星+磺胺间甲氧嘧啶	16.000	4.000	8.000	8.000	1.25	无关
⑦	恩诺沙星+阿米卡星	0.500	0.500	16.000	16.000	2.00	无关
⑧	庆大霉素+氧氟沙星	0.250	0.063	0.125	0.031	0.50	协同

3.2 2 种抗生素体外联合药敏试验 联合试验中,抗菌药物可表现为协同、相加、无关、拮抗 4 种作用,抗生素可根据其对细菌作用方式分为四大类:青霉素与阿莫西林属于 I 类抗生素(繁殖期杀菌药),可阻断粘肽的合成,影响细胞壁结构,有较强的杀菌效果;庆大霉素、阿米卡星、恩诺沙星与氧氟沙星属于 II 类抗生素(静止期杀菌药),对静止期细菌有较强杀灭作用,阻碍蛋白质合成;磺胺嘧啶钠与磺胺间甲氧嘧啶属于 IV 类抗生素(慢效抑菌药),作用于细菌叶酸转化,影响菌体合成蛋白质。

协同作用组:阿莫西林+氧氟沙星是 I 类+II 类联合可能呈现协同作用,该试验结果与理论相符,也与李荣誉等^[11]研究结果一致;对庆大霉素与氧氟沙星来说,同类抗生素不宜联用,但作用点不同的抗生素可以联用,如庆大霉素与喹诺酮类、磺胺药与抗菌增效剂等可阻碍蛋白质合成的不同环节,可产生增强或相加作用^[12],在该试验中呈现协同作用,与肖华平等^[13]试验结果相一致。无关作用组:阿米卡星+磺胺嘧啶钠、阿米卡星+磺胺间甲氧嘧啶属于 II 类+IV 类联用,可获协同或相加作用;恩诺沙星与阿米卡星同为 II 类抗生素,影响菌体内蛋白质合成的不同环节,所以在联合用药可产生增强或相加作用;此外在刘玲红^[14]的试验结果中也呈现出良好的抑菌效果,但该试验中呈现出无关作用;在单药抑菌效果中阿米卡星效果比庆大霉素效果差,可能是该兔源沙门氏菌菌株已产生对阿米卡星的耐药性,影响了这 3 组的联合药敏试验结果。拮抗作用组:庆大霉素+磺胺嘧啶钠、氧氟沙星+磺胺间甲氧嘧啶均属于 II 类+IV 类联用,可获协同或相加作用,但该试

验结果与理论不符,可能是因磺胺类药物易碱化产生沉淀而导致结果产生误差;青霉素+阿米卡星属于 I 类+II 类联合,可获协同作用^[13],而该试验联合用药产生拮抗作用,是否与此氨基糖苷类产生抑菌作用有关则有待进一步研究。

参考文献

[1] 石永琼.沙门氏菌的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(25): 37-38,41.
[2] 彭海滨,吴德峰,孔繁德,等.我国沙门菌污染分布概况[J].中国国境卫生检疫志,2006,29(2): 125-128.
[3] 岂晓鑫.1950-2009 年动物源沙门菌的分型、耐药性及致病性研究[D].扬州:扬州大学,2018.
[4] HUR J, JAWALE C, LEE J H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review[J]. Food research international, 2012, 45(2): 819-830.
[5] 孙海涛,张印,白丽雅,等.山东养兔发展现状与对策[J].山东畜牧兽医,2016,37(9): 75-76.
[6] 吴晓君,王少辉,杨登辉,等.华东地区沙门菌流行病学及耐药性分析[J].中国动物传染病学报,2019,27(1): 49-54.
[7] 谭艳,方治平.抗菌药物的作用机制及细菌耐药性机制的研究进展[J].国外医药(抗生素分册),2003(2): 65-69.
[8] 钟艾玲,田敏,刘艳全,等.氨基糖苷类抗生素的耐药机制研究进展[J].中国抗生素杂志,2019(4): 401-405
[9] 刘振波,夏苏苏,康琳,等.创伤弧菌针对氨基糖苷类药物的耐药性研究[J].中国国境卫生检疫杂志,2019,42(2): 90-92.
[10] 牛江婷,方词,伊淑帅,等.兔支气管败血波氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国兽药杂志,2018,52(2): 26-30.
[11] 李荣誉,黄慧,樊国燕,等.4 种抗菌药对鼠伤寒沙门菌的敏感性及联合用药效果[J].贵州农业科学,2018,46(12): 83-85.
[12] 王富海,张爱珍,曾彩贤,等.喹诺酮类抗菌药物的药理作用和临床合理应用探讨[J].中国合理用药探索,2018,15(1): 75-77.
[13] 肖华平,黄忍.阿莫西林与阿米卡星对沙门氏菌的体外联合药敏试验[J].中国兽药杂志,2006(9): 34-36.
[14] 刘玲红.动物源大肠杆菌的抗药性及联合用药策略研究[D].泰安:山东农业大学,2018.