

小鼠嗜肺巴斯德杆菌检测方法优化及感染小鼠的药物净化

张 韬^{1*}, 崔 璨^{2*}, 马贯中¹, 张爱华¹

(1. 南京医科大学医药实验动物中心, 南京 211166; 2. 上海南方模式生物科技股份有限公司, 上海 200120)

[摘要] 目的 优化小鼠嗜肺巴斯德杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*) 检测方法, 提高检测敏感性以强化嗜肺巴斯德杆菌的日常监测, 并探讨感染小鼠药物净化的可行性。**方法** 采用直接涂板法和改良增菌法同时检测嗜肺巴斯德杆菌, 比较两种方法的检测效果。采用纸片扩散法研究本地分离的嗜肺巴斯德杆菌菌株对 12 种抗生素的敏感性。48 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组, 每组 8 只, 用不同质量浓度的恩诺沙星连续给药 6 周, 评估恩诺沙星在 C57BL/6 小鼠的安全使用剂量。用本地分离的嗜肺巴斯德杆菌感染小鼠, 然后给予嗜肺巴斯德杆菌阳性鼠以含不同质量浓度恩诺沙星的饮用水, 检测恩诺沙星对嗜肺巴斯德杆菌感染小鼠的清除效果, 确定药物净化方案。**结果** 直接涂板法和改良增菌法检测嗜肺巴斯德杆菌的检出率分别为 1.3% 和 15.1% ($P < 0.05$); 嗜肺巴斯德杆菌对恩诺沙星、头孢西丁和头孢羟唑等抗生素敏感; $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 以下剂量的恩诺沙星饮水给药对小鼠无明显毒副作用; $85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 以上剂量的恩诺沙星对嗜肺巴斯德杆菌阳性成年鼠饮用水给药, 用药 2 周后均转阴, 停药 6 周仍未转阳。**结论** 改良增菌法检测嗜肺巴斯德杆菌的敏感性高于直接涂板法, 且流程简单便捷, 适用于动物房的日常健康监测。 $85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 以上剂量的恩诺沙星饮水给药能安全有效地清除小鼠嗜肺巴斯德杆菌, 必要时可以作为嗜肺巴斯德杆菌感染小鼠的应急净化方案。

[关键词] 嗜肺巴斯德杆菌; 检测方法优化; 恩诺沙星; 药敏实验; 药物净化

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)04-0351-07

Improvement of Detection Method of *Pasteurella pneumotropica* and Its Medical Elimination in Mice

ZHANG Tao^{1*}, CUI Can^{2*}, MA Guanzhong¹, ZHANG Aihua¹

(1. Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; 2. Shanghai Model Organisms Center, Inc., Shanghai 200120, China)

Correspondence to: ZHANG Aihua, E-mail: zhangaihua@njmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To modify the method for sensitive detection of *Pasteurella pneumotropica* in mice in routine monitoring, and to explore the feasibility of medical elimination in *Pasteurella pneumotropica* infected mice. **Methods** The *Pasteurella pneumotropica* were detected by routine procedure and modified method that using fluid medium before inoculation. The detection rates of the two methods were compared in statistics. The sensitivity of *Pasteurella pneumotropica* isolated from local facility to 12 antibiotics was studied by antimicrobial disk sensitivity test. Forty-eight female C57BL/6 mice were randomly divided into 6

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金资助项目(2017NJMU023)

[作者简介] 张 韬(1989—), 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: zhangtao@njmu.edu.cn

