

网络出版时间:2016-05-03 14:05

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.06.008

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160503.1405.016.html>

嗜水气单胞菌性鲫败血症的盐酸沙拉沙星 用药方案研究

宗乾坤,徐丽娟,吕利群

(上海海洋大学 水产与生命学院,国家水生动物病原库,农业部淡水种质资源重点实验室,上海 201306)

【摘要】 【目的】研究盐酸沙拉沙星在鲫鱼体内的药代学、药效动力学联合参数,确定盐酸沙拉沙星治疗鲫鱼细菌性疾病的防耐药突变用药方案。【方法】测定盐酸沙拉沙星对嗜水气单胞菌的体外最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)、抗菌后效应(PAE)、防耐药突变浓度(MPC)和防耐药突变选择窗(MSW);给鲫鱼经口灌服不同剂量(20,30,40 mg/kg)的盐酸沙拉沙星,于给药后0.5,1,2,4,6,8,10,12,16,24,48 h取血清及肌肉样品,研究盐酸沙拉沙星在鲫鱼体内的药代动力学,然后结合药代动力学和药效动力学结果,确定盐酸沙拉沙星防治嗜水气单胞菌引起的鲫鱼细菌性败血症的合理给药方案。【结果】盐酸沙拉沙星对嗜水气单胞菌的MIC为0.5 $\mu\text{g/mL}$,MBC为2.0 $\mu\text{g/mL}$,MPC为2.5 $\mu\text{g/mL}$,MSW为0.5~2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。按20,30,40 mg/kg剂量给鲫鱼经口灌服盐酸沙拉沙星后,鲫鱼体内的血药质量浓度大于MPC的维持时间分别为0,4,0,24.0 h; $\text{AUC}_{24}/\text{MIC}$ 分别为8.44,78.20,164.96; $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ 分别为4.496,6.662,15.294。【结论】40 mg/kg灌服剂量能使鲫的血药浓度维持在MPC以上的时间 $\geq(24-\text{PAE})$ h; $\text{AUC}_{24}/\text{MIC}\geq 100$ 或 $C_{\text{max}}/\text{MIC}\geq 8$,因此建议盐酸沙拉沙星防治嗜水气单胞菌引起的鲫鱼细菌性败血症的防耐药突变用药方案为:给药剂量40 mg/kg,每日给药1次,休药期不低于10 d。

【关键词】 鲫;盐酸沙拉沙星;防耐药突变浓度;嗜水气单胞菌;药代动力学;药效动力学

【中图分类号】 S943.117.41⁺3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)06-0046-07

Medication regimen of Sarafloxacin against *Aeromonas hydrophila* infection in crucian carp (*Carassius auratus*)

ZONG Qian-kun, XU Li-juan, LÜ Li-qun

(National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, College of Fisheries and
Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated *in vitro* pharmacodynamics (PD) parameters and *in vivo* pharmacokinetics (PK) parameters to determine the rational dosage of Sarafloxacin in crucian carp (*Carassius auratus*). 【Method】 The pharmacodynamics of Sarafloxacin on *Aeromonas hydrophila* were studied *in vitro* and the parameters were monitored after a single oral gavage of 20, 30, and 40 mg per kg body weight to determine a medication regimen to prevent bacterial sepsis in crucian carp. 【Result】 The minimal inhibitory concentration (MIC) of Sarafloxacin on AH10 was 0.5 $\mu\text{g/mL}$, the minimum bactericidal concentration (MBC) was 2.0 $\mu\text{g/mL}$, the mutant prevention concentration (MPC) was 2.5 $\mu\text{g/mL}$, and the mutant selection window (MSW) for the pathogenic bacterial strains was 0.5—2.5 $\mu\text{g/mL}$. The time for Sarafloxacin concentration of $>\text{MPC}$ in serum of crucian carp were 0, 4, 0, and 24.0 h at the dosages of 20, 30, and

【收稿日期】 2014-11-05

【基金项目】 农业部现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-12)

【作者简介】 宗乾坤(1991—),男,江苏溧阳人,在读硕士,主要从事水生动物传染病学研究。

【通信作者】 吕利群(1971—),男,湖北武穴人,教授,博士,主要从事水生动物传染病学研究。E-mail: lqlv@shou.edu.cn

40 mg/kg, respectively. The AUC_{24}/MIC values were 8.44, 78.20 and 164.96, and the C_{max}/MIC values were of 4.496, 6.662, and 15.294, respectively. 【Conclusion】 The dosage of 40 mg/kg resulted in $MPC \geq (24-PAE)h$, $AUC_{24}/MIC \geq 100$ or $C_{max}/MIC > 8$. Thus, the applicable regimen for prevention and treatment of bacterial diseases of crucian carp is 40 mg/kg, once per day, and no less than 10 d for withdrawal period.

