

# 鸭大肠杆菌耐酶抑制剂 $\beta$ -内酰胺酶 (IRBLs) 的检测及耐药性分析

谷晓霞, 刘建华, 胡功政\*, 苑丽, 潘玉善, 王磊, 陈玉霞

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:**根据耐酶抑制剂  $\beta$ -内酰胺酶 (IRBLs) 的耐药表型特点,应用纸片扩散法 (K-B 法) 检测 40 株鸭大肠杆菌产 IRBLs 情况并分析产 IRBLs 菌的耐药性。结果表明:产 IRBLs 阳性株 4 株,阳性率为 10%,其对阿莫西林、阿莫西林/棒酸、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、替卡西林/棒酸、氟苯尼考、庆大霉素、新霉素、多西环素耐药,说明 IRBLs 产生菌已在我国兽医临床上出现,且呈现多重耐药的特点。此外,2 株产 IRBLs 菌对哌拉西林/三唑巴坦敏感,表明三唑巴坦对哌拉西林有一定的保护作用。再者,1 株产 IRBLs 菌对三代头孢耐药,该菌株可能同时产生超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (ESBLs) 或 AmpC 酶,这提示 IRBLs 发展的新趋势。

**关键词:**鸭大肠杆菌;耐酶抑制剂  $\beta$ -内酰胺酶;纸片扩散法;耐药性

中图分类号:S834.1 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0119-04

## Detection of Inhibitor-resistant $\beta$ -Lactamase (IRBLs) and Analysis of Drug-resistance of Avian Pathogenic *E. coli* in Duck

GU Xiao-xia, LIU Jian-hua, HU Gong-zheng\*,  
YUAN Li, PAN Yu-shan, WANG Lei, CHEN Yu-xia

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Based on the drug-resistance characters of IRBLs, we studied the prevalence of IRBLs among 40 clinical isolates in duck. *E. coli* was studied by K-B test and the drug-resistance of IRBLs-producer to antibacterial drugs was analyzed. The results showed that 4 isolates produced IRBLs, with resistance to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, ampicillin/sulbactam, ticarcillin/clavulanic acid, florfenicol, gentamicin, neomycin, sulfadiazine and doxycycline, which suggested that IRBLs-producing isolates had emerged in China and were characterized by multidrug-resistance. Besides, two IRBLs-producing strains were susceptible to piperacillin/tazobactam, resulting from the protection of tazobactam to piperacillin. What's more, there was one IRBLs-producing strain which was resistant to the third generation cephalosporins, which explained it may also produced ESBLs or AmpC, and it implied the further development trend about IRBLs.

**Key words:** duck *E. coli*; IRBLs; K-B test; drug-resistance

随着  $\beta$ -内酰胺类抗生素与酶抑制剂 (如克拉维酸、舒巴坦、三唑巴坦) 的复合制剂在全球范围的广泛使用,于 20 世纪 90 年代初出现了耐氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸和哌拉西林/三唑巴坦

收稿日期:2009-09-30 修回日期:2009-11-12

基金项目:国家自然科学基金项目 (30771624)

