

文章编号: 1674-5566(2015)04-0587-07

鲫细菌性疾病控制中甲砒霉素药代-药效动力学联合参数的研究

李梦影, 喻飞, 张国亮, 孙朋辉, 胡鲲, 杨先乐, 吕利群

(上海海洋大学 农业部淡水种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 采用高效液相色谱法, 研究了甲砒霉素对致病性嗜水气单胞菌 AH10 (*Aeromonas hydrophila*) 体外药理学参数及口灌不同剂量的甲砒霉素在鲫体内药代动力学特征, 并制定甲砒霉素控制鲫细菌性败血症防耐药突变用药方案。研究结果表明, 甲砒霉素对 AH10 的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentrations, MIC) 为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 最小杀菌浓度 (minimal bactericidal concentrations, MBC) 为 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 防细菌耐药突变浓度 (mutant prevention concentration, MPC) 为 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 防耐药突变选择窗 (mutant selection window, MSW) 为 1.0 ~ 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在试验水温 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 对鲫口灌 20、30、40 mg/kg 体重剂量的甲砒霉素, 24 h 内血药浓度大于 MPC 的维持时间分别为 3、8、22 h; AUC_{24} (area under the drug concentration-time curve)/MIC 分别为 89.539、174.560、251.682; C_{max} (maximum concentration in the interval)/MIC 分别为 14.92、17.69、24.22;。综合血药浓度维持 MPC 以上的时间超过 24 h、 $\text{AUC}_{24}/\text{MIC} > 125$ 或 $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 10$ 等指标, 建议甲砒霉素控制鲫细菌性败血症的防耐药用药方案为: 剂量 40 mg/kg, 一日一次。根据肌肉内甲砒霉素的药理学方程, 药残达到国家限量标准所需时间约为 15 d, 所以在本试验水温 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下, 建议休药期不低于 15 d。

研究亮点: 研究甲砒霉素对嗜水气单胞菌 AH10 体外药理学参数 (MIC、MPC、MSW) 和通过测定口灌不同剂量的甲砒霉素在鲫血清、肌肉内各个时间点的药时数据, 并根据药代/药效学联合参数, 如 $\text{AUC}_{24}/\text{MIC} > 125$ 或 $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 10$ 指标、血药浓度 $> \text{MPC}$ 以上的时间超过 24 h 等, 综合确定用药方案; 以期为水产养殖抗菌药物的防耐药用药方案提供理论参考。

关键词: 鲫; 甲砒霉素; 药代动力学; 药效动力学; 防耐药突变浓度; 嗜水气单胞菌

中图分类号: S 948

文献标志码: A

甲砒霉素 (thiamphenicol, TAP) 为第二代酰胺醇类抗生素, 与氟苯尼考 (florfenicol, FF) 相比, 其抗菌谱及抗菌效果都略低于氟苯尼考, 但由于其物美价廉及对多种水产致病菌具有良好的抗菌效果、不易产生耐药性^[1] 等特点, 仍常被广泛应用于水产养殖动物细菌性疾病防控及治疗方面。

目前在水产养殖疾病治疗过程中, 基于 MIC 的治疗浓度仅能阻止敏感菌的生长, 却忽略了细菌耐药突变体的选择性富集^[2]。为了减少细菌耐药问题, 1999 年 DONG 和 DRLICA 等^[3-4] 提出防细菌耐药突变浓度 (MPC) 和耐药突变选择窗

(MSW) 的理论, MPC 是防止耐药突变菌株被选择性富集扩增所需的最低抗菌药物浓度, MSW 是最小抑菌浓度 (MIC) 和 MPC 之间的浓度范围。这一理论不仅着眼于治疗, 更为有效抑制细菌耐药及制定抗菌药物用药策略提供了新思路。

随着氯霉素的禁用, 现极有必要明确市面上两种酰胺醇类药物 (TAP、FF) 的治疗效果, 并制定合理的给药方案。传统的抗菌药物药代/药效学 (PK/PD) 联合模型主要通过 MIC 与药时曲线下面积 (AUC) 等指标确定治疗方案, 但仅能保证“控制感染”, 如果养殖周期内反复使用同一种抗菌药, 会导致抗菌药因致病菌产生耐药突变而失

收稿日期: 2015-01-12

修回日期: 2015-02-16

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-46-12)

作者简介: 李梦影 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产病害。E-mail: limengying333@163.com

