

恩诺沙星对 4 种水产致病弧菌的抑杀菌效应

马寅 金珊* 余开 陈寅儿 赵青松 王国良

(宁波大学 生命科学与生物工程学院 应用海洋生物技术教育部重点实验室 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用二倍稀释法测定恩诺沙星对溶藻弧菌、最小弧菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌 4 种 12 株菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC), 结果表明: 恩诺沙星对 12 株弧菌的 MIC 为 0.1-0.8 mg/L, MBC 为 0.4-3.2 mg/L。在此基础上, 从每种菌中选取一株对恩诺沙星较为敏感的菌株, 研究恩诺沙星不同药物浓度(1 MIC、2 MIC、4 MIC)对 4 种弧菌的杀菌动力学和抗菌后效应(PAE), 结果显示: 各浓度恩诺沙星对溶藻弧菌 X040625-R 菌株均有较强的杀菌作用, 而对哈维氏弧菌 M071202-H、创伤弧菌 Q050723-C、最小弧菌 H010911-Z 等 3 菌株却表现出了低浓度抑菌、高浓度缓慢杀菌的作用。恩诺沙星的抗菌后效应 PAE 与药物浓度及细菌与药物的接触时间成正比, 恩诺沙星对溶藻弧菌 X040625-R 的 PAE 最长, 对哈维氏弧菌 M071202-H 的 PAE 最短。

关键词: 恩诺沙星, 弧菌, 杀菌动力学, 抗菌后效应

Pharmacodynamics effect of enrofloxacin on four aquatic pathogenic vibrio

MA Yin JIN Shan* YU Kai CHEN Yin-Er ZHAO Qing-Song WANG Guo-Liang

(Key Laboratory of Applied Marine Biological, Ministry of Education, College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

Abstract: The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of enrofloxacin against 12 strains of *Vibrio alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* were determined by two-fold broth macrodilution method and the results showed that the MIC and MBC were 0.1-0.8 mg/L and 0.4-3.2 mg/L respectively. On the basis of these, 4 sensitive strains of 12 vibrio strains were measured with the killing-curves and the PAE in different concentrations of enrofloxacin. The results showed that every concentration of enrofloxacin against *V. alginolyticus* X040625-R had a strong anti-bactericidal effect, but that against *V. harveyi* M071202-H, *V. vulnificus* Q050723-C, *V. mimicus* H010911-Z showed that the three bacteria was inhibited in the lower concentration and gradually killed with the increasing concentration. The PAE of enrofloxacin had a direct relationship with the concentration and the mixing time of the drug. The PAE of enrofloxacin against *V. alginolyticus* X040625-R

was the longest while that against *V. harveyi* M071202-H was the shortest.

Keywords: Enrofloxacin, *Vibrio*, Killing-curves, PAE

弧菌广泛分布于自然水域中, 是水产养殖中最为常见的致病菌, 它可引起鱼、虾、蟹、贝等多种养殖品种发生弧菌病, 给水产养殖业造成极大危害。目前水产动物弧菌病的防治仍采用药物防治为主要手段或辅助措施^[1], 但在实际养殖生产中, 常为了控制病害而超剂量用药, 这不仅易导致病原微生物抗药性增强, 养殖产品药物过量残留, 而且污染环境, 影响产品质量, 甚至严重危害食用者健康^[2]。因此, 寻找低毒、高效、低污染渔药显得尤为重要。

恩诺沙星(Enrofloxacin)为第 3 代喹诺酮类动物专用抗菌药物, 因其抗菌谱广、疗效显著且与其它化学药剂之间无交叉耐药性等特点, 现已广泛应用于兽医临床, 是目前允许使用的渔药之一^[3]。据资料显示, 恩诺沙星适用于多种水产动物疾病的防治, 如出血性败血症、烂鳃病、肠炎病、溃疡病、弧菌病等^[4], 但大多报道仅局限于恩诺沙星对病原菌的药敏试验, 很少有进一步的研究。为了更加明确恩诺沙星的药物效应, 有效控制水产动物常见的细菌性疾病, 本文以溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、最小弧菌(*V. mimicus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*) 4 种水产常见致病弧菌为对象, 研究恩诺沙星对它们的抑杀菌作用及抗菌后效应, 期为水产养殖中更加合理用药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药品与培养基

