

抗菌药物联合应用对 霉形体的药效学研究*

翁碧芬

陈杖榴

(泉州市农业局)

(华南农业大学, 广州 510642)

摘要 本研究采用试管肉汤稀释法和棋盘法测定了17种抗菌药物单独或几种药联合对鸡败血霉形体 S₆ 株 (MGS₆) 的最低抑菌和最低杀菌浓度。结果表明, MGS₆ 对北里霉素、四环素、红霉素、氟哌酸等高度敏感; 四环素类与 TMP 联合呈现协同作用。对实验性感染 MGS₆ 的病鸡进行联合用药治疗试验, 初步筛选出几个有良好治疗作用的联合用药配方。本研究是对联合应用抗菌药物治疗实验性鸡败血霉形体病进行的初步探讨, 对防治本病具有一定的理论与实践意义。

关键词 鸡败血霉形体, 抗菌药, 联合用药, 最低抑菌浓度

鸡败血霉形体病又称慢性呼吸道病 (CRD) 是由禽败血霉形体 (*Mycoplasma gallisepticum*, MG) 引起的一种呼吸道传染病。该病在世界范围内流行, 是养禽业面临的及造成经济损失最大的疾病之一^[1,2]。因此, 防治 CRD 是当前养禽业迫切需要解决的问题。由于尚无切实可行的预防办法, 目前常以抗菌药作为防治 CRD 的主要措施。但是, 抗菌药长期使用或使用不合理易产生耐药性; 同时, 在鸡群中 MG 常与其他病原菌尤其是大肠杆菌合并感染^[3,4], 耐药菌株和合并感染常造成应用单一抗菌药疗效不佳或使治疗失败。

兽医临床上为了取得更好的防治疾病效果, 联合应用抗菌药物的现象日渐增多, 养鸡场应用两种或两种以上抗菌药防治 CRD 也越来越多, 但是对如何合理联合用药防治 CRD 的研究却很少, 所以其中不乏盲目混合使用几种抗菌药物的现象。这不仅造成药物和人力物力的巨大浪费, 而且可加快耐药菌株的出现。因此, 联合应用抗菌药物防治 CRD 的研究对指导合理用药有着重要的理论和实际意义。

为了弄清常用抗菌药对 CRD 的防治作用, 为兽医临床提供合理联合用药的理论和实验依据, 并给养禽业提供一些疗效好、价廉易得的国产药物配方, 本研究进行了抗菌药单独或联合应用对 MG 的体外抑菌试验和实验性感染 MGS₆ 疾病模型的治疗试验。

1 材料和方法

1.1 体外抑菌试验

1.1.1 培养基: 霉形体培养基为 FM-4改良培养基, 参考 Frey 等 (1968)的方法配制^[5]。

*高等学校博士学科点专项科研基金资助项目。

**本研究承蒙冯洪辉教授的帮助和指导, 谨致谢意。

***收稿日期 1994-6-28。

1.1.2 菌种及菌液制备：MGS₉冻干菌（批号8903），由哈尔滨兽医研究所提供。制备菌液时，接种于液体培养基培养，测定其颜色变化单位（ccu），置-20℃冰箱保存备用。

1.1.3 抗菌药：除麦迪霉素的日本产品外，其他均为国产原料药，由广州白云山兽药厂和华南农业大学饲料添加剂厂提供（药物种类见表1）。

1.1.4 抗菌药对 MGS₉ 的最低抑菌浓度（MIC）和最低杀菌浓度（MBC）测定：采用试管肉汤3/2倍稀释法将原药液稀释至20~25管，然后每管加入浓度为 10^{4-5} ccu/ml的菌液，37℃培养，每次重复三个样品，并设培养物、培养基和抗菌药三种对照。按常规制定 MIC 和 MBC 值。以上试验重复4次，取平均值。

1.1.5 四环素、金霉素、土霉素和氯霉素与 TMP 联合对 MGS₉ 的 MIC 和 MBC 测定：各药与 TMP 以5:1比例混合后进行稀释，其余方法同上。

1.1.6 四环素、金霉素、土霉素与氯霉素联合对 MGS₉ 的药敏试验：将4种抗生素原药液用 pH 4.5的磷酸盐缓冲液（PBS）稀释，然后按戴自英（1985）介绍的棋盘法进行试验^[6]。

1.2 鸡实验性感染 MGS₉ 的治疗试验

1.2.1 动物及分组：本地石歧杂鸡354只，分三批进行试验（即试验 I、II、III），鸡的日龄分别是25、29、25 d。每批鸡均采用随机分组，每组20~25只，编号、称重后饲养观察5~7 d，无异常表现并经抗体检测（抗原及抗体血清由哈尔滨兽研所提供）均为阴性或轻微凝集反应（“+”以下）时，进行人工感染 MGS₉。鸡的分组见表3。

