

# 猪肺炎支原体体外抗菌药物敏感性试验研究

张纯萍, 沈青春, 胡海燕, 王芳, 徐士新, 宁宜宝, 高和义

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-10-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0010-03 [中图分类号] S852.62

**[摘要]** 为了解猪肺炎支原体对抗菌药物的敏感性, 采用宏量肉汤稀释法对 4 株猪肺炎支原体的最小抑菌浓度 (MIC) 值进行了测定。结果表明, 猪肺炎支原体对泰妙菌素和环丙沙星最为敏感,  $\text{MIC} \leq 0.03 \mu\text{g/mL}$ , 其次分别为四环素类药物 (包括四环素和多西环素)、林可霉素和泰乐菌素, 而对氟苯尼考的敏感性则较差。本研究可为猪支原体肺炎的防控以及抗菌药物的合理使用提供参考。

**[关键词]** 猪肺炎支原体; 抗菌药物; 敏感性; 最小抑菌浓度

## Study on *In vitro* Antimicrobial Susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae*

ZHANG Chun-ping, SHEN Qing-chun, HU Hai-yan, WANG Fang,

XU Shi-xin, NING Yi-bao, GAO He-yi

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to investigate the antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae*, broth macrodilution method was used to detect minimum inhibitory concentration (MIC) of four isolates in this study. Results showed that tiamulin and ciprofloxacin ( $\text{MIC} \leq 0.03 \mu\text{g/mL}$ ) were the most susceptible to *Mycoplasma pneumoniae*, followed by tetracyclines (tetracycline and doxycycline included), lincomycin and tylosin. Reduced susceptibility to florfenicol of *M. hyopneumoniae* was observed. This study provides references for prevention and therapy of *Mycoplasma pneumoniae* of swine and appropriate use of antimicrobial drugs.

**Key words:** *Mycoplasma hyopneumoniae*; antimicrobial drugs; susceptibility; MIC

猪肺炎支原体是引起猪支原体肺炎 (又称猪喘气病) 的病原, 在规模化养殖场普遍存在, 给世界各

国的养猪业带来巨大危害<sup>[1]</sup>。虽然使用疫苗可以有效地减少感染, 但是在饲料和饮水中使用抗生素

**基金项目:** 北京市科技新星计划 (2009B52); 863 计划课题 (2012AA101302)

**作者简介:** 张纯萍, 女, 副研究员, 从事细菌流行病学及其耐药性研究。E-mail: chunpingzhang@sohu.com

### 参考文献:

- [1] Chu C, Lugovtsev V, Golding H, et al. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and its application for influenza virus production [J]. PNAS 2009, 106: 14802-14807.
- [2] Tree J A, Richardson C, Fooks A R, et al. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains [J]. Vaccine, 2001, 19: 3444-3450.

- [3] Jaluria P, Betenbaugh M, Konstantopoulos K, et al. Application of microarrays to identify and characterize genes involved in attachment dependence in HeLa cells [J]. Metab Eng, 2007, 9: 241-251.
- [4] Regina Todeschini A, Hakomori S I. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1780: 421-433.

(责任编辑: 陈希)

仍旧为养殖场常用的猪支原体肺炎的防治策略。目前对猪肺炎支原体耐药性研究的资料很少,主要是由于肺炎支原体生长条件苛刻,生长缓慢,因此其临床分离甚至培养均异常困难。目前世界各国,包括美国临床实验室标准化委员会(CLSI)和欧盟抗菌药物敏感性检测委员会(EUCAST)均没有猪肺炎支原体对抗菌药物敏感性检测的相应标准。本研究参考相应文献<sup>[2]</sup>,采用宏量肉汤稀释法,对本实验室保存和分离的4株猪肺炎支原体进行了10种抗菌药物的敏感性检测,以了解其对临床常用抗菌药物的敏感性,为猪支原体肺炎的防控提供数据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪肺炎支原体 共4株,分别为北京(BJ)株、232株、济南(JN)株和RM48株,均由本实验室保存。其中BJ株为2009年本实验室分离;232株为美国引进标准株;JN株分离自20世纪60年代;RM48株为2003年驯化株。

1.1.2 测试抗菌药物 泰乐菌素、替米考星、林可霉素、头孢噻呋、磺胺甲恶唑、多西环素、氟苯尼考和泰妙菌素均由中国兽医药品监察所提供;四环素和环丙沙星购自中国食品药品检定研究院。

