

联合用药对禽源沙门氏菌的体外抑菌试验

肖建光¹,常维山²

(1.泰山禽业科技职业培训学校,山东 27100 2.山东农业大学动物科技学院,泰安)

摘 要:研究阿莫西林、强力霉素、多粘菌素、头孢拉定、痢菌净分别和多种抗菌药联用在体外对沙门氏菌的抑制效果,为临床联合用药提供试验依据。采用棋盘微量测定法,强力霉素、阿莫西林、多粘菌素、头孢拉定、痢菌净分别与头孢噻肟钠、克林霉素、阿奇霉素、头孢曲松钠、阿莫西林、头孢哌酮、磷霉素、哌拉西林、甲硝唑、加替沙星、克林沙星、氨苄西林钠、乳糖酸红霉素组合,观察对沙门氏菌的抑菌或杀菌效果,测定对沙门氏菌的最小抑菌浓度(MIC),并计算出了部分抑菌浓度(FIC指数)。结果表明:强力霉素与阿莫西林、甲硝唑,阿莫西林与阿奇霉素、磷霉素钠,多粘菌素与克林霉素、阿奇霉素、阿莫西林、磷霉素钠,头孢拉定与氨苄西林钠、阿莫西林,痢菌净与阿莫西林、磷霉素钠、氨苄西林钠的联合使用对该株禽源沙门氏杆菌的体外抗菌活性较强,呈协同作用。强力霉素与阿奇霉素、磷霉素联合使用,阿莫西林和哌拉西林、红霉素联合使用,多粘菌素与哌拉西林,头孢拉定和林霉素钠、哌拉西林多粘菌素的联合使用,痢菌净与甲硝唑、多粘菌素的联合使用对禽源沙门氏菌表现出相加作用。

关键词:联合药敏试验;沙门氏菌;部分抑菌浓度(FIC指数)

中图分类号:S859.79

文献标识码:B

文章编号:1673-1085(2009)11-0033-04

1 材料与方法

省动物疾病控制中心提供。

1.1 材料

1.1.2 抗菌药物 各种原料药物的来源,见表1。

1.1.1 菌株 标准菌株沙门氏菌 C79-13,由山东

表1 抗菌药物来源

药物名称	药物含量	生产企业(地)	生产日期	剂型
头孢派啶钠	1g/瓶	上海新先锋药业	07.2.11	粉剂
加替沙星注射液	0.2g20ml/支	枣庄百科药业	07.9.2	水剂
盐酸阿米卡星	0.2g2ml/支	上海新先锋药业	07.10.31	水剂
硫酸庆大霉素	2ml 8万单位	上海新先锋药业	08.3.19	水剂
盐酸左旋氧氟沙星	2ml/支	上海新先锋药业	08.2.3	水剂
头孢噻肟钠	1g/瓶	上海新先锋药业	07.9.7	粉剂
头孢曲松钠	1g/瓶	上海新亚药业	08.1.4	粉剂
乳糖酸红霉素	0.25g/瓶	东北制药厂	07.9.5	粉剂
克林霉素	0.3g/瓶	内蒙古药业	07.1.1	粉剂
磷霉素钠	1g/瓶	东北制药厂	07.3.6	粉剂
哌拉西林	0.5g/瓶	山东鲁抗制药	07.6.8	粉剂
阿奇霉素	0.25g/瓶	浙江亚太制药	08.5.9	粉剂
阿莫西林	1g/瓶	哈药集团	08.2.1	粉剂

1.1.3 肉汤培养基 MH肉汤培养基购自杭州微生物试剂厂。其配方为300g牛肉、17.5g的酪蛋白酸性

水解物、1.5g可溶性淀粉、17.0g琼脂。将牛肉去脂肪肌腱后绞碎,加1000ml蒸馏水制成肉浸汤,加入各成分,调整pH值至7.4,于121℃高压蒸汽灭菌15min,