1.2.2 鸡 CRD 疾病模型的复制：

1.2.2.1 病原和接种：利用(1.1.2)所制备的浓度为 $10^8 \sim 10^9$ ccu/ml 的新鲜菌液，接种量为1.5~2.0ml，接种部位为左右胸气囊。

1.2.2.2 疾病模型指征：（1）临床症状：精神不振、咳嗽、啰音、打喷嚏、张口呼吸、流鼻涕等；（2）血中抗体水平：采用“全血平板凝集反应”方法测定；（3）病理剖检气囊变化情况；（4）平均增重；（5）死亡率。

1.2.3 给药方案：当感染鸡明显出现上述疾病指征时，开始投药。药物按所定剂量、体重准确称取，装入空胶囊中投服，每天1次，连续4 d。第一、二批试验以北里霉素作药物对照，第三批对照药物为硫氰酸红霉素。

1.2.4 药效观察：观察记录发病鸡的临床症状及各项指征，计算出每只鸡的平均增重、抗体反应阳性率、死亡率；每组抽检5只作病理剖检，统计气囊病变率。

2 结果

2.1 体外抑菌试验结果

2.1.1 17种抗菌药及其中几种与 TMP 联合对 MGS₉ 的抑菌试验结果，见表1。

2.1.2 金霉素、四环素、土霉素与氯霉素联合对 MGS₉ 的棋盘法抑菌试验结果，见表2。

2.2 鸡实验性感染 MGS₉ 治疗试验结果

2.2.1 临床症状：三批试验中，投药后第3 d即可见给药组比感染对照组的临床症状有不同程度的减轻，到试验结束时（试验 I、II 24 d，试验 III 13 d）则明显减轻或消失。

2.2.2 给药前后疾病模型指征变化，见表3。

表1 抗菌药物对 MGS₆ 的 MIC 和 MBC

Table 1 MIC and MBC of antibiotics and sulfonamides against MGS₆ (n=4)

药 物 Drug	MIC (M±SD) (μg/ml)	MBC(M±SD) (μg/ml)
强力霉素 Doxycycline	0.063±0.008	0.092±0.013
四环素 Tetracycline	0.038±0.004	0.092±0.007
金霉素 Chlortetracycline	0.081±0.015	1.230±0.164
土霉素 Oxytetracycline	0.087±0.007	0.238±0.062
北里霉素 Kitasamycin	0.016±0.002	0.090±0.017
红霉素 Erythromycin	0.022±0.004	0.038±0.002
麦迪霉素 Medemycin	0.072±0.006	0.107±0.038
链霉素 Streptomycin	2.028±0.243	5.305±0.920
庆大霉素 Gentamicin	9.877±0.000	22.223±0.000
洁霉素 Lincomycin	2.764±0.188	6.859±0.549
氯霉素 Chloramphenicol	0.939±0.174	1.859±0.315
氟哌酸 Norfloxacin	0.174±0.016	0.185±0.020
SM2 Sulfamethazine	568.889±0.000	>1280
SMD Sulfamethoxydiazine	853.333±0.000	>1280
SMZ Sulfamethoxazole	>1280	
SD Sulfadiazine	>1280	
TMP Trimethoprim	666.667±0.000	>666.667
四环素+TMP Tetracycline+TMP	0.029±0.005	0.075±0.010
金霉素+TMP Chlortetracycline+TMP	0.071±0.010	0.984±0.101
土霉素+TMP Oxytetracycline+TMP	0.056±0.009	0.157±0.019
氯霉素+TMP Chloramphenicol+TMP	1.143±0.092	1.875±0.275

表2 MGS₆ 对四环素类与氯霉素联合应用的棋盘法敏感试验

Table 2 Sensitivity tests of tetracyclines combined with chloramphenicol against MGS₆ by checkerboard method

药物与浓度 Drug & concentration (μg/ml)	金 霉 素 Chlortetracycline					土 霉 素 Oxytetracycline					四 环 素 Tetracycline					氯霉素 单药对照 Chloramphenicol control	
	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	0.2	0.1	0.05	0.025	0.013		
氯霉素 Chloramphenicol	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
	0.25	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
四环素 类单药对照 Tetracyclines control		-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	培养物对照 Negative control

注: -表示不生长, No growth. +表示生长 Growth.

