

临床常用几种抗菌药物对 HPS 抗菌活性研究

邵莉萍¹, 张继瑜^{1*}, 马志永² (1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050; 2. 上海兽医研究所, 上海 200241)

摘要 [目的] 研究抗菌药物恩诺沙星、环丙沙星、加替沙星对 27 株副猪嗜血杆菌临床分离菌株体外抗菌活性, 从而观察副猪嗜血杆菌对喹诺酮类抗菌药物的敏感性。[方法] 采用微量肉汤稀释法测定 MIC, 参考标准为美国临床和实验室标准协会 (CLSI)。[结果] 恩诺沙星 (MIC₅₀, MIC₉₀, 0.25 μg/mL, 2 μg/mL)、环丙沙星 (MIC₅₀, MIC₉₀, 0.125 μg/mL, 2 μg/mL)、加替沙星 (MIC₅₀, MIC₉₀, 0.125 μg/mL, 1 μg/mL) 均表现出一定的抑菌活性, 且加替沙星的抑菌活性最明显。在耐药性方面, 副猪嗜血杆菌对恩诺沙星的耐药性最强 (22.2%), 环丙沙星 (3.8%) 和加替沙星 (7.4%) 具有轻微的耐药性。[结论] 抗菌药物恩诺沙星、加替沙星以及环丙沙星对副猪嗜血杆菌临床分离株具有一定的抗菌活性, 在耐药性方面, HPS 已经对恩诺沙星表现出一定的耐药性, 因此, 今后在临床上遇到副猪嗜血杆菌引起的相关疾病, 可以采用合理的给药方案进行疾病的治疗, 对于预防耐药菌株产生至关重要。

关键词 恩诺沙星; 加替沙星; 环丙沙星; 副猪嗜血杆菌; MIC

中图分类号 S858.8 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)33-0113-02

Research of Antibacterial Activity of Clinical Commonly Used Drugs against HPS

SHAO Li-ping¹, ZHANG Ji-yu^{1*}, MA Zhi-yong² (Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730050; 2. Shanghai Veterinary Research Institute, Shanghai 200241)

Abstract [Objective] The purpose of the research is to evaluate the activity of the enrofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin against *Haemophilus parasuis* (27 isolates), and we can estimate the ability of the quinolone compounds and oxazolidinone antibacterial against *Haemophilus parasuis* (HPS). [Method] Broth microdilution method was used to determine MIC, following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations. [Result] Enrofloxacin (MIC₅₀, MIC₉₀, 0.25 μg/mL, 2 μg/mL), ciprofloxacin (MIC₅₀, MIC₉₀, 0.125 μg/mL, 2 μg/mL), gatifloxacin (MIC₅₀, MIC₉₀, 0.125 μg/mL, 1 μg/mL) exhibited activity against HPS, gatifloxacin was the best one of compounds in aspect of inhibition HPS. In respect of resistance, HPS was most resistant for enrofloxacin (22.2%), and showed a little resistance for ciprofloxacin (3.8%) and gatifloxacin (7.4%). [Conclusion] The compounds of quinolone revealed better antibacterial activity than the oxazolidinone antibacterial - linezolid, and linezolid doesn't show the function to restrain HPS. As respect of resistance, HPS reveals severe resistance for enrofloxacin. So, it is important for us to adopt the right ways to choose relevant drugs, when we encounter the diseases caused by HPS.