收稿日期:2009-10-18

在直径 90mm 的平皿内,倾注 4mm 厚的平板,保存备用。

1.1.4 其他 96 孔塑料板为聚苯乙烯微孔稀释板 12 孔 8 排,每孔容量 0.25ml。微量移液管为上海求精生化仪器厂产品,规格为 50~2000 μ l。其他有电子天平、无菌操作台、恒温箱、微型振荡器、蒸馏水等。

1.2 方法

1.2.1 细菌浓度测定 试验前将标准沙门氏菌 C79-13 菌种经培养、复苏并重新分离单菌落 2~3 个,接种到 3~5mlMH 培养液中,于 37℃恒温振荡,培养 8~10h,菌株经液体培养基稀释,接种于肉汤中,37℃培养 16~18 h,用生理盐水 10 倍稀释,分别接种于琼脂平板上,37℃培养 16~18h,进行菌落计数,采用微生物比浊法测定,生长浊度达到 9×10^8 个/ml。

1.2.2 棋盘法联合药敏试验 棋盘稀释法包括微量棋盘稀释法、试管棋盘稀释法和琼脂棋盘稀释法三种,其中微量棋盘稀释法为最常用的联合药敏方法之一。它使用 96 孔无菌微孔板,每种抗菌药物最高从 2 倍 MIC 浓度开始,用灭菌 MH 肉汤倍比稀释,一般取 6~8 个稀释度左右,各取 50 μ l 分别排列在平板的行与列上,然后在无菌微孔板中加入 100 μ l 菌液,无细菌生长的最低药物浓度为 MIC。

1.2.3 原药的配制 用分析天平精确称取抗生素制剂后,无菌操作溶于蒸馏水中,稀释至所需浓度,按制剂中所含抗菌药物基质换算,如某一批号的庆大霉素每毫克含基质 620 μ g,要配制成每毫升含 1000 μ g,每毫克庆大霉素就需要加溶剂溶解制成 0.62ml 的溶液。若制剂中含有杂菌,配制后宜用细菌滤器过滤除菌。然后分装于无菌试管或小瓶,在 -20℃冷冻状态下可保存 3 个月或更长时间。每次取出一管或一瓶保存于 4℃冰箱中,供日常药敏测定

使用。除氯霉素、氨基糖苷类和磺胺类药物可用较长时间外,其他抗菌药物可用一周左右。

1.2.4 操作方法

1.2.4.1 抗菌药物的准备 先将所需的抗菌药物在试管中用蒸馏水做倍比稀释成 256IU/ml、128IU/ml、64IU/ml...0.125IU/ml (或 μ g/ml),共 12 管,用微量加样器将稀释好的抗菌药物从低浓度到高浓度,依次加入到微量板的小孔内,每孔 50 μ l,第 12 孔内加不含抗菌药物的磷酸盐缓冲液作为对照。

1.2.4.2 菌液的制备 试验时将菌液做 1:5000 稀释,用微量加样器将稀释好的菌液依次按照抗菌药物的浓度加入到微量板的小孔中,每孔 50 μ l。如此每孔内抗菌药物的最终浓度为 256IU/ml、128IU/ml、64IU/ml、0.125IU/ml (或 μ g/ml)。第 12 孔内加 50 μ l 含双倍成分的 MH 培养液。最后将微量板置于振荡器上振荡 1min,使抗菌药物和菌液充分混匀。微孔板加盖并用胶纸密封,以减少孵育过程中的蒸发。置湿盒中 37℃培养 16~24h。其它联用药物按此步骤完成试验,观察试验结果。

1.2.5 计算部分抑菌浓度指数 FIC 在实验室中常以部分抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FIC 指数)的计算结果作为联合药敏试验的判断依据。

FIC 指数 = (甲药联合时的 MIC/甲药单独时的 MIC) + (乙药联合时的 MIC/乙药单独时的 MIC)。FIC 指数 ≤ 0.5 ,协同作用; $0.5 < \text{FIC 指数} \leq 1$,相加(累加)作用; $1 < \text{FIC 指数} \leq 2$,无关作用; FIC 指数 > 2 ,拮抗作用。