Key words: *Carassius auratus*; Sarafloxacin; mutant prevention concentration; *Aeromonas hydrophila*; pharmacodynamics; pharmacokinetic

鲫(*Carassius auratus*)因肉味鲜美、营养价值高而深受广大消费者的喜爱,是我国主要的淡水养殖品种。鲫在我国分布广泛,其环境适应能力很强,但近年来随着集约化高密度养殖模式的快速推广,养殖水体环境持续恶化,鲫的各种病害尤其是细菌性疾病时常发生,严重阻碍了鲫养殖业的发展^[1]。在细菌性病原中,嗜水气单胞菌作为一种主要的致病性细菌^[2],极易感染鱼只,且致死率较高。盐酸沙拉沙星(Sarafloxacin)是第3代喹诺酮(Quinolones)类化合物,具有抗菌谱广、抗菌活性强、吸收快、生物利用度高、组织分布广、半衰期长、残留少等特点^[3],其作用点是细菌的细胞核,与其他氟喹诺酮类药物不会产生明显的交叉耐药性^[4],因此适用于鲫鱼细菌性疾病的防治。当前针对盐酸沙拉沙星的研究很多,但多是研究其体外药效学参数,即最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)以及其体内药代动力学参数,并据此制定给药方案。如彭家红等^[5]开展了盐酸沙拉沙星在中华绒螯蟹体内的药动学及药效学研究,并确定了30 mg/kg的用药剂量。王翔凌等^[6]研究制定了盐酸沙拉沙星治疗鲫鱼细菌出血性败血病的剂量为每日20 mg/kg,休药期为14 d。上述研究更多地考虑了临床药物疗效,却忽视了临床中会产生耐药突变体的问题,所以为了避免盐酸沙拉沙星在临床使用中引起致病菌耐药性问题,有必要研究确定防止耐药菌产生的用药方案。国内徐丽娟等^[7]在制定恩诺沙星用药方案时,最先引入了防耐药突变理论,其主要参考了Dong等^[8]和Drlica^[9]先后提出的药物防耐药突变浓度(Mutant prevention concentration, MPC)和防耐药突变选择窗(Mutant selection window, MSW)理论, MPC是抑制细菌耐药突变体被选择性富集所需的最低抗菌药物浓度, MSW是最低抑菌浓度MIC和MPC之间的浓度范围^[7]。防耐药突变理论提供了一个遏制细菌耐药的新策略,也为盐酸沙拉沙星临床使用方案研究提供了更为严谨的科学依据。

本试验以实验室分离鉴定的致病性嗜水气单胞菌(AH10)为试验菌株^[10],测定了盐酸沙拉沙星对

AH10的体外药效学参数(包括MPC、MSW)及体内药代动力学参数,制定了盐酸沙拉沙星治疗鲫鱼细菌性疾病的防耐药用药方案,以期为盐酸沙拉沙星的临床应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验动物和试验菌株

试验用鲫鱼(体质量120~170 g/尾),从上海南汇某养殖场购得,挑选健康的个体,暂养于0.4 m×0.5 m×1.0 m的水族箱内,试验水温(22±1)℃。嗜水气单胞菌(菌株代号为AH10),由上海海洋大学国家水生动物病原库分离保存。

1.2 主要试剂与仪器

盐酸沙拉沙星标准品,纯度≥99.0%,购于Sigma公司;盐酸沙拉沙星原料药,纯度≥97%,购于南京精瑞久安生物技术有限公司;乙腈(色谱纯)、二氯甲烷(分析纯)、四丁基溴化铵(分析纯)、正己烷(分析纯),均购于国药集团化学试剂有限公司。

主要仪器有Agilent 1100高效液相色谱仪(配有紫外检测器)、涡旋振荡器、高速离心机和热水浴锅等。

1.3 盐酸沙拉沙星对嗜水气单胞菌的体外药效试验

1.3.1 MIC和MBC的测定 参考文献[11]的方法测定盐酸沙拉沙星的MIC和MBC,试验重复5次,结果取平均值。

1.3.2 体外抗菌后效应的测定 抗菌后效应(Post-anti-biotic effect, PAE)参考刘远飞^[12]的方法测定。试验设置试验组T1、T2、T3及对照组C1和残留对照组C2,各组菌液(细菌含量均为 10^7 CFU/mL)中盐酸沙拉沙星的含量分别为2MIC、4MIC、8MIC、0MIC和0.08MIC。所有处理组菌液于30℃恒温孵育1 h,然后采用400倍稀释法除药,取上述各试验组菌液0.1 mL,分别加到含有1.9 mL 30℃预热的MH肉汤中并混匀,同样的过程再重复1次即达到400倍的除药效果,各管混匀后于30℃恒温孵育。于除药后0, 1, 2, 3, 4, 5和6 h时分别对每组进行细菌计数,重复3次取平均值。绘制

除药后的细菌恢复生长动力学曲线,计算 PAE: $PAE = T - C$,其中 T 、 C 分别为试验组和对照组细菌含量等于重建后达到 10 倍初始含量(即 0 h 细菌含量)所需的时间。

