

5种抗生素对嗜水气单胞菌的抗菌后效应研究

苏振霞^{1,2}, 肖 辉², 陈列欢^{1,2}, 柏 春¹

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏省海洋资源开发研究院 甲壳素研发中心, 江苏 连云港 222005)

摘要: 采用菌落计数法测定了盐酸恩诺沙星、盐酸左氧氟沙星、氧氟沙星等 5 种抗生素对嗜水气单胞菌的抗菌后效应(PAE)。结果显示, 盐酸左氧氟沙星、氧氟沙星、盐酸沙拉沙星、盐酸恩诺沙星、烟酸诺氟沙星在 1×MIC、2×MIC 和 4×MIC 浓度时, 对嗜水气单胞菌都有抗生素后效应, 并随着抗生素浓度的增加, 抗菌后效应的时间也延长。

关键词: 抗生素; 嗜水气单胞菌; 抗菌后效应

中图分类号: S948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)01-0092-04

抗菌药是水产养殖上用于控制感染的不可缺少的药物, 它的应用使很多感染性疾病得到了有力控制, 但由于不合理的使用抗菌药物, 导致了不良反应增多, 细菌耐药性的产生相当严重, 故如何合理使用抗菌药物显得尤为重要。

抗生素后效应(Postantibiotic effects PAE)指细菌与抗生素短暂接触后, 在抗生素被清除后, 细菌生长仍受抑制的现象。早在 20 世纪 40 年代, 就有人发现此现象, 但到 20 世纪 70 年代, 才由 Vogelman 与 Craig 对此现象下了定义。由于 PAE 对抗生素临床合理使用具有十分重要的应用价值, 因此日益受到临床医生与学者的重视^[1]。有关抗菌药物 PAE 这一新概念目前尚未在水产养殖实践中应用, 在水产方面关于抗生素后效应的研究也较少, 只有房文红等^[2]在 2005 年对诺氟沙星和恩诺沙星抗生素后效应进行过研究报道, 盖春蕾^[3]在 2008 年对二氟沙星对 3 种海洋弧菌的抗菌后效应进行过研究报道。本课题将研究多种氟喹诺酮类药物对水产养殖常见病病原菌嗜水气单胞菌的抗菌后效应, 旨在为水产养殖临床合理用药和优化给药方案提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 药品

盐酸恩诺沙星(纯度 99%, 浙江朗博药业有限公司); 盐酸左氧氟沙星(纯度 90.5%, 浙江普洛康裕制药有限公司); 氧氟沙星(纯度 98.5%, 浙江普洛康裕制药有限公司); 盐酸沙拉沙星(纯度 98%, 潍坊永兴兽药厂); 烟酸诺氟沙星(纯度 98%, 浙江省

台州市东港兽药有限公司)

1.2 菌种

实验用嗜水气单胞菌由淮海工学院海洋学院生物技术实验室提供。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 氯化钠 5.0 g, 水 1 000 mL, 制备固体培养基时另加 2% 的琼脂。

1.4 药液制备

(1)可溶性抗生素药液制备

准确称取每一种可溶性抗生素 0.02 g, 倒入 100 mL 无菌双蒸水, 摇晃直至抗生素溶解, 作为母液放于冰箱中 4 °C 保存备用。使用时用液体培养基稀释到所需浓度。

(2)不溶性抗生素药液制备

首先配制磷酸盐缓冲液(pH 6.8), 然后准确称取每一种不溶性抗生素 0.02 g, 倒入 100 mL 磷酸盐缓冲液, 摇晃直至抗生素溶解, 作为母液放于冰箱中 4 °C 保存备用。使用时用液体培养基稀释到所需浓度。

收稿日期: 2011-12-26; 修回日期: 2012-03-10

基金项目: 江苏省海洋资源开发研究院开放基金(JSIMR10C04); 国家自然科学基金(40906054)

作者简介: 苏振霞(1978-), 女, 汉族, 山东沂水人, 博士, 副教授, 主要从事水产药物药代动力学研究, 电话: 15861247785; E-mail: suzhenxia@sina.com