崔 璨(1989—), 男, 硕士, 研究方向: 预防兽医。E-mail: 779349408@qq.com

*共同第一作者

[通信作者] 张爱华(1979—), 女, 预防兽医学博士, 高级实验师, 研究方向为实验动物科学。E-mail: zhangaihua@njmu.edu.cn

groups, with 8 in each group. All the groups were set to different concentration of enrofloxacin continuously for 6 weeks to find out the safe dosage. Mice were infected with local *Pasteurella pneumotropica* strain, the *Pasteurella pneumotropica* positive mice were administered enrofloxacin in drinking water at different doses to evaluate the effect of *Pasteurella pneumotropica* clearance results. **Results** The detection rates of *Pasteurella pneumotropica* by routine procedure and improved method were 1.3% and 15.1%, respectively. *Pasteurella pneumotropica* was sensitive to enrofloxacin, cefoxitin and cefadrazole etc. The mice were safe to enrofloxacin within a daily dosage of 300 mg/kg. The *Pasteurella pneumotropica* was not detected from positive mice treated with 85 mg/kg enrofloxacin after 2 weeks, and kept negative after withdrawal for 6 weeks. **Conclusion** Using fluid medium before inoculation can improve the positive detection rate of *Pasteurella pneumotropica*, which is simple, convenient, and suitable for daily health monitoring of animal facility. Oral administration of enrofloxacin more than a dosage of 85 mg•kg⁻¹•d⁻¹ can eliminate *Pasteurella pneumotropica* from the positive mice safely and effectively, and be an alternative contingency plan for the elimination of *Pasteurella pneumotropica* in mice.

[Key words] *Pasteurella pneumotropica*; Detection method improvement; Enrofloxacin; Antimicrobial susceptibility test; Medical elimination

嗜肺巴斯德杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*) 属于巴斯德菌科巴斯德菌属, 为革兰阴性短杆或球杆菌^[1]。嗜肺巴斯德杆菌是条件性致病菌, 多数动物感染后无任何临床症状, 但在动物免疫机制受到抑制和应激因子的作用下, 容易发生呼吸道疾病, 还可与仙台病毒、肺支原体等呼吸道病原微生物合并感染^[2], 因而影响实验动物质量; 而且使用隐性感染的小鼠进行动物实验, 也会对实验结果产生严重干扰^[3]。

由于嗜肺巴斯德杆菌对外界理化因素抵抗力不强, 生长条件相对苛刻, 在检测中与其他细菌涂布于同一培养基上同时培养时为弱势菌落, 故传统的血琼脂平皿直接分离培养法易造成漏检^[4]。因此, 优化嗜肺巴斯德杆菌检测方法以提高检测敏感度, 可避免检测假阴性的发生。目前, 针对嗜肺巴斯德杆菌感染, 最有效的清除方式是剖宫产和胚胎移植。然而这两种方法耗时且费用昂贵, 不适用于饲养量大、品系多的设施^[3]。因此, 需要建立一种应急情况下快速去除嗜肺巴斯德杆菌的药物净化方案。

本研究评价了直接涂板法和改良增菌法对嗜肺巴斯德杆菌的检出情况, 并对本地分离出的嗜肺巴斯德杆菌进行了抗生素敏感性测试; 然后用该菌株感染小鼠后隔离饲养, 进一步进行药物安全性和净化效果分析。本研究旨在优化嗜肺巴斯德杆菌检测方法, 提高检测敏感性, 以强化嗜肺

巴斯德杆菌的日常监测, 并对嗜肺巴斯德杆菌感染小鼠的药物净化方案进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

评价检测方法时, 选取某设施实验用小鼠 152 只。

药物安全性评价用 SPF 级 C57BL/6 小鼠 48 只, 雌性, 7~8 周龄。药物净化效果评价用 SPF 级 C57BL/6 小鼠 80 只, 雌性, 16~17 周龄。以上实验小鼠均购自南京医科大学医药实验动物中心 [SCXK (苏) 2016-0002], 饲养于南京医科大学医药实验动物中心 [SYXK (苏) 2015-0015]。动物饲养条件: 室温 (22±1) °C, 相对湿度 40%~70%, 给予 12 h 昼夜光照循环, 自由进水进食。实验过程中, 药物净化效果评价的实验小鼠均在屏障设施内的独立房间内, 以 IVC 笼具进行隔离饲养, 笼器具等装置单独进行高压灭菌处理。动物实验经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准 [IACUC-1701021]。

1.2 主要试剂和药品

脑心浸液培养基购自北京陆桥技术股份有限公司; 哥伦比亚血琼脂培养基购自上海科玛嘉微生物技术有限公司; 特级马血清购自南京贝斯特生物技术有限公司; PCR 相关试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 抗菌药物药敏纸片

