

杠板归对仔猪大肠杆菌的体外抑菌试验

李华坤 孙朋 昌莉丽

徐州生物工程职业技术学院, 江苏徐州 221006

摘要 采用纸片扩散法(K-B法)检测不同来源的大肠杆菌对 21 种抗生素类药物和不同浓度杠板归的敏感性,采用二倍稀释法确定杠板归的最小抑菌浓度,评估杠板归对多重耐药菌株的抑制效果。试验结果显示:20%杠板归水浸液对肠道多重耐药大肠杆菌平均抑菌圈达到 18 mm,对仔猪粪便大肠杆菌平均抑菌圈达到 23 mm,均为高度敏感;10%杠板归水浸液对仔猪粪便大肠杆菌平均抑菌圈达到 15 mm,高度敏感。杠板归与 20 种抗菌药联合对大肠杆菌抑菌圈明显增大。杠板归对多重耐药大肠杆菌菌株有明显抑制效果,杠板归与 20 种抗菌药联用起到协同作用,杠板归抗菌活性强可以代替抗菌药单独用于仔猪大肠杆菌病的治疗,为研制临床上耐药性疾病防治的新药物提供参考。

关键词 杠板归;仔猪;大肠杆菌;药敏试验

杠板归是蓼科蓼属植物,又名蛇倒退、刺犁头、刺蓼,具有抗炎、抗病毒、止咳祛痰、保肝、抗肿瘤、抗氧化和抑制 α -葡萄糖苷酶活性、抑制乙酰胆碱酯酶活性等药理作用,常用于泻痢、疔疮肿痛、蛇虫咬伤等症^[1-2]。杠板归资源丰富,生长范围广泛,抗大肠杆菌、沙门菌和多杀性巴氏杆菌,将其制备成复方中药用于畜禽细菌性腹泻是很好的研究方向,复方中药可以减少抗生素残留,对于保障食品安全和公共卫生安全具有十分重要的意义。本试验检测杠板归对多重耐药大肠杆菌抑制效果以及杠板归与抗菌药联用抑菌效果,以期为研制临床上耐药性疾病防治的新药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1)药物:杠板归来源于广东揭阳。头孢呋辛、头孢噻肟、头孢吡肟、头孢他啶、左氟沙星、链霉素、卡那霉素、万古霉素、大观霉素、阿米卡星、四环素、诺氟沙星、米诺环素、氧氟沙星、青霉素 G、头孢曲松、

多粘菌素 B、苯唑西林、卡那霉素、红霉素、克林霉素,21 种药物购自杭州滨和微生物试剂有限公司,空白纸片购自赛莫尔实验用品城。

2)菌株:大肠杆菌来源于徐州房村养猪场腹泻仔猪的小肠和粪便、无腹泻症状仔猪粪便及家兔新鲜粪便。I 号菌株大肠杆菌毒力基因 IRP2 菌株来自于患有大肠杆菌病腹泻后死亡的仔猪小肠,II 号菌株大肠杆菌毒力基因 IRP2 菌株来自于患有大肠杆菌病腹泻后死亡的仔猪粪便,III 号菌株来自于房村无腹泻症状的仔猪粪便,IV 号菌株来自于家兔新鲜粪便。

3)仪器与试剂:天津市英博生化试剂有限公司普通营养琼脂,杭州微生物试剂有限公司普通肉汤培养基,上海花潮电器有限公司 UTP-313 电子天平,上海亚荣生化仪器厂 RE-3000 旋转蒸发器,上海一恒科技有限公司 LRH 生化培养箱,日本 TOMY 公司 SX-500 高压灭菌锅。

1.2 方法

1)中药提取。杠板归水浸液制备,称取干燥杠板归 10、20 g 分别放入广口瓶中,用蒸馏水浸泡,

收稿日期:2020-04-20

基金项目:徐州市科技项目(KC19046,KC16SG284)