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

效。鉴于此本实验通过已有氟苯尼考^[5]相关研究,测定甲砒霉素对致病性嗜水气单胞菌(AH10)菌株^[6]的体外药效学参数及其在鲫体内的药代学参数,试图制定甲砒霉素控制鲫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指导。

1 材料与方法

1.1 仪器及色谱条件

1.1.1 仪器

主要仪器有:LC-100 高效液相色谱仪(购自上海伍丰科学仪器有限公司);旋转蒸发仪;精密电子天平;高速冷冻离心机;旋转蒸发仪等。

1.1.2 色谱条件

色谱柱:ZORBAX-C₁₈ 分析柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:V(乙腈):V(醋酸钠水溶液)=20:80, pH=4.3;紫外检测器波长:224 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

1.2 药品及试剂

主要药品:甲砒霉素标准品(≥99.1%),购自中国兽医药品监察所;甲砒霉素原料药:(≥98.5%),购于上海将来实业有限公司;MH 液体;琼脂培养基。

主要试剂:乙腈、甲醇为色谱级;氨水、无水醋酸钠、冰醋酸、乙酸乙酯、正己烷为分析纯。以上药品均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.3 试验动物及菌株

健康的鲫购自上海崇明养殖场,体质量为150~200 g,于实验室水族箱(0.4 m × 0.5 m × 1.0 m)暂养一周后,将个体均匀的个体分为3组,每组120尾,试验期间水温(22 ± 1) ℃。

嗜水气单胞菌为实验室分离鉴定后保存的菌株,编号 AH10。

1.4 甲砒霉素对嗜水气单胞菌(AH10)药效学研究

1.4.1 MIC、MBC、MPC 和 MSW 的测定

配制甲砒霉素药物浓度为 1 280 μg/mL^[7],细菌菌液浓度为 10⁶ CFU/mL,于 30 ℃ 培养 24 h 后,以能抑制细菌生长的最小药物浓度为 MIC。继续培养 48 h,将 MIC 以上未见细菌生长的各试管,接种营养琼脂平板,计数少于 5 个菌落的最小药物浓度为最小杀菌浓度(MBC)。重复 5 次取平均值。

分别配制含药物浓度为 2 MIC、4 MIC、6 MIC、8 MIC、10 MIC 的药液肉汤琼脂平板,调整细菌菌液浓度达 3 × 10¹⁰ CFU/mL,并吸取 0.1 mL 涂抹在上述含有不同药物浓度的琼脂平板上,使总接种量为 1.2 × 10¹⁰ CFU,孵育 72 h,没有菌落生长的最低药物浓度为 MPC,重复 5 次取平均值;MSW 为 MIC 与 MPC 之间的浓度范围^[8]。

1.4.2 PAE 的测定

设置试验组 T₁、T₂、T₃ 药物浓度分别为 2 MIC、4 MIC、8 MIC 和对照组 C₁、C₂ 分别为空白对照组和 0.08 MIC 药物残留对照组,于 30 ℃ 孵育,使细菌与药物短暂接触 1 h。采用 400 倍除药法,分别取上述试验组及对照管组中的混合液 0.1 mL,加至 30 ℃ 预温的 1.9 mL 的 MH 肉汤中,混合后再取 0.1 mL 分别加至 30 ℃ 预温的 1.9 mL 的 MH 肉汤中,并使 C₂ 中加入甲砒霉素的浓度相当于被 400 倍稀释后的药物浓度,于 30 ℃ 孵育,此时为去除药物后的零时。并在 0、1、2、3、4、5、6、8 h 进行细菌菌落计数,重复 3 次,取平均值^[9]。其中 T、C 分别为菌落数高于重建后零时 10 倍所需的时间,PAE 按照公式:PAE = T - C 计算。

1.5 甲砒霉素药动学研究

1.5.1 给药方式及样品采集

甲砒霉素原料药按照 20、30、40 mg/kg 体重剂量口灌入鱼前肠,每组 120 尾,无回吐现象的留作试验。分别于给药后 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 后取血液 2 mL,肌肉样品 2 g,血液于 4 ℃ 静置 8~12 h 后离心取上清于 -20 ℃ 保存,肌肉于 -20 ℃ 保存。各时间点设置 5 个重复,给药前采取同一批试验鱼血液及肌肉空白样品。