1.3.3 MPC、MSW 的测定 参考文献[13],分别配制盐酸沙拉沙星质量浓度为 1MIC、2MIC、3MIC、4MIC、5MIC、6MIC、7MIC、8MIC、9MIC、10MIC 的琼脂平板备用。挑取单个 AH10 菌落接种于 MH 肉汤过夜培养,3 000 r/min 离心 5 min,细菌沉淀用 10 倍体积的原液 MH 肉汤悬浮,振荡培养 6 h,3 000 r/min 离心 5 min 后将细菌含量调整为 3×10^{10} CFU/mL。各管分别取 100 μ L 浓度为 3×10^{10} CFU/mL 的菌液,均匀涂抹在含上述质量浓度盐酸沙拉沙星药物的琼脂平板上,每种药物浓度涂抹 4 个平板,使得单个平板的细菌总接种量达到 3×10^9 CFU。30 $^{\circ}$ C 孵育,72 h 后无菌落生长的最低药物质量浓度即为盐酸沙拉沙星对致病菌 AH10 的 MPC, MPC 与 MIC 之间的质量浓度范围即为 MSW。试验重复 5 次,结果取平均值。

1.4 盐酸沙拉沙星在鲫鱼体内的药代动力学研究

1.4.1 标准曲线的建立 样品定量采用外标试验法。准确称取 0.02 g 盐酸沙拉沙星标准品于 100 mL 棕色容量瓶中,用足量 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液溶解,配制成质量浓度为 200 μ g/mL 的盐酸沙拉沙星标准储备液。将标准储备液分别稀释成 200, 50, 20, 10, 1, 0.5, 0.1, 0.05 μ g/mL 的标准工作液,每个质量浓度取 3 组平行的样品,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤于样品瓶中,分别进行高效液相色谱(HPLC)检测。以 HPLC 峰面积为纵坐标(y)、药物质量浓度为横坐标(x)建立标准曲线,拟合回归方程并确定相关系数。

1.4.2 给药与样品采集 取配制好的药物,按 20, 30, 40 mg/kg 的剂量经口灌入鲫鱼前肠,选择无回吐者用于试验。于给药后 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48 h 尾静脉采集鲫鱼血液 2.0 mL/尾,同时取肌肉样品 2.0 g/尾,每个时间点采集血液和肌肉样品各 5 份。血液样品置 1.5 mL 离心管中于 4 $^{\circ}$ C 静置 8 h,离心后取上层血清置新的离心管中;肌肉组织保存在样品袋中,所有样品均于 -20 $^{\circ}$ C 保存。同时采集未用药的空白样品作为对照。

1.4.3 样品处理与检测 参考王翔凌等^[6]的方法,将冷冻保存的鲫鱼血清、肌肉样品自然解冻,分别取血清 1 mL 和肌肉组织 2 g 于 50 mL 离心管中,按 1:1 (血清样品为体积比,肌肉样品为质量(g)体积

(mL)比)分别加入 1 mol/L 氯化钠溶液,按 1:5 (血清样品为体积比,肌肉样品为质量(g)体积(mL)比)分别加入二氯甲烷,混合 2 min,液体快速混合器上中速混合 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上层水相,将下层有机相倒入 15 mL 具塞离心管中,向残渣再次加入以上试剂,试剂量减半,重复以上操作步骤,进行第二次萃取。合并 2 次萃取所得的有机相,在 60 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中蒸干。蒸残物用流动相(1 mL)溶解,涡旋混合器上混匀 2 min,加入 2 mL 正己烷去脂,液体快速混合器上混匀 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上层液体,下层再次加入相同体积的正己烷进行第 2 次去脂,混匀,离心后取下清液经 0.22 μ m 有机相一次性针头过滤器过滤后,4 $^{\circ}$ C 保存待测。

参考邱银生等^[14]的方法进行 HPLC 分析。色谱条件:色谱柱为 RP-ODS C18 分析柱(150 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m),流动相为乙腈-2%四丁基溴化铵溶液(V (乙腈): V (2%四丁基溴化铵)=1:9),用磷酸调 pH 至 2.5,流速为 1.2 mL/min,紫外检测波长为 280 nm,柱温为 30 $^{\circ}$ C,进样量为 20 μ L。

1.4.4 回收率和精密度 分别取 100, 10, 1 μ g/mL 盐酸沙拉沙星标准工作液各 100 μ L,分别加入到 1 g 的空白肌肉或 1 mL 血清中,使其理论药物含量分别为 10, 1, 0.1 μ g/g (肌肉)或 10, 1, 0.1 μ g/mL (血清),按照上述样品处理方法处理后进行 HPLC 分析,测算盐酸沙拉沙星的实测质量浓度,每个质量浓度设置 3 个重复,计算相对回收率(相对回收率=样品实测质量浓度/样品理论质量浓度 $\times$ 100%)。为了衡量检测方法的精密度,在 1 d 内的 3 个不同时间点对上述样品进行重复检测,并连续 3 d 重复检测,以此来计算检测方法的日内平均变异系数和日间平均变异系数:变异系数(CV)= $S/X \times 100\%$,其中 S 为标准偏差, X 为平均值。

