

## 联合用药缩小凡纳滨对虾斑点气单胞菌 耐药突变选择窗的研究

李 梅\*, 丁文俊, 王楚洁, 余碧芳, 罗清荣, 沈志华, 潘子强

(电子科技大学中山学院, 广东 中山 528402)

**摘要:** 通过测定斑点气单胞菌单药和双药抗生素最低抑菌浓度(MIC)、防突变浓度(MPC)和耐药突变选择窗(MSW),探索合理使用抗菌药物,防止细菌耐药性产生的用药方案。利用药物敏感性实验测定斑点气单胞菌对 10 种抗生素的抗性,筛选出 6 种不同机制的敏感性抗菌药物,应用琼脂平板稀释法对斑点气单胞菌测定单药以及双药的最低抑菌浓度(MIC)和防突变浓度(MPC),计算选择指数(SI)和联合指数(CI),测定联合用药对耐药突变选择窗(MSW)的影响。结果显示:6 种药物氯霉素、土霉素、利福平、红霉素、盐酸四环素、头孢霉素的 MIC 分别为 0.512、0.416、6.272、2.048、0.386 和 0.512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;MPC 分别为 524.288、1 277.952、802.816、1 024.000、1 185.792 和 10.880  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;SI 值分别为 1 024.000、3 072.000、128.000、500.000、3 072.000 和 21.250。土霉素与红霉素、盐酸四环素与红霉素、盐酸四环素与头孢霉素、土霉素与头孢霉素、盐酸四环素与土霉素、氯霉素与土霉素、氯霉素与盐酸四环素、利福平与氯霉素、利福平与头孢霉素、利福平与盐酸四环素、利福平与土霉素、红霉素与头孢霉素双药联合后的联合指数分别为 1.000、1.000、1.000、1.000、0.834、1.500、1.500、0.834、2.000、2.000、1.000 和 2.000。双药联合明显降低了药物 SI 值,有效缩小了斑点气单胞菌耐药突变选择窗,其中利福平与盐酸四环素双药联合后 SI 值由 128.000、3 072.000 均降低至 1.000,完全关闭了耐药突变选择窗,有效抑制斑点气单胞菌的耐药生长。

**关键词:** 斑点气单胞菌; 凡纳滨对虾; 联合用药; 最低抑菌浓度; 防突变浓度; 耐药突变选择窗

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

斑点气单胞菌(*Aeromonas punctata*) (同义名豚鼠气单胞菌 *A. caviae*) 可引起草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) 等水生动物及人发生疾病。Altwegg 等<sup>[1]</sup> 发现当人食用感染了包括斑点气单胞菌在内的病害对虾后,会诱发相应的肠胃炎病症。耐药突变选择窗(mutant selection window, MSW) 是细菌突变耐药株在最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC) 到防突变浓度(mutant prevention concentration, MPC) 之间的距离,缩小甚至关闭 MSW 可有效防止耐药突变的产生。国内外对 MSW 有一定的研究和报道,

Firsov 等<sup>[2]</sup> 通过体外 PK/PD 模型首先证明了 MSW 的存在,表明只有当药物浓度大部分时间处于 MSW 内时,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 的耐药突变体才会被选择性富集扩增。Cui 等<sup>[3]</sup> 则通过兔感染模型以左氧氟沙星-金黄色葡萄球菌为例在动物体内对 MSW 理论进行全面的验证,MSW 理论在动物体内首次得到验证。俞观泉等<sup>[4]</sup> 在几种抗菌药物对嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*) MSW 范围的研究中,发现恩诺沙星和氟苯尼考治疗嗜水气单胞菌虽可发挥一定的治疗效果,但容易导致耐药性突变株的产生;王浩等<sup>[5]</sup>

收稿日期:2014-10-04 修回日期:2015-01-10

资助项目:国家自然科学基金(30871648);广东省教育部产学研专项(2011B090400416);中山市科技计划专项(20123A317);电子科技大学中山学院科研团队培育专项(412YT02)

