

# 氟苯尼考对 3 种海洋致病性弧菌的体外抗菌后效应

李 晖<sup>1</sup> 李 健<sup>2\*</sup> 孙 铭<sup>2</sup> 梁俊平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 山东科技职业学院, 潍坊 261053)

(<sup>2</sup> 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 采用菌落计数法分别测定氟苯尼考对溶藻弧菌、哈维氏弧菌和灿烂弧菌的抗菌后效应 (PAE)。结果表明, 药物的浓度越大, 对细菌生长繁殖的抑制作用就越强; 除去药物后, 细菌的生长恢复速度就越慢。其中, 细菌的生长恢复速度和强度依次为溶藻弧菌 > 哈维氏弧菌 > 灿烂弧菌。在  $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$  和  $4 \times \text{MIC}$  浓度时, 氟苯尼考对溶藻弧菌、哈维氏弧菌和灿烂弧菌的 PAE 值分别为 0.39、0.46 和 1.07 h, 0.48、0.70 和 1.12 h, 0.63、1.03 和 1.19 h, 表明氟苯尼考对溶藻弧菌、哈维氏弧菌和灿烂弧菌均有不同程度的 PAE, 且 PAE 值与药物浓度呈正相关。因此在制定给药方案时, 可以参考本研究结果适当地延长给药时间间隔, 减少给药次数, 仍能维持较好的抗菌效果。

**关键词** 氟苯尼考 溶藻弧菌 哈维氏弧菌 灿烂弧菌 抗菌后效应

**中图分类号** S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0107-05

## Postantibiotic effects of florfenicol in vitro against three marine pathogenic *Vibrios*

LI Hui<sup>1</sup> LI Jian<sup>2\*</sup> SUN Ming<sup>2</sup> LIANG Jun-ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Shandong Vocational College of Science & Technology, Weifang 261053)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** The postantibiotic effects (PAEs) of florfenicol against *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* and *V. splendidus* were determined by colony counting. The results showed that the greater the drug concentration, the stronger the inhibition of bacterial growth and reproduction; and the slower the rate of recovery growth of bacteria after the drug was withdrawn. The ranking of recovery growth rate of the bacteria were: *V. alginolyticus* > *V. harveyi* > *V. splendidus*. It was found that, at concentrations of  $1 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$  and  $4 \times \text{MIC}$ , the PAE of florfenicol against *V. alginolyticus*, *V. harveyi* and *V. splendidus* was 0.39, 0.46 and 1.07 h; 0.48, 0.70 and 1.12 h; 0.63, 1.03 and 1.19 h, respectively. This indicated that PAE of florfenicol against *V. alginolyticus*, *V. harveyi* and *V. splendidus* was very significant, and the PAE increased with the increasing drug concentration. It is suggested that when formulate a prescription, the medicine withdrawal time can be prolonged, and the number of administration times can be reduced

主要养殖甲壳类良种培育课题(863 计划)(2012AA10A409)、国家虾产业技术体系(CARS-47)和公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830183

收稿日期: 2012-09-26; 接受日期: 2012-11-30

作者简介: 李 晖(1982-), 女, 硕士, 主要从事渔药药理学研究。E-mail: lihui\_319@163.com, Tel: 13371099096

while the antibiotic effect is still maintained.

**KEY WORDS** Florfenicol *Vibrio alginolyticus* *Vibrio harveyi* *Vibrio splendidus*  
Postantibiotic effect

氟苯尼考(Florfenicol)又名氟甲砜霉素,是新一代氯霉素类动物专用合成抗菌药物,是通过抑制肽酰基转移酶的活性,从而抑制肽链的延伸,干扰细菌蛋白质的合成(陈杖榴 2005)。研究表明,其抗菌活性和抗菌谱均优于氯霉素和甲砜霉素,其对人和动物的毒性也大大降低,是目前广泛应用于水产细菌性疾病防治的药物(廖昌容等 2005)。抗菌后效应(Postantibiotic effect, PAE)是指细菌与抗菌药物短暂接触后,将药物完全除去,细菌的生长仍然受到抑制效应,又称抗菌药物后效应(王浴生 1996),它是细菌对抗微生物药物敏感性的结构特征性指标(陈秀枢等 1991)。目前已认识到 PAE 是抗菌药物药效学的一个重要特性,几乎所有的抗菌药物均有 PAE 表现。PAE 的提出为研究抗菌药物药效学提供了更为重要的参数,可用于指导新抗菌药物给药方案的制定,并为临床调整用药间隔提供理论基础(王丽平等 2003)。本研究采用平板菌落计数法首次研究了氟苯尼考对水产动物的 3 种海洋病原细菌——溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*、哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 和灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 的抗菌后效应,旨在为优化氟苯尼考临床给药方案提供理论参考和有效指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

