

五种抗生素联合应用对大肠杆菌抗菌效果实验

杜冬冬,王涛,常维山

(山东农业大学动物科技学院,山东泰安 271018)

[收稿日期] 2011-11-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2012) 06-0014-03 [中图分类号] S852.61

[摘要] 研究亚胺培南与头孢曲松钠、亚胺培南与头孢噻肟钠、丁胺卡那与痢菌净在体外联合应用对于大肠杆菌 ATCC25922 的抗菌效果。测定各种药物对于大肠杆菌 ATCC25922 的最小抑菌浓度,应用棋盘微量稀释法测定亚胺培南与头孢曲松钠、亚胺培南与头孢噻肟钠、丁胺卡那与痢菌净对大肠杆菌 ATCC25922 的抑菌效果。结果显示,亚胺培南与头孢曲松钠、亚胺培南与头孢噻肟钠、丁胺卡那与痢菌净联合应用对大肠杆菌 ATCC25922 呈现协同作用。亚胺培南与头孢曲松钠、亚胺培南与头孢噻肟钠、丁胺卡那与痢菌净的联合应用大大减少了药物用量,提高了药物效果,为临床用药提供理论支持。

[关键词] 大肠杆菌;联合用药;棋盘微量稀释法;耐药性

Antibacterial Effect of Five Antibiotics Combined Application on *Escherichia coli*

DU Dong-dong, WANG Tao, CHANG Wei-shan

(Animal Scientific Department of Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: The combined antibacterial effects of imipenem and ceftriaxone sodium, imipenem and cefotaxime sodium, amikacin and mequindox on *Escherichia coli* ATCC25922 *in vitro* were studied. Firstly the minimal inhibitory concentration of these medicines against *Escherichia coli* ATCC25922 was determined. The antibacterial effects of imipenem and ceftriaxone sodium, imipenem and cefotaxime sodium, amikacin and mequindox were determined by chessboard micro-dilution method. The results showed that the combined application of imipenem and ceftriaxone sodium, imipenem and cefotaxime sodium, amikacin and mequindox on *Escherichia coli* ATCC25922 had synergistic effect. The combined application of imipenem and ceftriaxone sodium, imipenem and cefotaxime sodium, amikacin and mequindox reduced dosage of the drugs and improved curative effect, the study provided theoretical support for clinical medication.

Key words: *Escherichia coli*; drug combination; chessboard micro-dilution method; resistance

药物滥用导致大肠杆菌等细菌的耐药性是影响畜牧业健康发展的主要原因,如何减少细菌耐药性,已经成为人们越来越关心的话题。着眼于目前养殖行业的实际情况,新兽药的研发和合理用药是解决目前问题的关键,但是兽药研发周期长,合理用药是目前最适合的方法。两种或两种以上抗生素药物配伍时,可发生两种截然不同的效果。作用

相加或协同,疗效增强对治疗大有裨益,临床宜多用;作用拮抗,疗效降低或毒性增强,对治疗颇为有害,临床禁用^[1]。试验选取的亚胺培南、头孢曲松钠、头孢噻肟钠均属于 β -内酰胺类,其作用机理为抑制细菌细胞壁的合成,是繁殖期杀菌剂^[2];阿米卡星,又名丁胺卡那霉素,是半合成的氨基糖苷类抗生素,其作用机理是抑制细菌蛋白质的合

作者简介:杜冬冬,兽医硕士,从事细菌分子生物学研究。

通讯作者:常维山。E-mail: wschang@sdau.edu.cn

成^[2];痢菌净,又名乙酰甲喹,其作用机制是抑制细菌的 DNA 合成^[2]。亚胺培南抗菌谱最广,抗菌作用最强,是对 β -内酰胺酶高度稳定的一种 β -内酰胺类抗生素^[3]。本试验旨在研究亚胺培南与头孢曲松钠、亚胺培南与头孢噻肟钠联用后对大肠杆菌的抗菌活性及联合效果,从而为临床用药提供指导^[4-5]。痢菌净为临床常用药,但其治疗剂量接近中毒剂量,临床应用易中毒。研究丁胺卡那与痢菌净联合应用对大肠杆菌的抑菌效果,从而确定两种药物联用是否可以降低痢菌净的用量。通过联合用药以减少细菌耐药性和药物用量,具有实际应用价值。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 抗菌药物 亚胺培南(含量 50%,批号 10007) 韩国中外制药株式会社;头孢曲松钠(含量 98%,批号 100723) 上海新亚药业有限公司;痢菌净(含量 98.5%,批号 060509) 成都华康动物药业有限公司;头孢噻肟钠(含量 97.5%,批号 100201) 上海新先锋药业有限公司;丁胺卡那(含量 96%,批号 100716) 上海新亚药业有限公司。