通信作者:李 梅,E-mail:lm2570@zsc.edu.cn

也发现恩诺沙星对维氏气单胞菌(*A. veronii*)能发挥比较好的杀菌效果,又能减少耐药突变菌株发生的概率。但对于斑点气单胞菌,至今未见联合用药对耐药突变选择窗影响方面的报导。

本研究通过测定头孢霉素、土霉素、红霉素、四环素、氯霉素、利福平 6 种抗生素单药及双药联合用药对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)斑点气单胞菌的 MSW 变化,探讨抗生素联合用药缩小斑点气单胞菌的 MSW 的合理用药方案,为由斑点气单胞菌引起的水生动物疾病的合理用药提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**菌种来源** 斑点气单胞菌由本实验室从发病凡纳滨对虾中分离鉴定并保存。

**抗菌药物** 氯霉素、青霉素、硫酸链霉素、红霉素、盐酸四环素、头孢霉素等购自北京鼎国生物技术有限责任公司;土霉素、多黏菌素 E 购自上海源绿叶生物技术有限公司;利福平购自美国 GenView 公司;硫酸卡那霉素购自广州威佳科技有限公司。

### 1.2 单药 MIC 测定

根据 CLSI2010 标准<sup>[6]</sup>,采用琼脂平板二倍稀释法,分别配制药液浓度为 0.032、0.064、0.128、0.256(最低浓度参照 CLSI 确定,药物浓度按 2 倍递增)……4.096、8.192 和 16.384  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的琼脂平板,每个浓度做 2 个平板。将稀释后的菌液加入琼脂平板使每个平板中含菌量为  $3 \times 10^5$  CFU,放于 37  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱中培养 10 ~ 13 h。实验结果以最低不长菌的浓度为 MIC。

### 1.3 双药 MIC 测定

以单种药物的 MIC 为基础,以一种抗生素的 MIC 与另一种抗生素的 MIC 按不同的比例加入培养基中,配制 1MIC + 1MIC、1/2MIC + 1MIC、1/3MIC + 1MIC、1MIC + 1/2 MIC、1/2 MIC + 1/2 MIC、1/3 MIC + 1/2MIC … 1/3MIC + 1/3MIC 的药物琼脂平板(即每 2 种药物间有 9 种不同浓度组合的琼脂平板),用 1.2 的方法进行接种培养,以 CLSI2010 标准的方法进行判断。

### 1.4 单药 MPC 测定

吸取 200  $\mu\text{L}$  菌液接种于 200 mL LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 振荡过夜培养,菌液

3 000 r/min 离心 20 min 后,弃上清液,细菌再悬浮于 10 倍原液培养基中,140 r/min 振荡培养 6 h,菌液再次 3 000 r/min 离心 20 min 后,弃上清液,用无菌生理盐水将菌液浓度调整为  $3.0 \times 10^{10}$  CFU/mL。

以各药 MIC 为基准,采用倍比稀释法配置抗菌药物平板,药物浓度从 MIC、2MIC、4MIC 直到  $\geq 1 024 \mu\text{g}/\text{mL}$ (每个浓度 6 个重复),药物平板铺好后,分别取  $3.0 \times 10^{10}$  CFU/mL 菌液 100  $\mu\text{L}$  均匀涂抹在每个含有倍比稀释的抗菌药物琼脂平板上,每个药物浓度平板的细菌总接种量为  $1.2 \times 10^{10}$  CFU,并通过菌落计数确保每个浓度平板的接种量  $\geq 10^{10}$  CFU。于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养观察 24、48 和 72 h,以 72 h 时没有菌落生长的最低防突变浓度称为初测 MPCpr。以 MPCpr 为基准,依次递减(20%)抗菌药物浓度重新配制含药琼脂平板(各浓度 6 个),重复 MPCpr 测定时的细菌富集及接种,以 72 h 时不出现菌落生长的最低药物浓度定为 MPC。

### 1.5 双药 MPC 测定

根据测得各单药的 MPC 值,将两种药物按不同的比例混合,配制 1/2MPC + 1/2MPC、1/2MPC + 1/3MPC、1/2MPC + 1/4MPC … MIC + MIC 的药物琼脂平板,测得双药联合后的 MPC 值。

