论著

文章编号:1000-5404(2007)07-0638-03

奥硝唑联用培氟沙星对牙周病原菌体外抗菌活性研究

段延华,刘鲁川,蒋 艳,李 楠,孟德胜 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所口腔科,重庆 400042)

提 要:目的 评价奥硝唑和培氟沙星体外联合应用对牙周病原菌抗菌效果。**方法** 检测两药配伍的可行性。根据2种含药纸片抑菌环交界角形状,初步判断2种药物联合后对受试菌的作用效果。根据琼脂棋盘稀释法定量判断不同浓度组合药物联用后对受试菌的最低抑菌浓度并计算分级抑制浓度FIC指数。**结果** 2种药物溶液混合后无明显理化特性改变。牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普氏菌、消化链球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌6株标准菌株的FIC指数分别为0.312 5、0.375、0.562 5、0.75、1.062 5、1.062 5。**结论** 2种药物无配伍禁忌,对厌氧菌抗菌活性呈相加作用,对非厌氧菌仅培氟沙星起作用。

关键词:奥硝唑;培氟沙星;抗菌活性;棋盘稀释法

中图法分类号:R781.405;R965;R988.2 **文献标识码**:A

Antibacterial activities of ornidazole and pefloxacin against periodontal pathogen *in vitro*

DUAN Yan-hua, LIU Lu-chuan, JIANG Yan, LI Nan, MENG De-sheng (Department of Stomatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of combined ornidazole and pefloxacin for peridontal pathogen *in vitro* and estimate their antibacterial activities. Methods By the shape of corniform of two inhibition rings, the effect of two drugs was estimated. By the checkerboard method, the fractional inhibitory concentration (FIC) of two drugs was estimated when they were mixed at different concentrations. Results No obvious physical and chemical changes were observed when the two drugs mixed together. The FIC index of Pg, Fusobacterium nucleatum, Pi, Peptostreptococcus and *Staphylococcus aureus* was 0.312 5, 0.375, 0.562 5, 0.75, 1.062 5 and 1.062 5 respectively. Conclusion The two drugs are of good compatibility and of addition effect on anaerobic bacterium, but only pefloxacin is effective on aerobic bacteria.

Key words: ornidazole; pefloxacin; antibacterial activity; checkerboard method

牙周病是一种主要以厌氧菌感染为主的疾病,临床治疗主要以抗厌氧菌为主。奥硝唑是继替硝唑以后研制成的一种疗效高、疗程短、耐受性好的新一代广谱抗厌氧菌和原虫的硝基咪唑类新药,具有抗菌和杀虫的活性高,人体内半衰期长,组织渗透性好等特点,被推荐用于治疗口腔临床多种感染疾病[1-3]。但治疗中也不能忽视兼性厌氧菌和需氧菌所致的混合感染。培氟沙星是喹诺酮类的3代新型抗菌药物,体外抗菌活性研究显示该药对兼性厌氧菌和需氧菌有较强的抗菌活性,并且对部分厌氧菌也有一定抗菌作用[4]。本实验目的是检测2种药物联合应用的可行性及其联合后的抑菌效果和特点,为牙周病的合理用药提供依据。

作者简介:段延华(1972-),男,河南省漯河市人,硕士,主治医师,主要从事牙周病学方面的研究。电话:(023)60636700

通讯作者:刘鲁川,电话:(023)68757738

收稿日期:2005-12-02;修回日期:2006-09-31

1 材料与方法

1.1 实验仪器

厌氧罐(重庆市艾奇医疗器械有限公司),电子分析天平(精度精度1/10^5 g)(AE200型,Mettler Tolerdo Inc, Switzerland),电烤箱(重庆试剂设备厂),酸度计(DELTA235型,Mettler Tolerdo Inc, Switzerland)。

