

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

李梦影, 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: 为研究氟苯尼考在鲫和草鱼体内的药代学、药效动力学联合参数, 并制定氟苯尼考对鲫、草鱼的精确用药方案, 本实验结合氟苯尼考对致病性嗜水气单胞菌 CAAh01 的体外药效学研究, 确定了氟苯尼考防治该致病菌引起的鲫和草鱼细菌性败血症的给药方案。研究结果显示, 氟苯尼考对 CAAh01 菌株的最小抑菌浓度 (MIC) 为 $0.5 \mu\text{g/mL}$, 最小杀菌浓度 (MBC) 为 $1.0 \mu\text{g/mL}$, 防细菌耐药突变浓度 (MPC) 为 $6.0 \mu\text{g/mL}$, 防耐药突变选择窗 (MSW) 为 $0.5 \sim 6.0 \mu\text{g/mL}$ 。按 10、20、30 mg/kg 体质量剂量对鲫、草鱼口灌氟苯尼考后, 在鲫体内, 血药浓度大于 MPC 的维持时间分别为 5、8、24 h; AUC₂₄/MIC 分别为 177.06、265.90、426.50; C_{max} /MIC 分别为 15.59、21.32、31.24。在草鱼体内, 血药浓度大于 MPC 的维持时间分别为 0、0、3 h; AUC₂₄/MIC 分别为 38.60、75.08、121.94; C_{max} /MIC 分别为 4.75、10.08、19.99。研究表明, 综合血药浓度维持 MPC 以上的时间、AUC₂₄/MIC 或 C_{max} /MIC 指标, 氟苯尼考适用于鲫细菌性疾病的防治, 其防突变用药方案为剂量 30 mg/kg, 每日 1 次给药, 休药期不低于 20 d。对于草鱼细菌性疾病的防治, 氟苯尼考不宜连续使用。

关键词: 鲫; 草鱼; 氟苯尼考; 嗜水气单胞菌; 防耐药突变浓度; 药代动力学; 药效动力学

中图分类号: S 943

文献标志码: A

鲫 (*Carassius auratus*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国主要的淡水养殖品种。近年来, 集约化养殖的迅速发展导致环境持续恶化, 细菌性败血症、肠炎症、烂鳃病、赤皮病等细菌性疾病时常发生。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 作为一种主要的致病菌^[1], 极易感染水生动物且致死率较高。目前, 氟苯尼考作为一种较常用的水产抗菌药物, 以其抗菌谱广、分布广泛、吸收迅速等特点, 被广泛应用于大宗淡水鱼类细菌性疾病的治疗。

初期研究表明, 多数水产致病菌对氟苯尼考呈高度敏感^[2-5], 但长期不合理使用导致细菌耐药性增强。为了解决这一难题, Dong 等^[6] 和 Drlica^[7] 提出基于药物的防耐药突变浓度

(mutant prevention concentration, MPC) 和耐药突变选择窗 (mutant selection window, MSW) 的用药方案, 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 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和 MPC 之间的浓度范围。基于 MIC 的传统治疗策略仅阻止了大部分敏感细菌生长, 而新方案提供了一个限制耐药菌株选择性扩增的方法。MPC、MSW 理论的研究不仅弥补传统给药的局限性, 也解决了耐药问题。药物在动物体内的代谢过程和消除规律是临床制定给药方案的重要理论基础, 现已开展氟苯尼考药代学研究的水产动物较多, 如大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)^[8]、中华鳖 (*Trionyx sinensis*)^[9]、罗非鱼

收稿日期: 2013-11-11 修回日期: 2014-03-23

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46-12)

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

(*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*)^[10] 等。Yanong 等^[11] 和司力娜等^[12] 指出受种类、环境条件等因素影响,同一药物在不同动物体内代谢和消除规律有所差别。因此,开展氟苯尼考在不同动物体内的药代学研究,比较其差异并制定给药方案显得尤为重要。

本实验通过测定氟苯尼考对致病性嗜水气单胞菌 CAAh01 菌株^[13] 的体外药效学参数,并结合氟苯尼考在鲫、草鱼体内的药代学规律,制定氟苯尼考控制鲫、草鱼细菌性败血症的防突变用药方案,为制定临床用药方案提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

实验用健康鲫、草鱼,体质量 150 ~ 200 g,购自上海金山养殖场,暂养在实验室 0.4 m × 0.5 m × 1.0 m 的水族箱内,实验水温(22 ± 1) °C。

1.2 材料与仪器

氟苯尼考标准品:纯度 ≥ 99.0%,购于 Sigma 公司;氟苯尼考原料药:纯度 ≥ 98.5%,购于浙江国邦药业有限公司;Muller-Hinton (MH) 培养基:每 1 000 mL 含水解酪蛋白 17.5 g,牛肉粉 5 g,可溶性淀粉 0.15 g,琼脂 15 ~ 20 g,pH 为 7.2。营养琼脂培养基;乙腈(色谱纯)、冰醋酸(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯)、甲醇(色谱纯)、正己烷(分析纯)均购于国药集团化学试剂有限公司。

