中西医结合治疗产 ESBLs 大肠杆菌 引起的种鸭输卵管炎

司红彬¹, 唐承明², 陈鹏举³

(1. 广西大学 动物科技学院, 广西 南宁 530005; 2. 广西兽药监察所, 广西 南宁 530001;
3. 合肥市兽药制剂工程研究中心, 安徽 合肥 230001)

摘要: 采用实验室方法分离鉴定了种鸭输卵管炎细菌, 并对分离菌进行超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)检测和其对24种抗菌药的敏感性测定。结果显示, 分离细菌为产ESBLs大肠杆菌。药敏试验结果表明, 该菌对兽医临床中常用的 β -内酰胺类抗生素、氟喹诺酮类、氯霉素类、氨基糖苷类等均产生耐药性; 对黏杆菌素、亚胺培南、美罗培南敏感; β -内酰胺类药物与酶抑制剂联用能使药物对细菌的最低抑菌浓度(MIC)降低。采用复方 β -内酰胺类药物结合中药治疗一周, 取得了良好的治疗效果, 种鸭产蛋率恢复至86%。

关键词: 种鸭; 输卵管炎; β -内酰胺酶; 大肠杆菌

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)02-0157-04

Treating Seed Duck Salpingitis Caused by Producing-ESBLs *Escherichia coli* with Antibacterial and Chinese Traditional Medicine

SI Hong-bin¹, TANG Cheng-ming², CHEN Peng-ju³

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Guangxi Institute of Veterinary Drug Control, Nanning 53000, China;

3. The Project Research Center of Veterinary Drugs Preparation of Hefei, Hefei 230001, China)

Abstract: Bacteria which caused seed duck salpingitis were isolated and identified by laboratory means and its sensitivities to the extended spectrum β -lactamase (ESBLs), 24 species antibacterial and 5 pharmacopoeia compound pharmaceutical were determined. The results showed that the separated bacterium was *Escherichia coli* producing ESBLs. Tests of drug sensitivities showed that the bacterium produced drug resistance to many usual veterinary clinical drugs, such as β -lactam antibiotics, quinolones, chloramphenicols, aminoglycoside, and so on. The bacteria was sensitive to polymycin, imipenem, meropenem, β -lactam drugs combined with enzyme inhibitor could decrease the minimum inhibitory concentration (MIC). Therefore the best effective treating measures for salpingitis was using β -lactam drug and enzyme inhibitor combined with Chinese traditional medicine. One week after treatment, the laying rate of seed duck was recovered to 86%.

Key words: Seed duck; Salpingitis; ESBLs; *E. coli*

不明原因产蛋下降是种鸭行业常见疾病, 该病
主要引起种鸭产蛋量下降、蛋壳颜色异常、蛋形异

常, 造成受精率、孵化率受到较大影响, 给实际生产
带来较大损失。引起产蛋下降的原因很多, 如病毒

收稿日期: 2010-10-03

基金项目: 广西大学校基金(XBZ090415)

作者简介: 司红彬(1977-), 男, 河南商丘人, 博士, 主要从事细菌耐药性研究。E-mail: zhuli_2009@163.com

病感染、细菌病感染、饲料问题、环境问题等。在实际生产中经常遇到细菌引起种鸭输卵管炎而造成产蛋下降,但大都将其认为是普通疾病,随便用些常规药物治疗,结果久治不愈,造成输卵管伞发生器质性变化而被迫淘汰,给养殖户造成较大损失。此处举一例由产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠杆菌引起的种鸭输卵管炎的病菌分离鉴定及药敏试验,以期对种鸭输卵管炎的治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 发病情况

柳州市某养鸭户饲养的 290 日龄樱桃谷种鸭 20 000 只,于 2010 年 6 月开始,产蛋率由 90% 缓慢下降到 80%,其中蛋壳、蛋形不够好,沙皮蛋、螺纹蛋等畸形蛋比例由 3% 上升到 15%,合格种蛋的受精率、出雏率基本正常。对发病种鸭饲喂了头孢类药物、氟苯尼考等多种西药及中药,畸形蛋的比例一直没有下降,反而有上升趋势。

1.2 剖检病变

剖检病变特征为输卵管高度扩张,其内积有蛋样渗出物,表面不光滑,输卵管伞部内面呈轮层状,输卵管黏膜充血、增厚。个别患鸭输卵管伞严重坏死,成熟卵黄掉至腹腔之中,有的卵黄破烂成糊状污染整个腹腔器官,有的已形成严重的腹腔浆膜炎病变。卵巢充血,变性坏死,发育中的部分卵泡和成熟卵泡呈扁形或萎缩。根据疫苗程序、畸形蛋的比例、产蛋下降速度、剖检情况、临床表现和笔者多年的临床经验,初步判断此樱桃谷种鸭是由于耐药性细菌感染引起输卵管炎而导致产蛋缓慢下降。为了确诊,遂对病例进行了实验室诊断和抗体测定。