1.2 药液及琼脂培养基制备

奥硝唑,批号9911067,效价99.8%,由西安博华制药有限责任公司提供。甲磺酸培氟沙星(配制前于105 ℃烤箱干烤4~6 h脱水,配制时其磺酸根计算除去)分别以灭菌蒸馏水配成浓度为2 560 mg/L的储存液和质量浓度2%的2种液体(奥硝唑溶解度仅为2.5%)。TS血琼脂培养基,MH培养基(根据《药物微生物学检验手册》自行配制)。

1.3 实验菌株

牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277、具核梭杆菌ATCC 10953、中间普氏菌ATCC 25261、消化链球菌ATCC 27337[5,6](保洁公司

研究发展部提供)。金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、表皮葡萄球菌 ATCC 14990 来源于本校基础医学部微生物学教研室。各厌氧菌种先以 TS 液体培养基增菌(含质量浓度为 1% 葡萄糖,氯化血红素-维生素 K_1 每 100 ml 培养基含 1 ml)厌氧条件下培养 48 h,脱脂牛奶 -70 ℃保存。厌氧菌药敏实验细菌不得多次传代应用,每次实验均取保存菌种接种于 TS 血琼脂平板,置于厌氧罐(内置硼氢化钠 1 g;Na_2CO_3 1 g;柠檬酸 1 g,加水 20 ml,220 ℃烘烤 0.5 h 的还原钯粒作为 O_2 和 H_2 结合成水的催化剂)中 37 ℃培养 48 h[5]。非厌氧菌经 MH 培养基平板培养 24 h。之后从平板取适量活化细菌用 0.9% 灭菌生理盐水配成浓度为 0.5 号麦氏比浊管的标准化实验菌液(10^8 CFU/ml)。

1.4　实验方法

1.4.1　外观及 pH 值测定　　将 2 种质量浓度 2% 的药液各 10 ml 混合后置于恒温水槽(20 ℃),于 0、1、2、3、4、5、6 h 观测混合液外观,同时测其 pH 值。

1.4.2　琼脂扩散纸片法　　分别制备 2 种直径 6 mm 的干燥抗菌滤纸片(每片分别含奥硝唑,培氟沙星均为 5 μg)将含各自药物的 2 张纸片,置于平板上面,其间距离 2 ~ 3 mm,厌氧菌厌氧条件下培养 48 h,非厌氧菌培养 24 h,根据 2 种药片抑菌环形状交角,来初步判断 2 种抗菌药物联合时对受试菌作用情况[7]。

1.4.3　最低抑菌浓度(MIC)测定　　采用 2 倍稀释法,将奥硝唑和培氟沙星 2 种药物的贮备液,倍比稀释成 2 560、1 280、640、320……0.31 mg/L 系列浓度,灭菌后备用。TS 琼脂血平板每个含有 18 ml 琼脂培养基和 2 ml 2 560 mg/L 药液对倍稀释的不同浓度的药物。再将新鲜配制的标准化实验菌液(10^8 CFU/ml)接种于平板上,同时做阳性对照和空白对照平皿。厌氧菌厌氧条件下培养 48 h,非厌氧菌 37 ℃温箱培养 24 h 后观察,无菌生长的最低浓度为最低抑菌浓度。

1.4.4　琼脂棋盘稀释法定量测量 2 种药物相关作用　　每种细菌对 2 种药物分别的 MIC 值测定后,根据其 MIC 值,制备含有不同组合药物浓度的琼脂平板,使平板含药浓度为奥硝唑和培氟沙星的 2 倍 MIC 值对倍稀释到 1/16 MIC 值的两两组合(即:2 MIC_1、MIC_1、1/2 MIC_1、1/4 MIC_1、1/8 MIC_1、1/16 MIC_1 和 2 MIC_2、MIC_2、1/2 MIC_2、1/4 MIC_{12}、1/8 MIC_2、1/16 MIC_2 的两两组合)。接种标准化实验菌液培养观察,同时做空白对照和阳性对照培养皿,厌氧菌厌氧条件下培养 48 h,非厌氧菌 37 ℃温箱培养 24 h 后观察,无菌生长的最低浓度为两药联用的最低抑菌浓度。根据 FIC 指数来判定两药联合后的相互关系。FIC 指数 = A 药联用时 MIC/A 药单测时 MIC + B 药联用时 MIC/B 药单测时 MIC。当 FIC 指数 < 0.5,两药为协同作用;FIC 指数为 0.5 ~ 1,两药为相加作用;FIC 指数 1 ~ 2,两药为无关作用;FIC 指数 > 2,两药为拮抗作用[7]。