恩诺沙星(Enrofloxacin)含量 10%, 由河南省大明实业有限责任公司生产; 营养琼脂培养基和营养肉汤培养基, 杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 试验菌种

溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) D050610-R、L050510-R、X040625-R, 最小弧菌 (*V. mimicus*) H010911-Z、D06815-Z, 哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) L960915-H、M071202-H、R070618-H, 创伤弧菌 (*V. vulnificus*) H0908272-C、M0508153-C、Q050723-C, 均由本研究室分离自患病水产动物并

鉴定, 最小弧菌 ATCC33653-Z 购自中国科学院微生物研究所。

1.3 细菌培养及对数生长期菌悬液制作

将活化的 4 种弧菌分别接种于普通营养琼脂斜面培养基, 于 28 °C 恒温培养 24 h 后, 用 0.85% 无菌生理盐水制成浓度约为 10^7 CFU/mL 的菌悬液。取 2 mL 菌悬液于 200 mL 灭菌肉汤培养基中, 28 °C 振荡培养 24 h, 再取 1 mL 含菌培养液于 99 mL 灭菌肉汤培养基中, 28 °C 振荡培养 4 h, 至菌液对数生长期, 根据实验需要用 28 °C 预温的营养肉汤稀释至所需菌浊度。

1.4 恩诺沙星最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定

采用戴自英等^[5]的方法进行实验。根据实验结果, 从每种菌中选取一株对恩诺沙星较为敏感的菌株进行杀菌动力学和抗菌后效应实验。

1.5 恩诺沙星对 4 种水产致病菌的杀菌动力学

分别取 1 mL 10 MIC、20 MIC、40 MIC 浓度的药液加入 8 mL 的肉汤培养液中(对照组为不含药的 9 mL 营养肉汤), 再加入对数生长期细菌培养液 1 mL, 28 °C 恒温培养, 分别于培养 0、1、2、3、4、5、6、7、8 h 时取 0.1 mL 菌液进行平板计数, 相同过程重复 3 次, 求平均值。将细菌数的对数(lg)作为纵轴, 以培养时间(h)为横轴建立不同药物浓度对细菌的杀菌动力学曲线。

1.6 恩诺沙星对 4 种水产致病菌的抗菌后效应(PAE)

分别取 1 mL 浊度约为 10^8 CFU/mL 的对数生长期细菌培养液加入 3 个试验管(T)和 C₁、C₂ 两个对照管, 使试验管(T)中药物浓度分别为 1 MIC、2 MIC、4 MIC, C₁、C₂ 对照管中药物浓度为 0 MIC, 置于 28 °C 恒温培养 2 h, 再采用 1 000 倍稀释法除去试验管(T)中的药物, 并在 C₂ 对照管中加入一定量的药物, 使其药物终浓度为 0.004 MIC, 作为非残留药物造成 PAE 的对照。以上各管混匀后立即置于 28 °C 恒温箱中培养(重建后 0 时)。于重建后 0、1、

2、3、4、5、6 h 分别取 0.1 mL 菌液进行倒平板细菌计数。以细菌数的对数(lg)作为纵轴, 培养时间(h)为横轴, 建立细菌重建后恢复生长的动力学曲线, 并按公式 $PAE(h) = T - C$, 计算 PAE 值, 其中 T 为试管管细菌重建后浓度增加 1 个对数级所需时间, C 为对照管细菌重建后浓度增加 1 个对数级所需时间。

1.7 数据处理

实验数据均采用 Excel 统计分析程序处理并进行显著性检验, 数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 恩诺沙星对 4 种水产致病弧菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