1.5 数据处理

用 Excel 对 Agilent 1100 高效液相色谱仪得到的数据进行分析,应用 Kinetic 4.4 药代动力学软件拟合药代动力学模型,计算动力学参数。

2 结果与分析

2.1 盐酸沙拉沙星对嗜水气单胞菌的体外药效学研究

2.1.1 MIC、MBC 和 PAE 的测定 根据试验结果可以得出,盐酸沙拉沙星对嗜水气单胞菌 AH10 的 MIC 为 0.5 μ g/mL, MBC 为 2.0 μ g/mL。药物浓

度分别为 2MIC、4MIC、8MIC 的盐酸沙拉沙星药液与嗜水气单胞菌 AH10 菌悬液接触 1 h 后,用 400 倍稀释除药法去除盐酸沙拉沙星,对照组 C1 与残留药物对照组 C2 中的细菌生长动力学曲线几乎一致(图 1),表明 400 倍稀释足以除去药物。2MIC、4MIC 和 8MIC 处理的 PAE 分别为 1.12,1.51,1.92 h,表明随着药物浓度的升高 PAE 明显延长。

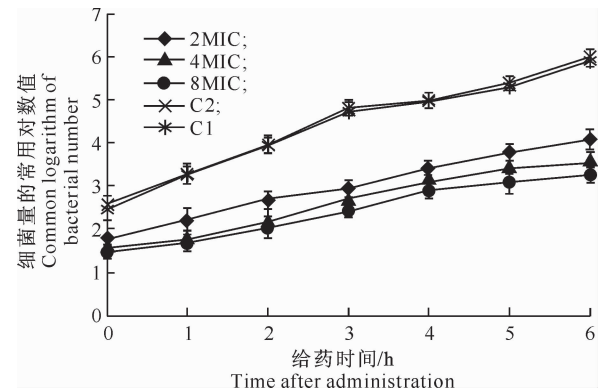


图 1 盐酸沙拉沙星作用 1 h 除去药物后嗜水气单胞菌的生长情况

Fig. 1 Regrowth circumstance of *Aeromonas hydrophila* when drug was cleaned after Sarafloxacin contacted with bacteria for 1 h

2.1.2 MPC、MSW 的测定 盐酸沙拉沙星对嗜水气单胞菌(AH10)的 MPC 为 2.5 $\mu\text{g/mL}$,MSW 为 0.5~2.5 $\mu\text{g/mL}$,表明当盐酸沙拉沙星药物质量浓度为 0.5~2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时会产生耐药突变菌株,只有当药物浓度高于 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,才能抑制突变菌株的出现,达到完全杀菌的效果。

2.2 盐酸沙拉沙星在鲫鱼体内的药代动力学

2.2.1 盐酸沙拉沙星标准工作曲线 以盐酸沙拉沙星标准工作液的质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标(x),以其 HPLC 峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,结果如图 2 所示。

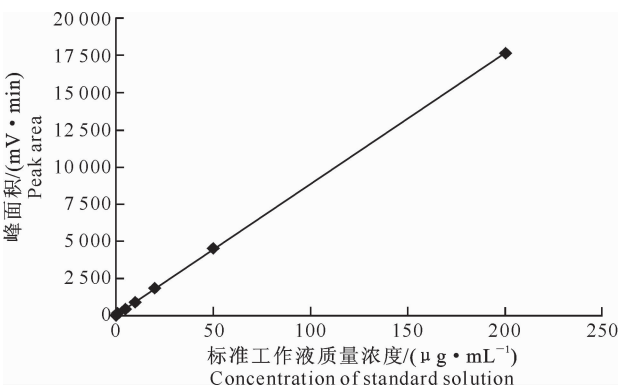


图 2 盐酸沙拉沙星的标准工作曲线

Fig. 2 Standard curve of Sarafloxacin in HPLC assay

由图 2 可知,盐酸沙拉沙星的标准工作曲线方程为 $y = 88.026x + 24.038 (r = 0.9999)$,可见在 0.1~200 $\mu\text{g/mL}$,盐酸沙拉沙星的 HPLC 峰面积与其质量浓度呈良好的线性相关,可以满足定量分析的需要。

2.2.2 回收率和精密度 盐酸沙拉沙星在血清、肌肉中的平均回收率分别为 85.81%和 82.21%,日内变异系数为 1.39%,日间变异系数为 2.89%,表明该方法的准确度和精密度都能够达到残留分析的要求。