李华坤,女,1978 年生,硕士,副教授、兽医师。

并保证药物充分浸泡(浸泡 24 h),用滤纸过滤,滤液用旋转蒸发仪 50 ℃制备药物浓度约为 10%和 20%杠板归溶液,将溶液冷藏备用。

2)药敏片的制备。制备杠板归药片,取空白纸片各 50 片放入 2 个小玻璃瓶中,分别量取 1 mL 10%和 20%杠板归溶液浸泡纸片,1 片空白纸片吸取 20 μL 药物,相当于原药 2 mg/片和 4 mg/片,浸泡 2 h 后取出,干燥后冷冻保存。制备杠板归联合抗菌药药片,选择 21 种抗菌药,其中部分药物对革兰氏阳性菌作用强、对革兰氏阴性菌弱,如红霉素、青霉素等作为对照。药物规格 10 片/瓶,每瓶中加入 0.2 mL 10%杠板归溶液浸泡纸片,浸泡 2 h 后取出,干燥后冷冻保存。

3)菌液制备。挑取菌落分别接种于营养肉汤培养基 37 ℃培养 18 h 后,制备菌悬液,采用麦氏比浊法比浊度一致,菌液浓度为 10⁵ CFU/mL。

4)采用纸片扩散法进行杠板归、抗菌药、杠板归联合抗菌药对大肠杆菌药敏试验。配比 4.2%的普通营养琼脂,过滤分装,121 ℃高压灭菌后备用。用灭菌棉拭子蘸取制备好的菌液,在管壁上旋转挤压几次,去掉过多的菌液,将棉拭子涂布到培养基的

表面,每种菌株各接种 15 个平皿。用灭菌尖头镊子取已备好的干燥药纸片,同一平皿上药片有杠板归、抗菌药、杠板归抗菌药。将药敏片分别贴在各组培养基的表面,2 片之间的距离为 1~2 cm,纸片距平皿边缘约 1.5 cm。将贴纸片的平板底部向上,在平板底部用标签标出药物名称,置 37 ℃温箱内培养,24 h 后分别测定抑菌圈的大小。

5)药敏试验判定标准。西药判定标准参照美国 CLSI 标准(详见表 1),抑菌结果分为 S 敏感、I 中介和 R 耐药。中药判定标准抑菌圈直径在 15 mm 以上为高度敏感,10~15 mm 为中度敏感,10 mm 以下为低度敏感,无抑菌圈为不敏感。

2 结果与分析

2.1 20%杠板归和 10%杠板归抗大肠杆菌药敏试验结果

20%杠板归对 4 种菌株平均抑菌圈均在 15 mm 以上,为高度敏感;10%杠板归对 III 号大肠杆菌平均抑菌圈在 15 mm 以上,为高度敏感(表 2)。

2.2 抗菌药抗大肠杆菌药敏试验结果

1)表 3 所示 10 种抗菌药物抗 I 号菌株结果:多

表 1 21 种抗生素药敏试验判定标准

药物名称	药敏片含量/(μg/片)	抑菌圈直径/mm		
		耐药 R	中介 I	敏感 S
头孢噻肟	30	≤14	15~22	≥23
头孢呋辛	30	≤14	15~17	≥18
头孢吡肟	30	≤14	15~17	≥18
丁胺卡那	30	≤14	15~16	≥17
头孢噻吩	30	≤14	15~17	≥18
左氟沙星	5	≤13	14~16	≥17
诺氟沙星	10	≤12	13~16	≥17
链霉素	10	≤11	12~14	≥15
卡那霉素	30	≤13	14~17	≥18
大观霉素	100	≤14	15~17	≥18
万古霉素	30	-	-	-
红霉素	15	-	-	-
四环素	30	≤14	15~18	≥19
米诺环素	30	≤14	15~18	≥19
头孢曲松	30	≤13	14~20	≥21
多粘菌素 B	30	≤8	9~11	≥12
苯唑西林	1	-	-	-
青霉素 G	10 U	-	-	-
妥布霉素	10	≤12	13~14	≥15
克林霉素	2	-	-	-
头孢他啶	30	≤14	15~22	≥23