与棋盘稀释法不同的是,试管、琼脂棋盘稀释法分别在试管及含有不同药物浓度的琼脂平板上进行。

2 试验结果

2.1 试验药物单用最小抑菌浓度结果 见表 2。

表 2 所试验药物单用最小抑菌浓度 (MIC)

强力霉素	阿莫西林	多粘菌素	头孢拉定	痢菌净	头孢噻肟钠	克林霉素	阿奇霉素	头孢曲松钠
8	256	8	256	16	4	256	32	4
克林沙星	氨苄西林钠	磷霉素	头孢哌酮	哌拉西林	甲硝唑	加替沙星	乳糖酸红霉素	
4	32	32	4	8	256	4	256	

由表 2 可知,克林沙星、头孢噻肟钠、头孢曲松钠、加替沙星、头孢哌酮对沙门氏菌的 MIC 值体外抗菌活性强,其 MIC 值为 $4\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,痢菌净、哌拉西林、多粘菌素、强力霉素也有较强的抗菌活性。阿

莫西林、头孢拉定、甲硝唑、乳糖酸红霉素、克林霉素对沙门氏菌的活性较差。

本试验主要讨论抗菌活性相对较差的药物之间的联合应用对沙门氏菌体外抑菌效果的研究。故对

MIC值在 $4\mu\text{g/ml}$ 或者 $4\mu\text{g/ml}$ 以下的药物不做讨论。

2.2 两种药物配伍对沙门氏菌体外试验药敏效果 见表3、表4、表5、表6、表7、表8。

表3 强力霉素与6种抗菌药联用对禽源沙门氏菌的体外抑菌试验

抗生素	6种抗生素		强力霉素		FIC	结果
	单 MIC	联 MIC	单 MIC	联 MIC		
克林霉素	256	256	8	8	2	无关作用
阿奇霉素	32	16	8	2	0.75	相加作用
阿莫西林	256	4	8	1	0.14	协同作用
磷霉素钠	32	16	8	1	0.63	相加作用
哌拉西林	8	4	8	2	0.75	相加作用
甲硝唑	256	16	8	2	0.31	协同作用

由表3可知,阿莫西林、甲硝唑与强力霉素联合使用呈不同程度的协同作用,抗菌活性提高了4~16倍。阿奇霉素、磷霉素钠、哌拉西林与强力霉素联合使用对沙门氏菌起到不同程度的相加作用,克林霉素与强力霉素的联合使用 $\text{FIC}=2$,表现出无关作用。

表4 阿莫西林与5种抗菌药联用对禽源沙门氏菌的体外抑菌试验

抗生素	5种抗生素		阿莫西林		FIC	结果
	单 MIC	联 MIC	单 MIC	联 MIC		
克林霉素	256	4	256	256	1.02	无关作用
磷霉素	32	4	256	4	0.14	协同作用
阿奇霉素	32	8	256	1	0.25	协同作用
哌拉西林	8	4	256	64	0.75	相加作用
红霉素	256	128	256	64	0.75	相加作用

由表4可见,磷霉素、阿奇霉素与阿莫西林的联合使用表现出不同程度的协同作用,抗菌活性提高4~64倍,哌拉西林、红霉素与阿莫西林联合使用表现出相加作用,克林霉素与阿莫西林联合使用表现出无关作用。

表5 多粘菌素与6种抗菌药联用对禽源沙门氏菌的体外抑菌试验

抗生素	5种抗生素		多粘菌素		FIC	结果
	单 MIC	联 MIC	单 MIC	联 MIC		
克林霉素	256	8	8	1	0.16	协同作用
阿奇霉素	32	4	8	0.25	0.16	协同作用
阿莫西林	256	32	8	0.5	0.19	协同作用
磷霉素钠	32	4	8	0.5	0.19	协同作用
哌拉西林	8	4	8	0.25	0.53	相加作用
甲硝唑	256	256	8	8	2	无关作用