2.2.3 盐酸沙拉沙星在鲫鱼血清中的代谢规律 对鲫鱼灌服 20,30,40 mg/kg 剂量的盐酸沙拉沙星,按各时间点采样后,经 Agilent 1100 高效液相色谱检测仪检测出盐酸沙拉沙星的药物峰时间数据,拟合药-时曲线。结果(图 3)发现,不同灌服剂量下,盐酸沙拉沙星在鲫鱼血清中的含量变化呈先上升后又下降的变化趋势,分别灌服 20,30,40 mg/kg 剂量盐酸沙拉沙星后鲫血清内的药物质量浓度迅速上升,分别在 1,4,1 h 时达到峰值,此时药物质量浓度分别为 1.230,4.124,7.021 $\mu\text{g/mL}$,此后随着用药时间延长药物质量浓度开始下降,48 h 后药物质量浓度低于 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (图 3)。3 个不同用药剂量相比,随着给药剂量的增加,血清中的药物质量浓度也随之增大。

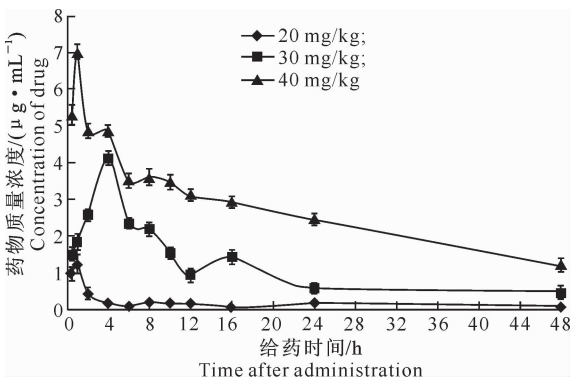


图 3 不同给药剂量下鲫鱼血清中盐酸沙拉沙星的药时曲线

Fig. 3 Change of Sarafloxacin concentration in serum of crucian carp with different doses

2.2.4 盐酸沙拉沙星在鲫鱼血清和肌肉中药代动力学参数的确定 在不同给药剂量下,对盐酸沙拉沙星在鲫鱼血清中的药时数据用 Kinetica 4.4 软件进行房室模型拟合。结果(表 1,表 2)表明,在 3 种灌服剂量下,盐酸沙拉沙星在鲫鱼血清中的药物代谢均属于一级吸收二室模型,而在肌肉中则属于一级吸收一室模型。

表 1 盐酸沙拉沙星在鲫鱼血清和肌肉中的药代动力学方程

Table 1 Pharmacokinetics equations of Sarafloxacin in serum and muscle of crucian carp

剂量/(mg·kg ⁻¹)Dose	组织 Tissue	方程式 Equation
20	血清 Serum	$C=2.116\ 48e^{-1.320\ 93t}+0.140\ 326e^{-0.015\ 240\ 1t}-2.256\ 806e^{-1.030\ 98t}$
30	血清 Serum	$C=8.396\ 14e^{-0.354\ 214t}+0.779\ 282e^{-0.009\ 874\ 2t}-9.175\ 422e^{-0.235\ 561t}$
40	血清 Serum	$C=37.196\ 1e^{-6.990\ 08t}+4.592\ 64e^{-0.030\ 010\ 9t}-41.788\ 74e^{-5.981\ 26t}$
40	肌肉 Muscle	$C=0.423\ 915\ 7e^{-0.016\ 094\ 1t}-0.423\ 915\ 7e^{-5.722\ 7t}$

注:C. 药物含量(μg/mL 或 μg/g);*t*. 给药后时间(h)。
Note:C. Concentration of drug (Unit: μg/mL or μg/g);*t*. Time after administration.

表 2 盐酸沙拉沙星在鲫鱼血清和肌肉中的药代动力学参数

Table 2 PK parameters of Sarafloxacin in serum and muscle of crucian carp

参数 Parameter	S1	S2	M	S3
<i>A</i> /(μg·mL ⁻¹)	2.116	8.396	3.638	37.196
<i>B</i> /(μg·mL ⁻¹)	0.140	0.779	6.930	4.593
<i>α</i> /h	1.321	0.354	12.360	6.990
<i>β</i> /h	0.015	0.010	0.011	0.030
<i>K_a</i> /h	2.296	0.304	5.723	1.714
<i>K_{el}</i> /h	0.209	0.089	0.016	0.264
<i>T</i> _{1/2<i>α</i>} /h	0.525	1.957	0.056	0.099
<i>T</i> _{1/2<i>β</i>} /h	45.482	70.198	65.648	23.097
<i>T</i> _{max} /h	0.503	3.334	2.941	0.742
MRT/h	55.503	78.535	92.784	31.820
<i>C</i> _{max} /(μg·mL ⁻¹)	2.248	3.331	6.858	7.647
AUC ₂₄ /(μg·mL ⁻¹ ·h ⁻¹)	4.22	39.10	142.62	82.48
AUC/(μg·mL ⁻¹ ·h ⁻¹)	6.40	51.67	265.46	124.42
CLs/(L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)	92.510	9.744	1.523	6.315
<i>V_d</i> /(L·kg ⁻¹)	443.103	108.987	94.623	23.930