### 1.6 选择指数 SI 和联合作用指数 CI 的计算

根据单药和双药的 MIC 值与 MPC 值计算选择指数 SI(select index)和联合作用指数 CI(combined index),分析效果最明显的药物。SI 数值( $\text{SI} = \text{MPC}/\text{MIC}$ )可比较抗菌药物选择耐药突变的能力,指数越小,抑制选择耐药突变能力越强。 $\text{CI} = (\text{DA}/\text{ICX}, \text{A}) + (\text{DB}/\text{ICX}, \text{B})$ (A, B 分别代表两种不同药物,ICX 指该种药物单独使用使生长抑制率达 MIC 时的药物浓度, D 指该种药物联用使生长抑制率达 X 时的药物浓度),联合作用指数越低,两种药物联用的协同性越好。

## 2 结果

### 2.1 单药 MIC、MPC 及 SI 值测定

药敏实验结果显示青霉素对斑点气单胞菌没有抑制效果;在 MIC 定域测定中发现斑点气单胞菌对多黏菌素 E、青霉素、链霉素、卡那霉素存在耐药作用。故利用头孢霉素、土霉素、红霉素、四环素、氯霉素、利福平等 6 种抗生素进行单药及联

合用药对斑点气单胞菌 MSW 的作用研究,结果显示氯霉素对斑点气单胞菌的最低抑菌浓度 MIC 为 0.512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、土霉素为 0.416  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、头孢霉素为 0.512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、盐酸四环素为 0.386  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、利福平为 6.272  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、红霉素为 2.048  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 1)。

除头孢霉素外,其余 5 种抗菌药物对斑点气

单胞菌的最低抗耐药突变浓度 MPC 均高于 MIC 的 50 倍以上,土霉素和盐酸四环素这两种四环素类抗菌药物虽然在较低的浓度就可以抑制斑点气单胞菌生长,但要抑制其耐药突变株的扩增则均需要药物浓度大于各自的 MIC 高达 3 000 倍以上。红霉素则在浓度大于 1 024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时仍不能对斑点气单胞菌有防耐药突变作用(表 1)。

表 1 单药对斑点气单胞菌的 MIC、MPC 及 SI 值  
Tab. 1 MIC, MPC and SI of antibiotics used alone to *A. punctata*

抗生素 antibiotics	最低抑菌浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) MIC	防突变浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) MPC	选择指数 SI
氯霉素 chloramphenicol	0.512	524.288	1 024.000
土霉素 oxytetracycline	0.416	1 277.952	3 072.000
利福平 rifampicin	6.272	802.816	128.000
红霉素 erythromycin	2.048	1 024.000	500.000
盐酸四环素 tetracycline hydrochloride	0.386	1 185.792	3 072.000
头孢霉素 cephalosporin	0.512	10.880	21.250

## 2.2 联合用药对斑点气单胞菌 MIC 的测定

将 6 种抗生素两两联合,测定联合用药对斑点气单胞菌的 MIC,红霉素与土霉素、盐酸四环素联合使用时,其有效抑制耐药突变株生长的浓度有所降低(表 2)。

表 2 红霉素联合用药对斑点气单胞菌抑菌的 MIC 测定  
Tab. 2 MIC of erythromycin combination to  
*A. punctata*

联合抗生素 combination of antibiotics		红霉素 erythromycin		
		1/3MIC	1/2MIC	MIC
土霉素 oxytetracycline	1/3MIC	+	+	-
	1/2MIC	+	-	-
	MIC	-	-	-
盐酸四环素 tetracycline hydrochloride	1/3MIC	+	+	-
	1/2MIC	+	-	-
	MIC	-	-	-
氯霉素 chloramphenicol	1/3MIC	+	+	+
	1/2MIC	+	+	+
	MIC	+	+	+
利福平 rifampicin	1/3MIC	+	+	+
	1/2MIC	+	+	+
	MIC	+	+	+
头孢霉素 cephalosporin	1/3MIC	+	+	+
	1/2MIC	+	+	+
	MIC	+	+	-