由表5可知,多粘菌素与克林霉素、阿奇霉素、阿莫西林、磷霉素钠联合使用表现出协同作用,与哌拉西林联合使用表现出相加作用,与甲硝唑联合使用呈无关作用。

表6 头孢拉定与5种抗菌药联用对禽源沙门氏菌的体外抑菌试验

抗生素	5种抗生素		头孢拉定		FIC	结果
	单 MIC	联 MIC	单 MIC	联 MIC		
阿莫西林	256	4	256	4	0.03	协同作用
磷霉素钠	32	16	256	8	0.53	相加作用
哌拉西林	8	4	256	2	0.51	相加作用
氨苄西林钠	32	4	256	16	0.19	协同作用
多粘菌素	8	4	256	4	0.52	相加作用

由表6可知,头孢拉定与阿莫西林、氨苄西林钠联合使用表现出协同作用,与磷霉素钠、哌拉西林、多粘菌素联合使用表现出相加作用。

表7 痢菌净与6种抗菌药联用对禽源沙门氏菌的体外抑菌试验

抗生素	6种抗生素		痢菌净		FIC	结果
	单 MIC	联 MIC	单 MIC	联 MIC		
克林霉素	256	64	16	4	0.5	协同作用
阿莫西林	256	32	16	0.5	0.09	协同作用
磷霉素钠	32	8	16	2	0.38	协同作用
哌拉西林	8	4	16	0.5	0.53	相加作用
氨苄西林钠	32	4	16	4	0.38	协同作用
多粘菌素	8	4	16	0.25	0.52	相加作用

由表7可知,痢菌净与氨苄西林钠、克林霉素、阿莫西林、磷霉素钠联合使用表现出协同作用,与阿奇霉素、哌拉西林、多粘菌素联合使用表现出相加作用。

表8 5种药物与其它抗菌药合用 FIC 指数

药物名称	强力霉素	阿莫西林	多粘菌素	头孢拉定	痢菌净
克林霉素	2	1.02	0.16		0.5
阿奇霉素	0.75	0.25	0.16		
阿莫西林	0.14	0.14	0.19	0.03	0.09
磷霉素钠	0.63	0.75	0.19	0.53	0.38
哌拉西林	0.75		0.53	0.51	0.53
甲硝唑	0.31		2		
氨苄西林钠		0.75		0.19	0.38
乳糖酸红霉素					
多粘菌素				0.52	0.52

3 结果分析

3.1 由上述试验可知,强力霉素与阿莫西林、甲硝唑的联合应用,阿莫西林和阿奇霉素、磷霉素钠的联合应用,多粘菌素与克林霉素、阿奇霉素、阿莫西林、磷霉素钠的联合使用,头孢拉定与氨苄西林钠、阿莫西林、痢菌净与阿莫西林、磷霉素钠、氨苄西林钠的联合使用对该株禽源沙门氏杆菌的体外抗菌活性较强,呈协同作用。两两之间的联合使用可减少药物的用量。

3.2 强力霉素与阿奇霉素、磷霉素联合使用、阿莫西林和哌拉西林、红霉素联合使用,多粘菌素与派拉西林、头孢拉定和林霉素钠、哌拉西林多粘菌素的联合使用,痢菌净与甲硝唑、多粘菌素的联合使用对禽源沙门氏菌表现出相加作用,在临床中也可减少药物的用量。

3.3 克林霉素与强力霉素、阿莫西林的联合使用,甲硝唑与多粘菌素的联合使用呈无关作用。

3.4 阿莫西林、克林霉素、甲硝唑、头孢拉定、红霉素对禽源沙门氏菌有一定的耐受,这与兽医临床上可能长时间使用这些药物有关系。但与其他药物联合使用时表现出较强的活性。

3.5 不同的两种抗菌药联合使用对沙门氏菌株可能表现不同的作用,本试验结果也证实了多种药物的联合应用对同一种沙门氏菌产生不同的影响。喹诺酮类抗生素能抑制 DNA 的合成和复制,这为兽医临床工作者带来了指导意义,为寻找最佳的药物组合提供了参考价值。同样为养殖户朋友在用药中提供了指导,可以降低养殖成本,提高养殖效益,减少细菌的耐药。