注:*A*. 分布相零时截距;*B*. 消除相零时截距;*α*. 分布速率常数;*β*. 消除速率常数;*K_a*. 吸收速率常数;*K_{el}*. 药物在中央室的消除速率常数;
*T*_{1/2*α*}. 分布半衰期;*T*_{1/2*β*}. 消除半衰期;*T*_{max}. 达峰时间;MRT. 平均滞留时间;*C*_{max}. 达峰浓度;AUC₂₄. 0~24 h 药时曲线下面积;AUC.
药时曲线下总面积;CLs. 总体清除率;*V_d*. 表观分布容积;S1、S2、S3. 分别为灌服 20,30,40 mg/kg 盐酸沙拉沙星的血清样品;M. 灌服
40 mg/kg 盐酸沙拉沙星的肌肉样品。

Note:*A*. Intercept of the linear equation on log transformed data;*B*. Slope of the linear equation on log transformed data;*α*. Distribution rate
constant;*β*. Elimination rate constant from the central compartment;*K_a*. Absorption rate constant;*K_{el}*. Elimination rate constant from
the central compartment;*T*_{1/2*α*}. Half-life of distribution;*T*_{1/2*β*}. Half-life of elimination;*T*_{max}. Time required to reach *C*_{max} in the inter-
val;MRT. Mean residue time of drug in body;*C*_{max}. Maximum concentration in the interval;AUC₂₄. Area under the drug concentra-
tion-time curve from the time zero to twenty-four;AUC. Area under the drug concentration-time curve from the time zero to last time
point;CLs. Total body clearance;*V_d*. The apparent volume of distribution during the terminal phase;S1,S2,and S3. The serum of cru-
cian carp after administration of Sarafloxacin at 20,30,40 mg/kg body weight, respectively;M. The muscle samples of crucian carp af-
ter administration of Sarafloxacin at 40 mg/kg body weight.

2.2.5 药代/药效动力学联合参数研究 不同灌服剂量的盐酸沙拉沙星在鲫鱼血清中的 PK-PD 联合参数见表 3 和图 4。表 3 显示,按 20,30,40 mg/kg 剂量灌服盐酸沙拉沙星后,鲫鱼体内的 AUC₂₄/MIC 分别为 8.44,78.20,164.96;*C*_{max}/MIC 分别为 4.496,6.662,15.294;图 4 显示,从血药浓度>

MPC 的持续时间来看,20 mg/kg 给药剂量下的时间为 0 h,30 mg/kg 给药剂量下的时间为 4 h,40 mg/kg 给药剂量下可以持续近 24 h。由此可确定最佳的给药剂量为 40 mg/kg,每日给药 1 次,根据治疗效果连续给药 3~5 d。

表 3 PK-PD 联合模型的主要相关参数

Table 3 PK-PD serum parameters

剂量/(mg·kg ⁻¹) Dose	<i>C</i> _{max} /MIC	AUC ₂₄ /MIC	MPC/(μg·kg ⁻¹)	MSW/(μg·kg ⁻¹)
20	4.496	8.44	2.5	0.5~2.5
30	6.662	78.20	2.5	0.5~2.5
40	15.294	164.96	2.5	0.5~2.5

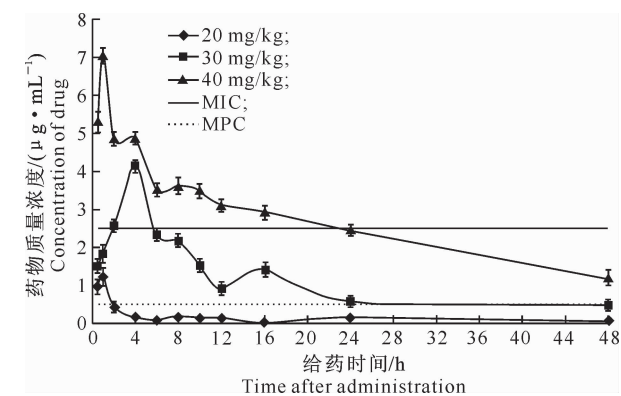


图 4 不同灌服剂量下鲫血清中的盐酸沙拉沙星质量浓度及 MIC、MPC 与 MSW
Fig. 4 Relationship of Sarafloxacin concentration in serum of crucian carp with MIC, MPC and MSW at different doses