恩诺沙星对 4 种 12 株弧菌的体外抑菌试验结果见表 1。恩诺沙星对 12 株弧菌均有明显的抗菌效应, 但同种不同菌株之间有明显差异。对比 4 种弧菌, 相对而言恩诺沙星对创伤弧菌的抑杀菌效果更好。

菌种 Test bacteria	恩诺沙星浓度 Enrofloxacin concentration (mg/L)		菌种 Test bacteria	恩诺沙星浓度 Enrofloxacin concentration (mg/L)	
	MIC	MBC		MIC	MBC
X040625-R	0.8	0.8	M071202-H	0.4	0.8
D050610-R	0.4	1.6	L960915-H	0.4	3.2
L050510-R	0.8	3.2	R070618-H	0.8	1.6
H010911-Z	0.2	1.6	Q050723-C	0.2	0.8
ATCC33653-Z	0.8	1.6	H0908272-C	0.4	1.8
D060815-Z	0.4	0.8	M0508153-C	0.1	0.4

2.2 恩诺沙星对 4 种水产致病弧菌的杀菌动力学曲线

恩诺沙星以 0 MIC、1 MIC、2 MIC、4 MIC 浓度对浊度约为 10^6 CFU/mL 的溶藻弧菌 X040625-R、最小弧菌 H010911-Z、哈维氏弧菌 M071202-H、创伤弧菌 Q050723-C 的杀菌曲线见图 1-4。从图中可知, 各浓度恩诺沙星在实验 1 h 内抗菌作用最强, 1 MIC、2 MIC、4 MIC 浓度恩诺沙星对 X040625-R、H010911-Z、M071202-H、Q050723-C 的杀菌率分

别为 20.57%、74.89%、80.05%、74.88%、90.00%、96.01%、90.00%、93.69%、94.37%、68.37%、98.00%、99.20%。药物在 1 MIC 浓度时主要呈现抑菌作用, 在 2 MIC 浓度时对 X040625-R 和 M071202-H 具有强烈杀菌作用, 对 H010911-Z 和 Q050723-C 却呈现短时间杀菌长时间抑菌的作用; 在 4 MIC 浓度时, 对 X040625-R、M071202-H、H010911-Z 均有强烈杀菌作用, 而对 Q050723-C 却呈现短时间杀菌, 长时间抑菌的作用。

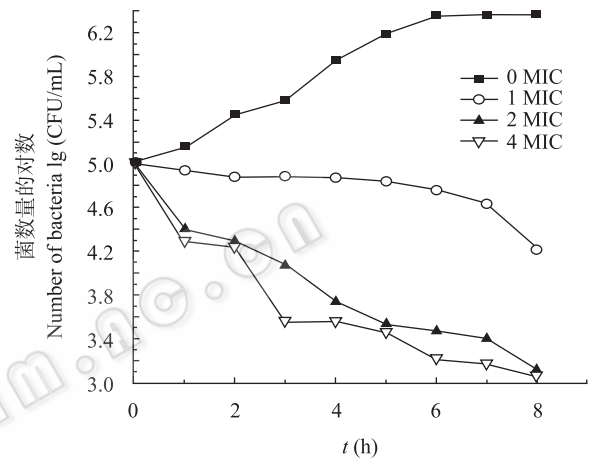


图 1 不同浓度恩诺沙星对溶藻弧菌 X040625-R 的杀菌曲线

Fig. 1 Bactericidal curve of enrofloxacin against *V. alginolyticus* X040625-R in different concentrations

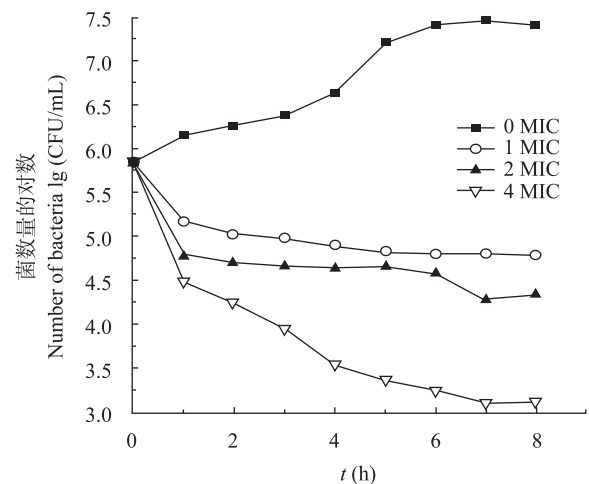


图 2 不同浓度恩诺沙星对最小弧菌 H010911-Z 的杀菌曲线

Fig. 2 Bactericidal curve of enrofloxacin against *V. mimicus* H010911-Z in different concentrations