粘菌素 B 敏感, 头孢噻肟中介, 头孢噻吩、左氟沙星、诺氟沙星、链霉素、卡那霉素、红霉素、米诺环素、苯唑西林耐药。

2) 表 4 所示 10 种抗菌药物抗 II 号菌株结果: 丁胺卡那、妥布霉素敏感, 头孢曲松中介, 卡那霉素、红霉素、四环素、多粘菌素 B、青霉素 G、克林霉素、大观霉素耐药。

3) 表 5 所示 10 种抗菌药物抗 III 号菌株结果: 丁胺卡那、头孢呋辛、头孢吡肟、头孢他啶敏感, 链霉素、头孢曲松、氧氟沙星中介, 卡那霉素、万古霉素、青霉素 G 耐药。

2.3 抗菌药与 10% 杠板归合用抗大肠杆菌药敏试验结果

1) 表 3 所示 10 种联合药物抗 I 号菌株结果: 多粘菌素 B、头孢噻肟、头孢噻吩、左氟沙星、诺氟沙星、链霉素、红霉素、米诺环素、苯唑西林敏感, 卡那霉素中介。

2) 表 4 所示 10 种联合药物抗 II 号菌株结果: 丁胺卡那、妥布霉素、头孢曲松、卡那霉素、红霉素、多粘菌素 B、青霉素 G、克林霉素、大观霉素敏感, 四环素中介。

3) 表 5 所示 10 种联合药物抗 III 号菌株结果: 丁胺卡那、头孢呋辛、头孢吡肟、头孢他啶、头孢曲松、氧氟沙星、链霉素、万古霉素、青霉素 G 敏感, 卡那霉

素中介。

3 结论与讨论

3.1 结论

1) I 号、II 号菌株对 10 种抗菌药物有不同程度耐药性, 将抗菌药物与杠板归合用后敏感度增加。普通致病性大肠杆菌、仔猪耐药大肠杆菌毒力基因 *IRP2* 对杠板归都是高度敏感, 20% 杠板归比 10% 杠板归抗菌效果好。说明杠板归对多重耐药大肠杆菌菌株有明显抑制效果, 浓度增加药效增强。

2) 杠板归与 21 种药物配合后有 20 种药物药敏试验抑菌圈明显增大, 与卡那霉素合用抑菌圈变化不显著。杠板归与 20 种抗菌药联用起到协同作用, 杠板归抗菌活性强, 可以代替抗菌药单独用于临床上耐药性仔猪大肠杆菌病的治疗。

3.2 讨论

1) 整个试验过程中, 杠板归溶液的提取浓缩、药片的干燥等都控制在 50 °C 以下, 杠板归溶液对 III 号大肠杆菌最低抑菌浓度为 0.031 5 g/mL。扶亚祥等^[3]用纸片法和试管法对杠板归水溶液进行体外抗菌试验, 结果显示杠板归水提取液对大肠埃希菌最低抑菌浓度 (MIC) 为 0.063 g/mL, 可进一步研究温度对杠板归作用产生的影响。

表 2 杠板归对大肠杆菌体外抑菌效果

菌株	20%杠板归抑菌圈				10%杠板归抑菌圈			
	低敏比率株 数/%	中敏比率株 数/%	高敏比率株 数/%	抑菌圈平均 值/mm	低敏比率株 数/%	中敏比率株 数/%	高敏比率株 数/%	抑菌圈平均 值/mm
I 号菌株	0	0	100	18.4	—	—	—	—
II 号菌株	0	0	100	17.1	—	—	—	—
III 号菌株	0	0	100	23.4	0	10	90	15.3
IV 号菌株	0	0	100	23.9	—	—	—	—