1.1.2 试验菌株 大肠杆菌(ATCC25922) 南京便诊生物科技有限公司。

1.1.3 培养基 Muller-Hinton(MH)肉汤和 Muller-Hinton(MH)琼脂培养基,美国 Difco 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 稀释药物 无菌精确称取亚胺培南、头孢曲松钠、头孢噻肟钠、丁胺卡那、痢菌净,用无菌蒸馏水溶解并稀释成 2048 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,于 -20°C 保存^[6]。

1.2.2 菌悬液的制备 从过夜培养的琼脂培养基平板上挑取 3 个菌落,接种于 MH 肉汤中增菌 6 h。以平板计数法进行细菌计数后,用 MH 肉汤稀释 1.5×10^5 CFU/mL^[7]。

1.2.3 最小抑菌浓度的测定(MIC) 参照微量肉汤稀释法测定各抗生素单用的最小抑菌浓度(MIC)。将亚胺培南、头孢曲松钠、头孢噻肟钠、丁胺卡那、痢菌净等 5 种抗菌药物以灭菌 MH 肉汤倍比稀释成 23 个浓度,分别为 2048、1024……0.0005 $\mu\text{g/mL}$,分别取 100 μL 依次加入 96 孔板,再将 1.5×10^5 CFU/mL 菌液 100 μL 加入孔中, 37°C 过夜培养,观察结果,以无菌生长的最低浓度

为该药单用最小抑菌浓度 MIC^[8-10]。

1.2.4 亚胺培南与头孢曲松钠药物联合应用对大肠杆菌 ATCC25922 的 FIC 指数测定 将亚胺培南和头孢曲松钠分别用灭菌 MH 肉汤倍比稀释,按棋盘法设计两两组合加入一次性 96 孔板至第 11 列、第 7 行(第 12 列和第 8 行为空白对照)。根据最小抑菌浓度的测定,使最高浓度为单药 MIC 的 2 倍。抗菌药物按浓度梯度各取 50 μL ,再加入 1.5×10^5 CFU/mL 菌液 100 μL , 37°C 过夜培养,观察结果,选择两药联合应用 FIC 指数最小时作为两种药物的最佳组合,并且以该 FIC 指数判定两种药物联合应用时的效果。亚胺培南与头孢噻肟钠、丁胺卡那与痢菌净 FIC 指数测定试验方法同上。

1.2.5 判断标准 FIC 指数 = (MIC 甲药联用 / MIC 甲药单用) + (MIC 乙药联用 / MIC 乙药单用)。FIC 指数 ≤ 0.5 ,为协同作用;FIC 指数在 0.5 ~ 1 范围,为相加作用;FIC 指数在 1 ~ 2 范围,为无关作用;FIC 指数 > 2 ,为拮抗作用。

2 结果及分析

2.1 亚胺培南与头孢曲松钠 MIC 试验结果 亚胺培南、头孢曲松钠、头孢噻肟钠、丁胺卡那、痢菌净等 5 种抗菌药物对大肠杆菌 ATCC25922 体外最小抑菌浓度如表 1 所示,可以看到亚胺培南对大肠杆菌 ATCC25922 最小抑菌浓度最小,这说明了亚胺培南具有很强的抗菌能力。本次试验着重研究了亚胺培南与头孢曲松钠、亚胺培南与头孢噻肟钠联合抗菌效果。

表 1 五种药物对大肠杆菌 ATCC25922 的 MIC 结果 $\mu\text{g/mL}$

| 菌株 | 亚胺培南 | 头孢曲松钠 | 头孢噻肟钠 | 丁胺卡那 | 痢菌净 |
|----------------|-------|-------|-------|------|-----|
| 大肠杆菌 ATCC25922 | 0.125 | 64 | 16 | 8 | 16 |