1.5 菌悬液制备

将菌种采用平板划线法接种在平板上培养 1 d, 挑取嗜水气单胞菌菌落在三角烧瓶中进行扩大培养。用温的液体培养基稀释到合适浓度。本实验中菌液浓度为 1.35×10^9 cfu/mL。

1.6 最小抑菌浓度(MIC)的测定

采用试管二倍稀释法^[4], 测定 5 种抗生素对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度(MIC)。

1.7 抗生素后效应(PAE)的测定

参照盖春蕾等^[3], 房文红等^[2]的方法。

(1) PAE 诱导

取 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 、 $8 \times \text{MIC}$ 的抗菌药液各 3 mL 与 3 mL 1.35×10^6 cfu/mL 对数生长期菌悬液置于 3 支 15 mL 试管中, 为试验管(T); 同时设细菌对照管 C, 加入 6.75×10^5 cfu/mL 对数生长期菌悬液 6 mL, 此时各管中药物浓度分别为 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 和 $0 \times \text{MIC}$, 即为诱导的药物浓度, 然后置于 28 °C 恒温水浴中诱导 1 h。

(2) 药物的除去与重建

取上述各试管及对照管中的菌液 0.1 mL 分别加至 4 支 9.9 mL 28°C 预温的培养基中重建, 此时为重建后的零时。

(3) 细菌生长动力学曲线建立

于重建后 0、1、2、3、4、5、6 和 8 h 分别吸取各管的培养液做系列稀释, 取 0.1 mL 于琼脂平板计数, 重复 3 次, 取平均值。以培养时间(h)为横坐标, 将计数所得的各时间点 cfu/mL 值(M)取常用对数 ($\lg M$), 以其为纵轴, 绘制对照管及试验管细菌重建后的生长曲线。

(4) PAE 的计算

按公式 $\text{PAE} = T - C$ 计算。其中 T 、 C 分别为加药组、对照组细菌数(cfu/mL)从去除药物零时开始增加 10 倍所需要的时间。

1.8 数据处理

PAE 数据以 3 次试验结果的平均数 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 最小抑菌浓度

表 1 是 5 种抗生素对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度。

表 1 5 种抗生素对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度

Tab. 1 The MIC of 5 kinds of antibiotics against *Aeromonas hydrophila*

药品	最小抑菌浓度 MIC(mg/L)
盐酸左氧氟沙星	0.012
氧氟沙星	0.024
盐酸沙拉沙星	0.024
盐酸恩诺沙星	0.098
烟酸诺氟沙星	0.098

由表 1 可知盐酸左氧氟沙星对嗜水气单胞菌的抑菌效果最好, 最小抑菌浓度为 0.012 mg/L, 氧氟沙星、盐酸沙拉沙星抑菌效果次之, 都为 0.024 mg/L, 最后是盐酸恩诺沙星和烟酸诺氟沙星, 其 MIC 为 0.098 mg/L。

2.2 5 种抗生素对嗜水气单胞菌的抗生素后效应

图 1 ~ 图 5 分别是 5 种抗生素在 0 MIC, 1 MIC, 2 MIC, 4MIC 作用于嗜水气单胞菌 1 h 后的细菌生长曲线。

由图 1 ~ 图 5 可知, 随着接触的药物浓度增大, 细菌生长速度在总体上表现出下降趋势。根据细菌生长曲线计算各组细菌数 M (CFU/mL) 增加 10 倍(一个数量级)所需时间, 然后按照 PAE 计算公式求得各组的 PAE, 见表 2。