1.1.3 支原体培养基 根据《中华人民共和国兽药典》中支原体培养基的配制方法<sup>[3]</sup>配制。

1.2 方法 采用宏量肉汤稀释法测定猪肺炎支原体对抗生素的敏感性。其中替米考星和泰乐菌素的最终稀释浓度范围为0.004~0.5 μg/mL,其余8种药物的最终稀释浓度范围均为0.03~4 μg/mL。

1.2.1 猪肺炎支原体悬液的配制 根据 Ter Laak 等的方法<sup>[2]</sup>略加改动。将冻存的4株猪肺炎支原体用新鲜配制的培养基进行复苏和传代,测定滴度为每毫升10<sup>9</sup> 颜色改变单位(CCU),然后用培养基无菌稀释至10<sup>4</sup> CCU/mL,作为接种用悬液备用。

1.2.2 不同浓度抗菌药物溶液的制备 根据抗菌药物的含量等进行计算并称量,然后用相应溶剂<sup>[4]</sup>分别配制成浓度为5120 μg/mL的储备液,置-40℃冰箱保存备用。每种药物均为8个稀释浓度。首先将抗菌药物储备液用肺炎支原体培养液稀释至最高稀释浓度的两倍:大环内酯类药物为1 μg/mL,其余8种药物均为8 μg/mL。将2 mL最高稀释浓度的药物加至第1支无菌小管中,其余7支小管中加入1 mL培养液,从第1管吸取1 mL至第2管中倍比稀释直至第8管,并从第8管中吸出1 mL废弃。

1.2.3 耐药性测定 将10<sup>4</sup> CCU/mL的猪肺炎支原体悬液1 mL加至每一个无菌小管中,此时管中的抗生素浓度相应地稀释为原来的一半,而每个管中支原体的浓度也变为5×10<sup>3</sup> CCU/mL。同时设置阴性和阳性对照管。置于温箱(36±1)℃培养。于试验第5天开始观察结果,培养基颜色由红色变为黄色,说明有肺炎支原体生长。在阳性对照变为黄色而阴性对照颜色无明显变化,而且连续两天的观察结果相同时,则以颜色没有明显变化的最低药物浓度为肺炎支原体对该药物的MIC值。

2 结果

试验第5天至第7天观察结果,发现部分药物的MIC值发生了改变:4株菌对泰乐菌素的MIC值均由0.06 μg/mL变为0.12 μg/mL;232株对多西环素和四环素的MIC值分别由第5天的0.06、0.03 μg/mL变为第7天的0.12和0.06 μg/mL;RM48和BJ株对四环素和多西环素的MIC值则分别由第5天时的0.06、0.12 μg/mL变为第7天时的0.12和0.25 μg/mL。而在实验的第7~10天进行观察时,4株猪肺炎支原体对10种药物的MIC值均未发生变化,因此选用第7天的观察结果判定本研究中猪肺炎支原体对抗菌药物的MIC值,具体见表1。

| 表1 猪肺炎支原体对抗菌药物的MIC值 |      |      |      |      |       |       |       |      |       | μg/mL |
|---------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| 菌株编号                | 泰乐菌素 | 替米考星 | 林可霉素 | 头孢噻呋 | 磺胺甲恶唑 | 多西环素  | 四环素   | 氟苯尼考 | 泰妙菌素  | 环丙沙星  |
| BJ                  | 0.12 | >0.5 | 0.5  | >4   | >4    | 0.12  | 0.25  | 2    | ≤0.03 | ≤0.03 |
| RM48                | 0.12 | >0.5 | 0.25 | >4   | >4    | ≤0.03 | 0.12  | 1    | ≤0.03 | ≤0.03 |
| 232                 | 0.12 | >0.5 | 0.25 | >4   | >4    | 0.12  | 0.06  | 1    | ≤0.03 | ≤0.03 |
| JN                  | 0.12 | >0.5 | 0.25 | >4   | >4    | ≤0.03 | ≤0.03 | 1    | ≤0.03 | ≤0.03 |