1.5.2 血清样品前处理

取 1 mL 血清,并加入 200 μL 25% 氨溶液和无水硫酸钠 0.2 g 混匀 1 min,再加入 4 mL 乙酸乙酯,水平震荡 15 min,4 ℃ 条件下 8 000 r/min 离心 10 min。再加入 2 mL 乙酸乙酯重复萃取一次,收集两次上清液,45 ℃ 恒温蒸发至干。加 1 mL 流动相溶解,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,HPLC 测定^[10]。

1.5.3 肌肉样品前处理

称取 1 g 肌肉,加入 400 μL 25% 氨溶液,混匀 1 min,再加入 5 mL 乙酸乙酯和 2 mL 乙酸乙

酯进行两次萃取,收集两次上清液,45 °C 恒温旋转蒸发至干。加入 2 mL 乙腈和 3 mL 正己烷,震荡 2 min,静置 10 min 后,4 °C 条件下 8 000 r/min 离心 5 min,取下层置 45 °C 下蒸发至干。再加入 1 mL 流动相溶解,4 °C 条件下 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,HPLC 测定^[10]。

1.5.4 标准曲线、回收率、精密度

称取 0.06 g 甲砒霉素标准品,用 V(乙腈):V(三蒸水) = 20:80,溶解于 100 mL 容量瓶中,此时甲砒霉素浓度为 600 μg/mL。并稀释成 20、10、5、1、0.5、0.05 μg/mL 标准液,经 0.22 μm 滤膜过滤后 HPLC 分析。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标绘制标准曲线。

取 100、10、1 μg/mL 浓度的甲砒霉素各 100 μL,加入到 1 mL 的鲫空白血清中,按照 1.5.2 方法进行处理,每个浓度 3 个平行,每个平行设 1 个空白对照,以测定相对回收率、日内及日间精密度。

1.5.5 数据处理

标准曲线、药时曲线用 Excel 绘制,药代动力学模型及参数应用 Kinetic 4.4 药代动力学软件处理。

2 结果与分析

2.1 甲砒霉素对 AH10 体外药效学研究

甲砒霉素对 AH10 的 MIC 为 1.0 μg/mL, MBC 为 2.0 μg/mL。表明甲砒霉素对嗜水气单胞菌具有较好的抗菌活性。防耐药突变浓度(MPC)为 8.0 μg/mL,耐药突变选择窗(MSW)为 1.0~8.0 μg/mL。表明甲砒霉素药物浓度在 1.0~8.0 μg/mL 时,可以达到治疗效果,但是不能防止耐药突变体的产生,只有当药物浓度高于 8.0 μg/mL 时,才能避免耐药性的产生。

将 2、4、8 MIC 浓度的甲砒霉素药液,与 AH10 菌液短暂接触 1 h 后,PAE 结果分别为 (1.30 ± 0.13) h、(1.83 ± 0.14) h、(2.1 ± 0.12) h;除药后细菌生长曲线(图 1)。结果发现在 2~8 MIC 范围内,PAE 的时间随着药物浓度的升高而明显延长,表明甲砒霉素为浓度依赖性药物。

2.2 鲫体内甲砒霉素的药代动力学研究

2.2.1 甲砒霉素标准曲线

甲砒霉素标准液在 0.05~20 μg/mL 浓度范

围内呈线性关系(图 2),其回归方程为 $y = 42.4x - 1.534$ ($r = 0.999$)。可见甲砒霉素线性关系良好。

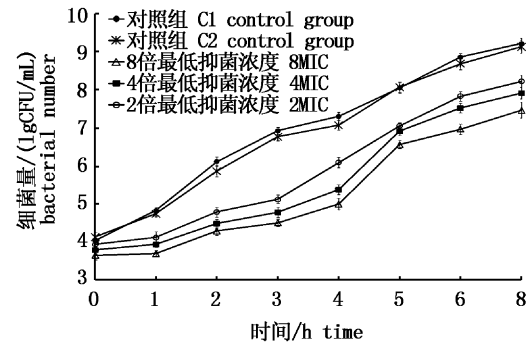


图 1 甲砒霉素作用于嗜水气单胞菌后 PAE 期的细菌的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Aeromonas hydrophila* in the PAE of thiamphenicol