1.3 实验室诊断

1.3.1 细菌学检查与生化鉴定 无菌采集病鸭的肝脏及心脏组织,分别接种于普通平板、血液平板,37℃培养 18~24 h 后,挑取可疑菌落接种于 SS 琼脂平板和麦康凯琼脂平板进行培养。按常规方法对所有分离株进行三糖铁试验(TSI)、糖发酵试验、吡啶试验、MR 试验、V-P 试验、枸橼酸钠利用试验、明胶液化试验、脲酶试验。

1.3.2 药敏试验

1.3.2.1 配制药物和菌液准备 试验药物:氟苯尼考、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、多西环素、阿米卡星、阿莫西林、头孢曲松等 24 种。用电子分析天平精确称取适量药物,溶于无菌蒸馏水中,使各种药液质量浓度为 1 280 mg/L,现配现用,使用前按比例稀释。首先挑取 1 个菌落接种于 5 mL 的

普通肉汤中,37℃培养 16 h,使活菌数为 10^8 cfu/mL (比浊管比浊确定),使用时用灭菌肉汤稀释 1 000 倍,使含菌量为 10^5 cfu/mL。

1.3.2.2 试管两倍稀释法分别测定受试菌 方法:取 12 支无菌加塞试管,第 1 支管加入稀释后的菌液 1.8 mL,其余均加 1 mL,然后准确移取 0.2 mL 质量浓度为 1 280 mg/L 的药物加入第 1 支试管中,混匀后吸出 1 mL 加入第 2 管中。同法依次稀释至第 11 管,弃去 1 mL,第 12 管为生长对照。于 37℃恒温培养 16~18 h。3 次重复,其中 2 次以无菌生长的最低相同浓度为最低抑菌浓度(MIC)值。采用此方法分别测定以上抗生素的 MIC 值。

1.3.3 血清抗体检测试验(HI) 按实验室常规方法进行测定。

1.3.4 ESBLs 的检测

1.3.4.1 ESBLs 的初筛 用纸片扩散初筛法^[1]:按美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)推荐的 ESBLs 表型筛选方法进行。将临床的分离的产 ESBLs 细菌涂布于 MH 平板后,按标准纸片扩散法的规定进行操作(37℃,16~18 h),如以下任一药物对受试菌的抑菌环直径满足条件即可怀疑受试菌产 ESBLs:头孢曲松(30 μg/片)≤25 mm,头孢他啶(30 μg/片)≤22 mm,头孢噻肟(30 μg/片)≤27 mm,氨基青(30 μg/片)≤27 mm。

1.3.4.2 ESBLs 的确证 采用 NCCLS 纸片扩散确证法^[1]对初筛出的菌株进行确认试验。细菌涂板方法同 1.3.4.1,药敏纸片为头孢他啶(30 μg/片),头孢他啶/克拉维酸(每片 30/10 μg);头孢噻肟(30 μg/片),头孢噻肟/克拉维酸(每片 30/10 μg),35℃下培养 16~18 h,头孢他啶与头孢他啶/克拉维酸或头孢噻肟与头孢噻肟/克拉维酸这两组中任一组出现加克拉维酸比不加克拉维酸的抑菌环直径≥5 mm 的情况,即可确定为产 ESBLs 菌株。

2 结果与分析

2.1 细菌分离鉴定结果

2.1.1 细菌分离培养 从病鸭输卵管分泌物中分离到 1 株细菌分离物,培养 24 h 后,在麦康凯琼脂平板上可见有玫瑰红色、圆形、表面光滑的菌落,SS 琼脂平板上也有红色菌落生长;从麦康凯琼脂平板上挑取典型菌落,分别接种于普通琼脂平板和血液琼脂平板上培养 24 h,可见有灰白色隆起、湿润、光滑,直径约在 1~3 mm 的菌落。经培养特性观察、染色、镜检证明,该分离菌为大肠杆菌^[2]。

2.1.2 生化试验结果 将纯化后的细菌分别接种

系列生化培养基, 结果表明, 该菌能分解葡萄糖、乳酸、甘露醇、麦芽糖, 产酸产气; 不分解肌醇和尿素; 不产生硫化氢; MR 试验阳性; V-P 试验阴性; 枸橼酸盐利用试验阴性, 不液化明胶。