注:“+”有耐药突变株生长;“-”为无耐药突变株生长

Notes:“+” indicates that bacterial growing positive;“-” indicates that no bacteria growth

## 2.3 双药 MPC 及 SI 的测定

通过双药联合后的 MPC 值,结合抗生素联合用药 MIC,计算 SI 值(表 3),通过 SI 可比较抗菌药物选择耐药突变的能力,比较单药 MSW 的 SI 可见,联合用药后 SI 值均有明显降低,降低倍数达 5~2 964 倍不等,其中利福平与盐酸四环素的双药联合后 SI 值由 128.000 和 3 072.000 均降低至 1.000,达到关闭耐药突变选择窗的效果,能有效抑制斑点气单胞菌的耐药生长。

## 3 讨论

MPC 的测定是一个活性测定,所以 MPC、MSW 概念适用于广泛的遗传耐药问题。有多位学者认为 MPC 代表着一个严格控制细菌耐药突变株生长的药物浓度,是防止细菌在第一步或之后耐药突变株被选择性富集扩增的最低防突变浓度<sup>[7-9]</sup>;SI 即为选择指数,是 MPC 与 MIC 的比值,可以反映 MSW 的大小,选择指数越小,MSW 越小,即抑制细菌耐药突变的能力越大。本研究中单药均能在较低浓度达到最低抑菌浓度 MIC,但防突变浓度 MPC 均远超出机体对药物的承受范围,其中土霉素和盐酸四环素属同类抗菌药物,抑菌效果相似,均在低于 0.512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度时达到最低抑菌浓度,但单药的防突变浓度 MPC 均高达 MIC 的 3 000 倍以上;头孢霉素是目前常用药,抑菌浓度在 0.512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时达到抑菌效果,

表 3 抗生素双药联合对斑点气单胞菌的 MIC、CI、MPC 及 SI  
Tab.3 MIC, CI, MPC and SI of antibiotics combination to *A. punctata*

联合药物 combination antibiotics	联合 MIC/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) combination MIC	联合指数 CI combination index	联合 MPC/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) combination MPC	联合 SI combination SI	SI 降低/倍 SI declines times
土霉素 + oxytetracycline +	0.208	1.000	4.000	19.230	159.744
红霉素 erythromycin	1.024		4.000	3.906	128.000
盐酸四环素 + tetracycline hydrochloride +	0.193	1.000	37.056	192.000	16.000
红霉素 erythromycin	1.024		64.000	62.500	8.000
盐酸四环素 + tetracycline hydrochloride +	0.193	1.000	0.800	4.145	741.120
头孢霉素 cephalosporin	0.256		0.080	0.313	68.000
土霉素 + oxytetracycline +	0.208	1.000	0.800	3.846	798.720
头孢霉素 cephalosporin	0.256		0.256	1.000	21.250
盐酸四环素 + tetracycline hydrochloride +	0.193	0.834	4.600	23.834	128.890
土霉素 oxytetracycline	0.139		10.000	71.942	42.700
氯霉素 + chloramphenicol +	0.512	1.500	0.512	1.000	1 024.000
土霉素 oxytetracycline	0.208		0.416	2.000	1 536.000
氯霉素 + chloramphenicol +	0.256	1.500	0.400	1.563	655.360
盐酸四环素 tetracycline hydrochloride	0.386		0.400	1.036	2 964.480
利福平 + rifampicin +	3.136	0.834	3.120	0.995	128.656
氯霉素 chloramphenicol	0.171		1.000	5.848	175.104
利福平 + rifampicin +	6.272	2.000	50.176	8.000	16.000
头孢霉素 cephalosporin	0.512		0.340	0.664	32.000
利福平 + rifampicin +	6.272	2.000	6.272	1.000	128.000
盐酸四环素 tetracycline hydrochloride	0.386		0.386	1.000	3 072.000
利福平 + rifampicin +	3.136	1.000	3.120	0.995	128.656
土霉素 oxytetracycline	0.208		2.400	11.538	266.240
红霉素 + erythromycin +	2.048	2.000	204.800	100.000	5.000
头孢霉素 cephalosporin	0.512		1.360	2.656	8.000