参考文献:

- [1] 陈晶 (2005),孙自铺. 非伤寒沙门菌耐喹诺酮类药物机制的研究进展[J].国外医药.抗生素分册, (06).
- [2] 殷凯生 (2001):, 殷民生. 实用抗感染药物手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 201.
- [3] 马越, 姚蕾, 陈鸿波, 等. 临床常见细菌的耐药性问题[J].中国抗生素杂志, 2002, 27.
- [4] 李胜利, 张婴元, 周乐, 等. 24 种抗菌药对临床分离葡萄球菌的体外抗菌活性. 中国抗感染化疗杂志, 2001, 1(2).
- [5] 吴本权, 唐英春, 张扣兴, 等. PBP2a 体外诱导与 MRSA 的耐药关系[J]. 中山医科大学学报, 1999, 20 (3): 198.
- [6] 徐志豪, 刘富光, 王选锐. 红霉素、磷霉素对铜绿假单胞菌生物被膜体外作用的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志.
- [7] 周旭美, 黎俊华. 磷霉素与环丙沙星联用的体外抗生素后效应研究[J]. 贵州医药, 2000, 24 (2): 84.
- [8] 胡功政, 苑丽, 刘智明. 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 2004 年 7 月 第 24 卷 第 4 期.
- [9] 马越, 李景云, 金少鸿. 美国食品药品监督管理局修订有关人用抗生素类药品说明书的新规定[J].中国药事, 2003,(10).
- [10] 李成忠, 王红宁, 黄勇. 多重耐药鸡致病性沙门氏菌 I 类整合子的检测研究. 中国畜牧兽医 2007 年第 34 卷第 1 期.
- [11] 叶秀彬. 抗菌药的副作用与其化学结构相关性的研究进展[J]. 广东药学, 2002, 12(3): 56.
- [12] 张华. 动物性产品中沙门氏菌的危害及控制措施[J]. 中国动物保健, 2004,(06).
- [13] 桂丙东, 孙敬. 细菌药物敏感性试验测定手册. 江西出版社.
- [14] 许加刚, 李宁. 抗生素联合应用的分类和指征. 2008 年 3 月第 5 卷第 3 期 World Health Digest □

齐鲁动保简讯

近日, 齐鲁动物保健品有限公司自行研发的新兽药硫酸头孢喹肟原料、注射用硫酸头孢喹肟、硫酸头孢喹肟注射液顺利通过农业部兽药评审中心的评审, 荣获三个国家二类新兽药注册证书, 这充分体现了目前齐鲁动物保健品有限公司的研发实力。我公司惠可宁(注射用硫酸头孢喹肟和硫酸头孢喹肟注射液)都顺利拿到农业部生产批准文号。头孢喹肟作为该公司又一重点拳头产品, 将迅速走上市场, 为中国畜牧业的发展发挥更大的作用。

头孢喹肟是头孢菌素类抗生素。通过抑制细胞壁的合成达到杀菌效果, 具有广谱的抗菌活性, 对青霉素酶与 B-内酰胺酶稳定。体外抑菌试验表明, 本品可抑制常见的革兰氏阳性和阴性菌, 包括大肠艾希氏杆菌、枸橼酸杆菌、克雷伯菌、巴氏杆菌、变形杆菌、沙门氏菌、粘质杆菌、牛嗜血杆菌、化脓放线杆菌、梭杆菌属的细菌、普雷沃菌、放线杆菌和猪丹毒杆菌。临床上主要用于治疗对头孢喹肟敏感的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌引起的牛和猪的细菌感染, 如猪的传染性胸膜肺炎、乳房炎、子宫炎、无乳综合征等, 牛呼吸系统疾病、腐蹄病、传染性延髓坏死、急性交叉指性坏死菌病、小牛的大肠杆菌引起的败血病等。