2.2 药敏试验结果

药敏试验结果见表 1。由表 1 可以看出, 根据 NCCLS 标准^[1], 该菌对兽医临床中常用的 β -内酰胺

类抗生素、氟喹诺酮类、氯霉素类、氨基糖苷类等均耐药。因此, 在治疗时应慎重选择以上药物, 以防止产生耐药性。 β -内酰胺类药物与酶抑制剂联用后, 其 MIC 值明显降低(如单独使用阿莫西林 MIC 值 > 128, 而阿莫西林与棒酸联用 MIC 值为 16), 说明酶抑制剂可显著增加治疗效果。

表 1 临床分离菌对抗生素的 MIC 值

药品	MIC	药品	MIC
阿莫西林	> 128	黏杆菌素	1
阿莫西林/棒酸(2:1)	16	氟苯尼考	64
头孢噻吩	> 128	环丙沙星	32
头孢噻吩/他唑巴坦(2:1)	8	恩诺沙星	64
头孢曲松	128	诺氟沙星	128
头孢曲松/他唑巴坦(2:1)	8	左旋氧氟沙星	16
头孢噻吩/磷霉素钙(2:1)	32	头孢拉定	> 128
头孢噻肟	64	氧氟沙星	128
头孢噻肟/他唑巴坦(2:1)	4	强力霉素	32
磷霉素钙	128	氨曲南	64
亚胺培南	0.25	阿米卡星	32
美罗培南	0.0625	阿奇霉素	> 128

2.3 抗体滴度试验结果

经过常规血清抗体检测试验(HI), 二倍稀释法稀释后放置 20 min, 加入 0.5% 红细胞悬液, 振荡混合后静置 40 min, 在对照出现正确结果下, 以完全抑制红细胞凝集的最大稀释度为该血清的 HI 滴度。试验结果为新城疫抗体滴度数据全为零, H9 抗体滴度较整齐, 多数在 8 孔左右。

2.4 菌株的鉴定结果

对该菌分离株初筛, 头孢曲松、头孢他啶、头孢噻肟、氨曲南的抑菌圈直径分别为 14 mm、16 mm、17 mm、14 mm, 均符合判断标准, 表明该菌株为产 ESBLs 酶可疑菌株。确证试验检测头孢噻肟(30 μ g/片)、头孢噻肟/克拉维酸(每片 30/10 μ g)、头孢他啶(30 μ g/片)、头孢他啶/克拉维酸(每片 30/10 μ g) 的抑菌圈分别为 15 mm、20 mm、15 mm、17 mm, 其中头孢噻肟与头孢噻肟/克拉维酸抑菌圈直径之间相差 5 mm, 根据标准确定该临床菌株产 ESBLs。

3 治疗措施及效果

治疗时采用中西医结合方法进行治疗。西药选用: 根据药敏试验结果, 采用左旋氧氟沙星治疗, 每 100 kg 饲料 20 g, 每日 1 次; 头孢噻肟/他唑巴坦(2:1)每 100 kg 饲料 10 g, 每日 2 次, 连用 4 d。饮水中可加入电解多维和鱼肝油, 以补充电解质和平衡钙磷的吸收。同时选用中药: 黄连 30 g、白头翁

40 g、生地 80 g、山楂 40 g、川芎 20 g、黄芪 25 g、益母草 70 g、苍术 50 g、菟丝子 50 g、牡蛎 50 g、地榆 45 g, 粉碎混合, 混入 50 kg 饲料中, 供种鸭采食, 连续饲喂 7 d。经上述中西结合方法对约 20000 只种鸭连续治疗 7 d 后, 除个别严重病例死亡外(死亡约 103 只), 其余患病种鸭逐步恢复健康, 产蛋率逐渐恢复正常, 达到 86%, 采食量逐渐达正常水平。

4 讨论

生产中, 遇到不明原因的种鸭产蛋下降、产畸形蛋的情况, 诊断治疗时需要了解免疫程序、畸形蛋比例、产蛋下降幅度和下降速度, 并在抗体测定的基础上进行判断, 根据种鸭的抗体水平及产蛋情况初步判断为细菌性感染。从表现产蛋下降的病鸭病料分离到 1 株细菌分离物, 根据培养特性观察、染色、镜检和生化试验结果可将该菌株判定为大肠杆菌。再结合病理剖检特征, 综合微生物学诊断结果可以初步判定该送检病鸭为输卵管炎型大肠杆菌感染。

输卵管炎型的大肠杆菌耐药性日趋严重。药敏试验结果和 ESBLs 确证试验结果表明, 引起输卵管炎的大肠杆菌具有严重耐药性, 已经产生了超广谱 ESBLs, 可以快速水解药物有效结构 β -内酰胺环, 使其丧失抗菌活性。产 ESBLs 细菌不仅对 β -内酰胺类药物耐药, 还对氨基糖苷类、氟喹诺酮类、氯霉素类等耐药。从药敏结果也不难看出, 该产酶菌仅对