(包括头孢氨苄 30 μg /片、头孢西丁 30 μg /片、头孢噻吩 30 μg /片、头孢羟唑 30 μg /片、头孢克洛 30 μg /片、青霉素 10 U/片、四环素 30 μg /片、复方新诺明(磺胺甲噁唑/甲氧苄啶) 23.75 或 1.25 μg /片、丁胺卡那 30 μg /片、庆大霉素 10 μg /片、妥布霉素 10 μg /片、恩诺沙星 10 μg /片) 购自杭州微生物试剂有限公司; 微需氧产气袋购自日本 Mitsubishi Gas Chemical 公司; 拜有利 10% 恩诺沙星注射液购自德国 Bayer 公司; 三溴乙醇、叔戊醇购自美国 Sigma 公司。

1.3 菌株

本研究第一部分优化检测方法时, 从待检小鼠咽拭子和气管中分离获得并检测确认为嗜肺巴斯德杆菌的菌株, 收集后用于药敏实验和药物净化研究。

1.4 主要仪器

生物安全柜 (BIO II Advance 6) 购自西班牙 Telstar 公司; 生化培养箱 (SPX-150BS-II) 购自上海新苗医疗器械制造有限公司; 三目生物显微镜 (CX31RTSF) 购自日本 Olympus 公司; 全波长酶标仪 (Multiskan Spectrum) 购自美国 Thermo 公司; NEW ATB 自动细菌鉴定分析仪 (IAF020480) 购自法国 BioMérieux 公司; PCR 仪 (S1000) 购自美国 Bio-Rad 公司; 电泳仪购自上海天能科技有限公司。

1.5 嗜肺巴斯德杆菌检测方法优化

小鼠经三溴乙醇 (250 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 采集咽拭子后, 安乐死小鼠, 无菌解剖小鼠; 采集气管内壁分泌物, 涂布于血琼脂平皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h (直接涂板法)。然后截取 0.5 cm 气管组织, 将咽拭子和气管组织一同放入增菌液 (脑心浸液培养基+体积分数为 5% 的马血清)^[5] 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h (改良增菌法)。培养结束后, 直接涂板法的血琼脂平皿按照国家标准^[4] 观察培养结果; 增菌培养的菌液接种于血琼脂平皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 分离培养 18~24 h 后观察培养结果。上述步骤中观察到的可疑菌落, 均按国家标准^[4] 继续进行纯化, 用梅里埃 NEW ATB 自动化微生物鉴定分析系统以及 16S rRNA 通用引物 PCR 序列比对法^[6] 进行菌株鉴定。两种方法

同时鉴定为嗜肺巴斯德杆菌者, 判定为阳性。记录两种方法的检测结果, 比较检出率。

1.6 抗生素敏感性测试

采用纸片扩散法, 将嗜肺巴斯德杆菌菌株增菌过夜后, 制成 0.5 麦氏菌悬液。将菌悬液均匀致密涂布于各血琼脂平皿表面, 室温下放置 15 min。然后将头孢氨苄、青霉素、恩诺沙星等 12 种抗菌药物药敏纸片分别平贴于已涂布菌液的各培养基表面, 与微需氧产气袋一起置于密封袋中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 测量抑菌环直径并进行比较分析。

1.7 恩诺沙星饮水给药安全性实验

48 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组, 每组 8 只, 饮水给药。实验组每天摄入恩诺沙星剂量分别为 85、150、200、250 和 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 配制方法是将 1.73、3.05、4.08、5.10 和 6.10 mL 恩诺沙星原液分别溶于 300 mL 灭菌水。连续给药 6 周, 对照组正常饮用灭菌水。每天观察小鼠状态, 记录给药后 2、6、24、48 h 各组小鼠的异常表现和死亡情况。实验结束时, 剖检各组实验动物, 取肝、肾组织, 用体积分数为 10% 的甲醛溶液固定标本, 脱水, 石蜡包埋, 切片后行 HE 染色, 用于组织病理学检查。