2　结果

2.1　2 种药物配伍结果

在 0 ~ 6 h 之内,奥硝唑和培氟沙星混合液外观无显著改变,其 pH 值经检测也无明显变化,说明两种药物无配伍禁忌。

2.2　2 种含药纸片抑菌环交界角形状

两药对厌氧菌抑菌环交界角均平直甚至外凸,显示协同作用。但对非厌氧菌奥硝唑无明显作用。

2.3　受试菌对 2 种药物单独应用的 MIC 值

两种药物分别单独应用时对受试菌的 MIC 值随细菌不同而改变。见表 1。

表 1　2 种药物对受试菌最低抑菌浓度 MIC 值(mg/L)

菌种	奥硝唑	培氟沙星
牙龈卟啉单胞菌	0.062	0.25
具核梭杆菌	0.062	0.25
中间普氏菌	0.125	0.5
消化链球菌	0.250	4
金葡菌	>256	0.062
表皮葡萄球菌	>256	0.125

2.4　受试细菌对 2 种药物最低抑菌浓度组合及 FIC 指数结果

当两种药物以不同浓度组合时,其联合抑菌能力比两种药物单用时的抑菌能力更强,见表 2。

表 2　2 种药物不同浓度联用 MIC 值和 FIC 指数结果

菌种	奥硝唑	培氟沙星	FIC 指数
牙龈卟啉单胞菌	1/4 MIC	1/16 MIC	0.3125
具核梭杆菌	1/4 MIC	1/8 MIC	0.375
中间普氏菌	1/2 MIC	1/16 MIC	0.5625
消化链球菌	1/2 MIC	1/4 MIC	0.75
金葡菌	1/16 MIC	1 MIC	1.0625
表皮葡萄球菌	1/16 MIC	1 MIC	1.0625

3　讨论

目前抗生素已成为治疗口腔感染性疾病的重要手段。针对牙周病混合感染的特点,可采用 2 种抗菌药物联合应用以提高疗效。由于抗菌药物种类多,作用特点各不相同,因此选择合适的抗菌药物联合应用具有重要意义。甲硝唑和替硝唑是目前临床上常用的抗厌氧菌药物,效果良好,但随着时间推移和应用日益广泛,其耐药菌株在不断增加,不良反应也逐渐引起了人们的注意[8]。奥硝唑是继甲硝唑和替硝唑之后的第 3 代硝基咪唑类衍生物,具有良好的抗厌氧菌功效且副作用更小,它在体内主要以具有细胞毒作用的原药和具有细胞毒作用的中间产物作用于细菌的 DNA,使其螺旋结构断裂或阻断其转录复制而死亡,达到抗菌目的。培氟沙星抗菌谱广,具有良好的药物动力学和药效学特点,近年来得到广泛应用。因此本实验将此 2 种药物联合应用来进行牙周致病菌抗菌活性研究。

奥硝唑和培氟沙星均为杀菌剂,而且抗菌谱范围

明显不同,联合应用时不会产生诸如杀菌剂和抑菌剂同时应用所产生的拮抗作用。当2种2%的溶液配伍后放置于25 ℃恒温水槽中6 h,混合液一直保持清亮透明状态,未见有颜色改变及絮状物或沉淀物生成。其混合液pH值在6 h内没有明显变化,说明2种药物混合物比较稳定,没有配伍禁忌。