左旋氧氟沙星、黏杆菌素、含有酶抑制剂的β-内酰胺类复方药物、碳青酶烯类药物最为敏感,如阿莫西林/棒酸(2:1)、头孢噻唑/他唑巴坦(2:1)、头孢曲松/他唑巴坦(2:1)、头孢噻肟/他唑巴坦(2:1)、亚胺培南、美罗培南,对头孢噻唑/磷霉素钙(2:1)、环丙沙星、强力霉素相对敏感,对阿莫西林、三代头孢类、磷霉素钙、诺氟沙星、氧氟沙星有严重的耐药性。喹诺酮类药物作为一种应用较晚的广谱抗菌药物,其耐药性也呈逐年上升的趋势,表明动物源大肠杆菌对其适应性产生速度很快,大肠杆菌的耐药谱越来越广,耐药率比 20 世纪 90 年代显著升高^[3-5]。本次试验结果与宋立等^[6]报道的家禽大肠杆菌以多重耐药为主,耐 10~19 种药物的菌株占 50% 以上的结果相一致。刘晓华等^[7]也报道了吉林省部分地区鸡源大肠杆菌普遍耐药,耐药菌株大多数为多重联合耐药,11 重耐药菌株最多。因此,建议在临床上停用已普遍产生耐药性、明显无效的药品,选用目前应用较少,经药敏试验证明对大肠杆菌敏感的药品。此外,还应考虑采取联合用药、交叉或轮换用药等方法。

治疗输卵管炎要慎重选药,宜中西医结合治疗。过去养殖户一直认为输卵管炎随使用些药品就能治愈,但从以上药敏试验结果不难看出,现今引起输卵管炎的细菌一般耐药性较强,尤其久治不愈的病例,更要慎重选药。在用一些抗生素治疗不见效的情况下,应进行剖检,若输卵管伞没有发生器质性病变,则应立即换用其他更好的药品进行治疗,以免造成

更大的损失,培养更多的耐药性细菌。治疗输卵管炎时,最好结合中药进行调节机体,如本次治疗选用方剂为激蛋散加减,方中益母草、黄芪、川芎理气活血,黄连、白头翁清热解毒,地榆清大肠湿热同时止血,苍术燥湿健脾理气,山楂健脾助消化,诸药合用达到治疗与修复输卵管损伤目的。

参考文献:

[1] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Fourteenth Informational Supplement; Standard M100-S13[S]. Pennsylvania; NCCLS, 2004.

[2] 张致平. 微生物药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.

[3] 张宇. 喹诺酮类抗菌药的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(16): 1345-1348.

[4] 肖方, 李新生, 张素梅, 等. 质粒介导的喹诺酮类耐药基因在鸡源大肠杆菌中的流行[J]. 华北农学报, 2010, 25(1): 222-225.

[5] 杜向党, 张素梅, 李新生, 等. 鸡致病性大肠杆菌对头孢噻唑和氟喹诺酮类药物的敏感性[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(8): 73-76.

[6] 宋立, 宁宜宝, 张秀英, 等. 中国不同地区家禽大肠杆菌血清型分布和耐药性比较研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1466-1473.

[7] 刘晓华, 张林波, 沙里金, 等. 吉林省部分地区鸡源大肠杆菌耐药性监测[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(3): 338-341.

(上接第 148 页)

参考文献:

[1] 陈萍. 长吻鮠人工高产养殖技术[J]. 现代农业科技, 2009(22): 317-319.

[2] 戴建华, 殷文莉, 杨代淑, 等. 长吻鮠肝脏线粒体 DNA 的研究[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1994, 49(1): 115-120.

[3] 万全, 刘恩生, 申德林, 等. 长吻鮠染色体组型分析[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 182-184.

[4] Wang Z, Zhou J, Ye Y, et al. Genetic structure and low-genetic diversity suggesting the necessity for conservation of the Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris* (Pisces: Bagridae)[J]. Environ Biol Fishes 2006, 75: 455-463.

[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd Edition. New York: Cold

Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[6] Xiao M, Yang G. Isolation and characterization of 17 microsatellite loci for the Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*)[J]. Mol Eco Resources Note, 2009, 9: 1039.

[7] Excoffier Laval L, Schneider S. Arlequin ver 3. 0: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evol Bioinformatics Online, 2005, 1: 47-50.

[8] 吴清江. 长吻鮠(*Leiocassis longirostris* Gunther)的种群生态学及其最大持续鱼获量的研究[J]. 水生生物学集刊, 1975, 5(3): 387-408.

[9] Avise J C, Arnold J, Ball R M. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic[J]. Annual Rev Ecol Sys 1987, 18: 489-522.