1.8 嗜肺巴斯德杆菌阳性鼠药物净化研究

制作 1×10^7 CFU/mL (菌落形成单位, colony forming unit) 的嗜肺巴斯德杆菌菌液, 以 100 μL /只的剂量对 C57BL/6 小鼠进行灌胃处理。1 周后, 采集咽拭子, 将咽拭子放入增菌液中, 按 1.5 节中改良增菌法进行嗜肺巴斯德杆菌检测。检测出嗜肺巴斯德杆菌阳性后, 将小鼠分为实验组和对照组。实验组小鼠每天摄入的恩诺沙星剂量分别为 50、85、150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 连续给药 2 周后停药 6 周; 对照组正常饮水。每个剂量组和对照组均 4 笼, 每笼 5 只小鼠。其间每周以笼为单位, 对笼内所有小鼠采集咽拭子, 按 1.5 节中改良增菌法进行嗜肺巴斯德杆菌检测。这部分实验中, 相关微生物和感染小鼠的实验操作均在生物安全柜内完成; 实验结束后, 对所有小鼠尸体以及实验废弃物等做高压灭菌处理。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件对各实验结果数据进行统计分析。检测方法优化实验结果分析采

用 Fisher 精确概率法；血液生化指标结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较先进行方差分析，然后组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 嗜肺巴斯德杆菌检测方法优化

对 152 只小鼠同时采用直接涂板法和改良增菌法进行嗜肺巴斯德杆菌检测。结果显示，直接涂板法只有极个别平板分离出可疑菌落（图 1A），改良增菌法平板可疑菌落生长更具优势（图 1B）。挑取可疑菌落分离培养后，该菌在血平皿上呈灰白色的光滑滴露样（图 1C）；染色后

油镜下观察显示，该菌为两端钝圆的革兰阴性小杆菌（图 1D）。然后经 NEW ATB 微生物鉴定分析系统和 16 S rRNA 通用引物 PCR 序列比对法（图 1E）鉴定，结果均证明是嗜肺巴斯德杆菌（相似度均 $\geq 99\%$ ）。

最终，152 只小鼠中一共检出嗜肺巴斯德杆菌阳性样品 23 份（对应 23 只小鼠）。其中，直接涂板法检出率为 1.3%（2/152），改良增菌法检出率为 15.1%（23/152）。经统计学分析，两者差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），提示改良增菌法优于直接涂板法。

将鉴定为嗜肺巴斯德杆菌的分离株进行冻存，用于后续的药敏实验和药物净化研究。



图 1 直接涂板法(A)和改良增菌法(B)分离结果对比,以及菌落分离纯化后在血平皿上的菌落形态(C)、革兰染色镜检(D, $\times 1\ 000$)及 PCR 序列比对(E)结果

Figure 1 Results of isolation by routine procedure (A) and modified method (B), as well as the colony morphology on blood plate after purification (C), microscopic result of Gram staining (D, $\times 1\ 000$) and sequence alignment (E)

2.2 嗜肺巴斯德杆菌药敏试验

选用青霉素、四环素等 12 种常见抗生素对嗜肺巴斯德杆菌做药敏试验。结果显示，所试嗜肺巴斯德杆菌菌株对恩诺沙星、头孢西丁、头孢羟唑、头孢克洛、四环素、庆大霉素和妥布霉素敏感；对头孢噻吩、复方新诺明和丁胺卡纳中度