溶藻弧菌、哈维氏弧菌、灿烂弧菌分离株于 2010 年 6 月由中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室提供,实验于黄海水产研究所微生物实验室进行。

### 1.2 药品

氟苯尼考原粉购自河南大明实业有限公司,含量 98.5%,批号 2008120301。

### 1.3 培养基

2216E 液体培养基:蛋白胨 5 g,酵母浸出膏 1 g,磷酸铁 0.01 g,过滤陈海水 1 000 ml, pH 值为 7.6~7.8, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 备用。2216E 固体培养基:蛋白胨 5g,酵母浸出膏 1g,磷酸铁 0.01 g,琼脂粉 18 g,过滤陈海水 1 000 ml, pH 值为 7.6~7.8, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,置 4℃ 冰箱保存备用。

### 1.4 药液的制备

准确称取适量的氟苯尼考药品,用无菌蒸馏水配制成浓度为 1 280  $\mu\text{g/ml}$  的贮存液 100 ml,经 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤除菌后分装,分别配制用于测定 PAE 的 100 $\times$ 、200 $\times$ 、400 $\times$  MIC 浓度的药液,121℃ 高压蒸汽灭菌 20min 后, -20℃ 贮存备用。临用前稀释到所需要的倍数,灭菌后 4℃ 保存备用。

### 1.5 MIC 的测定

氟苯尼考对溶藻弧菌、哈维氏弧菌和灿烂弧菌的最小抑菌浓度(MIC)值参照李 晖等(2010)。

### 1.6 体外 PAE 的测定

方法参照王志强等(2001)。

#### 1.6.1 细菌计数

方法参照《微生物学实验》(沈 平 1999)。用 0.9% 无菌生理盐水对菌悬液进行 10 倍比系列稀释后,取  $10^4 \sim 10^6$  的稀释度的稀释液各 0.10 ml 置于琼脂平板上进行均匀涂布,每个稀释度 3 个平板,28℃ 恒温箱培养 18~24 h 后,对细菌数在 30~300 间的平板进行菌落计数,取其平均值,单位为 CFU/ml。

### 1.6.2 对数生长期细菌悬液的制作

将保存菌种接种于2216E液体培养基中,28℃培养18~24 h后平板划线,于28℃培养18~24 h,挑取平板上1~2个菌落接种于2216E液体培养基中,28℃培养8~10 h,使活菌数在 $10^8$  CFU/ml,用时根据需要以28℃预温的2216E液体培养基稀释到所需的浊度。

### 1.6.3 PAE的诱导

取 $40\times$ 、 $20\times$ 、 $10\times$  MIC的药液各0.1 ml与0.9 ml对数生长期菌悬液( $1\times 10^8$  CFU/ml)置于3支15 ml试管中,为试验管(T);同时设细菌对照管 $C_1$ 、 $C_2$ (为0.1 ml的无菌生理盐水与0.9 ml的对数生长期细菌悬液),各管混匀后立即置于28℃恒温水浴培养1 h,此时各管中的药物浓度为 $4\times$ 、 $2\times$ 、 $1\times$ 、 $0\times$  MIC。

### 1.6.4 药物的去除与重建

采用100倍稀释除药法。取上述各试验管及对照管中的菌液0.1 ml分别加入到5只9.9 ml 28℃预温的2216E液体培养基中重建,并在 $C_2$ 对照管中加入一定量所用抗菌药物,使其中药物浓度相当于 $4\times$  MIC试验管中被100倍稀释后的抗菌药浓度,作为非残留药物造成的PAE的对照,以上各管立即置于28℃恒温振荡器中培养,作为重建后的零时。

### 1.6.5 细菌生长动力学曲线建立

于重建后0、1、2、3、4、5、6、8 h分别取菌液0.1 ml作系列稀释、平板计数,得出CFU/ml值。重复3次,取平均值。将计数所得的各时间点CFU/ml值取常用对数( $\log_{10}$ ),以其为纵轴,以时间(h)为横轴作图,建立对照管及试验管细菌重建后恢复生长的动力学曲线。

### 1.6.6 PAE的计算

由细菌生长动力学曲线计算 $T$ 、 $C_1$ ,按公式 $PAE = T - C_1$ 计算。其中 $T$ 、 $C_1$ 分别为试验管与对照管细菌CFU/ml值高于重建后零时10倍( $\log_{10}$  CFU/ml)所需时间(h)。