Key words Enrofloxacin; Gatifloxacin; Ciprofloxacin; HPS; MIC

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪呼吸道一种常在菌, 起初该病原菌被称为猪嗜血杆菌, 后来证明其生长时不需要 X 因子 (血红素和其他卟啉类物质), 需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD 或 V 因子), 因此将其命名为 HPS^[1]。形态学上, HPS 革兰氏染色成红色, 属于革兰氏阴性菌, 在光学显微镜下观察, HPS 菌体呈多形性, 从单个的球杆菌到细长的丝状菌体均可见。该菌在体外培养时非常脆弱, 存活时间短, 容易自行死亡, 在 TSA 固体培养基上长出光滑、透明的灰白色针尖大菌落, HPS 感染引起猪多发性浆膜炎和关节炎以及脊髓炎, 被称之为格拉斯氏病^[2-3]。该病常呈继发感染, 在机体遭受应激或者病毒感染时, 常常会侵入动物体内, 引起动物发病, 属于典型的机会致病菌。易感猪群为 2~8 周龄的断奶前后仔猪, 以及 1~4 月龄的保育阶段猪, 发病率为 10%~15%, 死亡率可达 50%, 降低了猪出栏率, 给生猪养殖行业带来巨大的经济损失。临床常用疫苗来对未发病的猪群进行免疫, 但是, 由于受血清性的多样性和非特异性致病菌的分离数量增加等因素影响, 使得交叉保护疫苗的开发应用尤为困难。

抗菌药是临床实际应用于治疗该疾病的主要选择。抗菌药作为抗菌的有效化合物, 已经是全世界养殖户用于抵抗

细菌感染最常用的临床药物。但是长期滥用抗生素使细菌极易产生耐药性, 甚至出现超级细菌, 例如, 耐甲氧西林金葡菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌、耐青霉素肺炎链球菌、多重耐药性结核杆菌以及耐万古霉素肠球菌。这些耐药菌的出现, 给临床细菌病的治疗造成困难, 严重影响疫病的治疗效果, 使得一些细菌病难以得到有效的控制。据国内外研究报道, 临床分离的 HPS 当中, 存在三甲氧苄氨嘧啶 + 磺胺甲噁唑耐药菌株, 也有部分对新霉素耐药, 此外西班牙学者发现临床分离的 HPS 对青霉素、氨基青霉素、土霉素、红霉素以及替米考星等常见药物存在耐药现象。后来, 中国的研究学者发现, 临床分离的 HPS 对喹诺酮类、头孢类以及庆大霉素出现了耐药现象^[4-5]。

抗菌药物对 HPS 的敏感性检测的试验对于格拉斯氏疾病的治疗是尤为重要的, 目前, 国内外很少有关于抗菌药物对副猪嗜血杆菌敏感性试验的研究报告。为此, 研究 27 株 HPS 临床分离菌对喹诺酮类药物恩诺沙星 (enrofloxacin)、加替沙星 (gatifloxacin)、环丙沙星 (ciprofloxacin) 的敏感性 (图 1), 从而为临床用药提供给药方案指导。喹诺酮类化合物是一类人工合成的含 4-喹诺酮基本结构的抗菌药, 对革兰氏阴性菌具有良好的抗菌活性和较强的药代学特性, 自 20 世纪 60 年代问世以来, 已经经历 4 代的结构改造与修饰, 目前兽医临床常用的为第 3 代的环丙沙星和恩诺沙星, 以及第 4 代的加替沙星, 其中恩诺沙星兽医临床应用最为广泛^[6-7]。但是, 自 2000 年以来, 临床常见致病菌对喹诺酮类药物的耐药性在临床疾病的治疗中越发普遍, 特别是肠道菌的耐药

基金项目 “十二五”国家科技支撑计划项目 (2015BAD1101); 国家现代农业产业技术体系专项 (CAR-38)。

作者简介 邵莉萍 (1991—), 女, 甘肃高台人, 硕士研究生, 研究方向: 基础兽医。* 通讯作者, 研究员, 博士生导师, 从事兽医药理学与毒理学研究。

收稿日期 2017-04-15

性。因此,观察喹诺酮类药物对 HPS 的抑菌活性,对于预防耐药菌产生具有重要的指导意义^[7]。

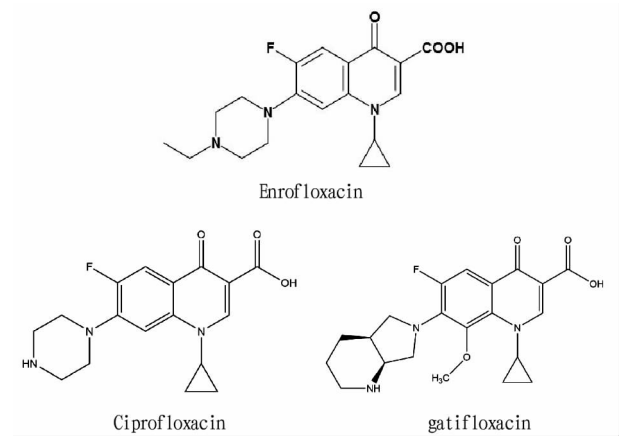


图1 恩诺沙星(enrofloxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、加替沙星(gatifloxacin)化学结构结构