表 3 10 种抗菌药与 10% 杠板归对 I 号菌株药敏试验结果

药物名称	抗菌药		10%杠板归和抗菌药	
	抑菌圈直径/mm	结果	抑菌圈直径/mm	结果
头孢噻肟	22	I	27	S
头孢噻吩	12	R	23	S
左氟沙星	0	R	22	S
诺氟沙星	0	R	22	S
链霉素	0	R	20	S
卡那霉素	0	R	17	I
红霉素	0	R	20	S
米诺环素	13	R	26	S
多粘菌素 B	12	S	25	S

2)目前从杠板归中分离鉴定出的化学成分 130 余种,黄酮类、醌类、苯丙素类、萜类、生物碱类、挥发性成分等。张荣林等^[4]从杠板归中分离到 7 种黄酮类化合物。王定勇等^[5]从中分离到槲皮素-3-O-a-D-葡萄糖苷、蒽醌类的大黄素。杠板归中化学成分结构类型多样,国外的研究发现主要含有香豆素类衍生物^[6]、三萜类化合物(如诺米林酸类衍生物)^[7]、蔗糖酯衍生物

(如蔗糖苯基丙酸酯)^[8,9]以及新黄酮类聚合物。温度对杠板归作用产生影响,杠板归的抗菌活性成分有待进一步研究,除此外还可以研究水质、提取方式、种植环境、加工工艺等对杠板归的作用影响。

3)杠板归溶液制备药敏片,将药片冷冻保存 1 年仍具有较强的抗菌活性,杠板归在临床上可以制备成多种制剂用于防治畜禽疾病,如颗粒剂、冻干粉剂、胶

表 4 10 种抗菌药与 10%杠板归对 II 号菌株药敏试验结果

药物名称	抗菌药		10%杠板归和抗菌药联用	
	抑菌圈直径/mm	结果	抑菌圈直径/mm	结果
丁胺卡娜	19	S	20	S
卡那霉素	7	R	24	S
大观霉素	0	R	18	S
红霉素	0	R	25	S
四环素	0	R	15	I
多粘菌素 B	0	R	16	S
青霉素 G	0	R	20	S
妥布霉素	15	S	20	S
克林霉素	0	R	20	S
头孢曲松	17	I	22	S

表 5 10 种抗菌药与 10%杠板归对 III 号菌株药敏试验结果

药物名称	抗菌药		10%杠板归和抗菌药联用	
	抑菌圈直径/mm	结果	抑菌圈直径/mm	结果
头孢呋辛	20	S	26	S
头孢吡肟	22	S	32	S
丁胺卡娜	19	S	25	S
链霉素	13	I	20	S
卡那霉素	11	R	19	I
万古霉素	0	R	23	S
头孢曲松	18	I	30	S
青霉素 G	0	R	28	S
氧氟沙星	13	I	22	S
头孢他啶	26	S	28	S

囊剂等,制备的药物成品可以低温冷冻保存使用。

参 考 文 献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].2 卷.上海:上海科技出版社,1999.

[2] 黄鹤飞,张长城,袁丁,等.杠板归抗炎及抑菌活性部位研究[J].安徽医药,2008(7):595-596.

[3] 扶亚祥,何湘蓉,李俊超,等.杠板归化学成分分析及抗菌效果研究[J].动物医学进展,2008,29(9):45-49.

[4] 张荣林,孙晓翠,李文欣,等.杠板归化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2008,25(2):105-107.

[5] 王定勇,卢江红.杠板归根化学成分研究[J].亚热带植物科学,2004,33(2):10-12.

[6] SUN X, SNEEDEN A T. Neoflavonoids from *Polygonum perfoliatum*[J]. *Planta Med*, 1999, 65(7):671-673.

[7] LIU J. Two new limonoids from *Polygonum orientale* L.[J]. *Indian J Chem Sect B*, 2001, 32(41):644-646.

[8] KASHIWADA Y, NONAKA G I, NISHIZOKA I. Galloylsucroses from rhubarbs[J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(5):1469-1472.

[9] CHEN T, LI J X, XU Q. Phenylpropanoid glycosides from *Smilax glabra*[J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(8):1051-1055.

【责任编辑:胡敏】