

舒巴坦钠和 EDTA 使产 ESBLs 鸡大肠杆菌 恢复对抗菌药物敏感性

刘保光, 刘建华, 吴华, 陈玉霞, 胡功政*, 徐利纳, 陈燕杰, 孟春萍

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为测定舒巴坦钠、膜通透性促进剂(EDTA)对抗菌药物体外抗菌活性的影响, 采用微量肉汤稀释法, 测定 10 种抗菌药物及其与舒巴坦钠、EDTA、舒巴坦钠+EDTA 联用对产 ESBLs 鸡大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)。结果表明, 舒巴坦钠和 EDTA 可以增强部分抗菌药物对产 ESBLs 鸡大肠杆菌的抗菌活性, 产 ESBLs 菌对常用第三代头孢噻吩、头孢噻肟的耐药率高于 80%, 对氟喹诺酮类、多西环素、氟苯尼考、阿米卡星、磷霉素的耐药率高达 100%, 对第四代头孢头孢吡肟的敏感率为 100%; 对加舒巴坦钠的头孢噻肟、氟苯尼考、阿米卡星及磷霉素的耐药率低于未加舒巴坦钠的单方药物, 耐药率分别为 0、88.9%、88.9%、0; 对加 EDTA 的加替沙星、多西环素、氟苯尼考、阿米卡星及磷霉素的耐药率低于未加 EDTA 的单方药物, 耐药率分别为 30%、11.1%、22.2%、11.1%、0; 多数菌株对加舒巴坦钠+EDTA 的阿米卡星、磷霉素、氟苯尼考、头孢噻吩的耐药率均较仅加舒巴坦钠或 EDTA 的低, 耐药率均为 0。

关键词: 舒巴坦钠; EDTA; 超广谱 β -内酰胺酶; 鸡大肠杆菌; 敏感性

中图分类号: S831.7; R818.051 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0326-04

Recovery of antibacterial sensitivity of ESBLs-producing fowl *E. coli* by sulbactam and EDTA

LIU Bao-guang, LIU Jian-hua, WU Hua, CHEN Yu-xia, HU Gong-zheng*, XU Li-na, CHEN Yan-jie, MENG Chun-ping
(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To determine effect of sulbactam and EDTA on antibacterial activity of antimicrobial drugs *in vitro*, MIC of 10 antimicrobial agents alone and their respective combinations with sulbactam, EDTA and sulbactam+ EDTA against ESBLs-producing *E. coli*, were determined by using broth microdilution method. The results showed that sulbactam and EDTA can enhance antibacterial activity of parts of antimicrobial agents, the resistant rate of ESBLs-producing isolates to third generation cephalosporin ceftiofur, cefotaxime was higher than 80% and the resistant rates to fluoroquinolones, doxycycline, florfenicol, amikacin and fosfomycin were up to 100%. All the ESBLs-producing isolates were sensitive to cefepime. The resistant rate to third generation cephalosporin cefotaxime, florfenicol, amikacin and fosfomycin combinations with sulbactam, were lower than that to antibacterial drugs alone, is 0, 88.9%, 88.9%, 0 respectively. The resistant rate to gatifloxacin, doxycycline, florfenicol, amikacin and fosfomycin combinations with EDTA, were lower than that to antibacterial drugs alone, is 30%, 11.1%, 22.2%, 11.1%, 0 respectively. The resistant rates of most strains to sulbactam+EDTA amikacin, fosfomycin, florfenicol and ceftiofur combinations were much lower than those combinations either only sulbactam or EDTA and were all 0.

Key words: sulbactam; EDTA; extended spectrum β -lactamases; fowl *E. coli*; sensitivity

产生超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum β -lactamases, ESBLs)是细菌对 β -内酰胺类抗生素耐

药最重要的机制^[1]。ESBLs 主要由肠杆菌科细菌产生, 大肠杆菌和肺炎克雷伯菌是其代表菌种, 其他

收稿日期: 2010-03-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771624)