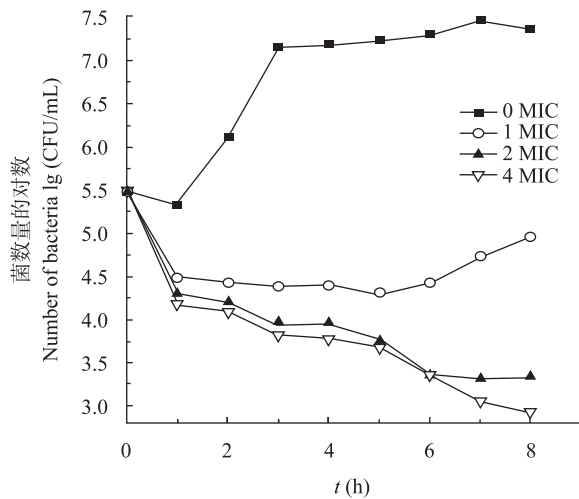


图 3 不同浓度恩诺沙星对哈维氏弧菌 M071202-H 的杀菌曲线

Fig. 3 Bactericidal curve of enrofloxacin against *V. harveyi* M071202-H in different concentrations

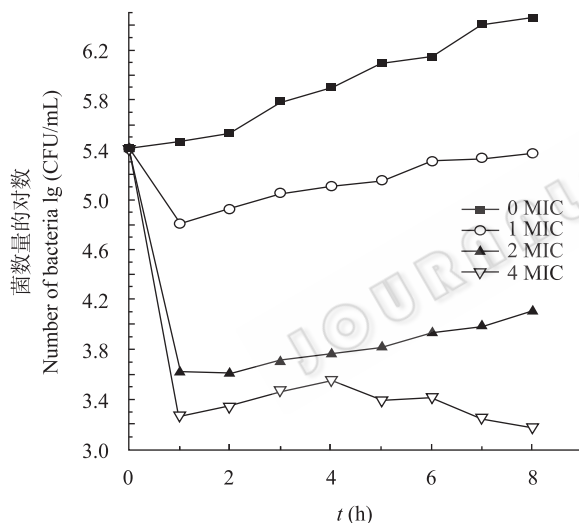


图 4 不同浓度恩诺沙星对创伤弧菌 Q050723-C 的杀菌曲线

Fig. 4 Bactericidal curve of enrofloxacin against *V. vulnificus* Q050723-C in different concentrations

2.3 恩诺沙星对 4 种水产致病菌的抗菌后效应 (PAE)

1 MIC、2 MIC、4 MIC 恩诺沙星对 H010911-Z、M071202-H、Q050723-C、X040625-R 菌株的 PAE 见表 2。各浓度恩诺沙星对 4 种弧菌都有明显的 PAE。对 X040625-R 的 PAE 显著长于对 Q050723-C、H010911-Z 和 M071202-H ($P < 0.05$)。各菌 1 MIC 浓

度恩诺沙星产生的 PAE 与 2 MIC 和 4 MIC 产生的 PAE 差异显著 ($P < 0.05$)，2 MIC 和 4 MIC 浓度恩诺沙星对 H010911-Z 和 M071202-H 产生的 PAE 差异显著 ($P < 0.05$)，而对 Q050723-C 和 X040625-R 产生的 PAE 差异不显著。此外，实验也显示 C₁ 对照管细菌与 C₂ 残留药对照管细菌的生长差异不大，说明 1 000 倍稀释法可以完全消除药物的影响，试验各管细菌生长受抑制的原因为 PAE 所致，而非残药的持续作用。