## 1.7 数据的分析与处理

PAE数据以3次试验结果的平均数±标准差表示,统计学处理用SPSS软件进行 $t$ 检验。

## 2 结果

根据前期实验测得的氟苯尼考对溶藻弧菌、哈维氏弧菌和灿烂弧菌的最小抑菌浓度(MIC)值均为 $2\mu\text{g/ml}$ (李 晖等 2010),使3种弧菌分别接触 $1\times$  MIC、 $2\times$  MIC、 $4\times$  MIC的氟苯尼考,弧菌接触药物1 h后,以活菌数CFU/ml的对数( $\log_{10}$  CFU/ml)为纵坐标,以孵育时间为横坐标,绘制细菌生长动力学曲线,去除药物后细菌恢复生长情况见图1、图2和图3。

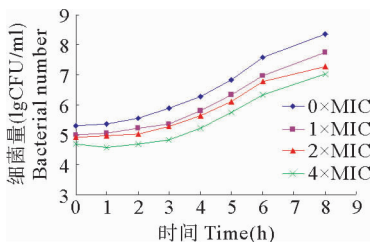


图1 氟苯尼考作用于溶藻弧菌后PAE期细菌生长曲线

Fig. 1 The growth curve of

*V. alginolyticus* in the PAE of florfenicol

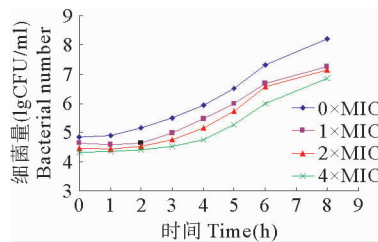


图2 氟苯尼考作用于哈维氏弧菌后PAE期细菌生长曲线

Fig. 2 The growth curve of

*V. harveyi* in the PAE of florfenicol

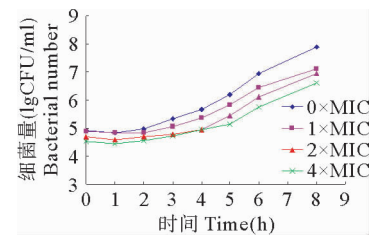


图3 氟苯尼考作用于灿烂弧菌后PAE期细菌生长曲线

Fig. 3 The growth curve of

*V. splendidus* in the PAE of florfenicol

由图1、图2、图3可以看出,药物的浓度越大,对细菌生长繁殖的抑制作用就越强,除去药物后,细菌的生长恢复情况就越慢。其中,弧菌的生长恢复速度和强度依次为溶藻弧菌>哈维氏弧菌>灿烂弧菌,说明氟苯尼

考在体外对灿烂弧菌的抑制作用稍强于溶藻弧菌和哈维氏弧菌。实验中还可见 PAE 测定中的对照管与残留药物对照管细菌生长呈一致性,说明试验各管中细菌生长的受抑制为 PAE 所致,而非残留药物的作用。

根据细菌生长曲线计算各组细菌数(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 1。试验结果表明,氟苯尼考在  $1 \times \text{MIC} \sim 4 \times \text{MIC}$  剂量范围内对 3 株受试弧菌均产生了明显的抗菌后效应( $P < 0.05$ ),且随着药物浓度的增加而增加,PAE 增加呈浓度依赖性关系。在相同的药物接触浓度时,PAE 时间均为灿烂弧菌 > 哈维氏菌 > 溶藻弧菌。

表 1 氟苯尼考对溶藻弧菌、哈维氏弧菌、灿烂弧菌的 PAE(平均值±标准误,  $h, n=3$ )

Table 1 The PAEs of florfenicol against *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, and *V. splendidus* (Mean±S. E.,  $h, n=3$ )

药物浓度	Antibiotic concentration	$1 \times \text{MIC}$	$2 \times \text{MIC}$	$4 \times \text{MIC}$
氟苯尼考对溶藻弧菌	Florfenicol against <i>V. alginolyticus</i>	$0.39 \pm 0.03^a$	$0.46 \pm 0.13^b$	$1.07 \pm 0.25^c$
氟苯尼考对哈维氏弧菌	Florfenicol against <i>V. harveyi</i>	$0.48 \pm 0.09^a$	$0.70 \pm 0.14^b$	$1.12 \pm 0.16^c$
氟苯尼考对灿烂弧菌	Florfenicol against <i>V. splendidus</i>	$0.63 \pm 0.02^a$	$1.03 \pm 0.03^b$	$1.19 \pm 0.22^c$

注:同一行数据右上角不同上标字母代表有显著差异( $P < 0.05$ )

Note: Values in each row without a common superscript are significantly different( $P < 0.05$ )

