

喹赛多对家禽常见病原菌的体外抗菌活性研究

黄玲利, 袁宗辉, 范盛先, 刘登才, 陈 品, 王大菊

(华中农业大学 兽药研究所, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用试管二倍稀释法测定喹赛多对家禽6种13株常见病原菌的体外抑菌活性。结果表明: 喹赛多对家禽革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有较强的抑制作用, 对鸡大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌抑菌活性最明显, 其最小抑菌浓度(MIC)分别为0.62、1.25和0.62 $\mu\text{g/mL}$ 。该药对大肠杆菌还表现出杀菌活性, 最小杀菌浓度(MBC) $\geq 80 \mu\text{g/mL}$ 。喹赛多抗菌活性与喹乙醇相近, 强于磺胺二甲嘧啶, 比盐酸金霉素略差。这些结果表明, 喹赛多是一种活性较强的抑菌剂, 可推荐用作家禽常见病原菌感染的预防药物。

关键词: 喹赛多; 抑菌活性; 家禽; 试管二倍稀释法

中图分类号: S816.73

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)02-0081-03

喹恶啉是一类合成的动物专用抗病促生长药物添加剂。国内广泛使用的品种有喹乙醇和痢菌净。卡巴多在一定范围内非法使用。但这些老的品种对畜禽均有较强的毒副作用, 在动物可食性组织中的残留影响食品安全, 国际上已限制或禁止它们的使用^[1]。喹赛多是喹恶啉的一个新品种, 不论是对动物的一般毒性, 还是特殊毒性, 喹赛多均比其同类药物要好^[2~3], 还具有明显的促进生长和提高饲料转化率的作用, 残留也容易控制^[4]。华中农业大学兽药研究所采用化学合成方法研制出该药。本文选用喹乙醇、金霉素和磺胺二甲嘧啶作为对照药, 研究喹赛多对家禽常见病原菌的体外抑菌活性, 为临床正确使用喹赛多提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

喹赛多: 华中农业大学兽药研究所合成, 质量分数大于99.5%, 批号970501。喹乙醇: 湖北中牧安达药业有限公司产品, 质量分数98%, 批号970612。磺胺二甲嘧啶: 湖北省三梅集团制药公司产品, 质量分数100%, 批号980213。盐酸金霉素: 福州抗生素厂产品, 质量分数95%, 批号9705224。

氯化钠、浓盐酸、氢氧化钠、蛋白胨、琼脂粉、牛肉浸膏、小牛血清等, 均为分析纯或生化试剂。

1.2 菌种与菌液制备

鸡大肠杆菌(C84010)、鸡沙门氏菌(C79-6)、鸡巴氏杆菌(X-73)、鸭多杀性巴氏杆菌(C48-57), 均购自中国兽医药品监察所。鸡大肠杆菌O₁、O₂、O₇₈和O₁₃₇株及鸭疫里氏杆菌RA-Ym株, 由华中农业大学动物

科学院微生物室提供。自湖北武汉黄陂鸡场患病肉鸡体内分离大肠杆菌1株, 记为X₁; 自湖北患病七彩山鸡体内分离大肠杆菌1株, 记为X₂; 自武汉正大养鸡场及某养殖户患病鸡体内分离金黄色葡萄球菌各1株, 记为Y₁和Y₂。

取冻干菌种, 按冻干菌种恢复培养方法^[5]使菌种复苏, 将复苏菌种接种在适宜的固体培养基上, 37℃培养20 h。大肠杆菌、沙门氏菌采用普通营养琼脂培养基, 巴氏杆菌采用马丁氏培养基, 金黄色葡萄球菌、鸭疫里氏杆菌采用巧克力琼脂培养基, 其中鸭疫里氏杆菌采用厌氧培养。冻干菌种经斜面传代培养2代后, 临用前用少量灭菌生理盐水将培养物洗下, 置4℃冰箱保存, 即为原菌液。采用平皿表面计数法确定原菌液浓度, 再用灭菌生理盐水稀释至 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的菌液备用。

1.3 供试药液与培养基配制

精确称取 $w=99.5\%$ 喹赛多100.5 mg, 用二甲亚砷溶解并定溶至100 mL, 配成1 000 $\mu\text{g/mL}$ 原液。精确称取 $w=98\%$ 喹乙醇102.4 mg, 用灭菌双蒸水溶解并定溶至100 mL, 配成1 000 $\mu\text{g/mL}$ 原液。精确称取 $w=100\%$ 的磺胺二甲嘧啶100 mg, 加少量0.08 g/mL氢氧化钠溶液溶解, 再用灭菌双蒸水定溶至100 mL, 配成1 000 $\mu\text{g/mL}$ 原液。精确称取 $w=95\%$ 盐酸金霉素105.3 mg, 用灭菌双蒸水溶解并定容至100 mL, 配成1 000 $\mu\text{g/mL}$ 原液。各药物原液置4℃保存备用, 临用时用灭菌双蒸水稀释至工作浓度。

普通琼脂、肉汤培养基, 马丁氏肉汤、琼脂培养基及巧克力琼脂培养基均参照文献^[6]方法制备。

1.4 试验方法

最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)用试

收稿日期: 2002-09-30

作者简介: 黄玲利(1976-), 女, 博士研究生。通讯作者: 袁宗辉(1958-), 男, 教授, 博士。

基金项目: “九五”国家重点科技攻关计划资助项目(96-009-02-04-05)

管二倍稀释法测定^[7].参考文献[8],将喹赛多与对照药物待测质量浓度设为160.00、80.00、40.00、20.00、10.00、5.00、2.50、1.25、0.62、0.31、0.16 $\mu\text{g/mL}$.每质量浓度设3个重复.喹赛多另设二甲亚砷溶剂对照.