Agilent 1100 高效液相色谱仪;漩涡振荡器;高速离心机;旋转蒸发仪等。

1.3 实验菌株

嗜水气单胞菌(菌株代号为 CAAh01),由上海海洋大学国家水生动物病原库分离保存。

1.4 氟苯尼考对嗜水气单胞菌体外药效学研究

MIC 和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)的测定 采用试管两倍稀释法^[14],所用菌株 CAAh01 菌悬液浓度为 10⁴ ~ 10⁶ CFU/mL,于 30 °C 恒温摇床培养 24 h,观察无细菌生长的试管的最低药物浓度,即为 MIC。将未见细菌生长的试管继续培养 48 h,并接种琼脂平板,将菌落数不超过 5 个的最小药物浓度确定为 MBC。重复 5 次,取平均数为 MIC 和 MBC 值。

PAE(post antibiotic effect)的测定 参考刘远飞^[15]的方法,设置实验组 T1、T2、T3 分别含 10、20、40MIC 药液 0.2 mL 与 1.8 mL 浓度为 10⁶ ~ 10⁸ CFU/mL 菌液,C1、C2 对照组分别含 0.2 mL 无菌生理盐水与 1.8 mL 相同浓度的菌液,于 30 °C 恒温孵育,使细菌与药物接触 1 ~ 2 h。采用 400 倍除菌法,取上述各实验组药物-细菌混合物及对照管组中的菌液 0.1 mL,分别加至含 1.9 mL 的 MH 肉汤中,混匀后再取 0.1 mL 菌液分别加至另外含 1.9 mL 的 MH 肉汤中重建,并在 C2 对照组中加入一定量氟苯尼考,使其中药物浓度相当于 4MIC 实验组中被稀释 400 倍后的药物浓度,作为残留药物产生 PAE 的对照,各管混匀于 30 °C 恒温孵育,此时为重建后的零时。于重建后 0、1、2、3、4、5、6、7 和 8 h 进行细菌计数,重复 3 次,取平均值。绘制细菌恢复生长曲线,由细菌恢复生长曲线计算 T、C,按公式 PAE = T - C 计算。其中 T、C 分别为实验组与对照组细菌浓度值高于重建后零时 10 倍所需的时间。

1.5 MPC、MSW 的测定

采用琼脂平板法^[16],分别配制浓度为 2、4、6、8、10、12、14、16MIC 的药液。将单个病原菌菌落接种于 MH 肉汤过夜培养后,3 000 r/min 离心后,再接种于 10 倍原液 MH 肉汤中,振荡培养 6 h,离心后将菌液浓度调整为 3 × 10¹⁰ CFU/mL。取 0.1 mL 浓度为 3 × 10¹⁰ CFU/mL 的菌悬液,均匀涂抹在已含有上述稀释倍数的氟苯尼考琼脂平板上,使每个琼脂平板的总接种量为 1.2 × 10¹⁰ CFU,于 30 °C 孵育 72 h,没有菌落生长的最低药物浓度为 MPC。MSW 为耐药突变选择窗,窗的上界为 MPC,下界为 MIC,两者之间的范围为 MSW。重复 5 次,取平均数为 MPC 和 MSW 值。

1.6 氟苯尼考在鲫、草鱼体内的药物动力学研究

给药方式及取样 将鲫、草鱼分别分成 3 组。取配制好的药物,3 组分别按 10、20、30 mg/kg 剂量口灌入鲫、草鱼前肠,无回吐者用于实验。对鲫在给药 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、16、24、48、72、96、120、144、192、240、480、720 h 后自尾静脉取血液、肌肉样品,对草鱼在给药 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、16、24 h 后取血液、肌肉样品。血液样品 4 °C 静置过夜,离心后取血清置离心管中,肌肉组织保存于样品袋中。-20 °C 保

存,各时间点设置5个重复,实验前取空白样品作为对照。

样品前处理 参考马寅^[8]实验方法,血清解冻后取1 mL置于15 mL离心管中,肌肉组织解冻后取1 g剪碎、研磨后置于15 mL离心管中。并各加入4 mL乙酸乙脂,在漩涡混合器上振荡5 min,6 000 r/min高速离心10 min,收集上层乙酸乙酯提取液于另一个15 mL离心管中。同法重复1次,收集2次上清液于50 mL离心管中,45 °C下旋转蒸发至干。再向离心管中加入1 mL流动相、2 mL正己烷,涡旋振荡2 min,溶解残存物,6 000 r/min高速离心10 min,充分静置后,取上清液经0.22 μm有机相一次性针头过滤器过滤后,4 °C保存待测。

色谱条件 用Agilent 1100高效液相色谱仪测定,色谱柱,RP-ODSC₁₈分析柱(150 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相,乙腈:水:冰醋酸=500:985:15(V/V/V);流速,1.5 mL/min;紫外检测器波长:224 nm;柱温,室温;进样量,10 μL。

标准曲线的建立 样品定量采用外标实验法。准确称取0.01 g氟苯尼考标准品,用流动相溶解并用蒸馏水定容于100 mL容量瓶中,此时氟苯尼考浓度为100 μg/mL。将其稀释成20、5、1、0.5、0.05 μg/mL系列浓度的标准工作液,每个浓度取3组平行,经0.22 μm微孔滤膜过滤后,分别进行HPLC检测。以峰面积为纵坐标,药物质量浓度为横坐标,建立标准曲线,并确定相关系数。