Fig. 1 The chemical structures of enrofloxacin, ciprofloxacin and gatifloxacin

1 材料与方法

- 1.1 药品 恩诺沙星,纯度 98%,由北京索莱宝科技有限公司提供;环丙沙星,纯度 98%,由上海麦克林生化科技有限公司提供;加替沙星,纯度 98%,由上海麦克林生化科技有限公司提供。
- 1.2 菌株 HPS 临床分离株 27 株,由上海兽医研究所马志永研究员馈赠。
- 1.3 质控菌株 流感嗜血杆菌 ATCC49247,购自北纳生物。
- 1.4 主要试剂 大豆胰蛋白胨琼脂(tryptone soya agar, TSA)和大豆胰蛋白胨肉汤(tryptone soya broth, TSB)培养基购自青岛海博生物技术有限公司,新生牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司,辅酶I(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, NAD)购自 biosharp。
- 1.5 培养基配置 将液体培养基 TSB 按照产品要求配置一定体积的培养液,高压灭菌之后,冷却至45℃左右,无菌加

入过滤除菌的 10% NAD 及 5% 新生牛血清,放置在 4 ℃ 条件下备用。

1.6 抗菌药液与菌液的制备 抗菌药液制备:试验前精密称取恩诺沙星、环丙沙星、加替沙星,无菌操作配制成 2048 μg/mL 的药液,放置 4 ℃ 冰箱保存备用,临用前用相应的细菌培养液稀释至试验需要的浓度。恩诺沙星、加替沙星用 DD 水作溶剂,振荡 30 min;环丙沙星用甲醇做溶剂,振荡 30 min。

菌液配置:挑取单菌落接种至已制备好的 TSB 液体培养基当中,置 37 ℃ 振荡培养 20 h 后,用 TSB 培养基稀释菌液,直至菌液浓度为 0.5 麦氏单位。

1.7 最小抑菌浓度(MIC)测定 采用微量肉汤稀释法分别测定待测药物对每株菌株的 MIC,试验参考标准美国临床和实验室标准协会(CLSI)^[8-9]。将一定浓度的待测药物倍比稀释到 96 孔板各试验孔中,稀释梯度为 15 个梯度,浓度范围为 256 ~ 0.015625 μg/mL。然后用相应的细菌培养液稀释已调节至 0.5 麦氏单位浓度的菌液,稀释后的菌液在 15 min 内完成接种,保证每孔细菌的终浓度为 5 × 10⁵ CFU/mL,每孔对应的药物浓度分别为相应的 15 个梯度所对应的浓度。阴性对照组为接种细菌的细菌培养液。当阴性对照组长出细菌时,试验结果方可采纳。

2 结果与分析

药物对 27 株 HPS 的 MIC 结果见表 1,可以看出,恩诺沙星(MIC₅₀, MIC₉₀, 0.25, 0.125 μg/mL, 2 μg/mL)、环丙沙星(MIC₅₀, MIC₉₀, 0.125 μg/mL, 2 μg/mL)、加替沙星(MIC₅₀, MIC₉₀, 0.125 μg/mL, 1 μg/mL)均表现出良好的抑菌活性,喹诺酮类药物当中,HPS 对恩诺沙星的耐性最强(22.2%),而对加替沙星的敏感性最强(93.0%),环丙沙星介于恩诺沙星和加替沙星之间。由此可见,喹诺酮类药物恩诺沙星对 HPS 已经产生一定的耐药性,对环丙沙星和加替沙星的耐药性还不是特别强烈,其中对于加替沙星的敏感性最好(表 2)。