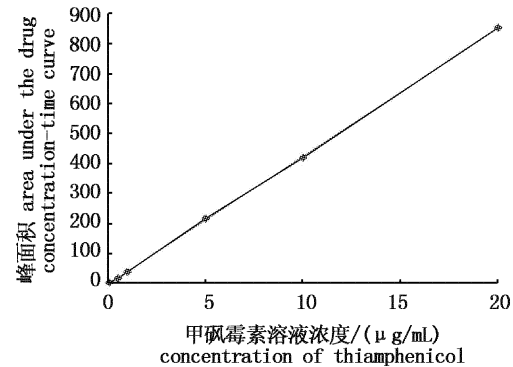


图 2 甲砒霉素标准曲线

Fig. 2 Standard curve of thiamphenicol

2.2.2 回收率和精密度

按 1.5.2 样品处理方法操作后,测得鲫血清中甲砒霉素的平均回收率为 83.58%,日内精密密度为 2.72%,日间精密密度为 2.96%,实验数据表明重现性较好,精密度较高。

2.2.3 鲫血清中甲砒霉素的代谢规律

按 20、30、40 mg/kg 体质量剂量口灌鲫甲砒霉素后,试验数据经 Excel 软件绘制药时曲线(图 3),结果显示单剂量口灌鲫甲砒霉素高浓度组比低浓度组达峰浓度升高,达峰时间提前。按 20、30、40 mg/kg 体剂量口灌甲砒霉素后,在第 1、0.5、0.5 h 血药浓度分别达到峰值 (14.917 ± 1.23)、(17.685 ± 1.63)、(24.218 ± 1.48) μg/mL;此后浓度下降,24 h 浓度分别为 (2.001 ± 0.23)、(5.209 ± 0.13)、(7.567 ± 0.21) μg/mL。

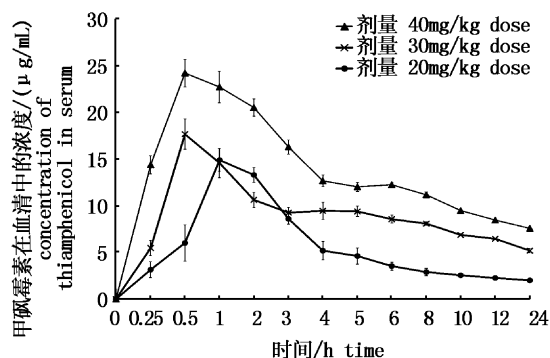


图3 不同给药剂量下甲磺霉素在
鲫血清中的药时曲线 (n=5)

Fig.3 The concentration time curve of thiamphenicol
in serum of crucian carp at various doses (n=5)

2.2.4 鲫体内甲磺霉素的药代学参数

口灌不同给药剂量,药时数据经 Kinetica 4.4 软件进行动力学模型拟合和参数计算。药动学参数见表1,相关药代学参数见表2。结果表明,3种口灌剂量条件下,鲫血清及肌肉内甲磺霉素药时数据均符合一级吸收二室模型。

表1 鲫口灌不同剂量甲磺霉素后药动学方程

Tab.1 The concentration-time equations of
thiamphenicol in crucian carp serum

剂量 dose	方程式 equation
20 mg/kg	$C = 25.781e^{-0.778t} + 3.190e^{-0.0225t} - 28.971e^{-1.686t}$
30 mg/kg	$C = 13.549e^{-1.6972t} + 10.274e^{-0.0333t} - 23.823e^{-7.403t}$
40 mg/kg	$C = 16.638e^{-0.3933t} + 11.003e^{-0.0193t} - 27.641e^{-7.459t}$

2.2.5 甲磺霉素 PK/PD 联合参数确定

甲磺霉素是浓度依赖性药物^[1],有研究指出 AUC_{24}/MIC 、 C_{max}/MIC 指标是浓度依赖性药物制定临床给药方案的重要参数^[11]。口灌不同剂量的甲磺霉素,鲫血清中的 PK-PD 联合参数及关系见表3、图4。结果发现,按 20、30、40 mg/kg 体质量剂量口灌甲磺霉素,在鲫血清中, AUC_{24}/MIC 分别为 89.539、174.560、251.682; C_{max}/MIC 分别为 14.92、17.69、24.22 (表3); 血浆药物浓度大于 MPC 的维持时间分别为 5、8、22 h (图4)。