回收率和精密度 取氟苯尼考100、10、1 μg/mL标准液各100 μL,分别加入1 mL的鲫、草鱼空白血清,使其理论浓度分别为10、1、0.1 μg/mL,按样品前处理方法处理样品,进行HPLC测定,每个浓度水平重复3次,根据样品的理论浓度和实测浓度计算相对回收率。相对回收率(%) = 样品实测浓度/样品理论浓度 × 100%。将上述处理的样品在1 d内不同时间点重复进样测3次,重复3 d进行测定,以此计算日内平均变异系数和日间平均变异系数,以衡量检测方法的精密度。变异系数(CV,%) = S/X × 100, S为标准偏差, X为平均值。

数据处理 计算得出的数据用Excel管理计算,应用Kinetic 4.4药代动力学软件,拟合动

力学模型,计算相关动力学参数。

2 结果

2.1 氟苯尼考体外药效学研究

氟苯尼考对CAAh01的MIC为0.5 μg/mL, MBC为1.0 μg/mL。

以浓度为1、2、4MIC的氟苯尼考药液,与CAAh01菌悬液接触1 h后,PAE分别为(1.44 ± 0.12)、(1.76 ± 0.11)、(2.32 ± 0.13) h。结果发现,在1~4MIC范围内,随着药物浓度的升高,PAE的时间明显延长,去除药物后,对照组C1与残留药物对照组C2中的细菌生长一致,表明400倍稀释可以去除药物(图1)。

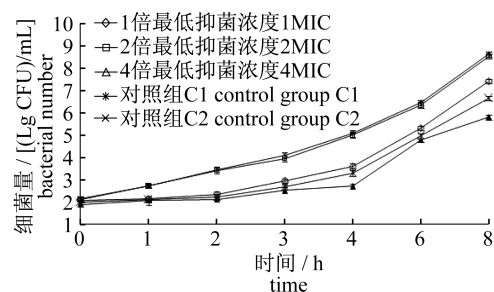


图1 氟苯尼考和CAAh01接触1 h后,去除药物后细菌恢复生长情况

Fig. 1 The regrowth circumstances of CAAh01 when cleaned flufenicol after flufenicol contacting with CAAh01 1 h

2.2 氟苯尼考对CAAh01的MPC、MSW

氟苯尼考对CAAh01的MPC为6.0 μg/mL, MSW的范围为0.5~6.0 μg/mL。表明当氟苯尼考药物浓度在0.5~6.0 μg/mL范围内时,耐药突变菌株被选择性富集扩增,只有高于耐药突变浓度6.0 μg/mL时,才能既抑制耐药菌的产生,又达到较好的杀菌效果。

2.3 氟苯尼考在鲫、草鱼体内药代动力学

氟苯尼考标准工作曲线 以氟苯尼考浓度为横坐标(X),氟苯尼考峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线(图2)。线性回归方程为 $Y = 170.7X + 324.5$ ($r = 0.996$)。可见在0.05~20 μg/mL浓度范围内,氟苯尼考线性关系良好。以引起2倍基线噪音的药量为最低检测限,可知氟苯尼考的定量检测限为0.02 μg/mL。

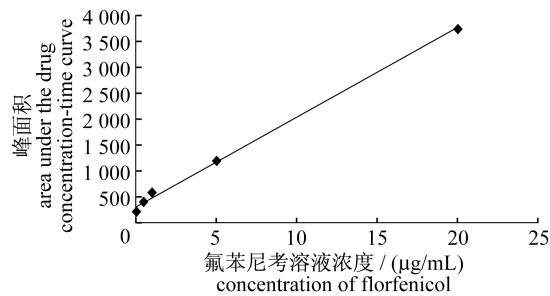


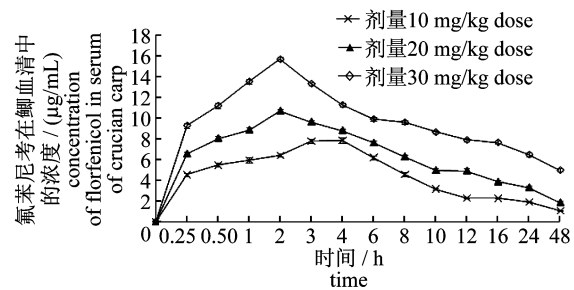
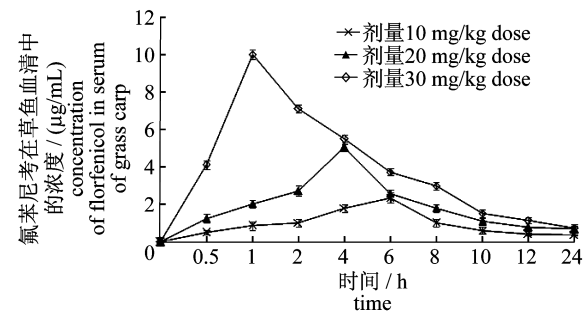
图2 氟苯尼考标准工作曲线