作者简介:谷晓霞 (1982-),女,硕士生,主要从事抗菌药物药理研究, E-mail:guxiaoxia723@163.com; \* 通讯作者:胡功政。

的新型  $\beta$ -内酰胺酶,称为耐酶抑制剂  $\beta$ -内酰胺酶(inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamase,IRBLs),即不能被  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂抑制的  $\beta$ -内酰胺酶<sup>[1]</sup>,属于 Bush-Jacoby-Medeiros 功能分类的 2br 亚类,Am-bler 分子分类的 A 类<sup>[2]</sup>。IRBLs 以 TEM 型即 IRT 为主,SHV 型即 IRS(inhibitor-resistant SHV,IRS)较少见<sup>[3]</sup>。前者是 TEM-1、2 点突变所致并多来自 TEM-1 点突变,后者是 SHV-1 点突变所致。尚有报道<sup>[4]</sup>OXY 型者,主要是 OXY-2 点突变。IRBLs 按底物谱分为耐酶抑制剂的 TEM 衍生的  $\beta$ -内酰胺酶(IRTs)、耐酶抑制剂的广谱  $\beta$ -内酰胺酶(IRBSBLs)和耐酶抑制剂的超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(IRES-BLs)<sup>[5]</sup>。目前 IRBLs 在欧美等国中报道<sup>[6]</sup>较多,国内蒋胜等<sup>[7]</sup>报道从社区获得性感染中分离出 IRBLs 且主要分离自尿液,国内外兽医领域尚未见动物源细菌 IRBLs 的研究报道。目前尚无明确的筛选产 IRBLs 细菌的标准,常用的 ESBLs 检测方法难以检出。本研究以河南省某些地区患病鸭中所分离的大肠杆菌为研究对象,根据 Bradford 介绍的 IRBLs 的耐药特点<sup>[8]</sup>,使用纸片扩散法(K-B 法)筛选 IRBLs,并用微量肉汤法测定了其对于 20 种抗菌药的最小抑菌浓度(MIC),首次报道了鸭大肠杆菌中产 IRBLs 的检出和耐药情况,为临床上有效检测产 IRBLs 菌、合理选择抗菌药、探讨 IRBLs 菌耐药机制及研发新的抗菌药物提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株 40 株鸭大肠杆菌,分离自河南省漯河、中牟、鹤壁、商丘,经法国生物梅里埃 VITEK32 全自动细菌鉴定仪鉴定,河南农业大学药理实验室保存。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922,购自中国药品生物制品鉴定所。

1.1.2 培养基 胰蛋白胨大豆肉汤、Mueller-Hinton 肉汤、麦康凯琼脂,均为中国检验检疫科学研究院北京陆桥技术有限责任公司产品。

1.1.3 药敏纸片及药品 头孢唑啉 CZ(30  $\mu$ g/片)、头孢西丁 FOX(30  $\mu$ g/片)、哌拉西林 PIP(100  $\mu$ g/片)、氨苄西林 AM(10  $\mu$ g/片)、氨苄西林/舒巴坦 AM/SU(10  $\mu$ g/10  $\mu$ g/片)、阿莫西林/棒酸 AMX/CA(20  $\mu$ g/10  $\mu$ g/片)、替卡西林/棒酸 TIC/CA(75  $\mu$ g/10  $\mu$ g/片)、哌拉西林/三唑巴坦 PIP/TA(100  $\mu$ g/10  $\mu$ g/片)均为北京天坛药物生物技术开发公司产品。

阿莫西林、阿莫西林/棒酸、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、替卡西林/棒酸、哌拉西林、哌拉西林/三唑巴坦、乳酸环丙沙星、左氧氟沙星、磷霉素、头孢曲松钠、头孢噻肟、头孢吡肟、多西环素、阿米卡星、氟苯尼考、庆大霉素、新霉素、亚胺培南/西司他丁、黏菌素,由河南牧翔动物药业有限公司提供。

1.1.4 实验仪器 90-1 磁力搅拌器、YXQGO2 型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、DZF-6050 型真空干燥箱、微量移液器。