敏感；对头孢氨苄和青霉素则具有耐药性（表 1）。因此，选用恩诺沙星对小鼠进行后续药物净化研究。

2.3 恩诺沙星饮水给药的安全性

恩诺沙星注射液配制不同的质量浓度，对小鼠进行连续饮水给药，实验期内各剂量组小鼠

表1 嗜肺巴斯德杆菌菌株对12种抗生素的药敏试验结果

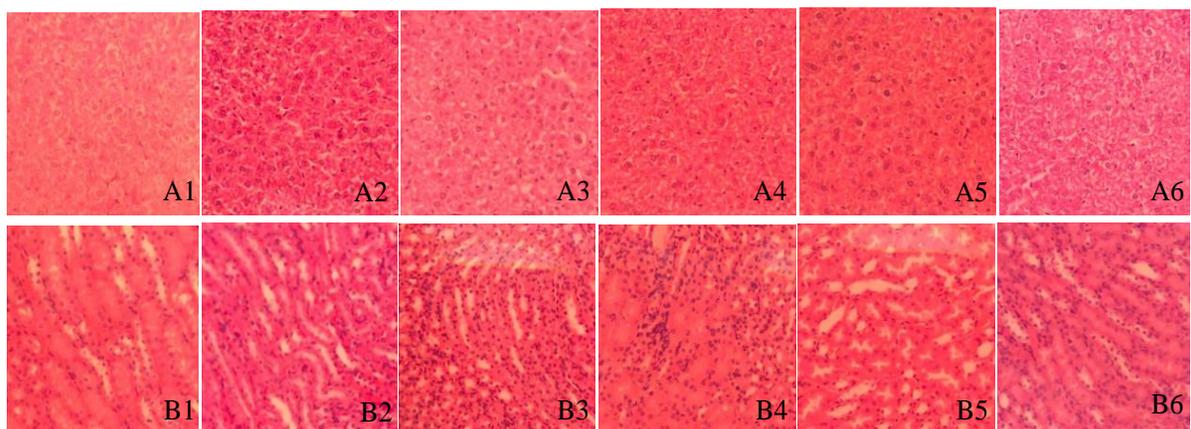
Table 1 Antimicrobial sensitivity test results of *Pasteurella pneumotropica* to 12 antibiotic

抗生素名称	每片含量	抑菌环直径/mm	耐药性判断标准:抑菌环直径/mm			结果判定
			耐药	中介	敏感	
头孢西丁	30 μg	21.5	≤14	15-17	≥18	敏感
头孢羟唑	30 μg	27.0	≤14	15-17	≥18	敏感
头孢克洛	30 μg	23.5	≤14	15-17	≥18	敏感
四环素	30 μg	25.0	≤14	15-18	≥19	敏感
庆大霉素	10 μg	19.0	≤12	13-14	≥15	敏感
妥布霉素	10 μg	19.0	≤12	13-14	≥15	敏感
恩诺沙星	10 μg	32.0	≤22	23-27	≥28	敏感
头孢噻吩	30 μg	15.5	≤14	15-17	≥18	中度
复方新诺明 [#]	23.75/1.25 μg	25.5	≤24	25-31	≥32	中度
阿米卡星	30 μg	16.0	≤14	15-17	≥18	中度
头孢氨苄	30 μg	5.0	≤14	15-17	≥18	抗药
青霉素	10 U	0.0	≤14	-	≥15	抗药

注:[#]复方新诺明含23.75 μg/片磺胺甲噁唑和1.25 μg/片甲氧苄啶。

饮食和精神均未见异常,未出现跛行、呕吐、腹痛、皮肤红斑瘙痒等异常反应或死亡,各时间点大体剖检也未见异常。HE染色结果(图2)显示,与对照组相比,实验组的肝、肾病理学检查均未见明显变化。实验组各剂量下的血液生化指标检测结果的平均值与对照组比较,肝功能相关的谷丙转氨酶(ALT)、总蛋白(TP)、白蛋白

(ALB)和肾功能相关的血肌酐(CREA)的测量值较为一致,差异无统计学意义($P>0.05$,表2);各剂量实验组的碱性磷酸酶(ALP)含量高于对照组($P<0.05$),但仍在正常范围(118 ± 15.9)^[7-8];血尿素氮(BUN)和尿酸(UA)水平均低于对照组($P<0.05$),但没有明确提示意义。



注: A1~6分别为对照组、85 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组、150 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组、200 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组、250 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组和300 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组的肝脏组织; B1~6分别为对照组、85 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组、150 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组、200 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组、250 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组和300 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量组的肾脏组织。

图2 各组小鼠肝脏(A)和肾脏(B)组织的病理学结果(HE染色,×400)

Figure 2 Histological observation on liver (A) and kidney (B) in each group (HE staining, ×400)