### 3 讨论与结论

PAE 实验结果表明,氟苯尼考对溶藻弧菌、哈维氏弧菌和灿烂弧菌均显示了明显的 PAE,且呈浓度依赖性,即药物浓度越大,PAE 值也越大,这与研究氟喹诺酮类药物所得到的结论相似(Carbone *et al.* 2001;房文红等 2005;盖春蕾等 2008)。其原因可能是药物浓度增高时会占领更多的受体部位或对细菌造成更严重的损伤。但当药物浓度过高,PAE 值增加不显著,逐渐趋于坪值。因为当药物浓度过高时,药物可能使受体达到饱和状态而使药物对细菌 PAE 在某一接触浓度以上即趋于恒定(刘芳萍等 2002)。

同一种药物接触浓度对不同的细菌具有不同的 PAE。本研究发现,在相同药物接触浓度时,氟苯尼考对 3 种弧菌的 PAE 值均为灿烂弧菌 > 哈维氏弧菌 > 溶藻弧菌。盖春蕾等(2008)与王志强等(2001)在研究抗菌药物的 PAE 中也得到了相似的结论。这可能与每一种细菌都有其特定的靶位——DNA 螺旋酶(Pruul 1979)有关,靶位不同,抗菌药物与之结合的紧密程度也不一样,因此在与相同浓度药物接触后,不同的细菌恢复再生长的时间也不一样。据报道(Zhanel *et al.* 1994;董景之 1997;傅得兴等 1997),氯霉素类药物对革兰氏阴性、阳性菌的 PAE 与氟喹诺酮类相当或稍短。抗菌药物的 PAE 还受很多其他因素的影响,其中药物种类、接触浓度、细菌接种量、细菌种类、接触时间均可不同程度地影响抗菌药对细菌 PAE 的长短。此外,据报道(Fuursted 1997),培养基、抗菌药的联合应用、不同的测定方法、孵育温度、pH 值、阳离子浓度、环境中氧的浓度等,也可影响到抗菌药物对细菌的 PAE。

国内兽医界对氟苯尼考的 PAE 研究较少,张世新等(2006)研究氟苯尼考对大肠杆菌 K99(*Escherichia coli* K99)的体外 PAE 时得到相似的结论,氟苯尼考对大肠杆菌 K99 在  $2 \times \text{MIC}$ 、 $5 \times \text{MIC}$ 、 $8 \times \text{MIC}$  接触浓度产生的 PAE 分别为  $0.912 \pm 0.104$  h、 $1.428 \pm 0.095$  h、 $2.034 \pm 0.137$  h。张旭等(2006)报道了氟苯尼考对禽多杀性巴氏杆菌 *Pasteurella multocida* 在  $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$ 、 $8 \times \text{MIC}$  接触浓度产生的 PAE 分别为  $0.18 \pm 0.02$  h、 $0.66 \pm 0.26$  h、 $1.31 \pm 0.13$  h。氟苯尼考对大肠杆菌 K99 和禽多杀性巴氏杆菌均产生了明显的 PAE。综上所述,可以看出,氟苯尼考对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有杀菌作用。但有报道氟苯尼考对革兰氏阴性菌的杀菌速率明显高于阳性菌(胡功政 2004),与其作用机制和细菌细胞壁的主要成分有关。氟苯尼考的作用机制是抑制细菌蛋白质的合成,所以药物必须首先进入细菌内部才能发挥作用。革兰氏阴性菌的细胞壁主要由磷脂组成,有利于脂溶性高的氟苯尼考通过;而革兰氏阳性菌细胞壁主要成分是黏肽,仅含有少量的磷脂,因此氟苯尼考对阴性菌的杀菌速率明显高于阳性菌。目前在水产致病菌方面尚未见关于氟苯尼考 PAE 方面的研究报道。本研究中,氟苯尼考对 3 种海洋致病性弧菌也表现出较强的 PAE,其中在  $4 \times \text{MIC}$  时,PAE 时间都大于 1 h,这与兽医界报道的试验结果相符合。因此可以利用氟苯尼考 PAE 较长的特性,在给水产动物用