### 1.2 方 法

1.2.1 耐酶抑制剂  $\beta$ -内酰胺酶(IRBLs)的检测 根据 Bradford 介绍的 IRBLs 菌的耐药特点<sup>[8]</sup>,应用纸片扩散法(K-B 法)检测。在 M-H 琼脂平板上,均匀涂布受试菌液,用无菌镊子将 PIP、PIP/TA、CZ、FOX、AM、AM/SU、AMX/CA 和 TIC/CA 药敏片,依次贴于 MH 培养基上,两相邻纸片间距  $\geq 25$  mm。30 min 后,将贴好药敏片的平皿倒置于 37  $^{\circ}$ C 恒温箱,培养 16~18 h 后,用游标卡尺测量各药敏片抑菌圈的直径(mm)。参照 IRBLs 菌的耐药表型特点、耐药底物轮廓(表 1)和药敏判断标准<sup>[7-11]</sup>,其对阿莫西林、哌拉西林、替卡西林、阿莫西林/棒酸、替卡西林/棒酸耐药,对窄谱头孢菌素、7- $\alpha$ -甲氧基头孢菌素和氧亚氨基头孢菌素敏感,在大多数情况下对哌拉西林/三唑巴坦亦敏感,可以检出 87% 的产 IRBLs 大肠杆菌。大肠埃希菌 ATCC 25922 作为质控菌。

1.2.2 抗菌药物对产 IRBLs 的大肠杆菌 MIC 测定 采用微量肉汤稀释法<sup>[10]</sup>,测定阿莫西林、阿莫西林/棒酸等 21 种抗菌药的最小抑菌浓度(MIC)。标准菌株 ATCC25922 作为质控菌。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐酶抑制剂 $\beta$ -内酰胺酶(IRBLs)的检测结果

40 株鸭大肠杆菌分离株,经 K-B 纸片法检测 IRBLs 阳性株为 4 株,检出率为 10%(表 2)。

表 1 常见 IRBLs 的耐药底物轮廓<sup>[9]</sup>

Tab. 1 The outline of drug-resistance substrates of IRBLs<sup>[9]</sup>

$\beta$ -内酰胺酶 $\beta$ -Lactamase	阿莫西林 AMX	阿莫西林/克拉 维酸 AMX/CA	替卡西林 TIC	替卡西林/克拉 维酸 TIC/CA	头孢唑啉 CZ	头孢西丁 FOX
IRT	R	I/R	I/R	I/R	S/I	S
OXA 族酶 (OXA - enzyme)	R	I/R	R	I/R	S	S
TEM - 青霉素酶 (TEM - penicilase)	R	I/R <sup>a</sup>	R	S/I <sup>a</sup> / R <sup>a</sup>	S/ I <sup>a</sup>	S
头孢菌素酶 <sup>b</sup> (Cephalosporinase)	I/R	I/R	S/I	S/I	I/R	I/R

S:敏感 (susceptible); R:耐药 (resistance); I:中介 (intermediate); a:高产青霉素酶 (hypsi - penicilase); b:高产头孢菌素酶 (hypsi - cephalosporinase)。

表 2 鸭大肠杆菌 IRBLs 检出结果

Tab. 2 The results of IRBLs-producing of duck

	头孢唑啉 CZ	头孢西丁 FOX	哌拉西林 PIP	哌拉西林/ 他唑巴坦 PIP/TA	氨苄西林 AM	氨苄西林/ 舒巴坦 AM/SU	阿莫西林/ 棒酸 AMX/CA	替卡西林/ 棒酸 TIC/CA
LA20	19	22	22	39	0	13	14	18
L19	18	24	15	20	0	16	15	18
L18	17	23	13	17	0	13	18	18
L16	19	20	20	21	10	16	14	19

### 2.2 抗菌活性 (MIC) 测定结果

20 种抗菌药物对 4 株产 IRBLs 鸭大肠杆菌的抗菌活性 (MIC) 测定结果见表 3。结果表明 4 株产 IRBLs 鸭大肠杆菌对阿莫西林、氨苄西林高度耐药,加入酶抑制剂棒酸或舒巴坦后,复方药物和单药相比 MIC 值降低不多,细菌仍然耐药,对替卡西林/棒酸也耐药。有 2 株产 IRBLs 菌对哌拉西林耐药,加入三唑巴坦后,其复方对 1 株耐药株的 MIC 值降低 8 倍,对 2 株敏感株的 MIC 值降低 4 倍,这与 K-B 纸片法检测结果一致。有 3 株产 IRBLs 鸭大肠杆菌 (L16、L18、L19) 对左氧氟沙星、环丙沙星、头孢噻肟、头孢曲松敏感,1 株 (LA20) 对这 4 种抗菌药均耐药;4 株产 IRBLs 鸭大肠杆菌均对头孢吡肟、阿米卡星、磷霉素、亚胺培南/西司他丁、黏菌素敏感;对氟苯尼考、庆大霉素、新霉素耐药;对多西环素中介或耐药。