表2 鲫血清中口灌不同剂量

甲磺霉素药动学参数

Tab.2 The pharmacokinetic parameters of
thiamphenicol in crucian carp serum

参数 parameters	给药剂量 dose		
	20 mg/kg	30 mg/kg	40 mg/kg
A/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	25.781	13.549	16.638
α/h	0.7788	1.6972	0.3933
B/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.190	10.274	11.003
β/h	0.0225	0.0333	0.0193
Kel/($1/\text{h}$)	0.166	0.075	0.045
Ka/($1/\text{h}$)	1.686	7.403	7.459
$T_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.890	0.408	1.762
$T_{1/2\beta}/\text{h}$	30.800	27.813	35.880
T_{max}/h	1.0	0.5	0.5
$C_{max}/(\mu\text{g}/\text{mL})$	14.917	17.685	24.218
MRT/h	35.928	31.684	48.211
$AUC_{24}/[\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})]$	89.539	174.560	251.682
$AUC/[\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})]$	89.539	174.560	251.682
$CLs/[L/(\text{kg} \cdot \text{h})]$	0.114	0.095	0.065
Vd/(L/kg)	5.084	2.847	3.384

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;Kel. 药物在中央室的消除速率常数;Ka. 吸收速率常数; $T_{1/2\alpha}$. 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;MRT. 平均滞留时间; AUC_{24} . 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。

Note: 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; Kel. Elimination rate constant from the central compartment; Ka. Absorption rate constant; $T_{1/2\alpha}$. 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; MRT. Mean residue time of drug in body from 0 to 24 h; AUC_{24} . 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.

表3 PK-PD 模型的相关参数

Tab.3 The parameters of PK-PD integration

剂量 /(mg/kg) dose	C_{max} /MIC	AUC_{24} /MIC	MPC /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MSW /($\mu\text{g}/\text{mL}$)
20	14.92	89.539	8.0	1.0~8.0
30	17.69	174.560	8.0	1.0~8.0
40	24.22	251.682	8.0	1.0~6.0

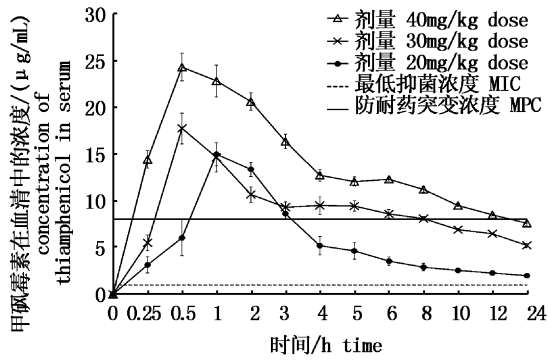


图4 鲫血清中口服不同剂量甲砒霉素在不同时间的药物浓度与 MIC、MPC 及 MSW 的关系图

Fig. 4 Oral different dose of thiamphenicol in crucian carp serum at different time in drug concentration and MIC, MPC and MSW diagram

2.2.6 休药期的确定

休药期的确定是临床制定给药方案的重要组成部分。中国和欧盟规定了甲砒霉素的最高残留限量(MRLs)为 50 μg/kg。根据休药期的定义,仅根据可食用组织中残留的浓度来确定,因此本研究将肌肉组织作为残留检测组织,在给药剂量为 40 mg/kg 时,其药动学方程为 $C = 15.969e^{-0.2459t} + 3.064e^{-0.0132t} - 19.033e^{-0.2637t}$ 。在试验水温(22 ± 1) °C 条件下,口服 40 mg/kg 剂量药物后,鲫肌肉中甲砒霉素含量低于国家规定的最高残留限量(MRLs) 50 μg/kg 的时间至少为 15 d。

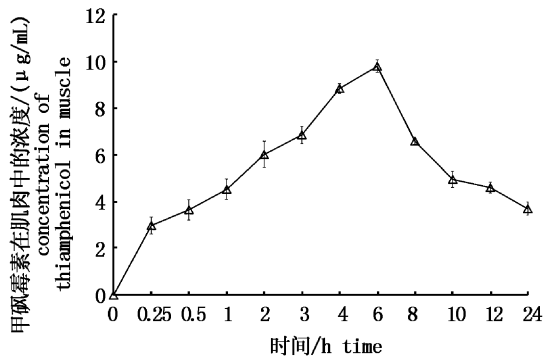


图5 40 mg/kg 口服剂量甲砒霉素在鲫肌肉中的药时曲线

Fig. 5 Concentration-time curve of thiamphenicol in crucian carp muscle following oral 40 mg/kg