由表1可知,4株猪肺炎支原体除了对四环素类药物的MIC值有差异外,对其余抗菌药物的MIC

值基本相同。猪肺炎支原体对泰妙菌素和环丙沙星最为敏感,其MIC值均小于所测试的最低药物浓

度,而对头孢噻唑和磺胺甲恶唑的 MIC 值则均高于所测试的最高药物浓度,对氟苯尼考的 MIC 值为  $1 \sim 2 \mu\text{g/mL}$ 。根据猪肺炎支原体对药物的敏感性判定标准<sup>[5]</sup>,BJ 株已经对氟苯尼考产生了耐药性。此外,猪肺炎支原体对同类药物的 MIC 值之间也存在差异:4 株支原体对泰乐菌素的 MIC 值均为  $0.12 \mu\text{g/mL}$ ,而对替米考星的 MIC 值则均  $>0.5 \mu\text{g/mL}$ ,是对泰乐菌素 MIC 值的 4 倍以上;不同支原体分离株对四环素类药物的耐药性也存在差异:JN 株对多西环素和四环素的 MIC 值均不高于  $0.03 \mu\text{g/mL}$ ,而 BJ 株则均在 JN 株的 4 倍以上。

### 3 讨论

支原体是一种最小的可独立生存的微生物,直径约 300 nm。与细菌不同,支原体没有坚硬的细胞壁,仅有一个三层的膜结构,因此各种作用于细胞壁的药物对其无效,如  $\beta$ -内酰胺类药物。本实验中头孢类抗生素也是作用于细胞壁的药物,因此其对肺炎支原体的 MIC 值大于所测试的最高药物浓度。

一般认为,肺炎支原体对影响蛋白质合成的药物都比较敏感<sup>[6]</sup>。本研究的结果基本证实了这一点。其中泰妙菌素和氟喹诺酮类抗生素对猪肺炎支原体的 MIC 均低于  $0.03 \mu\text{g/mL}$ ,是治疗猪肺炎支原体感染的有效抗菌药物,其余依次为四环素类药物(包括四环素和多西环素)、林可霉素和泰乐菌素,这与其他研究<sup>[2,7]</sup>的结果一致。大环内酯类抗生素是临床治疗儿童和成人肺炎支原体感染的一线抗菌药物,目前人医临床分离株对该药物的耐药性报道日渐增加<sup>[8-9]</sup>。本实验仅测试了猪肺炎支原体对两种兽医专用大环内酯类抗生素(替米考星和泰乐菌素)的 MIC 值,结果表明其对替米考星的 MIC 值远高于对泰乐菌素的 MIC 值,具体原因有待进一步研究。本研究中 BJ 株对兽用抗菌药物氟苯尼考已经产生了耐药性,推测这可能与其在兽医临

床上的广泛使用有关。

本研究结果表明,尽管猪肺炎支原体对所测试抗菌药物的 MIC 值不同,但是对多数药物均较敏感,有利于兽医临床对猪支原体肺炎的防控。在实际临床工作中,我们应加强对病原菌的耐药性监测,根据药敏结果合理选用抗菌药物,以更好地防控疾病的发生和蔓延。

### 参考文献:

- [1] 沈青春,宁宜宝,覃青松.猪肺炎支原体的研究进展[J].中国兽药杂志,2003,37(6):26-30.
- [2] Ter Laak E A, Pijpers A, Noordergraaf J H, et al. Comparison of methods for *in vitro* testing of susceptibility of porcine *Mycoplasma* species to antimicrobial agents[J]. Antimicrob Agents Chemoth, 1991,35(2):228-233.
- [3] 中华人民共和国兽药典二 000 年版一部[S].
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, approved standard, third edition, M31-A3 [S]. 2008.
- [5] Omer A I Kibaida. A comparison of methods used to measure the *in vitro* antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma* species of animal origin[M]. 2010.
- [6] David Taylor - Robinson and Christiane Béb  ar. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections[J]. J Antimicrob Chemoth. 1997,40:622-630.
- [7] Hannan P C, O'Hanlon P J, and Rogers N H. *In vitro* evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens[J]. Res Vet Sci, 1989,46:202-211.
- [8] Zhao F, Lv M, Tao X X, et al. Antibiotic sensitivity of 40 *Mycoplasma pneumoniae* isolates and molecular analysis of macrolide-resistant isolates from Beijing, China [J]. Antimicrob Agents Chemoth, 2012,56(2):1108-1109.
- [9] Liu Y, Ye X Y, Zhang H, et al. Characterization of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumonia* isolated from children in Shanghai, China [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010,67:355-358.

(责任编辑:李文平)