表 3 21 种抗菌药物对 4 株产 IRBLs 鸭大肠杆菌的 MIC 测定结果

Tab. 3 MIC values of 4 IRBLs-producing *E. coli* for 21 antimicrobial drugs

	LA20	L19	L18	L16		LA20	L19	L18	L16
阿莫西林 AMX	>128	>128	>128	>128	头孢噻肟 CTX	128	0.5	0.25	0.25
氨苄西林 AM	128	>128	>128	>128	多西环素 DOX	16	16	16	8
黏菌素 PB	0.125	<0.062 5	<0.062 5	0.25	阿米卡星 AK	4	1	1	0.5
哌拉西林 PIP	16	>128	>128	16	磷霉素 FO	2	4	2	2
替卡西林/棒酸 TIC/CA	4	16	128	4	庆大霉素 GM	16	8	16	2
左氧氟沙星 LEV	128	1	1	1	新霉素 NM	16	8	16	16
环丙沙星 CIP	128	1	0.5	1	氟苯尼考 FLO	>128	64	128	64
头孢曲松 CRO	>128	0.25	0.25	0.25	头孢吡肟 CPM	8	<0.062 5	<0.062 5	<0.062 5
阿莫西林/棒酸 AMX/CA	>128	>128	>128	>128	亚胺培南/西司他丁 IPM	0.25	0.25	0.25	0.25
氨苄西林/舒巴坦 AM/SU	32	64	64	64	哌拉西林/他唑巴坦 PIP/TA	4	16	128	4

## 3 讨论

IRBLs 菌株的出现,与临床上大量使用酶抑制剂复合制剂有关,自从它被发现以来,作为一种新的  $\beta$ -内酰胺酶已经被确立,并且被广泛研究<sup>[12]</sup>。它的出现,给致病菌  $\beta$ -内酰胺酶的检测带来了复杂性,也使得  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的抑制活性大大削减,同时也增加了兽医临床抗感染治疗的难度,使抗感染治疗面临新的挑战。

产 IRBLs 菌主要产生于肠杆菌科,尤以大肠埃希菌最多,少见于奇异变形杆菌、肺炎克雷伯菌、产酸

克雷伯菌、索氏志贺菌和阴沟肠杆菌。本文检测的 IRBLs 均为肠杆菌科,与相关文献报道的一致<sup>[13]</sup>。本实验鸭大肠杆菌中 IRBLs 的检出率为 10%,检出率不高,这说明 IRBLs 在兽医临床上还未大面积流行,我们应该防患于未然,加强对 IRBLs 的检测,合理选用抗生素。此外,IRBLs 的出现表明细菌在抗菌药物选择压力下产生了新的耐药机制,细菌并不限于依赖产生 IRBLs,还可以通过多种机制获得耐酶抑制剂表型,从而对更为广谱的  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药<sup>[7]</sup>。此实验仅仅是从耐药表型上检测 IRBLs,要确定其特性还需做等电点、酶活性、动力学参数的测定以及分子生物学试验。值得进一步关注 IRBLs 的世界性分布、进化趋势以及寻找更准确快速的检测 IRBLs 方法。