作者简介: 刘保光(1983—), 男, 河南商丘人, 硕士研究生, 主要从事兽医药理学研究; *通讯作者, yaolilab@163.com

如沙门菌、枸橼酸杆菌等也可产生^[2]。ESBLs的特点是其能水解氧氨基头孢菌素和氨基青霉素，但能被β-内酰胺酶抑制剂所抑制^[3]。ESBLs产生菌，不仅对β-内酰胺环类抗生素耐药，而且也对氟喹诺酮类、氨基糖苷类、氟苯尼考、多西环素耐药^[4]，即呈多重耐药特点。将β-内酰胺环类抗生素与β-内酰胺酶抑制剂舒巴坦钠联用，可大大提高其对产ESBLs抗菌的活性^[5]。舒巴坦钠与β-内酰胺环类联用的抗菌作用国内外已有报道^[5-7]，膜通透性促进剂EDTA能增加抗菌药物对细菌的抗菌作用国外已有报道^[8]，在国内仅有 1 篇^[9]。关于舒巴坦钠、EDTA对产ESBLs菌的抗菌作用，河南农业大学兽医药理学实验室已有的研究表明，在动物方面，产ESBLs与膜通透性降低在细菌多重耐药产生中有协同作用，但首次研究试验菌株较少，仅有 6 株。为了使结果更具代表性，笔者选择 18 株新近分离的产ESBLs鸡大肠杆菌，分别研究酶抑制剂舒巴坦钠、膜通透性促进剂EDTA及二者联用对抗菌药物敏感性的影响，为产ESBLs鸡大肠杆菌感染的控制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

18株产ESBLs鸡大肠杆菌，由河南农业大学兽医药理学实验室分离，是从24株鸡大肠杆菌分离菌中按CLSI方法^[10]通过表型筛选和确证实验证实后选出的，经过法国生物梅里埃Vitek-32全自动细菌鉴定仪鉴定。质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922，由中国普通微生物菌种保存中心提供。

1.1.2 培养基

主要培养基成分为 MH 肉汤、麦康凯琼脂、MH(A)培养基和 GN 增菌液。

1.1.3 药敏纸片及药品

氨基青霉素 (AZT, 每片 30 μg)、头孢曲松 (CRO, 每片 30 μg)、头孢泊肟 (CPO, 每片 30 μg)、头孢噻肟 (CTX, 每片 30 μg)、头孢噻肟/棒酸 (CTC, 每片 30/10 μg)、头孢他啶 (CAZ, 每片 30 μg)、头孢他啶/棒酸 (CAC, 每片 30/10 μg)均由北京天坛药物公司提供。加替沙星(GAT)、乳酸环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LEV)、磷霉素(FOS)、舒巴坦钠(SBT)、

头孢噻唑(CTF)、头孢噻肟(CTX)、头孢吡肟(CPM)、多西环素(DOX)、阿米卡星(AK)和氟苯尼考(FLO)均由河南牧翔动物药业有限公司提供。

1.1.4 试验仪器

主要试验仪器为 Vitek-32 全自动细菌鉴定仪、磁力搅拌器、手提式电热压力蒸汽消毒器、隔水式电热恒温培养箱、电子分析天平、振荡培养箱、超净工作台、真空干燥箱、微量移液器。

1.2 方 法

采用微量肉汤稀释法，先测定左氧氟沙星、加替沙星等 10 种抗菌药对产ESBLs鸡大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)，再分别测定这些药物与舒巴坦钠、EDTA以及舒巴坦钠+EDTA联用的MIC。药物与舒巴坦钠的质量比为 2:1，EDTA浓度为 1/2MIC。标准菌株ATCC25922 作为质控菌。耐药临界值按CLSI颁布的数值标准^[10-11]判定。

2 结果与分析

10 种抗菌药物及其与舒巴坦钠、EDTA、舒巴坦钠+EDTA 联用对 18 株产 ESBLs 鸡大肠杆菌的抗菌活性见表 1、表 2。

表 1 10 种抗菌药及其与舒巴坦钠联用对 18 株产 ESBLs 鸡大肠杆菌的抗菌活性

Table 1 Antibacterial activity of 10 antimicrobial drugs alone and in combination with sulbactam on 18 ESBLs-producing isolates from fowl *E. coli*

抗菌药物	抗菌活性/(μg·mL ⁻¹)			耐药率/%	
	平均值	范围	耐药 临界值		
LEV	64.00	64	≥8	≤2	100
GAT	64.00	64	≥8	≤2	100
CIP	67.20	32~128	≥4	≤1	100
CTF	90.70	32~128	≥8	≤2	100
CTX	96.90	16~128	≥64	≤8	83.3
CPM	6.56	2~16	≥32	≤8	0
DOX	38.20	16~64	≥16	≤4	100
FLO	124.40	64~128	≥32	≤8	100
AK	128.00	>128	≥32	≤8	100
FOS	128.00	>128	≥256	≤64	100
LEV+舒巴坦钠	36.90	8~64			100

续表

抗菌药物	抗菌活性/(μg·mL ⁻¹)	耐药率/%
------	-----------------------------	-------

	平均值	范围	耐药 临界值	敏感 临界值
GAT+舒巴坦钠	51.20	32~64		100
CIP+舒巴坦钠	43.20	16~64		100
CTF+舒巴坦钠	8.00	8		100
CTX+舒巴坦钠	7.11	4~8		0
CPM+舒巴坦钠	2.06	1~4		0
DOX+舒巴坦钠	27.50	16~32		100
FLO+舒巴坦钠	40.90	16~64		88.9
AK+舒巴坦钠	48.00	16~64		88.9
FOS+舒巴坦钠	46.20	16~64		0