取5组灭菌小试管,各加入适宜灭菌液体培养基1 mL.在无菌条件下吸取待测药液(320 $\mu\text{g/mL}$)1 mL加入各组第一管中,混匀.从第一管吸取1 mL加入第二管,如此倍比稀释至倒数第二管.倒数第二管弃去1 mL.最后一管作为对照管,只加菌液不加药物.各管分别加入 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 新鲜菌液0.1 mL,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,观察各管细菌生长情况.与对照比较,以目测法找出始变澄清的第一管,该管中所含药物浓度,即为MIC,然后取高浓度液体培养物少量接种于固体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养24 h,以无菌落出

现的最低药物浓度为MBC.每株细菌如此重复3次.

2 结果

喹赛多对大肠杆菌、沙门氏菌和金色葡萄球菌有较强的抑菌活性(表1).其MIC分别为0.62、0.62和1.25 $\mu\text{g/mL}$.对大肠杆菌还表现出杀菌作用,其 $MBC\geq 80.00\text{ }\mu\text{g/mL}$.

喹赛多与喹乙醇相比,抗菌作用基本相似,除个别菌株外,其MIC与MBC值均相同.喹赛多对供试菌作用比磺胺二甲嘧啶强,而比盐酸金霉素差(表2).其MIC是磺胺二甲嘧啶的1/4~1倍,是盐酸金霉素的1~4倍.而其余菌作用效果均不及其他两种对照药物.故喹赛多是一种活性较强的抑菌剂.

表1 喹赛多对13株家禽常见菌的抗菌作用¹⁾
Tab. 1 Antibacterial activity of cyadox against 13 strains of poultry pathogenic bacteria

供试细菌 bacteria	ρ (喹赛多 cyadox)/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)											阴性对照
	160.00	80.00	40.00	20.00	10.00	5.00	2.50	1.25	0.62	0.31	0.16	control
鸡大肠杆菌 C84010 <i>Escherichia coli</i>	---	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
鸡大肠杆菌 O ₁ <i>E. coli</i>	---	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
鸡大肠杆菌 O ₂ <i>E. coli</i>	---	---	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
鸡大肠杆菌 O ₇₈ <i>E. coli</i>	---	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
鸡大肠杆菌 O ₁₃₇ <i>E. coli</i>	---	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
鸡大肠杆菌 X ₁ <i>E. coli</i>	---	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
鸡大肠杆菌 X ₂ <i>E. coli</i>	---	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
鸡沙门氏菌 C79-6 <i>Salmonella</i> spp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
鸡巴氏杆菌 X-73 <i>Pasteurella multocida</i>	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
鸭巴氏杆菌 C48-57 <i>P. multocida</i>	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
鸭里氏杆菌 RA-Ym <i>Listeria</i>	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
鸡金色葡萄球菌 Y ₁ <i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
鸡金色葡萄球菌 Y ₂ <i>S. aureus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+

1)---: 杀菌作用;—: 抑菌作用;+: 细菌生长

表2 喹赛多及对照药对13株家禽常见病原菌的MIC与MBC比较

Tab. 2 The MIC and MBC of cyadox and the control drugs against 13 strains of pathogenic bacteria in poultry								$\mu\text{g/mL}$
菌株 bacteria	喹赛多 cyadox		喹乙醇 olaquinox		盐酸金霉素 aureomycin		磺胺二甲嘧啶 sulfadimidine	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
鸡大肠杆菌 C84010 <i>Escherichia coli</i>	0.62	160	0.62	10	0.31	80	1.25	20
鸡大肠杆菌 O ₁ <i>E. coli</i>	10.00	160	2.50	40	10.00	160	5.00	80
鸡大肠杆菌 O ₂ <i>E. coli</i>	20.00	80	2.50	40	10.00	160	5.00	80
鸡大肠杆菌 O ₇₈ <i>E. coli</i>	5.00	160	5.00	160	10.00	160	10.00	160
鸡大肠杆菌 O ₁₃₇ <i>E. coli</i>	5.00	160	2.50	40	10.00	160	10.00	160
鸡大肠杆菌 X ₁ <i>E. coli</i>	2.50	160	1.25	>160	5.00	160	2.50	40
鸡大肠杆菌 X ₂ <i>E. coli</i>	5.00	160	2.50	40	5.00	80	2.50	80
鸡沙门氏菌 C79-6 <i>Salmonella</i> spp.	0.62	>160	0.62	>160	1.25	160	5.00	160
鸡巴氏杆菌 X-73 <i>Pasteurella multocida</i>	10.00	>160	20.00	>160	5.00	160	10.00	160
鸭巴氏杆菌 C48-57 <i>Pasteurella multocida</i>	10.00	>160	5.00	>160	2.50	160	10.00	>160
鸭里氏杆菌 RA-ym <i>Listeria</i>	20.00	>160	20.00	>160	0.62	160	40.00	>160
鸡金色葡萄球菌 Y ₁ <i>Staphylococcus aureus</i>	1.25	>160	2.50	>160	0.31	80	1.25	40
鸡金色葡萄球菌 Y ₂ <i>S. aureus</i>	1.25	>160	1.25	>160	2.50	>160	10.00	160