表2 恩诺沙星不同剂量组小鼠的血液生化指标

Table 2 Blood biochemical indexes in mice at different doses of enrofloxacin

检测项目	恩诺沙星剂量/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)					
	85	150	200	250	300	0(对照组)
ALT/(U·L ⁻¹)	22.13±3.61	22.75±3.66	21.25±1.85	20.00±3.37	25.63±1.25	22.00±2.83
TP/(g·L ⁻¹)	42.59±3.80	43.96±4.20	42.29±4.39	41.41±7.16	42.74±1.84	46.45±0.35
ALB/(g·L ⁻¹)	30.85±0.54	31.19±0.58	30.33±1.60	29.45±3.31	30.39±1.44	31.90±0.28
ALP/(U·L ⁻¹)	129.17±9.07*	124.00±11.53*	125.63±6.97*	126.00±9.26*	120.50±11.26*	89.50±10.61
BUN/(mmol·L ⁻¹)	8.28±1.25*	8.61±1.57*	8.35±0.98*	7.39±1.35*	8.25±1.50*	12.85±0.49
CREA/(μmol·L ⁻¹)	18.00±2.20	18.88±2.21	19.75±1.85	18.50±1.87	19.63±2.69	16.50±3.54
UA/(μmol·L ⁻¹)	197.83±47.81*	179.63±62.64*	176.00±37.72*	209.83±67.30*	201.50±75.95*	345.97±45.74

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.4 恩诺沙星的净化效果

综合文献 [3, 9~10] 和安全性实验结果, 通过设计 3 个剂量梯度 (50 mg·kg⁻¹·d⁻¹、85 mg·kg⁻¹·d⁻¹、150 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 来测试恩诺沙星饮水给药的疗效, 结果如表 3 所示。各剂量实

验组给予恩诺沙星饮水给药 1 周后, 嗜肺巴斯德杆菌阳性小鼠均转阴; 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量组在停药第 6 周后, 4 笼中有 2 笼出现嗜肺巴斯德杆菌转阳; 但 85 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 和 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量组维持 6 周仍未转阳。

表3 恩诺沙星药物净化效果

Table 3 Effect of drug purification with enrofloxacin

组别	阳性率(阳性笼数/总笼数)								
	给药 第0天	给药后 1周	给药后 2周	停药后 1周	停药后 2周	停药后 3周	停药后 4周	停药后 5周	停药后 6周
对照组	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
50 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 剂量组	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4
85 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 剂量组	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
150 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 剂量组	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

3 讨论

嗜肺巴斯德杆菌是目前国内外实验小鼠感染率最高的病原菌之一 [11-12]。因为嗜肺巴斯德杆菌本身比较脆弱、动物感染后带菌量较少 [12]、在血平皿上属于非优势菌落等原因, 直接分离容易造成漏检, 因此提高嗜肺巴斯德杆菌的检测敏感性十分重要。已有报告显示, 从小鼠咽部采样, 嗜肺巴斯德杆菌分离率最高 [12]。因此, 本研究使用增菌液 (脑心浸液培养基+体积分数为 5% 的马血清) 对小鼠咽拭子和气管组织进行增菌。结果显示, 相比于直接涂板法, 改良增菌法的嗜肺巴斯德杆菌检出率更高, 提示后者可用于动物房的日常健康监测。

除了胚胎移植和剖宫产净化外, 嗜肺巴斯德杆菌感染鼠的药物净化方法值得进一步探讨。本研究中, 本地分离的嗜肺巴斯德杆菌菌株对 7 种抗生素敏感。其中, 恩诺沙星口服吸收较快且完全, 组织分布浓度高 [13], 能购买到液体制剂, 而其他抗生素存在口服不易吸收或剂型不方便操作等问题。因此, 本研究选择恩诺沙星经饮水给药进行后续研究。此前, 有研究者尝试用恩诺沙星治疗嗜肺巴斯德杆菌阳性小鼠, 给药剂量为 8.5~85 mg·kg⁻¹·d⁻¹ [3, 9-10]。本研究以 85 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 为最低剂量, 设置了梯度递进的高浓度剂量组, 进行安全性测试。结果显示, 本实验条件下 300 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 以下剂量的恩诺沙星饮水给药安全性良好, 与前人在大鼠上进行的毒理实