表 3 抗菌药物联合应用对实验性鸡 CRD 的疗效
Table 3 Efficacies of antibacterial combinations on treating experimental CRD in chickens

分 组 Group	动物数 No. of animals	剂量 Dosage (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)	观察指标 Index of disease			
			平均增重 Aver. wt. gain (kg)	抗体阳性率 Rate of antibody	死亡率 Mortality (%)	气囊病变率 Lesion rate of air sac
健康对照 Health control	19	0	0.433± 0.095	1/18	5.26	0/5
空白对照 Negative control	20	0	0.261± 0.061	15/15	25	5/5
药物对照 (北里霉素) Positive control (Kitasamy.)	20	50	0.303± 0.054*	14/19	5.0	2/5
四环素 + TMP Tetracycline + TMP	17	50	0.344± 0.122*	10/15	11.76	1/5
土霉素 + 红霉素 Oxytetracy. + Erythromy.	19	50	0.290± 0.108	11/18	5.26	2/5
金霉素 + 氯霉素 Chlortetracy. + Chloramphen.	19	50	0.340± 0.089*	11/18	0	1/5
健康对照 Health control	17	0	0.451± 0.069	0/17	0	0/5
空白对照 Negative control	21	0	0.301± 0.099	16/17	19.5	4/5
药物对照 (北里霉素) Positive control (Kitasamy.)	20	100	0.399± 0.091*	10/18	10	1/5
金霉素 + 呋喃唑酮 Chlortetracy. + Furazolidone	18	100	0.399± 0.089*	9/17	5.56	0/5
金霉素 + 氯霉素 Chlortetracy. + Chloramphen.	19	100	0.385± 0.097*	8/19	0	0/5
金霉素 + 氯霉素 + TMP Chlortetracy + Chloramphen + TMP	20	100	0.440± 0.049*	9/20	0	0/5
健康对照 Health control	16	0	0.257 + 0.075	3/16	0	2/16
空白对照 Negative control	16	0	0.085± 0.029	11/11	31.25	11/11
药物对照 (红霉素) Positive control (Erythromy.)	19	80	0.158± 0.078*	11/16	15.79	8/16

续表3 Continue Table 3

分 组 Group	动物数 No. of animals	剂量 Dosage (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)	观察指标 Index of disease			
			平均增重 Aver. wt. gain (kg)	抗体阳性率 Rate of antibody	死亡率 Mortality (%)	气囊病变率 Lesion rate of air sac
金霉素 Chlortetracycline	18	80	0.161± 0.046*	9/15	16.67	7/16
Ⅲ 金霉素 + 氯霉素 Chlortetracy. + Chloramphen.	17	80	0.167± 0.049*	9/16	5.88	5/16
金霉素 + 氯霉素 + TMP Chlortetracy + Chloramphen + TMP	17	80	0.215± 0.072*	7/16	5.88	5/17
氟哌酸 Norfloxacin	21	10	0.184± 0.050*	12/17	19.05	7/17
氟哌酸 + TMP Norfloxacin + TMP	19	10	0.242± 0.094*	10/17	10.53	4/17

注: * 与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。Significant difference of comparison with negative control ($P < 0.05$).

* 与药物对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。Very significant difference of comparison with negative control ($P < 0.01$).

3 讨 论

3.1 MGS₀ 对抗菌药的敏感性 本试验测定的 MIC 和 MBC 结果表明, MGS₀ 对北里霉素、红霉素、四环素、强力霉素、麦迪霉素、金霉素、土霉素和氟哌酸 较为敏感 (MIC 为 0.012~0.127 μg/ml); 对氯霉素、链霉素、洁霉素次之; 对磺胺类耐药 (MIC > 568.9 μg/ml)。这与 Whither 等 (1984)、周翠堤 (1986) 报道的试验结果基本一致; 与王凤岚等 (1983)、张敬仁 (1990) 报道的有一定差异^[7-10]。引起差异的原因很多, 不仅与试验方法、培养基成分和 pH、接种物浓度、培养条件和观察结果时间、确定标准等有很大关系, 而且与菌株也有密切关系。据报道, 模式菌株 (标准株) 与分离株对抗菌药的敏感性或抵抗力差异极大^[3-10]。Senterfit (1983) 认为, 接种物浓度为 10⁴ ccu/ml 左右时, 则试验结果重复性较好, 此浓度与机体内的霉形体含量接近, 试验结果比较符合临床实际^[11]。

3.2 抗菌药联合应用对 MGS₀ 的体外抑菌作用 根据棋盘法抑菌试验结果, 按部分抑菌浓度指数 (FIC 指数) 计算公式得出四环素、金霉素、土霉素分别与氯霉素联合抑菌试验的指数均为 1.0, 表明联合用药有相加作用; 另外, 四环素、金霉素、土霉素与 TMP 合用则呈现协同作用, 两药按 5:1 比例联合, 其 MIC 或 MBC 显著或极显著低于单独用药时的 MIC 和 MBC ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 但氯霉素与 TMP 联合表现为无关作用。以上结果与两种抑菌性药物联合应用大多数有相加作用及 TMP 对多种抗生素有增强作用的理论是一致的。