Fig.2 Standard curve of florfenicol in HPLC assay

回收率和精密度 氟苯尼考在鲫血清中的平均回收率为 86.87%, 日内变异系数为 2.62%, 日间变异系数为 3.35%, 氟苯尼考在草鱼血清中的平均回收率为 83.73%, 日内变异系数为 2.68%, 日间变异系数为 2.95%, 结果表明方法的准确度和精密度均较适用于样品的测定。

口服不同剂量氟苯尼考在鲫、草鱼血清中的代谢规律 分别对鲫、草鱼口服 10、20、30 mg/kg 体质量剂量的氟苯尼考后, 按各时间点采样, 经高效液相色谱检测出氟苯尼考的出峰时间数据, 拟合药时曲线, 结果发现, 口服 10、20、30 mg/kg 体质量剂量的氟苯尼考在鲫、草鱼血清中变化的趋势基本一致, 在给药后首先表现为上升趋势, 到达峰值后下降(图 3, 图 4)。随着给药剂量的升高, 药物在血清中的达峰浓度升高, 达峰时间提前。口服 10、20、30 mg/kg 剂量的氟苯尼考, 在鲫体内浓度迅速上升, 第 4、2、2 h 时血药浓度分别达到峰值为 (7.795 ± 0.28) 、 (10.659 ± 0.16) 、 (15.619 ± 0.19) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 此后浓度下降, 48 h 浓度低于 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。氟苯尼考在草鱼体内, 第 6、4、1 h 时血药浓度达到峰值分别为 $(2.375 \pm$

$0.11)$ 、 (5.038 ± 0.26) 、 (9.990 ± 0.19) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 第 24 h 浓度降至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下。

图3 不同给药剂量下鲫血清中的氟苯尼考的药时曲线 ($n=5$)Fig.3 Florfenicol concentration-time curves in serum of crucian carp at different administration doses ($n=5$)图4 不同给药剂量下草鱼血清中的氟苯尼考的药时曲线 ($n=5$)Fig.4 Florfenicol concentration-time curves in serum of grass carp at different administration doses ($n=5$)

口服不同剂量氟苯尼考在鲫、草鱼血清中的药代学参数的确定 将不同给药剂量下, 氟苯尼考在鲫、草鱼血清中药时数据用 Kinetica4.4 软件进行房室模型拟合。结果表明, 在 3 种口服剂量下, 氟苯尼考在鲫、草鱼血清中药物代谢均属于一级吸收二室模型(表 1, 表 2)。

表1 口服不同剂量氟苯尼考在鲫、草鱼血清中的药代学方程

Tab.1 Best concentration-time equations of florfenicol in crucian carp and grass carp serum

物种 species	剂量/(mg/kg) dose	方程式 equation
鲫 <i>Carassius auratus</i>	10	$C = 17.747e^{-0.3313t} + 1.704e^{-0.0075t} - 19.751e^{-0.3187t}$
	20	$C = 9.663e^{-0.2445t} + 5.136e^{-0.0212t} - 5.1365e^{-0.8357t}$
	30	$C = 14.195e^{-0.5204t} + 9.562e^{-0.0148t} - 23.757e^{-1.1110t}$
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	10	$C = 4.367e^{-0.2638t} + 0.116e^{-0.0340t} - 4.484e^{-0.3035t}$
	20	$C = 9.877e^{-0.3629t} + 0.386e^{-0.0595t} - 10.262e^{-0.4341t}$
	30	$C = 9.872e^{-0.2214t} + 0.707e^{-0.0837t} - 10.579e^{-0.6228t}$

注:“C”是氟苯尼考在鲫、草鱼血清中的药物浓度,“t”为时间(h)

Notes:“C”represents the concentration of florfenicol in serum of crucian carp and grass carp,“t”stands for time(h)

表 2 口灌不同剂量氟苯尼考在鲫、草鱼血清中的药动学参数
Tab.2 PK parameters of florfenicol in crucian carp and grass carp serum

参数 parameters	给药剂量/(mg/kg) dose					
	鲫 <i>Carassius auratus</i>			草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>		
	10	20	30	10	20	30
$A/(\mu\text{g/mL})$	17.747	9.663	14.195	4.367	9.877	9.872
α/h	0.331 3	0.244 5	0.520 4	0.263 8	0.362 9	0.221 4
$B/(\mu\text{g/mL})$	1.704	5.136	9.562	0.116	0.386	0.707
β/h	0.007 5	0.021 2	0.014 8	0.034 0	0.059 5	0.083 7
K_{el}/h	0.069	0.053	0.035	0.089	0.111	0.082
K_a/h	0.319	0.836	1.111	0.303	0.434	0.623
$T_{1/2ka}/\text{h}$	2.175	0.829	0.624	2.626	2.261	3.131
$T_{1/2\beta}/\text{h}$	92.108	32.666	46.860	20.104	11.655	8.278
T_{max}/h	4.0	2.0	2.0	6.0	4.0	1.0
$C_{max}/(\mu\text{g/mL})$	7.795	10.659	15.619	2.375	5.038	9.994
$AUC_{24}/[\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})]$	88.526	132.952	213.248	19.302	37.544	60.967
$AUC/[\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})]$	122.638	192.968	349.274	19.302	37.544	60.967
$CLs/[L/(\text{kg}\cdot\text{h})]$	0.036	0.071	0.041	0.433	0.464	0.386
$Vd/(L/\text{kg})$	2.130	2.860	3.081	5.747	5.413	5.909