表 1 各抗菌药物在不同浓度下对 HPS 的抑菌率

Table 1 Inhibition rate of different concentrations agents for HPS

药物 Durg	≥0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	≥8
恩诺沙星 Enrofloxacin	11(41)	2(48)	2(56)	3(67)	3(78)	3(89)	3(100)	
环丙沙星 Ciprofloxacin	9(33)	7(59)	0(59)	2(67)	0(67)	8(96)	1(100)	
加替沙星 Gatifloxacin	10(37)	6(59)	3(70)	1(74)	5(93)	2(100)		

表 2 HPS 对药物的耐药率(R)与敏感率(S)

Table 2 Resistance rate(R) and sensitivity(S) of HPS for drugs

药物 Durg	MIC ₅₀ μg/mL	MIC ₉₀ μg/mL	R %	S %
恩诺沙星 Enrofloxacin	0.250	2	22.2	77.7
环丙沙星 Ciprofloxacin	0.125	2	3.8	66.7
加替沙星 Gatifloxacin	0.125	1	7.4	93.0

3 结论与讨论

HPS 是猪呼吸道常在菌。在一定的条件下,就会侵入猪

体内,例如猪蓝耳病、猪丹毒、猪肺疫以及仔猪腹泻等疾病致使猪抵抗力低下,此时 HPS 突破机体黏膜屏障,侵入体内,引起猪发病。病理变化为猪心脏呈绒毛心,肝脏表面出现白色被膜^[10]。近几年来,随着抗菌药物的大范围使用,细菌的耐药性问题也越来越严重,目前,HPS 对喹诺酮类药物的耐药性正在逐渐增强,临床上,HPS 菌株耐药性在逐渐增强,尤其对大环内酯类、四环素类、β-内酰胺类、喹诺酮类以及磺胺类药物的耐药性,而这些药物是格拉斯氏病临床治疗常用的有效药物。喹诺酮类化合物恩诺沙星、环丙沙星以及加替沙

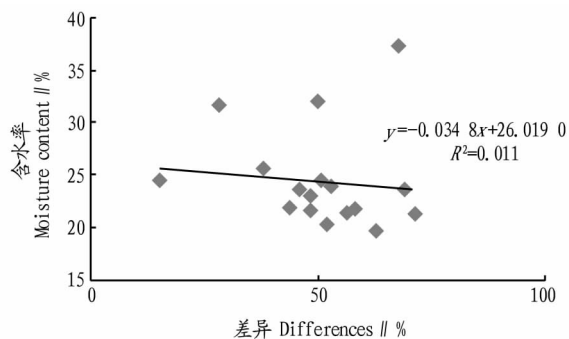


图 5 检测差异与含水率的线性相关(浅层土壤)

Fig. 5 Linear correlation between detect differences and moisture content (shallow soil)

(3)便携式 XRF 仪对土壤的现场快速检测结果的准确性主要影响因素为矿化度矿化不均匀(不均匀效应),湿度的变化(湿度效应)对检测结果准确性的影响不显著。

参考文献

[1] 崔茂培. 便携式 XRF 仪在金矿土壤化探找矿中的应用[J]. 四川地质学报, 2015, 35(2): 299-302.
[2] 葛良全, 周四春, 赖万昌. 原位 X 辐射取样技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1997.

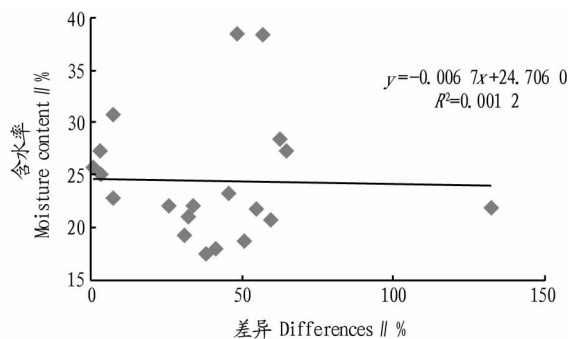


图 6 检测差异与含水率的线性相关(深层土壤)

Fig. 6 Linear correlation between detect differences and moisture content (deep soil)

(上接第 114 页)