但其单药的 MPC 为  $10.880 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 虽在本研究的药物中 MPC 最小, 但是 SI 仍然高达 21.250。嗜水气单胞菌和斑点气单胞菌同属于气单胞菌属, 赵占春<sup>[10]</sup>曾建议将嗜水气单胞菌和斑点气单胞菌合为一种, 因为两个菌种的生理生化反应基本一致, DNA 碱基成份接近, 细胞壁脂多糖碳水化合物成份接近, 且抗原性亦相同。俞观泉等<sup>[4]</sup>测定卡那霉素和盐酸恩诺沙星对 5 株嗜水气单胞菌 MIC 和 MPC 时发现, 两种药物对嗜水气单胞菌的 MIC 相差不大, 但 MPC 之间的差异较大。尽管嗜水气单胞菌和斑点气单胞菌为同属不同种, 但同样发现单药的 MIC 非常接近, MPC 却相差甚远, 而造成这种差别的原因尚待进一步研究。

目前, 在由气单胞菌引起的水生动物传染病的抗菌药物的合理使用、防止细菌耐药性产生的用药方案方面的研究中, 针对嗜水气单胞菌的报导较多。Xu 等<sup>[11]</sup>研究发现恩诺沙星对嗜水气单

胞菌敏感, 其 MIC 为  $0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$ , MPC 为  $1.125 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; 王美珍等<sup>[12]</sup>在嗜水气单胞菌对四环素类药物的研究中建议优先使用四环素类药物治疗, 但是宋铁英等<sup>[13]</sup>却发现卡那霉素、链霉素对不同来源的嗜水气单胞菌大多产生抑菌效果。本研究中双药联合应用能有效缩小斑点气单胞菌耐药突变选择窗, 其中土霉素与红霉素, 盐酸四环素和头孢霉素, 土霉素和头孢霉素, 氯霉素和盐酸四环素的双药联合等均能有效抑制斑点气单胞菌的耐药突变生长; 氯霉素与土霉素的双药联合虽没有达到关闭耐药突变选择窗的程度, 但与单药 SI 相比, SI 降幅超过 1 000 倍; 利福平与盐酸四环素的双药联合则达到关闭耐药突变选择窗的效果, 有效杀灭斑点气单胞菌。盐酸四环素类的抗菌药物无论单药还是双药, 对斑点气单胞菌均具有较好的抑菌及杀菌效果, 利福平与盐酸四环素的联合用药完全关闭了 MSW, 证明了运用 MSW

理论使运用低药物浓度而达到杀菌效果成为可能。而本研究发现卡那霉素、链霉素对斑点气单胞菌并不敏感,由此可见,斑点气单胞菌虽与嗜水气单胞菌为同一属,但药敏性并不相同,即使同种的嗜水气单胞菌,其药敏性也存在差异。因此,抗菌药物的合理使用及防止细菌耐药性产生的用药方案需对地方流行菌株的相应特性研究后制定。

传统用药理论多以 MIC 为依据,高于 MIC 用药浓度虽然保证了最低治疗效果<sup>[14-15]</sup>。但根据 MSW 理论,当药物浓度在 MIC 和 MPC 范围间,容易诱导耐药突变株的产生。因此,为防止由于耐药菌的产生导致药物失效,治疗用药量应高于 MPC 浓度。阮兆娟等<sup>[16]</sup>的研究表明抗菌药物的应用不合理是引起细菌耐药的主要原因之一,MSW 理论的指出对抗菌药物的研究和提出更高的要求,除治疗效果外,同时考虑到产生耐药突变株的诱导因素,根据该理论研究得出的给药方案更适合机体治疗,预防耐药突变株的产生和扩散。然而单药 MPC 浓度无疑过高,因而抗菌药物联合应用应代替单药应用,在降低药物浓度的同时达到杀菌效果,是缩小甚至关闭耐药突变选择窗的最佳选择。