2.2.6 鲫休药期的确定 为了确保市场上食用水产品的安全,国家或者国际上通常会制定一些针对水产品中药物最大残留限量(MRL)的检测标准,据此并结合动物对药物的残留消除规律人们可确定药物的休药期。我国暂时还未制定盐酸沙拉沙星在水产上的 MRL 标准,但是根据欧盟(EEC)的规定,鱼肌肉中盐酸沙拉沙星的 MRL 为 30.0 $\mu\text{g/kg}$ 。休药期通常根据药物允许残留量以及药物在食用动物组织中的消除速度来确定,本研究将肌肉组织作为药物残留的检测组织,选取最佳的给药剂量 40 mg/kg 来计算休药期。灌服剂量 40 mg/kg 盐酸沙拉沙星在鲫肌肉中的药时曲线见图 5。

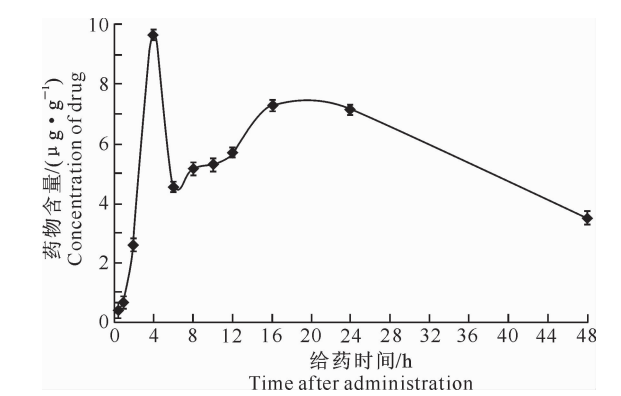


图 5 灌服 40 mg/kg 盐酸沙拉沙星后鲫肌肉的药时曲线
Fig. 5 Change of Sarafloxacin concentration in muscle of crucian carp at 40 mg/kg

由图 5 可知,盐酸沙拉沙星在鲫肌肉内的达峰时间为 4 h,达峰含量为 $(9.67 \pm 0.07) \mu\text{g/g}$ 。根据推算出的药动学方程可知,达到欧盟(EEC)规定的鱼肌肉盐酸沙拉沙星 MRL(30.0 $\mu\text{g/kg}$)所需的时间为 10 d,残留量几乎为 0 的时间为 50 d。据此可

以确定盐酸沙拉沙星在水产上的休药期至少为 10 d。

3 讨 论

嗜水气单胞菌能够感染各种淡水鱼,被感染的鱼表现为慢性皮肤溃疡,严重时可导致鱼患败血症而死亡,给我国鲫养殖业造成了巨大损失^[2]。盐酸沙拉沙星属于喹诺酮类广谱抗菌药,由于其较好的临床应用效果而被广泛应用于水产养殖业^[3]。本实验室从濒死的鲫鱼体内分离得到 1 株典型致病嗜水气单胞菌 AH10^[10],药敏试验显示盐酸沙拉沙星对该致病菌具有很好的抗菌作用,所以本试验通过测定盐酸沙拉沙星对病原菌 AH10 的体外药效学参数,并结合其在鲫体内的药代动力学参数,制定了盐酸沙拉沙星治疗鲫细菌性疾病的防耐药用药方案。

传统的盐酸沙拉沙星给药方案主要依据药物的体外药效学参数 MIC、MBC 以及其体内药代动力学参数^[5-6]来确定,这些将 PK/PD 结合起来得到的参数更多地用于预测临床药物疗效(达到抑制或者杀灭细菌的效果),但是忽视了临床中耐药突变体的产生问题,因为 MIC 的测定使用 $10^4 \sim 10^5$ CFU 细菌,而细菌自发突变的频率仅为 10^{-7} ,因此临床中参照这样的测定参数易造成耐药突变菌株的产生。为了解决这一问题,近年来科学家们提出了 MPC 和 MSW 的新理论,认为只有当药物的质量浓度高于 MIC 的临界值即 MPC 时,才能达到完全杀灭病原菌的效果, MIC 和 MPC 之间的范围即为 MSW, MPC、MSW 为临床上抗生素给药方案的制定提供了新的指导,这使得药物在临床中达到治疗效果的同时又能够抑制耐药突变菌株的选择性富集扩增,从而限制了细菌耐药现象的进一步发展。在新近的研究中,李梦影等^[1]和徐丽娟等^[7]在制定药物给药方案时成功引入了这一新理论,参考上述研究,本试验在制定盐酸沙拉沙星治疗鲫细菌性疾病的用药方案时采用了 MPC、MSW 这一新理论,临床中参考该用药方案就能够在杀灭细菌的同时有效避免耐药菌的出现。

本研究结合以上药效学/药代学联合模型,同时根据徐丽娟等^[7]提出的氟喹诺酮类药物 $\text{AUC}_{24}/\text{MIC} \geq 100$ 或 $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 8$ 的标准^[15-16],综合血药质量浓度在 MPC 以上的时间大于 $(24 - \text{PAE})\text{h}$,以确定临床中盐酸沙拉沙星治疗鲫细菌性疾病的防耐药用药方案。在经口灌服 20, 30 和 40 mg/kg 给药剂量下,参考盐酸沙拉沙星对嗜水气单胞菌 AH10