表 2 不同药物浓度恩诺沙星对 4 种菌的 PAE (h, n=3)
Table 2 The PAE of enrofloxacin against four kinds bacteria (h)

菌种 Test bacteria	恩诺沙星浓度 Enrofloxacin concentration		
	1 MIC	2 MIC	4 MIC
H010911-Z	0.250±0.026	0.370±0.032	0.830±0.042
M071202-H	0	0.080±0.021	0.019±0.061
Q050723-C	0.070±0.035	0.860±0.047	1.090±0.119
X040625-R	0.640±0.035	1.760±0.050	1.850±0.079

3 讨论

3.1 恩诺沙星的抗菌活性

恩诺沙星为广谱抗菌药，大量的研究结果证实其对绝大多数水产致病菌都有高度的抗菌活性^[6]。Martinsen 等^[7]比较了恩诺沙星、沙氟沙星、氟甲喹、噁喹酸等 4 种药物对 5 种水产致病菌的抑菌效果。结果表明，这些药物中恩诺沙星的抗菌活性最强；Roque A 等^[8]的药物敏感性实验显示恩诺沙星对分离自南美白对虾的 141 株弧菌的平均最小抑菌浓度 MIC 为 0.45 mg/L；何平等总结了国内外关于恩诺沙星对水产致病菌的体外抑菌试验，认为恩诺沙星对敏感病原微生物如气单胞菌等的 MIC 小于 0.1 mg/L，但对弧菌、链球菌等病原微生物的 MIC 约为 0.20–0.63 mg/L^[9]；本研究结果也表明，恩诺沙星对溶藻弧菌、最小弧菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌 4 种 12 株菌均有较强的抑杀菌作用，MIC 小于或等于 0.80 mg/L，从 1 MIC 到 2 MIC 浓度其杀菌活性显著增加，但从 2 MIC 到 4 MIC 浓度其杀菌活性虽有所增加，但差异不显著，这与雷军等的研究结果基

本一致,可能与恩诺沙星的作用机制有关^[10]。

3.2 体外 PAE

PAE 是指细菌短暂接触抗菌药物,当药物消除后细菌生长仍受到持续抑制的效应。已有研究表明,几乎所有的抗菌药都具有不同程度的 PAE,且已把它作为细菌对抗菌药敏感性的结构特征性指标之一^[11]。PAE 形成的机制至今还不是十分清楚,有学者认为可能是由于抗生素持续存在于被作用细菌结合部位,从而引起细菌非致死性损伤所致,或抗生素与细菌靶位持续性结合,白细胞协同杀菌效应,从而使细菌细胞修复时间延长^[12];而喹诺酮类药物的 PAE 可能是药物与 DNA 螺旋酶作用,影响其正常功能,使 DNA 复制时间延长所致^[13]。目前,国内外关于恩诺沙星对水产动物致病菌 PAE 方面的报道很少,仅房文红等^[14]报道了恩诺沙星对迟缓爱德华菌具有明显的 PAE,其在 1/2 MIC、1 MIC、2 MIC 和 4 MIC 浓度时 PAE 分别为 0.29、0.48、1.97、2.30 h;陈俭清等^[15]研究表明 2 MIC、4 MIC 和 8 MIC 的恩诺沙星对嗜水气单胞菌的 PAE 分别为 1.73±0.28 h、1.86±0.14 h、1.76±0.06 h,PAE 长短与药物浓度及细菌与药物的接触时间成正相关。此外相关学者^[16-17]在研究其它药物的抗菌后效应时还证实了 PAE 的长短可受细菌的种类和数量、抗生素的种类、机体的生理病理状态、金属阳离子、免疫功能、组织 pH 值及联合用药等因素的影响。本研究结果显示,不同浓度恩诺沙星对 4 种弧菌均有明显的 PAE,恩诺沙星对不同弧菌的 PAE 差异显著,恩诺沙星的 PAE 呈浓度依赖性。