3 讨论

疾病是家禽养殖业面临的重大威胁。细菌性感染是导致我国禽发病率和死亡率居高不下的主要因素。虽然市场上有大量抗菌药物销售, 但因长期使用而效果欠佳。喹恶啉类是畜禽生产中广泛应用的一类抗菌促生长药物, 其中喹乙醇历年因其良好的抗菌促生长效果而深受广大养殖户欢迎, 但已有研究证明, 它易造成动物蓄积性中毒, 家禽对其特别敏感, 有关规定已明确指出鸡饲料中应严格限制使用喹乙醇^[1]; 另一种药物卡巴氧因其极强的遗传毒性及致癌性, 早已被禁止用作饲料添加剂^[2-3]。为充分发挥本类药物的促生长效果, 同时保证动物健康, 华中农业大学兽药研究所合成另一新品种喹赛多, 已有资料表明, 喹赛多是一种安全、无毒的药物添加剂^[2-3]。本试验结果表明, 喹赛多对鸡大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌等家禽常见病原菌均有较强的抗菌活性, 其抗菌活性与喹乙醇相近, 比磺胺二甲嘧啶强, 与已有研究结果一致^[8], 故而证明喹赛多是一种较强的抑菌剂, 有望作为一种抗感染药物应用于家禽饲料中。

喹赛多不溶于水, 微溶于二甲亚砷(1:500), 而二甲亚砷本身具有一定抑菌效果。为弄清喹赛多的抑菌效果是否受二甲亚砷影响, 设一溶剂对照组, 即将二甲亚砷纯试剂与喹赛多质量浓度为1 000 μg/mL的二甲亚砷溶液, 按相同倍数稀释以测定其抑菌效

果。结果表明, 二甲亚砷纯试剂稀释至喹赛多质量浓度≥80. 00 μg/mL的相同倍数时无抑菌现象发生, 且在160. 00 μg/mL时也无杀菌现象出现, 而本试验所测MIC均在80. 00 μg/mL以下, 故二甲亚砷对喹赛多的抑菌效果无影响。

参考文献:

[1] 谢 麟. 喹乙醇的安全性毒理学评价与合理应用[J]. 兽医与饲料添加剂, 1999, 4(2): 25—27.

[2] BOJARSKI J, DONKER A A, BAKRI A, et al. Cytogenetic effects of quinoxaline-1, 4-dioxide-type growth-promoting agents[J]. Mutation Research, 1983, 116: 129-135.

[3] SIERENBURG TH J, van LENTHEN H, de GRAAF G J. Photochemical reactions of quinoxin, olaquinox, carbadox and cyadox with protein, indicating photoallergic properties[J]. Toxicology, 1990, 63: 85—95.

[4] ABVVRS M J A, van der MOLEN E J, de GRAAF G J, et al. Clinical signs and performance of pigs treated with different doses of carbadox, cyadox and olaquinox[J]. J Vet Med, 1990, A 37: 68—76.

[5] 中国兽药监察所, 中国微生物菌种保藏管理委员会兽医微生物中心. 中国兽医菌种目录[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 167—171.

[6] 谢正杨, 吴挹芳. 现代微生物培养基和试剂手册[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994. 604.

[7] 徐叔云, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 1 063—1 072.

[8] 范盛先, 袁宗辉, 王大菊, 等. 喹赛多体外抑菌试验[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(1): 51—54.

In vitro Antibacterial Activity of Cyadox on Poultry Bacteria

HUANG Ling-li, YUAN Zong-hui, FAN Sheng-xian, LIU Deng-cai, CHEN Pin, WANG Da-ju
(Institute of Veterinary Phamaceutical, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The *in vitro* antibacterial activity of cyadox on 6 species 13 strains of clinical pathogenic bacteria in poultry was tested by microdilution method. The results showed that cyadox was active both on gram-positiv bacteria and gram-negative bacteria, and more active on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. than the others. The MIC of these was 0.62, 1.25 and 0.62 μg/mL respectively. It showed germicidal action only on *Escherichia coli*, the MBC≥80 μg/mL. The antibacterial activity of cyadox was similar to that of olaquinox, stronger than that of sulfadimidine, and weaker than that of aureomycin. These results indicated that cyadox had strong bacteriostatic activity, and could be used as a drug additive to protect poultry from bacterial infection in the field.

Key words: cyadox; antibacterial activity; poultry; microdilution

【责任编辑 柴 焰】