注:A:分布相零时截距; α :分布速率常数;B:消除相零时截距; β :消除速率常数; K_{el} :药物在中央室的消除速率常数; K_a :吸收速率常数; $T_{1/2ka}$:分布半衰期; $T_{1/2\beta}$:消除半衰期; T_{max} :达峰时间; C_{max} :达峰浓度;AUC₂₄:0~24 h内药时曲线下面积;AUC:药时曲线下总面积;CLs:总体清除率;Vd:表观分布容积

Notes:A:intercept of the linear equation on log transformed data; α :distribution rate constant;B:slope of the linear equation on log transformed data; β :elimination rate constant; K_{el} :elimination rate constant from the central compartment; K_a :absorption rate constant; $T_{1/2ka}$:half-life of absorption from the central compartment; $T_{1/2\beta}$:half-life of elimination; T_{max} :time required to reach C_{max} in the interval; C_{max} :maximum concentration in the interval;AUC₂₄:area under the drug concentration-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;Vd:the apparent volume of distribution during the terminal phase

药代/药效动力学联合参数研究 结果发现,口灌 10、20、30 mg/kg 剂量的氟苯尼考,在鲫体内,AUC₂₄/MIC 分别为 177.06、265.90、426.50; C_{max} /MIC 分别为 15.59、21.32、31.24(表 3);血浆药物浓度大于 MPC 的维持时间分别为 5、8、24 h(图 5)。在草鱼体内,AUC₂₄/MIC 分别为 38.60、75.08、121.94; C_{max} /MIC 分别为 4.75、10.08、19.99(表 3);血浆药物浓度大于 MPC 的维持时间分别为 0、0、3 h(图 6)。

鲫休药期的确定 为保障水产品的食用安全,通常根据国家规定的最大残留限量(maximum residue limit,MRL)标准和动物对药物的残留消除规律来确定休药期。欧盟规定:氟苯尼考在有鳍鱼

类肌肉和皮肤组织及所有动物源性食品肝脏和肾脏组织中的 MRL 分别为 1 000、1 000、2 000 和 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本研究将肌肉组织作为残留检测组织,利用已确定的给药剂量 30 mg/kg 计算休药期。结果发现,氟苯尼考在鲫肌肉中的达峰时间为 6 h,达峰浓度为 $(5.069 \pm 0.15) \mu\text{g}/\text{g}$;在给药第 10、20、30 d,氟苯尼考浓度分别为 (1.030 ± 0.12) 、 (0.643 ± 0.13) 、 $(0.214 \pm 0.17) \mu\text{g}/\text{g}$ (图 7),可知当达到国家规定的氟苯尼考残留限量(MRL)1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,所需时间至少为 20 d,而残留量几乎为 0 的时间至少为 30 d。所以建议的休药期至少为 20 d。

表 3 药物-药效联合模型的主要相关参数
Tab.3 Serum PK-PD indices

物种 species	剂量/(mg/kg) dose	C_{max}/MIC	AUC ₂₄ /MIC	MPC/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	MSW/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$
鲫 <i>Carassius auratus</i>	10	15.59	177.06	6.0	0.5~6.0
	20	21.32	265.90	6.0	0.5~6.0
	30	31.24	426.50	6.0	0.5~6.0
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	10	4.75	38.60	6.0	0.5~6.0
	20	10.08	75.08	6.0	0.5~6.0
	30	19.99	121.94	6.0	0.5~6.0

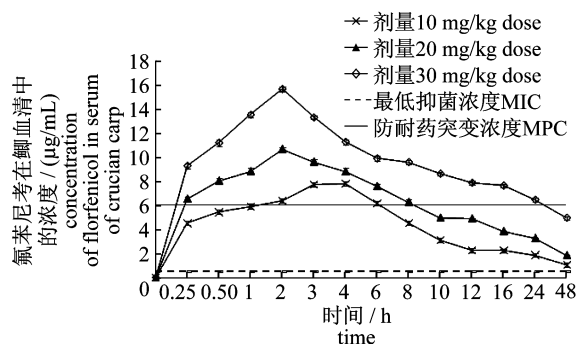


图5 口服不同剂量氟苯尼考在鲫血清中不同时间的药物浓度与 MIC、MPC 及 MSW 的关系图

Fig. 5 Oral different doses of florfenicol in crucian carp serum at different time in drug concentration and MIC, MPC and MSW diagrams

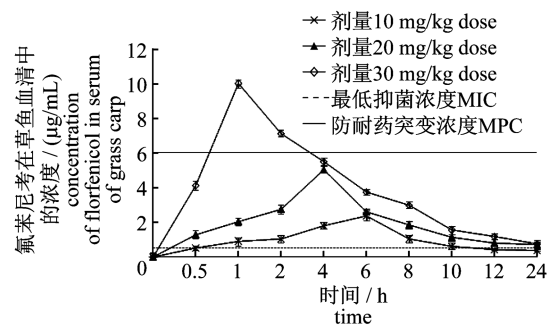


图6 口服不同剂量氟苯尼考在草鱼血清中不同时间的药物浓度与 MIC、MPC 及 MSW 的关系图

Fig. 6 Oral different doses of florfenicol in grass carp serum at different time in drug concentration and MIC, MPC and MSW diagrams