星曾因抗菌谱广泛抗菌活性突出,特别是对于多重耐药菌,在世界范围内广泛应用。在 2009—2010 年,宋德平等^[11]、方泉明等^[12]对江西的 HPS 临床分离株做了药敏试验,结果表明 HPS 对猪场大量使用的链霉素、青霉素等抗生素具有一定的耐药性,但是对头孢类抗菌药物则比较敏感。后来,在 2015 年,魏光河^[13]对重庆地区的 HPS 进行药敏试验,结果发现该地区菌对第 3 代头孢和多黏菌素类药品极度敏感,敏感率高达 100%,而对于四环素类、喹诺酮类、大环内酯类以及青霉素类均表现出 33.3%~100% 的耐药性。

该研究发现,喹诺酮类药物对革兰氏阴性菌的抗菌效果显著,比如肠道、呼吸道或者全身性的革兰氏阴性菌,然而,由于在临床上的滥用,使得其耐药范围越来越广,耐药机理也是千变万化。该试验研究的 HPS 临床分离菌,恩诺沙星的耐药性最强,达到 22.2%,其次是加替沙星(7.4%)和环丙沙星(3.8%),而加替沙星的敏感率最高,为 93.0%。恩诺沙星的耐药率大约是环丙沙星的 7 倍,加替沙星的 3 倍。因此,当临床格拉斯氏疾病发生时,可以采用加替沙星或环丙沙星作为治疗药物进行给药,切记勿滥用药物,以防止更多的耐药菌的产生。

参考文献

[1] 徐惠娟,薛云,赵战勤,等. 副猪嗜血杆菌国内流行血清型菌株的生物

[3] 马俊杰,杨琦,王业耀,等. 土壤重金属快速监测技术研究与进展[J]. 中国环境监测, 2015, 31(3): 132-138.
[4] 章晔,谢庭周,曹利国. X 射线荧光探矿技术[M]. 北京: 地质出版社, 1984.
[5] 葛良全. 现场 X 射线荧光分析技术[J]. 岩矿测试, 2013, 32(2): 203-212.
[6] 陆安祥,王纪华,潘立刚,等. 便携式 X 射线荧光光谱测定土壤中 Cr, Cu, Zn, Pb 和 As 的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(10): 2848-2852.
学特性比较研究[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(5): 729-735.
[2] 王建,邵卫星,吕占军,等. 2012 年我国部分省市规模化猪场副猪嗜血杆菌分离鉴定及菌株血清分型[J]. 动物医学进展, 2014(3): 48-52.
[3] STRAW B E. Diseases of swine[M]. 9th edition. [s. l.]: Blackwell Publishing, 2006.
[4] 米丁丹,张艳禾,张万江,等. 副猪嗜血杆菌临床分离株耐药性与耐药机制的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(7): 524-527.
[5] 刘英玉. 副猪嗜血杆菌耐药性调查和耐药机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
[6] CHENG G Y, HAO H H, DAI M H, et al. Antibacterial action of quinolones: From target to network[J]. European journal of medicinal chemistry, 2013, 66(42): 555-562.
[7] HOOPER D C, JACOBY G A. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance[J]. Annals of the New York academy of sciences, 2015, 1354(1): 12.
[8] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. Nature protocols, 2008, 3(2): 163-175.
[9] SADER H S, BIEDENBACH D J, PAUKNER S, et al. Antimicrobial activity of the investigational pleuromutilin compound BC-3781 tested against Gram-positive organisms commonly associated with acute bacterial skin and skin structure infections[J]. Antimicrobial agents & chemotherapy, 2012, 56(3): 1619-1623.
[10] 于江,吴家强,张玉玉,等. 副猪嗜血杆菌的分离与血清型鉴定[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(4): 64-66.
[11] 宋德平,黎家祥,金冲. 一株副猪嗜血杆菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 养猪, 2010(4): 55-56.
[12] 方泉明,黄建珍,黄冬艳. 副猪嗜血杆菌江西株的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(4): 161-163.
[13] 魏光河. 重庆渝东部分地区副猪嗜血杆菌血清学调查与药敏试验[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(9): 13-15.