大量的研究证实牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普氏菌、消化链球菌是牙周病的优势病原菌,其中牙龈卟啉单胞菌在成人牙周炎的龈下菌斑中最多见,且炎症严重部位该菌所占比例较高[9]。从表2结果看来,奥硝唑对4株厌氧菌标准菌株的MIC分别为0.062、0.062、0.125、0.25 mg/L,说明4种厌氧菌对奥硝唑极其敏感。培氟沙星对4株厌氧菌标准菌株的MIC分别为0.25、0.25、0.5、4 mg/L,可见培氟沙星对4株厌氧菌标准菌株也均有一定的抗菌活性,同文献[4]报道有一定差别。培氟沙星对金葡菌和表皮葡萄球菌标准菌株的MIC分别为0.062、0.125 mg/L,也具有很好的抗菌活性。

在奥硝唑和培氟沙星圆形含药纸片形成的抑菌环交界角形状中,2种药物对4种厌氧菌的抑菌环交界角均平直甚至外凸,初步显示了2种药物对厌氧菌的协同作用。但对于金葡菌和表皮葡萄球菌,含奥硝唑的药敏纸片的抑菌环未形成,结合表2结果可知奥硝唑对此2种细菌MIC值均大于256 mg/L,说明奥硝唑对非厌氧菌无效。

在FIC指数测定中,2种药物以不同浓度组合后,对于牙龈卟啉单胞菌,当奥硝唑浓度为单用该药的1/4 MIC,培氟沙星浓度在1/16 MIC时即可抑制细菌生长,其FIC指数为0.312 5。同样对具核梭杆菌,中间普氏菌、消化链球菌,奥硝唑浓度分别在1/4 MIC、1/2 MIC、1/2 MIC,培氟沙星浓度在1/8 MIC、1/16 MIC、1/4 MIC时即可达到抑制细菌的效果,FIC指数分别为0.375、0.562 5、0.75。2种药物共同作用于4种厌氧菌的FIC指数均小于1,说明2种药物对厌氧菌的作用是协同的,联用后可以在更低浓度下抑制厌氧菌活性。但对于金葡菌和表皮葡萄球菌,2种药物联用时,仅在培氟沙星浓度等于或高于单用该药的MIC值时才起到抑菌作用,2种药物联用的FIC指数均为1.062 5,显示了仅培氟沙星单独起作用。

根据上述试验结果,当2种药物以合适比例联合应用时,既可以协同作用来抑制厌氧菌的活性,又可以在培氟沙星单独作用下抑制非厌氧菌的活性,能够有效针对以厌氧菌为主的牙周混合感染,但还需要进一步临床验证。

参考文献:

[1] 刘学聪,边百川,张 玉. 奥硝唑糊剂治疗牙周炎的近期疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(15): 2019.

[2] 李从荣, 金正江, 詹 燏, 等, 奥硝唑治疗口腔厌氧菌感染的临床与实验研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(3): 325-327.

[3] Citron D M, Tyrrell K L, Warren Y A, *et al*. *In vitro* activities of tinidazole and metronidazole against Clostridium difficile, Prevotella bivia and Bacteroides fragilis[J]. Anaerobe, 2005, 11(6): 315-317.

[4] 于守汎. 培氟沙星在目前抗菌疗法中的地位[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2002,23(4): 179-181, 187.

[5] 周学东,肖晓蓉. 口腔微生物学[M]. 成都: 四川大学出版社, 2001: 390-407.

[6] Socransky S S, Haffajee A D. Evidence of aetiology: a historical perspective[J]. Periodontol 2000, 1994, 5(4): 7-25.

[7] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 197-205.

[8] Citron D M, Kwok Y Y, Appleman M D. *In vitro* activity of oritavancin (LY333328), vancomycin, clindamycin, and metronidazole against Clostridium perfringens, *Propionibacterium acnes*, and anaerobic Gram-positive cocci? [J]. Anaerobe, 2005, 11(1-2): 93-95.

[9] Hutter G, Schlagenhauf U, Valenza G, *et al*. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens[J]. Microbiology, 2003, 149 (Pt 1): 67-75.

(编辑 薛国文)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明mmHg与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg=0.133 kPa)。

本刊编辑部