3 讨论

本实验药效学指标显示甲砒霉素对嗜水气

单胞菌 AH10 具有较好的抗菌活性。相比氟苯尼考,其抗菌效果略低、MPC 略高^[5],因此在应用于临床控制感染时,这两种药物都能达到一定的治疗效果。水产养殖临床用药应选择有效的抗菌药物(低 MPC、窄 MSW)或者采取轮换使用药物的手段以避免耐药性的产生。目前国内外关于甲砒霉素药代学研究已有报道,如鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[12]、欧洲舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax* L)^[13]等。本实验药代学特征显示,甲砒霉素在鲫鱼体内吸收迅速、分布广泛、消除缓慢。其结果与杨洪波等^[1]、李静^[10]的报道结果一致。与鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)^[14]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[15]等动物体内甲砒霉素药代学参数相差较大,这可能与种属差异、给药剂量、环境等因素有关^[16]。因此在制定药物临床应用策略时,应综合考虑每种药物的抗菌谱及药物在不同种属体内的药代学差异,只有当 PK/PD 参数联合使用时,才能起到治疗效果。

传统给药方案主要依据药物体内药代学特征和体外最小抑菌浓度确定,并根据 AUC_{24}/MIC 、 C_{max}/MIC 和 $T > MIC$ 指标判定药物活性和临床疗效。如杨洪波等^[1]制定了甲砒霉素防治松浦镜鲤细菌性败血症的给药剂量为 8.52 ~ 47.94 mg/kg, PK-PD 同步型参数 AUC_{24}/MIC 为 35.37, C_{max}/MIC 为 24.89。这样的方法在大多数情况下是有效的,但是当血清或组织液药物浓度高于 MIC 且处于突变选择窗内时,会出现耐药突变菌株的选择性富集而使细菌耐药^[2]。为解决这一问题,临床实践中应通过选择低 MPC、窄 MSW 的药物,或通过调整剂量方案使治疗量高于 MPC 的浓度,并结合动物体内药物-血液浓度变化特征,制定更加合理的用药方案。

徐丽娟等^[17]和王浩等^[18]应用 MPC、MSW 理论与药物体内药代学特征相结合的模型,建立了恩诺沙星控制鲫细菌性败血症的用药方案。基于以上 MSW 理论的治疗策略,本实验制定了甲砒霉素控制鲫细菌性败血症防耐药突变用药方案。高延玲等^[19]指出,浓度依赖性药物在 $AUC_{24}/MIC > 125$ 或 $C_{max}/MIC > 10$ 情况下可以起到理想的治疗效果。结果发现,在鲫体内,口服 30、40 mg/kg 体重剂量的药物都能达到 $AUC_{24}/MIC > 125$ 、 $C_{max}/MIC > 10$ 的要求;但血药浓度大于 MPC 的维持时间分别为 8 h、22 h。为了在控

制感染的同时可以限制耐药菌的产生,应保证血药浓度大于 MPC 的维持时间在 (24-PAE) h 以上,因此确定最佳给药剂量为 40 mg/kg,且浓度依赖性药物应每日一次给药^[17]。由此可知,在试验水温 (22 ± 1) °C 条件下,甲砒霉素治疗鲫细菌性疾病的给药剂量为 40 mg/kg,一日一次,休药期至少为 15 d。

参考文献:

- [1] 杨洪波,王荻,卢彤岩. 松浦镜鲤口灌甲砒霉素对嗜水气单胞菌的 PK-PD 模型分析[J]. 水产学杂志, 2013, 26(2): 49-54.
YANG H B, WANG D, LU T Y. Pharmacodynamic effect of thiamphenicol in serum of songpu mirror carp on *Aeromonas hydrophila* in vitro pharmacokinetic model [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2013, 26(2): 49-54.
- [2] 崔俊昌,刘又宁,王睿,等. 耐药突变选择窗与细菌耐药的动物体内研究[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2007, 6(5): 339-341.
CUI J C, LIU Y N, WANG R, et al. Correlation of mutant selection window with selection of drug resistant mutants in rabbits [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2007, 6(5): 339-341.
- [3] DONG Y Z, ZHAO X L, 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(7): 1756-1758.
- [4] DRILICA K. The mutant selection window and antimicrobial resistance[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(1): 11-17.
- [5] 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, LV 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.
- [6] 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.
- [7] 陈俭清,卢彤岩,刘红柏,等. 恩诺沙星对嗜水气单胞菌的体外药效学研究[J]. 水产学杂志, 2010, 23(1): 47-50.
CHEN J Q, LU T Y, LIU H B, et al. Pharmacodynamics of enrofloxacin on aeromonas hydrophila in vitro [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2010, 23(1): 47-50.
- [8] 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]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2007, 12(9): 989-992.
- [9] 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.
- [10] 李静. 不同温度下甲砒霉素在鲫体内的药物动力学及残留研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
LI J. Pharmacokinetics and residues of thiamphenicol in crucian carp at different temperatures [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [11] 杨亚军,李剑勇,李冰. 药动学-药效学结合模型及其在兽用抗菌药物中的应用[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(1): 114-117, 121.
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.
- [12] 韩冰,杨洪波,王荻,等. 甲砒霉素在鲤鱼及鲫鱼体内的残留研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(26): 25-30.
HAN B, YANG H B, WANG D, et al. Study on thiamphenicol residue in common carp and crucian carp [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(26): 25-30.
- [13] MALVISI J, ROCCA G D, ANFOSSI P, et al. Tissue distribution and residue depletion of thiamphenicol after multiple oral dosing in seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Journal of Applied Ichthyology, 2002, 18(1): 35-39.
- [14] 郝凯. 水产品中甲砒霉素残留控制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
HAO K. Studies on control of thiamphenicol residues in fishery [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006.
- [15] 陈玉露. 甲砒霉素和氟甲砒霉素在凡纳滨对虾体内的药代动力学和对药酶影响的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2009.
CHEN Y L. Studies on pharmacokinetics and impact to drug metabolic enzyme of thiamphenicol and florfenicol in *Litopenaeus vannamei* [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2009.
- [16] YANONG R P E, CURTIS E W, SIMMONS R, et al. 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.
- [17] 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[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 635-643
- 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.
- [18] 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[J]. 淡水渔业, 2013, 43(2): 48-53.
- 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.
- [19] 高延玲, 陈杖榴, 王付民. 抗微生物药物 PK-PD 研究在优化兽药给药方案中的应用[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(8): 27-31.
- GAO Y L, CHEN Z L, WANG F M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs in acquiring optimal regimen of veterinary medicine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2005, 39(8): 27-31.

Integrated pharmacokinetics-pharmacodynamics parameters of thiamphenicol in crucian carp (*Carassius auratus*)

LI Mengying, YU Fei, ZHANG Guoliang, SUN Penghui, HU Kun, YANG Xianle, LÜ Liqun
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, the pharmacodynamics (PK) of thiamphenicol on pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain (AH10) and the pharmacokinetic (PD) parameters of thiamphenicol in crucian carp (*Carassius auratus*) were investigated by high-performance liquid chromatography (HPLC) system, which were used to draw reasonable medication regimen to control disease and prevent drug resistant bacteria. The in vitro pharmacodynamic results showed that the minimal inhibitory concentrations (MIC) of thiamphenicol on AH10 was 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the minimal bactericidal concentrations (MBC) was 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; the mutant prevention concentration (MPC) was 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8MIC); the mutant selection window (MSW) of thiamphenicol on the pathogenic bacterial strains was 1.0-8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The time of thiamphenicol concentration in serum of crucian carp above MPC was 3h at the dosage of 20 mg/kg; 8h at the dosage of 30 mg/kg, 22 h at the dosage of 40 mg/kg, respectively; $\text{AUC}_{24}/\text{MIC}$ (Area under the drug concentration-time curve)/MIC and C_{max} (Maximum concentration in the interval)/MIC of thiamphenicol in serum were 89.539 and 14.92 at the dosage of 20 mg/kg, respectively; 174.560 and 17.69 at the dosage of 30 mg/kg, respectively; 251.682 and 24.22 at the dosage of 40 mg/kg, respectively. Considering the drug remained in the plasma with a concentration above MPC for 24 h and $\text{AUC}_{24}/\text{MIC} > 125$ or $C_{\text{max}}/\text{MIC} > 10$, it is suggested that hemorrhagic septicemia can be controlled using a dosing regimen of 40 mg/kg thiamphenicol, at intervals of 24 h. The proposed withdrawal time in crucian carp should not be less than 15 d at the water temperature of $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Key words: crucian carp (*Carassius auratus*); thiamphenicol; pharmacodynamics; pharmacokinetic; mutant prevention concentration; *Aeromonas hydrophila*