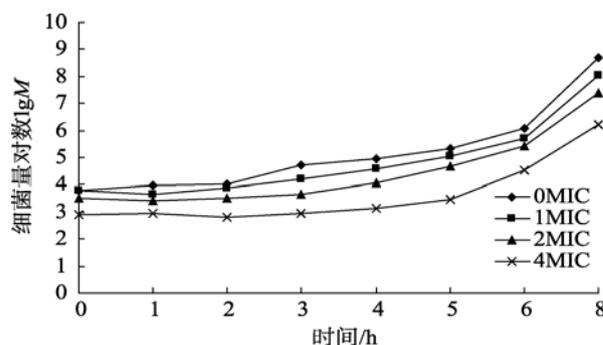


图 1 烟酸诺氟沙星作用于嗜水气单胞菌后 PAE 期的细菌的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Aeromonas hydrophila* in the PAE of Norfloxacin nicotinate

由表 2 可知, 5 种抗生素对嗜水气单胞菌都产生较明显的 PAE, 并且随着接触的药物浓度增大, PAE 也明显的增加。盐酸左氧氟沙星、氧氟沙星、盐酸沙拉沙星、盐酸恩诺沙星、烟酸诺氟沙星在 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 和 $4 \times \text{MIC}$ 浓度时, 对嗜水气单胞菌的 PAE

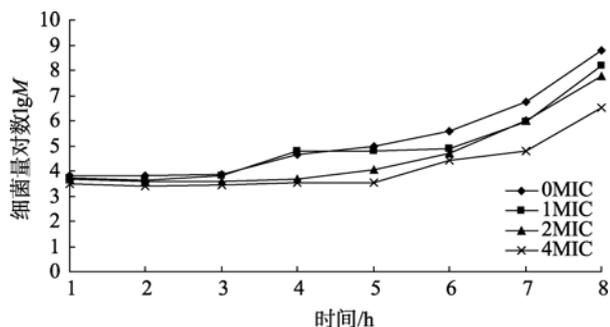


图2 盐酸左氧氟沙星作用于嗜水气单胞菌后 PAE 期的细菌的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of *Aeromonas hydrophila* in the PAE of Levofloxacin hydrochloride

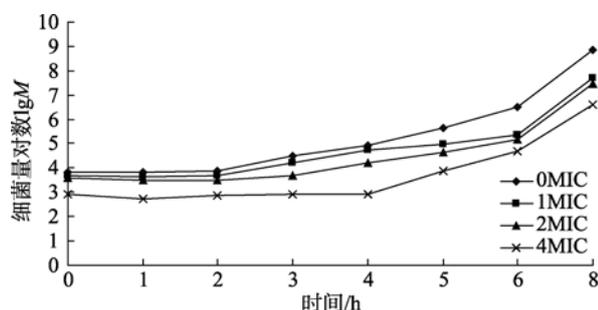


图3 氧氟沙星作用于嗜水气单胞菌后 PAE 期的细菌的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of *Aeromonas hydrophila* in the PAE of Ofloxacin

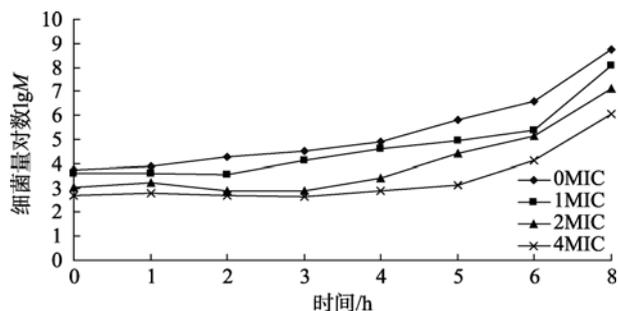


图4 盐酸恩诺沙星作用于嗜水气单胞菌后 PAE 期的细菌的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of *Aeromonas hydrophila* in the PAE of Enrofloxacin hydrochloride

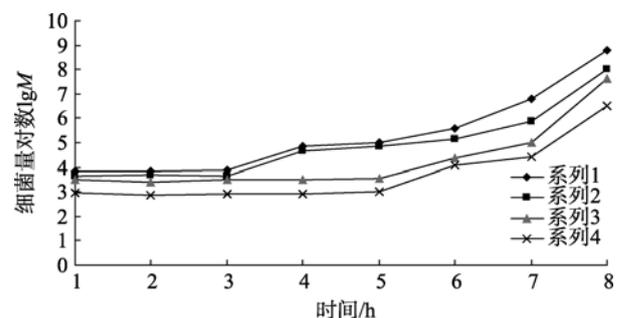


图5 盐酸沙拉沙星作用于嗜水气单胞菌后 PAE 期的细菌的生长曲线

Fig. 5 The growth curve of *Aeromonas hydrophila* in the PAE of Sarafloxacin hydrochloride