3.3 关于水产药的合理使用

近几年,随着水产养殖规模和集约化程度的不断扩大和提高,养殖病害日趋增长,尤其是大规模细菌性疾病频繁爆发,新的病原也不断出现,这均为疾病的防控带来了更大的困难。但至今细菌性疾病仍是以药物防治为主,养殖过程中滥用、误用及不规范使用药物的现象仍普遍存在,而绿色、高效、低毒的渔药种类却很少。因此,如何合理用药并有效避免或减少由于养殖用药所带来的负面影响已是不容忽视的问题。传统上抗菌药物给药方案的确定

主要依赖于药物 MIC、MBC 及药物在机体内的药代动力学参数,故传统给药方案要求机体内药物浓度维持在 MIC 以上才有治疗意义,当药物浓度低于 MIC 时,应再次给药。但 PAE 的研究证实了当药物消除后或大大低于 MIC 时,药物的有效性并不消失,仍会在一定时间内抑制细菌的生长,因此,在临床设计给药方案时,应对症选药,将药物的 MIC 和 PAE 结合考虑,适当延长给药间隔时间,减少给药次数。恩诺沙星疗效显著,应用广泛,但因其在对动物体内的半衰期较长,其代谢产物环丙沙星对人体有一定的危害,因此,在防治水产动物疾病时疗程不宜过长,产品上市前要有一定时间的休药期。

参 考 文 献

- [1] 郑天伦,王国良,金珊. 海水养殖动物弧菌病防治的研究进展[J]. 台湾海峡, 2002, 21(3): 372-377.
- [2] 郑宗林,向磊. 我国水产药物使用现状分析. 水产养殖[J]. 2002(4): 36-39.
- [3] 赵晶,康世良. 兽用喹诺酮类抗菌剂恩诺沙星的药物代谢动力学研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1999(4): 12-21.
- [4] 林璐明,苏跃朋. 水产抗生素类药物的耐药性机制及合理应用[J]. 河北渔业, 2009(5): 42-43.
- [5] 戴自英,刘裕昆,汪复,等. 临床抗菌药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 325-433.
- [6] 陈辉,杨先乐. 渔用药无公害使用技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 154-156.
- [7] Martinsen B, Horsberg TE. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10 °C [J]. Antimicrob Agellts Chemother, 1995, 39(5): 1059-1064.
- [8] Roque A, Molina-Aja A, Bolán-Mejía C, et al. *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001, 17(5): 383-387.
- [9] 何平,尹文林,沈锦玉. 恩诺沙星在水产养殖生产上的合理使用[J]. 科学养鱼, 2008(12): 54-55.
- [10] 雷军,王浴生,黎世能. 氟喹诺酮类药物抗菌作用的量效关系研究[J]. 中国抗生素杂志, 1993, 18(3): 228-233.

- [11] 崔丽霞. 抗生素后效应及其临床意义[J]. 广东药学院学报, 2001, 17(3): 209-210.
- [12] 郜琪臻, 刘鸿琴. 抗生素后效应是临床不可忽视的药效学参数[J]. 辽宁药物与临床, 1999, 2(4): 21-23.
- [13] 杨继章, 杨树民. 抗生素后效应与临床用药决策[J]. 上海医药, 2005, 26(1): 18-20.
- [14] 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.
- [15] 陈俭清, 卢彤岩, 刘红柏, 等. 恩诺沙星对嗜水气单胞菌的体外药效学研究[J]. 水产学杂志, 2010, 23(1): 47-50.
- [16] Carbone M, Pennisi MG, Masucci M, et al. Activity and postantibiotic effect of marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin and ciprofloxacin against feline *Bordetella bronchiseptica* isolates[J]. Veterinary Microbiology, 2001, 81(1): 79-84.
- [17] 吴永章, 刘力, 杨志强, 等. 抗生素后效应及其应用研究[J]. 四川畜牧兽医, 2006, 33(6): 22-23.

(上接 p.1215)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号(Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>