3.3 抗菌药联合应用对实验性 CRD 疗效的评价 从三批治疗试验的结果 (表 3) 可看出, 大多数联合用药的疗效优于或相当于目前用于治疗 CRD 有较好效果的对照药物北里霉素或

红霉素，其中金霉素+氯霉素+TMP 和氟哌酸+TMP 两个配方的疗效最好，它们与对应的金霉素+氯霉素及氟哌酸比较，平均增重效果存在显著差异 ($P < 0.05$)，死亡率也明显降低，这个结果表明 TMP 对金霉素+氯霉素和氟哌酸在体内有增效作用，前者已有不少研究报告^[12]，但 TMP 能增强氟哌酸的作用尚未见文献报道，本研究试验例数有限，仅是初步结果，尚须作进一步广泛试验加以验证。

金霉素与呋喃唑酮、氯霉素联合应用也表现较好疗效，它们的作用优于或相当于北里霉素和红霉素，可能与试验鸡有继发感染大肠杆菌有关，因为呋喃唑酮、氯霉素对大肠杆菌有较强的作用。

在本试验中，虽然上述配方和给药方案对 CRD 有较好的疗效，但由于 CRD 是慢性传染病，也是条件性疾病，常可因并发感染或应激因素而使本病复杂多变，故对给药剂量和疗程等应根据实际情况加以调整。今后，对联合应用抗菌药物防治 CRD 还应进行更深入的研究，以求更好发挥药物的协同作用。

参 考 文 献

- [1] Blaxland J D et al. Avian Mycoplasmas. In: Poultry Diseases. Gordon, R. F.; Jordan, F. T. W. eds. Bailliere Tindall: London. 1982, 62~65.
- [2] Yoder U W. Mycoplasma gallisepticum Infection. In: Diseases of Poultry. Thed. Hofstad, M. S.; et al. eds, Iowa State Univ. Press, Ames La., 1984, 236~249.
- [3] Lin M T. *In vitro* comparison of the activity of various antibiotics and drugs against new Taiwan isolates and standard strains of avian mycoplasma. Avian Dis, 1987, 37:705~712.
- [4] Gross W B. Factors affecting the development of respiratory complex in chickens. Avian Dis, 1990, 34(3):607~610.
- [5] Frey M F et al. A medium for the isolation of avian mycoplasma, Am J Vet Res, 1968, 29(1): 2163~2171.
- [6] 戴自英主编. 临床抗菌药理学. 北京: 人民卫生出版社, 1985, 6~22, 345.
- [7] Whithear K G et al. Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure of fermentative avian mycoplasma to antibiotics. Avian Dis, 1983, 27(4):937~949.
- [8] 周翠堤. 动物致病性霉形体 (Mycoplasma) 对抗菌药物的敏感性. 上海农业学报, 1986, 2(1):1~8.
- [9] 王凤岚, 孙小芝. 几种抗生素治疗鸡败血霉形体病的试验. 兽医科技杂志, 1983, (12):17~20.
- [10] 张敬仁. 禽霉形体对抗生素敏感性的研究. 中国兽医杂志, 1990, 16(4):4~7.
- [11] Senterfit L B. Antibiotics sensitivity testing of mycoplasmas In: Methods in mycoplasmaology. Vol. II, Tully, J. G.; Razin, S., eds. New York: Academic Press, 1983, 398~401.
- [12] 北京医学院附属第一医院抗菌素研究室. 增效剂甲氧苄氨嘧啶 (TMP) 对抗菌药物增效作用的实验研究. 中华医学杂志, 1972, 1:50~54.

PHARMACODYNAMIC STUDIES OF THE COMBINATIONS
OF ANTIBACTERIAL AGENTS AGAINST
MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

Weng Bifen, Chen Zhangliu

(*South China Agricultural University*)

Abstract

The minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) of 17 antibiotics and sulfonamides alone and combinations of tetracyclines, chloramphenicol with TMP against *Mycoplasma gallisepticum* S₆ (MGS₆) were determined by broth dilution method. The results show that MGS₆ was highly susceptible to kitasamycin, erythromycin, tetracyclines and norfloxacin, and that combinations of tetracyclines with TMP manifested a synergistic effect. Some formulas of antibacterial combinations were used to treat the experimental infection with MGS₆ in chickens. Most of these formulas displayed the synergistic effects against MGS₆ in chickens. The combinations of antibacterial agents against MGS₆ were evaluated in the present report.

Key words *Mycoplasma gallisepticum*, Antibacterial, Combination, Minimal concentration