表 2 5 种抗生素对嗜水气单胞菌的 PAE

Tab. 2 The PAE of 5 kinds of antibiotics against *Aeromonas hydrophila*

药品	抗生素对嗜水气单胞菌的 PAE(h)		
	1MIC	2 MIC	4 MIC
盐酸左氧氟沙星	0.25±0.06	1.02±0.10	1.870±0.12
氧氟沙星	0.53±0.10	1.05±0.14	1.61±0.37
盐酸沙拉沙星	0.22±0.03	1.44±0.08	1.61±0.13
盐酸恩诺沙星	0.69±0.11	1.18±0.19	2.46±0.32
烟酸诺氟沙星	0.60±0.12	0.90±0.13	1.71±0.20

分别为: 0.25, 1.02, 1.870 h; 0.53, 1.05, 1.61 h; 0.22, 1.44, 1.61 h; 0.69, 1.18, 2.46 h; 0.60, 0.90, 1.71 h。

3 讨论

虽然早在 20 世纪 40 年代初, 人们已经发现抗菌后效应现象, 但直到 70 年代以后人们才开始重视抗生素后效应的研究。抗生素后效应(PAE)是近年来在国内外开始引起学术界关注的新理论, 是评价抗生素药理学的一项新指标, 它是细菌对抗微生物药敏感性的结构特征性指标, 几乎是所有抗菌药物的一种性质。

PAE 的一个重要临床意义就是设计合理的给药

方案, 以便更科学地指导感染性疾病的治疗。从药理学的角度看, 传统抗生素应用主要依赖于体外细菌对药物的敏感性(MIC 或 MBC)与药物的药代动力学参数, 常常按 MIC 与血药浓度或感染组织中的药物浓度来选用药物、药物剂量及用药间隔。理论上, 当血药浓度低于 MIC 时, 应再次给药。由于 PAE 反映了抗生素消除后或大大低于 MIC 时细菌的生长仍受到抑制, 故可充分利用 PAE 的特点来指导合理用药。PAE 已成为确定抗生素剂量与用药间隔的一个重要参数。对具有明显 PAE 的药物, 最适给药间隔为血药浓度超过 MIC 或 MBC 的时间加上 PAE 的持续时间^[5-8]。

关于氟喹诺酮类药物 PAE 的研究在国内兽医界已有少量研究,如伍金娥等^[9]2003 年报道恩诺沙星在 8MIC, 4MIC, 2MIC 时对金黄色葡萄球菌的 PAE 为(2.01±0.3)h, (1.26±0.26)h, (1.01±0.19)h; 对大肠杆菌的 PAE 为(1.95±0.04)h, (1.49±0.13)h, (1.19±0.35)h。诺氟沙星在 8MIC, 4MIC, 2MIC 时对金黄色葡萄球菌的 PAE 为(1.61±0.11)h, (0.92±0.28)h, (0.47±0.21)h; 对大肠杆菌的 PAE 为(1.07±0.17)h, (1.02±0.14)h, (0.7±0.23)h。刘芳萍等^[10]2002 年报道了单诺沙星对大肠杆菌和金葡球菌的体外抗菌后效应。结果显示,单诺沙星对大肠杆菌、金葡球菌均有不同程度的较强的 PAE, 且 PAE 值与药物浓度呈正相关。刘远飞^[11]等 2003 年报道了单诺沙星和恩诺沙星对大肠杆菌和金葡球菌的抗菌后效应, 并且指出单诺沙星和恩诺沙星对大肠杆菌和金葡球菌均有较明显的 PAE, 且随着药物作用剂量的增大, PAE 的时间相应增加。单诺沙星和恩诺沙星在 2MIC 和 4MIC 时对大肠杆菌和金葡球菌的 PAE 比 0.5MIC 有显著性($P<0.05$)增加。刘涤洁^[12]2002 年报道了恩诺沙星和环丙沙星对金葡球菌的抗菌后效应及抗菌后亚抑菌浓度效应, 报道指出 2、4 MIC 的恩诺沙星对金葡菌的 PAE 为 1.03、1.50 h, 1/2、1、2、4 MIC 的环丙沙星的 PAE 为 0.51、0.88、1.47、1.92 h; PAE 的大小与药物浓度呈正相关, 且环丙沙星比恩诺沙星对金葡菌有更长的效应。