的体外药效学参数以及不同给药剂量情况下的药时曲线,发现 3 种给药剂量中只有 40 mg/kg 剂量下血药质量浓度保持在 MPC 以上的时间超过 24 h。因此建议盐酸沙拉沙星治疗嗜水气单胞菌 AH10 引起的鲫出血性败血症的最佳给药剂量为 40 mg/kg,给药间隔时间为 1 d。根据其药动学方程可计算出达到欧盟(EEC)规定的鱼肌肉盐酸沙拉沙星残留限量(MRL)为 30.0 $\mu\text{g/kg}$ 所需的时间为 10 d,残留量几乎为 0 的时间为 50 d,所以建议休药期至少为 10 d。

[参考文献]

- [1] 李梦影,徐丽娟,吕利群. 氟苯尼考在鲫和草鱼体内的药代/药效动力学联合参数及其临床给药方案的研究 [J]. 水产学报, 2014, 38(6): 888-895.
Li M Y, Xu L J, Lü L Q. Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their significances in drawing medication regimen [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(6): 888-895. (in Chinese)
- [2] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述 [J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it [J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282-288. (in Chinese)
- [3] 陈玉海,赵凤利,张彦青,等. 铽-沙拉沙星荧光光度法测定沙拉沙星含量 [J]. 分析试验室, 2009, 28(6): 24-26.
Chen Y H, Zhao F L, Zhang Y Q, et al. Determination of Salafloxacin by fluoremetry with terblum-Sarafloxacin system [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2009, 28(6): 24-26. (in Chinese)
- [4] 李艳华,同清波,孙丁岩,等. 兽用喹诺酮类抗菌剂沙拉沙星的研究概况 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001(9): 29-30.
Li Y H, Yan Q B, Sun D Y, et al. Research overview of veterinary quinolone antibacterial agent sarafloxacin [J]. Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2001(9): 29-30. (in Chinese)
- [5] 彭家红,王元,房文红,等. 盐酸沙拉沙星在中华绒螯蟹体内药动学及药效学研究 [J]. 海洋渔业, 2013, 35(3): 331-336.
Peng J H, Wang Y, Fang W H, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Sarafloxacin hydrochloride in *Eriocheir sinensis* [J]. Marine Fisheries, 2013, 35(3): 331-336. (in Chinese)
- [6] 王翔凌,方之平,操继跃,等. 盐酸沙拉沙星在鲫体内的残留及消除规律研究 [J]. 水生生物学报, 2006, 30(2): 198-203.
Wang X L, Fang Z P, Cao J Y, et al. Studies on residue and depletion of Sarafloxacin hydrochloride in goldfish, *Carassius auratus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(2): 198-203. (in Chinese)
- [7] 徐丽娟,权可艳,王浩,等. 恩诺沙星控制嗜水气单胞菌性鲫败血症的耐药用药方案 [J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 1-9.
Xu L J, Quan K Y, Wang H, et al. Medication regimen for prevention of drug resistance using enrofloxacin against *Aeromonas hydrophila* in crucian carp *Carassius auratus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 1-9. (in Chinese)
- [8] Dong Y, Zhao X, Domagala J, et al. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of mycobacterium bovis BCG and *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43: 1756-1758.
- [9] Drlica K. A strategy for fighting antibiotic resistance [J]. ASM News, 2001, 67: 27-33.
- [10] Xu L J, Wang H, Yang X L, et al. Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters-based dosing guidelines of enrofloxacin in grass carp *Ctenopharyngodon idella* to minimize selection of drug resistance [J]. BMC Veterinary Research, 2013, 9: 126-135.
- [11] 戴自英. 临床抗菌药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 6-8.
Dai Z Y. Clinical pharmacology of antimicrobial [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1985: 6-8. (in Chinese)
- [12] 刘远飞. 氟喹诺酮类抗菌药后效应及其机制的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002.
Liu Y F. Studies on the post-antibiotic effects of fluoroquinolones and mechanism [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2002. (in Chinese)
- [13] 崔俊昌,刘又宁,王睿,等. 左氧氟沙星药代动力学/药效动力学参数与金黄色葡萄球菌耐药的相关性研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(9): 989-992.
Cui J C, Liu Y N, Wang R, et al. Correlation of levofloxacin pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters with selection of *Staphylococcus aureus* resistance [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2007, 12(9): 989-992. (in Chinese)
- [14] 邱银生,操继跃,王大菊,等. 盐酸沙拉沙星在肉鸡组织中的残留 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21(5): 515-518.
Qiu Y S, Cao J Y, Wang D J, et al. Tissue residues of Sarafloxacin hydrochloride in broiler chickens [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2001, 21(5): 515-518. (in Chinese)
- [15] Samuelsen O B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review [J]. Aquaculture, 2006, 255: 55-75.
- [16] Shi J. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics in antibacterial drug development and pharmacotherapy [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2007, 12(10): 1099-1113.