药时,延长给药间隔时间或者减少给药次数,其疗效应该不亚于甚至优于较短时间或者连续给药。

按传统的观念,抗菌药物的药效学指标常用的是最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。抗菌药物的临床应用主要依赖于药敏试验、血药浓度、半衰期、组织分布及消除率等药动学参数,并且强调抗菌药物治疗需维持在MIC以上浓度,方能发挥疗效,却忽略了药物对细菌生长繁殖规律的影响和机体免疫机制在杀灭细菌中所起的重要作用(张旭等 2008)。现已证明,PAE是确定给药间隔的重要参数,PAE的提出在较大程度上完善了药效学评价指标,且PAE的研究发现提示,药物消除后或血药浓度在低于MIC的一段时间内,细菌的生长仍受到持续抑制(刘芳萍等 2002)。在PAE期间致病菌毒性降低,宿主免疫作用的敏感性增强,进一步增强了药物对细菌的作用。因此,临床上可将PAE与MIC、MBC及药效学参数结合,为全面评价抗菌药物的药效学提供重要的参考依据(郭胜才等 2002)。目前氟苯尼考在水产上的应用越来越广,为防止药物滥用所造成的对水产动物的危害、对养殖水环境的污染,尤其是耐药性微生物的出现,在制订给药方案时,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,既有利于降低临床上可能出现的不良反应,又能达到高效、安全、经济的治疗目的。

## 参 考 文 献

- 王丽平,江善祥,史晓丽. 2003. 抗菌药物的抗菌后效应研究进展及其意义. 动物医学进展, 24(5): 39-41
- 王志强,陈杖榴. 2001. 兽用氟喹诺酮类的抗菌后效应、抗菌后亚抑制浓度效应、亚抑制浓度效应. 中国兽药杂志, 35(5): 13-17
- 王浴生. 1996. 抗生素后效应及其临床意义. 中国(抗生素)杂志, 21(4): 306-315,320
- 刘芳萍,佟恒敏,李昌文. 2002. 单诺沙星对大肠杆菌和金葡萄球菌的体外抗菌后效应. 黑龙江畜牧兽医, 2:7-8
- 李 晖,李 健,张 喆,潘鲁青. 2010. 麻保沙星对主要海洋致病性弧菌的体外抗菌活性及抗菌后效应研究. 中国水产科学, 17(1):97-102
- 沈 萍. 1999. 微生物学实验. 北京:高等教育出版社: 92-94
- 张 旭,王大菊,伍金娥. 2006. 氟苯尼考对禽多杀性巴氏杆菌的抗菌后效应. 华中农业大学学报, 25(4): 408-410
- 张 旭,薛克友,王大菊,赵芬琴,谢欣梅. 2008. 氟苯尼考在鸡体内的药动学及其体内抗菌后效应研究. 中国兽药杂志, 42(12):39-42
- 张世新. 2006. 氟苯尼考对大肠杆菌 K99 体外抗菌后效应研究. 中国兽医杂志, 42(8): 52-53
- 陈杖榴. 2005. 兽医药理学. 北京:中国农业出版社, 219-220
- 陈秀枢,李有武,孙长贵. 1991. 体外抗菌素后效应的方法学及其对临床金黄色葡萄球菌的研究. 临床检验杂志, 9(2): 58-62
- 房文红,周 凯. 2005. 诺氟沙星对溶藻弧菌和恩诺沙星对迟缓爱德华菌的抗菌药物后效应. 海洋渔业, 27(1): 44-48
- 胡功政,苑 丽,刘智明,王升运,王付民. 2004. 氟苯尼考及其与多西环素联合的体外抗菌作用. 中国兽医学报, 24(4): 379-383
- 郭胜才,冯友根. 2002. 抗菌后效应及对抗生素药物临床应用新见解. 解放军药学学报, 18(2): 101-104
- 盖春蕾,李 健,刘 淇,王 群. 2008. 二氟沙星对3种海洋弧菌的抗菌后效应研究. 海洋水产研究, 29(2): 98-101
- 傅得兴,谭 玲,李 琼. 1997. 抗生素后效应及其临床意义. 中国医院药学杂志, 17(8): 349-350
- 董景之. 1997. 抗生素的后效应. 天津药学, 9(3):12-16
- 廖昌容,徐力文,陈毕生. 2005. 氟苯尼考对六种海洋致病弧菌的体外抗菌活性研究. 水产养殖, 26(4): 1-4
- Carbone M, Pennisi MG, Masucci M and 3 others. 2001. Activity and postantibiotic effect of marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin and ciprofloxacin against feline *Bordetella bronchiseptica* isolates. Vet Microbiol 81(1): 79-84
- Fuursted K. 1997. Postexposure factors influencing the duration of postantibiotic effect: Significance of temperature, pH, cations, and oxygen tension. Antimicrob Agents Chemother 41(8): 1693-1696
- Pruul H, McDonald PJ. 1979. Enhancement of leukocyte activity against *Escherichia coli* after brief exposure to chloramphenicol. Antimicrob Agents Chemother 16(6): 695-700
- Zhanel GG, Graig WA. 1994. Pharmacokinetic contributions to postantibiotic effects. Focus on aminoglycosides. Clin Pharmacokinetics 27(5): 377-392