近年来鱼虾病疫情在国内频频暴发,吴雅丽等<sup>[17]</sup>对广东水产动物研究发现,由于养殖户对药物的滥用,导致耐药性疫情暴发。而新药研发较慢,价格偏高,因此在原有药物的基础上,研究新的用药方式用以防控鱼虾疾病则是水产业的重要方向。本研究结果对由斑点气单胞菌引起的水生动物病情的有效防控,抑制斑点气单胞菌的耐药突变的产生提供了理论依据。本研究组所选药物均为西药类的抗菌药物,梁利国等<sup>[18]</sup>的研究发现,五倍子 (*Galla chinensis*)、苏木 (*Caesalpinia sappan* L) 等 18 种中药对气单胞菌属均有抑菌作用。卢静等<sup>[19]</sup>的研究也发现中药中的没食子酸和槲皮素对嗜水气单胞菌同样具有抑菌作用,但中药见效相对较慢,在一些价值较高的水生经济动物快速诊治中的应用受到制约。因此,在药物选择时,应根据具体情况选用合适的药物种类及剂量。目前,在国内外均未见联合用药对斑点气单胞菌 MSW 影响的研究报导,本研究结果为水生动物由斑点气单胞菌引起的疾病的合理用药奠定了一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Altwegg M, Martinetti L G, Lüthy H J, *et al.* *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp [ J ]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1991, 10( 1 ): 44 - 45.
- [ 2 ] Firsov A A, Vostrov S N, Lubenko I Y, *et al.* *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* [ J ]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2003, 47( 5 ): 1604 - 1613.
- [ 3 ] Cui J, Liu Y, Wang R, *et al.* The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus* [ J ]. *Journal of Infectious Diseases*, 2006, 194( 11 ): 1601 - 1608.
- [ 4 ] 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. ]
- [ 5 ] Wang H, Quan K Y, Xu L J, *et al.* Dosing guidelines of enrofloxacin in *Ctenopharyngodon idella* against *Aeromonas veronii* [ J ]. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43( 2 ): 48 - 53. [ 王浩, 权可艳, 徐丽娟, 等. 恩诺沙星控制草鱼维氏气单胞菌的用药方案. *淡水渔业*, 2013, 43( 2 ): 48 - 53. ]
- [ 6 ] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement [ J ]. *Clinical and Laboratory Standards Institute Document*, 2010, 30( 1 ): 1.
- [ 7 ] Kluytmans J, van Belkum A, Veurhug H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks [ J ]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1997, 10 ( 3 ): 505 - 520.
- [ 8 ] Lucet J C, Chevret S, Durand Z L, *et al.* Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit, results of a multicenter study [ J ]. *Archives OF Internal Medicine*, 2003, 163( 2 ): 181 - 188.
- [ 9 ] Cesur S, Ckoca F. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital staff and outpatients [ J ]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2004, 25( 2 ): 169 - 171.
- [ 10 ] Zhao Z C. New classification and identification of