复配药物浓度按第一个药物计算，下同。

从表1可以看出，18株产ESBLs鸡大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药率均达到100%，加入舒巴坦钠后耐药率没有变化；对第三代头孢菌素类(头孢噻唑、头孢噻肟)的耐药率也较高，但加入舒巴坦钠后，对头孢噻肟的耐药率变为0；对氟苯尼考、阿米卡星、磷霉素的耐药率达到100%，加入舒巴

表2 10种抗菌药分别与EDTA、EDTA+舒巴坦钠联用对18株产ESBLs鸡大肠杆菌的抗菌活性

Table 2 Antibacterial activity of 10 antimicrobial combinations with EDTA and sulbactam+EDTA against 18 ESBLs-producing isolates from fowl *E. coli*

抗菌药物	抗菌活性/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		耐药率/%	前一药物耐 药临界值
	平均值	范围		
LEV+EDTA	10.20	8.0~16.0	100	≥ 8
GAT+EDTA	6.80	2.0~16.0	30.0	≥ 8
CIP+EDTA	11.60	4.0~32.0	100	≥ 4
CTF+EDTA	30.70	8.0~64.0	100	≥ 8
CTX+EDTA	24.90	8.0~64.0	11.1	≥ 64
CPM+EDTA	4.50	1.0~8.0	0.0	≥ 32
DOX+EDTA	8.11	2.0~16.0	11.1	≥ 16
FLO+EDTA	17.30	8.0~32.0	22.2	≥ 32
AK+EDTA	12.60	2.0~32.0	11.1	≥ 32
FOS+EDTA	74.70	16.0~128.0	0.0	≥ 256
LEV+EDTA+舒巴坦钠	5.33	2.0~16.0	22.2	
GAT+EDTA+舒巴坦钠	3.70	1.0~8.0	30.0	
CIP+EDTA+舒巴坦钠	8.40	4.0~32.0	100	
CTF+EDTA+舒巴坦钠	1.95	1.0~4.0	0	
CTX+EDTA+舒巴坦钠	1.23	0.1~4.0	0	
CPM+EDTA+舒巴坦钠	1.25	0.5~2.0	0	
DOX+EDTA+舒巴坦钠	4.78	2.0~8.0	0	
FLO+EDTA+舒巴坦钠	7.78	2.0~16.0	0	
AK+EDTA+舒巴坦钠	3.80	0.5~8.0	0	
FOS+EDTA+舒巴坦钠	14.40	2.0~32.0	0	

坦钠后都有所降低，对磷霉素的耐药率变为0；对

多西环素的耐药率在加入舒巴坦钠前后没有明显变化。

从表2可以看出，18株产ESBLs的鸡大肠杆菌对加入EDTA加替沙星的耐药率降至30%，但对加替沙星+EDTA+舒巴坦钠、环丙沙星+EDTA+舒巴坦钠的耐药率，与对加替沙星+EDTA、环丙沙星+EDTA的耐药率无差异。

综合分析表1、表2可知，对加入EDTA的头孢噻唑的耐药率与对头孢噻唑单用的耐药率没有变化，但对第三代头孢菌素类+EDTA+舒巴坦钠的耐药率比对第三代头孢菌素类仅与EDTA或舒巴坦钠联用的耐药率有所降低；对加入EDTA的多西环素、氟苯尼考、阿米卡星的耐药率均比对单药的耐药率低，对氟苯尼考、阿米卡星、多西环素分别与EDTA+舒巴坦钠联用的耐药率均比仅与EDTA或舒巴坦钠联用的耐药率低。

3 结论与讨论

本试验检测的产ESBLs鸡大肠杆菌均呈多重耐药特性，一是因为鸡大肠杆菌携带ESBLs的质粒同时携带有氟喹诺酮类、氨基糖苷类等多种抗菌药的耐药基因，使产ESBLs菌具有多重耐药表型^[4]，二是因为产生ESBLs等特异性耐药机制和外膜通透性降低、主动外排作用等非特异性耐药机制协同存在导致了多重耐药。舒巴坦钠与 β -内酰胺类抗生素联用能明显提高对产酶耐药菌的体外抗菌活性^[5]。本试验结果表明，舒巴坦钠不仅能增强第三代头孢菌素类抗生素对产ESBLs鸡大肠杆菌的抗菌活性，而且能明显提高阿米卡星、氟苯尼考、磷霉素的抗菌活性。其原因可能是舒巴坦钠本身对产ESBLs菌有一定的内在活性，或当用舒巴坦钠抑制ESBLs后，膜通透性改变，主动外排的作用亦相应减弱，从而在细菌细胞内的药物浓度增加，使这3种药物对产ESBLs鸡大肠杆菌的抗菌活性相应增强，其具体分子机制有待研究。