本实验表明:产 IRBLs 的鸭大肠杆菌,对阿莫西林、氨苄西林、阿莫西林/棒酸、替卡西林/棒酸、氨苄西林/舒巴坦耐药,这与 Bradford<sup>[8]</sup>介绍的 IRBLs 的耐药表型一致。哌拉西林与阿莫西林和替卡西林相比,敏感性较高,只有 2 株耐药,这可能和哌拉西林本身固有的对产 IRBLs 菌株的高度活性有关。在产 IRBLs 细菌中,有 2 株对哌拉西林/三唑巴坦仍然敏感,这与三唑巴坦的保护作用有关。IRBLs 产生菌对不同酶抑制剂的复合制剂敏感性不同,说明了 IRBLs 对酶抑制剂舒巴坦、棒酸、三唑巴坦的作用有一定的差异。另外,本实验检出的产 IRBLs 菌表现出多重耐药的特点,应引起我们高度关注。从实验结果还可看出,有 1 株产 IRBLs 菌(LA20)对第三代头孢菌素头孢曲松、头孢噻肟耐药,表明该酶可能同时产生 ESBLs 酶或 AmpC 酶。Sirot D 等<sup>[14]</sup>曾报道 TEM-50 酶同时具有 IRT $\beta$ -内酰胺酶和 ESBLs 的特征,是由于 TEM 酶突变而导致的复杂 TEM 变异体所致。ESBLs 酶的表型特征为对第三代头孢菌素及单环酰胺类抗生素耐药,AmpC 酶对第三代头孢耐药且对  $\beta$ -内酰胺类抗生素/酶抑制剂复合物也耐药,因此此菌株可能同时产 ESBLs 酶或 AmpC 酶,这与临床上广泛使用酶抑制剂复合制剂及对三代头孢的不规范使用有关。随着酶抑制剂和超广谱头孢菌素的广泛使用,该类酶甚至耐酶抑制剂的超广谱  $\beta$ -内酰胺酶会不断出现,这也提示了演变发展的新趋向。

#### 参考文献:

- [1] 魏泽庆. 酶抑制剂耐药的  $\beta$ -内酰胺酶研究进展[J]. 国外医学流行病学:传染病学分册, 2002, 29(3):144-146.
- [2] Bush K, Jacoby G A, Medeiros A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39:1211.
- [3] Perez M O, Perez-Moreno M, Carulla M, et al. Mechanism of reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in *Escherichia coli* strains from the health region of Tortosa (Catalonia, Spain)[J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10:234.
- [4] Sirot D, Labia R, Pouedras P, et al. Inhibitor-resistant OXY-2-derived  $\beta$ -lactamase produced by *Klebsiella oxytoca*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(9):2184-2187.
- [5] 明德松, 吴一波, 谢尊金. 单纯产耐酶抑制剂  $\beta$ -内酰胺酶菌的检测及其耐药性分析[J]. 世界感染杂志, 2004, 4(1):44-45.
- [6] Kaye K S, Gold H S, Schwaber M J, et al. Variety of beta-lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the northeastern United States[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(5):1520-1525.
- [7] 蒋胜, 吕晓菊, 刘凯. 耐酶抑制剂  $\beta$ -内酰胺酶的研究现状[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(4):193-197.
- [8] Bradford P A. Extended-spectrum beta-lactamase in the 21<sup>st</sup> century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4):933-951.
- [9] Chaibi E B, Sirot D, Paul G, et al. Inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamase: Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics[J]. J Antimicrob Chemother, 1999, 43:44.
- [10] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Approved Standard M100-S18[S]. CLSI, Wayne, PA, USA, 2007.
- [11] CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard-third edition[S]. CLSI document M31-A3, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [12] 李金钟. 耐酶抑制剂  $\beta$ -内酰胺酶研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8):720-722.
- [13] Aroin C, Labia R, Dubois V, et al. TEM-80, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase in a clinical isolate of enterobacter cloacae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(5):1183-1189.
- [14] Sirot D, Chanal C, Bonnet R, et al. Inhibitor-resistant TEM-33 beta-lactamase in a *Shigella sonnei* isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7):2179-2180.