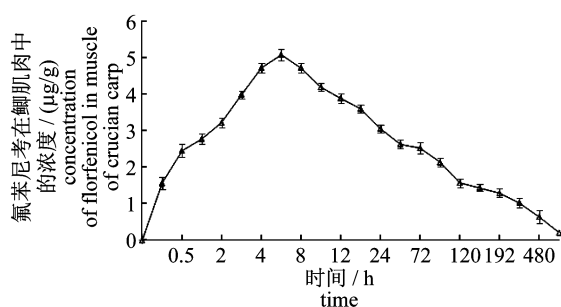


图7 30 mg/kg 口服剂量氟苯尼考在鲫肌肉中的药时曲线

Fig. 7 Concentration-time curve of florfenicol in crucian carp muscle following oral 30 mg/kg dose

3 讨论

本实验开展了氟苯尼考对嗜水气单胞菌的体外药效学及其在鲫、草鱼体内的药代动力学研究。

药效学结果显示,氟苯尼考对嗜水气单胞菌 CAAh01 具有较好的抗菌活性;对 CAAh01 具有较长的 PAE,可适当延长给药间隔。药代动力学特征显示,氟苯尼考在草鱼血清中表现为吸收迅速,消除较快;其在鲫血清中表现为吸收迅速,消除相对缓慢。本研究结果与已有报道^[17-20]结果一致。中华鳖^[9]、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)^[21]、西伯利亚鲟 (*Acipenser baeri*)^[22]、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[23] 等动物体内氟苯尼考消除和代谢规律差异较大,同时受鱼体大小、环境等因素的影响^[11-12],开展特定药物在不同养殖动物体内的药代学研究十分重要。在制定抗菌药给药方案时,需要综合考虑药物的抗菌谱及每种药物在不同动物体内的药代动力学特点,只有当药效/药代学结合使用时,才能达到药物疗效。

传统的药效学/药代学结合参数制定抗菌药给药方案时, AUC_{24}/MIC 、 C_{max}/MIC 和 $T > MIC$ 指标更多地用于预测临床药物疗效^[24],但是并不能考虑到限制耐药突变体的产生,且以 MIC 作为评价细菌敏感性指标,预测抗菌药物抑制细菌耐药性缺乏准确性。近年来提出的 MPC、MSW 理论,弥补了传统药效学/药代学理论没有对浓度在突变选择窗的有效时间加以限定的不足。徐丽娟等^[13,25]应用 MPC、MSW 理论并结合体内药代学参数,建立了恩诺沙星控制鲫细菌性败血症的用药方案。综合血药浓度维持在 MPC 以上的时间超过 (24-PAE)h、 AUC_{24}/MIC 或 C_{max}/MIC 指标,确定给药剂量及给药间隔,通过肌肉中氟苯尼考的浓度达到国家限定标准时间确定休药期,为优化临床给药方案,限制耐药突变体选择性富增提供了新思路。

本研究基于以上的药效学/药代学联合模型,根据王瑞雪等^[22]指出的 $AUC_{24}/MIC > 125$ 或 $C_{max}/MIC > 8 \sim 10$ 标准,综合血药浓度维持 MPC 以上的时间超过 (24-PAE)h^[13],确定防耐药用药方案。结果发现,由于氟苯尼考在草鱼体内代谢较快,虽然口服 20、30 mg/kg 剂量的氟苯尼考可以治疗草鱼细菌性败血症,但血药浓度维持在 MPC 以上的时间较短,不能预防耐药突变体的产生,长期使用必然导致细菌耐药性增强。对鲫口服 10、20、30 mg/kg 体质量剂量的氟苯尼考,均达到 $AUC_{24}/MIC > 125$ 或 $C_{max}/MIC > 8 \sim 10$ 的要求,在 30 mg/kg 体质量剂量下血药浓度 $> MPC$ 发挥抗菌疗效的时间可达到 24 h 以上,由此可确定最佳的

给药剂量 30 mg/kg,且浓度依赖性药物适宜每日 1 次给药^[26],由此可知,氟苯尼考控制鲫细菌性败血症的用药方案为剂量 30 mg/kg,每日 1 次给药,休药期不低于 20 d。由于每种抗菌药对不同的致病菌株 MPC、MSW 差异较大^[27-28],临床用药可以通过选择更理想的药物(低 MPC、窄 MSW)调整剂量方案,同时结合药物在动物体内药代学规律,科学制定抗菌药给药方案。药代/药效学联合模型的研究,为制定更广泛、合理的渔用抗菌药防耐药用药方案提供了理论参考。

参考文献:

- [1] Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by IT[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282 - 288. [陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992, 16(3): 282 - 288.]
- [2] Xy L W, Liao C R, Liu G F. Security about florfenicol used in aquaculture[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(4): 512 - 518. [徐力文, 廖昌容, 刘广锋. 氟苯尼考用于水产养殖的安全性. 中国水产科学, 2005, 12(4): 512 - 518.]
- [3] Yang Q, Wu Z X, Chen X X, et al. Research advances of pharmacodynamics and pharmacokinetics of florfenicol in aquaculture animals[J]. Reservoir Fisheries, 2010, 3(5): 116 - 121. [杨倩, 吴志新, 陈孝焯, 等. 氟苯尼考的药效学及其在水产动物中的代谢动力学研究进展. 水生态学杂志, 2010, 3(5): 116 - 121.]
- [4] Liao C R, Xu L W, Chen B S. In vitro antibacterial activities of florfenicol against six marine pathogenic vibrios[J]. Journal of Aquaculture, 2005, 26(4): 1 - 4. [廖昌荣, 徐力文, 陈毕生. 氟苯尼考对六种海洋致病弧菌的体外抗菌活性研究. 水产养殖, 2005, 26(4): 1 - 4.]
- [5] Cao H P, Yan M, Yang X L. Antibacterial activities of florfenicol in vitro and its efficacy against *Aeromonas hydrophila* administered in injection to *Carassius auratus gibelio*[J]. Fishery Modernization, 2007, 34(4): 47 - 49, 53. [曹海鹏, 闫明, 杨先乐. 氟苯尼考的体外抑菌作用及其对鲫抗嗜水气单胞菌感染的效果. 渔业现代化, 2007, 34(4): 47 - 49, 53.]
- [6] 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]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43(7): 1756 - 1758.
- [7] Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(1): 11 - 17.
- [8] Ma Y. Pharmacokinetics of florfenicol and enrofloxacin in healthy and vibrio alginolyticus infected *Pseudosciaena crocea*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2012. [马寅. 氟苯尼考和恩诺沙星在大黄鱼体内的代谢动力学研究. 宁波: 宁波大学, 2012.]
- [9] Zhu L M, Yang X L, Lin Q C, et al. The residues and pharmacokinetics of florfenicol in *Trionyx sinensis* following intramuscular injection and oral administration[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 515 - 519. [朱丽敏, 杨先乐, 林启存, 等. 肌注和口服氟苯尼考在中华鳖体内残留分析及药代动力学. 水产学报, 2006, 30(4): 515 - 519.]
- [10] Feng J B, Jia X P, Li L D. Tissue distribution and elimination of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. caureus*) after a single oral administration in freshwater and seawater at 28 °C[J]. Aquaculture, 2008, 276(1-4): 29 - 35.
- [11] Yanong R P E, Cuds E W. Pharmacokinetic studies of florfenicol in koi carp and threespot gourami *Trichogaster trichopterus* after oral and intramuscular treatment[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2005, 17(2): 129 - 137.
- [12] Si L N, Chen C, Li S W, et al. Pharmacokinetic comparison for enrofloxacin in golden trout and taimen[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(6): 390 - 392. [司力娜, 陈琛, 李绍戊, 等. 恩诺沙星在金鳟和哲罗鲑鱼体内的药代动力学比较. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 390 - 392.]
- [13] 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): 635 - 643. [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防耐药用药方案. 中国水产科学, 2013, 20(3): 635 - 643.]
- [14] Dai Z Y. Clinical antibacterial medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1985: 6 - 8. [戴自英. 临床抗菌药理学. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 6 - 8.]
- [15] Liu Y F. Studies on the post-antibiotic effects of fluoroquinolones and mechanism [D]. Haerbin:

- Northeast Agricultural University,2002. [刘远飞. 氟喹诺酮类抗菌药后效应及其机制的研究. 哈尔滨: 东北农业大学动物医学院,2002.]
- [16] Cui J C, Liu Y N, Wang R, *et al.* Correlation of levofloxacin pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters with selection of staphylococcus aureus resistance [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics,2007,12(9):989 – 992. [催俊昌,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. 中国临床药理学与治疗学,2007,12(9):989 – 992.]
- [17] Yuan G F. Studies on pharmacokinetics of florfenicol in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Suzhou:Soochow University,2012. [袁国锋. 氟苯尼考在草鱼体内的药物代谢动力学研究. 苏州:苏州大学,2012.]
- [18] Liu H X, Liu X Q, Zhang Z L, *et al.* Pharmacokinetics of florfenicol induced through single enterocoelia injection and oral administration to *Carassius auratus* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2011,20(5):54 – 58. [刘海侠,刘晓强,张振龙,等. 氟苯尼考单剂量腹腔注射和灌服后在鲫体内的药代动力学. 西北农业学报,2011,20(5):54 – 58.]
- [19] Zhang S Y, Cao J Y, Luo Y L. Studies on the pharmacokinetics of florfenicol in the crussian carp [J]. Reservoir Fisheries,2007,27(3):97 – 99. [张收元,操继跃,罗宇良. 氟苯尼考在鲫体内的药代动力学研究. 水利渔业,2007,27(3):97 – 99.]
- [20] Sun Y X, Zhao H Y, Shan Q, *et al.* Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp(*Carassius auratus cuvieri*) after a single dose intramuscular or oral administration [J]. Aquaculture,2010,309(1 – 4):82 – 85.
- [21] Lin M, Ji R X, Chen Z Q, *et al.* Pharmacokinetics of florfenicol in *A. japonica* and *A. Anguilla* [J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2011, 39 (36): 22341 – 22343. [林茂,纪荣兴,陈政强,等. 氟苯尼考在日本鳊和欧洲鳊体内的药代动力学. 安徽农业科学,2011,39(36):22341 – 22343.]
- [22] Wang R X, Wang D, Li S W, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of florfenicol and florfenicol amine in *Acipenser baeri* [J]. Journal of Shanghai Ocean University,2012,21(4):568 – 574. [王瑞雪,王荻,李绍戌,等. 氟苯尼考及氟苯尼考胺在西伯利亚鲟体内的药代动力学及组织分布. 上海海洋大学学报,2012,21(4):568 – 574.]
- [23] Samuelsen O B, Bergh O, Ervik A. Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and *in vitro* antibacterial activity against *Vibrio anguillarum* [J]. Disease of Aquatic Organisms,2003,56(2):127 – 133.
- [24] Yang Y J, Li J Y, Li B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic models and its applications in veterinary antimicrobial drugs [J]. Hubei Agricultural Sciences,2011,50(1):114 – 117,121. [杨亚军,李剑勇,李冰. 药代动力学 – 药效学结合模型及其在兽用抗菌药物中的应用. 湖北农业科学,2011,50(1):114 – 117,121.]
- [25] 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):1746 – 6148.
- [26] Li Y J, Xing J, Chen W J. Optimize drug regimen of time dependence and concentration dependence antibacterial [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application,2008,2(24):72 – 73. [李运景,邢洁,陈文娟. 时间依赖性抗菌药与浓度依赖性抗菌药物给药方案的优化. 中国现代药物应用,2008,2(24):72 – 73.]
- [27] Yu G Q, Lu T Y, Yang Y H. The study on mutation selection windows (MSW) of several antibiotics against *A. hydrophila* [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2012,48(12):73 – 75. [俞观泉,卢彤岩,杨雨辉. 几种抗菌药物对嗜水气单胞菌突变选择窗(MSW)范围的研究. 中国兽医杂志,2012,48(12):73 – 75.]
- [28] Blondeau J M, Borsos S, Blondeau L D, *et al.* Comparative minimum inhibitory and mutant prevention drug concentrations of enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin against bovine clinical isolates of *Mannheimia haemolytica* [J]. Veterinary Microbiol, 2012, 160 (1 – 2): 85 – 90.

Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their significances in drawing medication regimen

LI Mengying, XU Lijuan, LÜ Liqun*

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

Abstract: This study aims to investigate the differences of *in vitro* pharmacodynamics (PD) parameters and *in vivo* pharmacokinetic (PK) of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain (CAAh01), which were used to draw reasonable medication regimen to control disease and prevent drug resistant bacteria. The pharmacodynamics of florfenicol on bacterium CAAh01 were studied *in vitro* and the pharmacokinetic parameters of florfenicol in crucian carp and grass carp were monitored after a single oral gavage of 10, 20, 30 mg per kg body weight to determine a medication regimen to prevent bacterial sepsis in grass carp and crucian carp. The *in vitro* pharmacodynamic results showed that MIC of florfenicol on CAAh01 was 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and MBC was 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; the MPC was 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (12MIC); the mutant selection window (MSW) of florfenicol on the pathogenic bacterial strains was 0.5 – 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The time of florfenicol concentration in serum of crucian carp above MPC was 5h at the dosage of 10 mg/kg; 8 h at the dosage of 20 mg/kg, 24 h at the dosage of 30 mg/kg, respectively; $\text{AUC}_{24}/\text{MIC}$ and $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ of florfenicol in serum were 177.06 and 15.59 at the dosage of 10 mg/kg, respectively; 265.90 and 21.32 at the dosage of 20 mg/kg, respectively; 426.50 and 31.24 at the dosage of 30 mg/kg, respectively. The time of florfenicol concentration in serum of grass carp above MPC was 0h at the dosage of 10 mg/kg and 20 mg/kg, 3h at the dosage of 30 mg/kg, respectively; $\text{AUC}_{24}/\text{MIC}$ and $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ of florfenicol in serum were 38.60 and 4.75 at the dosage of 10 mg/kg, respectively; 75.08 and 10.08 at the dosage of 20 mg/kg, respectively; 121.94 and 19.99 at the dosage of 30 mg/kg, respectively. Considering the drug remained in the plasma with a concentration above MPC and $\text{AUC}_{24}/\text{MIC} \geq 100$ or $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 8$, florfenicol is determined to be applicable for the prevention and treatment of bacterial diseases of crucian carp. The recommendation of the dosing regimen to prevent the selection of drug-resistance is 30 mg/kg, at the intervals of 24 h for 1 day, and the proposed withdrawal period should not be less than 20 d. However, it is not suitable to be used continuously to control and treat bacterial diseases in grass carp.

Key words: *Carassius auratus*; *Ctenopharyngodon idella*; florfenicol; *Aeromonas hydrophila*; mutant prevention concentration; pharmacodynamics; pharmacokinetic

Corresponding author: LÜ Liqun. E-mail: lqlv@shou.edu.cn