本试验结果表明，氟喹诺酮类、头孢噻肟、多西环素、氟苯尼考、阿米卡星、磷霉素加入EDTA后对产ESBLs鸡大肠杆菌的MIC降低，部分菌株可恢复敏感性。大多抗菌药物，如 β -内酰胺类、氨基糖苷类药物，均主要通过大肠杆

菌外膜蛋白(OmpF和OmpC,主要是OmpF)进入细胞内发挥抗菌作用^[12]。文献[13]报道,EDTA作为一种常见的膜通透性促进剂,可以与维持细胞膜结构和功能的必需成分Ca²⁺、Mg²⁺等络合,从而导致细胞流动性和通透性增加,最终结果是增加药物进入细菌的浓度,以对抗外膜渗透性降低及药物外排泵出增强的多重耐药机制。文献[9]报道,在各抗菌药物中加入EDTA可治疗多重耐药细菌感染。在本试验中观察到,在抗菌药物中加入EDTA使产ESBLs的多重耐药菌对多数抗菌药恢复了敏感性,说明EDTA与抗菌药联用,对控制多重耐药菌感染有应用价值。

本试验结果表明,第三代头孢菌素、阿米卡星、氟苯尼考、磷霉素与舒巴坦钠+EDTA联用的MIC,均比与舒巴坦钠、EDTA联用的MIC有所下降。这表明,β-内酰胺酶抑制剂舒巴坦钠与膜通透性促进剂EDTA联用,不仅对提高β-内酰胺环类药物的抗菌活性有协同作用,而且对提高阿米卡星、氟苯尼考、磷霉素的抗菌活性有协同作用,从而进一步从表型上证明了特异性耐药机制产生ESBLs与非特异性耐药机制膜通透性降低在产ESBLs禽大肠杆菌多重耐药中有协同作用。据本试验结果推测,舒巴坦钠+EDTA与第三代头孢、阿米卡星、氟苯尼考、磷霉素等联用,可能在产ESBLs多重耐药禽大肠杆菌的防治上有应用前景。

参考文献:

- [1] Bradford P A . Extended-spectrum β-Lactamases in the 21st century :Characterization ,epidemiology ,and detection of this important resistance threat[J] . Cin Microbiol Rev , 2001 , 14 : 933-951 .
- [2] 匡秀华,杨玉荣,胡功政,等.鸡肠杆菌科细菌β-内酰胺酶和超广谱β-内酰胺酶的检测及药敏分析[J].中国兽医学报,2008,28(2):170-174.
- [3] Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A . A functional classification scheme for β-Lactamases and its correlation with molecular structure[J] . Antimicrob Agents Chemother , 1995 , 39 : 1211-1233 .
- [4] Paterson D L, Mulazimoglu L, Casellas J M, et al . Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β-Lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia[J] . Clin Infect Dis , 2000 , 30 : 473-478 .
- [5] 胡功政,张春辉,梁军,等.猪鸡致病菌β-内酰胺酶、超广谱β-内酰胺酶检测与药敏分析[J].中国农业科学,2005,38(2):399-404.
- [6] Fuchs P C, Stickel S, Anderson P H, et al . *In vitro* inactivation of aminoglycosides by sulbactam , other betalactams , and sulbactam-betalactam combinations[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991 , 35(1) : 182-184 .
- [7] 张春辉,周青云,胡功政.舒巴坦钠与常见β-内酰胺环类抗生素的体外抑菌试验[J].中兽医医药杂志,2005,24(5):36-37.
- [8] Bernard Lakaye ,Alain Dubus ,Bernard Joris .Method for estimation of low outer membrane permeability to β-Lactam Antibiotics[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy , 2002 , 9 : 2901-2907.
- [9] 庞晓军,莫国艳,利春红,等.乙二胺四醋酸使耐药菌恢复对抗菌药物敏感性的研究[J].中国医院药学杂志,2008,28(14):1182-1184.
- [10] M100-S18 CLSI document[S] .
- [11] M31-A3 CLSI document[S] .
- [12] Nikaido H .Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux[J] . Science , 1994 , 264 : 382-388 .
- [13] 严杰,钱利生,余传霖.临床医学分子细菌学[M].北京:人民卫生出版社,2005:570-572.

责任编辑:王赛群
英文编辑:罗文翠