验结论一致^[14]。因为文献 [3] 中 $25.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量治疗曾出现过疑似复发, 结合安全性试验的结果, 本研究进一步设置 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 三个剂量组, 探寻合适的药物净化剂量。既往研究中往往以单只鼠为单位进行检测评估疗效, 本研究选择以笼为单位评估净化效果, 更接近实际饲养状态, 能准确地反映恩诺沙星饮水给药的效果。结果显示, $85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 以上剂量的恩诺沙星饮水给药 2 周能有效清除感染小鼠体内的嗜肺巴斯德杆菌, 且在停药 6 周后未出现复阳。综合考虑, 笔者认为每天 $85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 恩诺沙星是清除感染小鼠体内嗜肺巴斯德杆菌的推荐剂量。

综上所述, 改良增菌法提高了嗜肺巴斯德杆菌检测的灵敏度, 可用于动物房的日常健康监测。在饲养繁育量大的非生产种群内, $85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 以上剂量的恩诺沙星饮水给药作为一种药物净化手段, 可以成为除剖宫产和胚胎移植以外清除嗜肺巴斯德杆菌的应急替代方案。

参考文献:

- [1] 邢进, 冯育芳, 岳秉飞, 等. 嗜肺巴斯德杆菌研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 90-94. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.0020.
- [2] 田克恭, 贺争鸣, 刘群. 实验动物疫病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [3] UENO Y, SHIMIZU R, NOZU R, et al. Elimination of *Pasteurella pneumotropica* from a contaminated mouse colony by oral administration of Enrofloxacin [J]. *Exp Anim*, 2002, 51(4): 401-405. DOI: 10.1538/expanim.51.401.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物 嗜肺巴斯德杆菌检测方法: GB/T 14926.12—2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [5] Duelliet M, Cowan M, Laporte A, et al. Implementation of a PCR assay of *Pasteurella pneumotropica* to accurately screen for contaminated laboratory mice[J]. *Lab Anim*, 2011, 40(10): 305-312. DOI: 10.1038/labani.2011.305.
- [6] 赵莹莹, 邢卉春. 基于不同引物的 16S rRNA 序列分析法对 SBP 腹水细菌的鉴定及抗感染疗效评价的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(29): 4713-4719. DOI: 10.11569/wcjd.v23.i29.4713.
- [7] 王冬平, 李善如, 张敏, 等. 三种小鼠血液生理生化正常值的测定[J]. 实验动物科学与管理, 2000, 17(2): 24-28. DOI: CNKI: SUN: SYDG.0.2000-02-005.
- [8] FOX J G, ANDERSON L C, OTTO G M, et al. Laboratory animal medicine [M]. 3rd Ed. Amsterdam: Elsevier Inc, 2015: 57-58.
- [9] GOELZ M F, THIGPEN J E, MAHLER J, et al. Efficacy of various therapeutic regimens in eliminating *Pasteurella pneumotropica* from the mouse[J]. *Lab Anim Sci*, 1996, 46(3): 280-285.
- [10] MATSUMIYALC, LAVOIE C. An outbreak of *Pasteurella pneumotropica* in genetically modified mice: treatment and elimination[J]. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2003, 42(2): 26-28.
- [11] 李红, 刘星, 张丽芳, 等. 嗜肺巴斯德杆菌选择性培养基研制及应用[J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(1): 20-25. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2001.01.004.
- [12] 高正琴, 邢进, 王春玲, 等. 小鼠嗜肺巴氏杆菌感染的监测与分析[J]. 实验动物与比较医学, 2007, 27(3): 183-185. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2007.03.009.
- [13] 赵晶, 康世良. 兽用喹诺酮类抗菌剂恩诺沙星的药物代谢动力学研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1999(4): 40-41. DOI: CNKI: SUN: HLJX.0.1999-04-038.
- [14] 董漓波, 叶启薇, 孙永学, 等. 恩诺沙星对 SD 系大白鼠的急性及亚急性毒性研究[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(4): 1-4. DOI: CNKI: SUN: HNNB. 0.1995-04-000.

(收稿日期: 2020-11-19 修回日期: 2021-03-31)