本研究结果显示, 盐酸恩诺沙星, 烟酸诺氟沙星在 4 MIC 时对嗜水气单胞菌都显示了较长的 PAE, 特别是盐酸恩诺沙星的 PAE 最长。诺氟沙星和恩诺沙星作为水产养殖中常用的氟喹诺酮类药物, 在制

订水产给药方案时, 应充分利用其 PAE 的重要价值, 可考虑以血药浓度高于 MIC 的时间加上 PAE 的时间作为给药间隔, 在满足疗效的基础上, 不仅能降低生产上可能出现的不良反应, 而且可以达到高效、安全、经济的治疗目的。

参考文献:

- [1] 顾彦琪, 贾伶, 陆冬良. 抗菌药物的后效应及其临床意义[J]. 人民军医, 2001, 44(1): 37-38.
- [2] 房文红, 周凯. 诺氟沙星对溶藻弧菌和恩诺沙星对迟缓爱德华菌的抗生素后效应[J]. 海洋渔业, 2005, 27(1): 44-48.
- [3] 盖春蕾, 李健, 刘淇, 王群. 二氟沙星对 3 种海洋弧菌的抗菌后效应研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 98-101.
- [4] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 91-92.
- [5] 王浴生. 抗生素后效应及临床意义[J]. 中国抗生素杂志, 1996, 21(4): 306-315.
- [6] 黄莹, 王大菊. 喹诺酮类抗菌药后效应研究概况[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(10): 31-33.
- [7] 匡长春, 王芳, 宋棋. 抗生素后效应的表达方法及临床意义[J]. 中国药师, 2000, 3(6): 365-366.
- [8] 张槐. 抗生素后效应及其实践意义[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(1): 83-84.
- [9] 伍金娥, 李德学, 王大菊. 7 种抗菌药物对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌体外抗生素后效应的研究[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(10): 30-32.
- [10] 刘芳萍, 佟恒敏, 李昌文. 单诺沙星对大肠杆菌和金葡球菌的体外抗菌后效应[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2002, 2: 6-8.
- [11] 刘远飞, 佟恒敏, 韩建春. 单诺沙星和恩诺沙星对大肠杆菌和金葡球菌的抗菌后效应[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(7): 19-20.
- [12] 刘涤洁, 陈杖榴, 冯淇辉. 恩诺沙星和环丙沙星对金葡菌的抗菌后效应及抗菌后亚抑菌浓度效应[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(3): 276-278.

Postantibiotic effects of 5 kinds of antibiotics against bacterium *Aeromonas hydrophila*

SU Zhen-xia^{1,2}, XIAO Hui², CHEN Lie-huan^{1,2}, Bai Chun¹

(1. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Chitins Research and Development Center, Lianyungang 222005, China)

Received: Dec., 26, 2011

Key words: Antibiotics; *Aeromonas hydrophila*; Postantibiotic effect

Abstract: In this paper, the postantibiotic effects (PAE) of 5 kinds of antibiotics against bacterium *Aeromonas hydrophila* were determined by colony counting. The results showed that at the concentrations of 1, 2 and 4 MIC, all these five antibiotics have PAE against bacterium *Aeromonas hydrophila*, and the time of PAE was prolonged with the increase of as the antibiotics concentrations.

(本文编辑: 康亦兼)