- clinical of *Aeromonas* [J]. Harbin Medical Journal, 1982, 2(2): 100 - 102. [赵占春. 气单胞菌属 (*Aeromonas*) 的新分类法及临床鉴定, 哈尔滨医药, 1982, 2(2): 100 - 102. ]
- [11] Xu L, Wang H, Yang X, *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.
- [12] Wang M Z, Chen C F, Liu Z X, *et al.* Development of drug-resistance of *Aeromonas hydrophila* to tetracyclines and floroguinolones [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(1): 89 - 93. [王美珍, 陈昌福, 刘振兴, 等. 嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类药物的耐药性研究. 华中农业大学学报, 2011, 30(1): 89 - 93. ]
- [13] Song T Y, Chen Q, Zheng Z Y, *et al.* Antimicrobial-resistance and Mechanism of *Aeromonas hydrophila* [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2008, 23(2): 119 - 124. [宋铁英, 陈强, 郑在予, 等. 不同来源嗜水气单胞菌的抗菌素耐药性及耐药机制分析. 福建农业学报, 2008, 23(2): 119 - 124. ]
- [14] Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance [J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(1): 11 - 17.
- [15] Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated [J]. Clinical Infectious Diseases, 2007, 44(5): 681 - 688.
- [16] Ruan Z J, Zuo G Y. Research progress in influence of combined antibiotics on mutant selection window of bacterium [J]. China Healthcare Innovation, 2013, 8(23): 20. [阮兆娟, 左国营. 抗生素联合应用对细菌耐药突变选择窗影响的研究进展. 中国医疗前沿, 2013, 8(23): 20. ]
- [17] Wu Y L, Deng Y T, Jiang L, *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from various aquatic animals in Guangdong Province [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(2): 219 - 224. [吴雅丽, 邓玉婷, 姜兰, 等. 广东省水产动物源气单胞菌对抗菌药物的耐药分析. 上海海洋大学学报, 2013, 22(2): 219 - 224. ]
- [18] Liang L G, Bing X W, Zhang X J, *et al.* The antimicrobial effects of 18 kinds of Chinese herbs decoction to pathogenic *Aeromonas sobria* *in vitro* [J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(1): 66 - 69. [梁利国, 邴旭文, 张晓君, 等. 18 种中草药煎液对温和气单胞菌的抑、杀菌效果. 淡水渔业, 2010, 40(1): 66 - 69. ]
- [19] Lu J, Wang Z N, Chen R, *et al.* *In vitro* antibacterial activity of several Chinese medicine monomers and antibiotics on *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(6): 1128 - 1132. [卢静, 王振宁, 陈锐, 等. 几种中药单体和抗生素对嗜水气单胞菌及温和气单胞菌的体外抑菌活性研究. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1128 - 1132. ]

## Narrowing mutant selection window of *Aeromonas punctata* from *Litopenaeus vannamei* by combination of antibiotics

LI Mei<sup>\*</sup>, DING Wenjun, WANG Chujie, SHE Bifang, LUO Qingrong, SHEN Zhihua, PAN Ziqiang  
(Zhongshan Institute, University of Electronic Science and Technology of China, Zhongshan 528402, China)

**Abstract:** The purpose of this study is to explore the rational use of antimicrobial drugs, and prevent bacterial resistance to antibiotics through determination minimal inhibitory concentration (MIC), mutant prevention concentration (MPC) and mutant selection window (MSW) of monotherapy and double medicine antibiotics on *Aeromonas punctata*. Resistances of 10 antibiotics were tested via drugs sensitivity assays, 6 sensitive antimicrobial drugs with different mechanisms were screened and their MIC, MPC, selection index (SI) and MSW to *Aeromonas punctata* were determined respectively via single-drug and double-drug's combination by agar plate dilution method. The MIC of chloramphenicol, oxytetracycline, rifampicin, erythromycin, tetracycline hydrochloride, cephalosporins were 0.512, 0.416, 6.272, 2.048, 0.386, 0.512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The MPC of 6 antibiotics were 524.288, 1277.952, 802.816, 1024.000, 1185.792, 10.880  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The SI were 1024.000, 3072.000, 128.000, 500.000, 3072.000, 21.250. The combination index of oxytetracycline and erythromycin, tetracycline hydrochloride and erythromycin, tetracycline hydrochloride and cephalosporins, oxytetracycline and cephalosporins, tetracycline hydrochloride and oxytetracycline, chloramphenicol and oxytetracycline, chloramphenicol and tetracycline hydrochloride, rifampicin and chloramphenicol, rifampicin and cephalosporins, rifampicin and tetracycline hydrochloride, rifampicin and oxytetracycline, erythromycin and cephalosporins were 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 0.834, 1.500, 1.500, 0.834, 2.000, 2.000, 1.000, 2.000, respectively. It was confirmed that the mutant selection window of *A. punctata* was narrowed effectively via double drug combination. The SIs declined from 128.000 and 3072.000 to 1.000 and 1.000 after combination of rifampicin and tetracycline, so this demonstrated that combination of rifampicin and tetracycline closed the resistant mutant selection window, and inhibited effectively the resistant growth of *A. punctata*.

**Key words:** *Aeromonas punctata*; *Litopenaeus vannamei*, combined antibiotics; MIC; MPC; MSW

**Corresponding author:** LI Mei. E-mail: lm2570@zsc.edu.cn