2.2 亚胺培南与头孢曲松钠联合应用对大肠杆菌 ATCC25922 试验结果 如表 2 所示,亚胺培南与头孢曲松钠联合应用 FIC 指数小于 0.5,两药联用呈现协同效果。亚胺培南与头孢曲松钠联合应用使两药分别增效 8 倍与 16 倍。

表 2 亚胺培南与头孢曲松钠联合应用 FIC 值

| 抗生素 | 单用 MIC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 联用 MIC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 增效倍数 | FIC |
|-------|--|--|------|--------|
| 头孢曲松钠 | 64 | 4 | 16 | 0.1875 |
| 亚胺培南 | 0.125 | 0.0156 | 8 | 0.1875 |

2.3 亚胺培南与头孢噻肟钠联合应用对大肠杆菌 ATCC25922 试验结果 亚胺培南与头孢噻肟钠联合应用 FIC 值为 0.5,说明两药呈现协同作用(表 3 所示)。头孢噻肟钠为繁殖期抑菌剂,与亚胺培南联用其效果增强 4 倍,大大减少了药物用量,提高了药物效果。

表 3 亚胺培南与头孢噻肟钠联合应用 FIC 值

| 抗生素 | 单用 MIC /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 联用 MIC /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 增效倍数 | FIC |
|-------|---|---|------|-----|
| 头孢噻肟钠 | 16 | 4 | 4 | 0.5 |
| 亚胺培南 | 0.125 | 0.0313 | 4 | 0.5 |

2.4 丁胺卡那与痢菌净联合应用对大肠杆菌 ATCC25922 试验结果 痢菌净是价格便宜、抗菌效果好的药物,然而其毒性较强,临床应用治疗量与药物中毒量非常接近。痢菌净应用中是在养殖中经常出现的问题,与丁胺卡那联合应用可以减少用药量,提高药物效果。如表 4 所示,丁胺卡那与痢菌净联合应用 FIC 值小于 0.5,呈现协同作用,可以使痢菌净在原有治疗效果上大大减少用药量。

表 4 丁胺卡那与痢菌净联合应用 FIC 值

| 抗生素 | 单用 MIC /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 联用 MIC /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 增效倍数 | FIC |
|------|---|---|------|--------|
| 丁胺卡那 | 8 | 0.25 | 32 | 0.0937 |
| 痢菌净 | 16 | 1 | 16 | 0.0937 |

3 讨论

近年来大肠杆菌耐药性日趋严重,药物预防和治疗用量逐年增加^[11]。为减少细菌耐药性和降低药物用量,联合用药是目前有效的解决方法。应用棋盘微量稀释法选取亚胺培南与头孢曲松钠、亚胺培南与头孢噻肟钠、丁胺卡那与痢菌净联合应用,研究其对大肠杆菌的抗菌效果。试验结果显示亚胺培南与头孢曲松钠、亚胺培南与头孢噻肟钠、丁胺卡那与痢菌净联合应用均呈现协同作用。亚胺培南单用时其 MIC 为 $0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$,与头孢曲松钠联合应用时 MIC 为 $0.0156 \mu\text{g}/\text{mL}$,其 MIC 值降低至原用药量的 1/8;亚胺培南与头孢噻肟钠联合应用时亚胺培南 MIC 值为 $0.0313 \mu\text{g}/\text{mL}$,其 MIC 值

降低至原用药量的 1/4,同时亚胺培南与头孢曲松钠联合应用使头孢曲松钠增效 16 倍,而亚胺培南与头孢噻肟钠联合应用使头孢噻肟钠增效 4 倍。这说明相同类型的药物与亚胺培南联合应用增效倍数不同,是由于这两种药物与细菌的相互作用机制不同所导致。

痢菌净单用时 MIC 值为 $16 \mu\text{g}/\text{mL}$,与丁胺卡那联合应用时 MIC 值为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$,其 MIC 值降低至原用药量的 1/16。痢菌净在临床用药时可以通过与丁胺卡那联合应用降低其药物用量,从而使其用量可以远远低于其中毒剂量。

总之,这几种药物联合应用不但可以减少用药量,并且可以降低细菌耐药性的产生,从而降低用药成本、减少药物残留。

参考文献:

- [1] 杨汉春,陈声,吴清明,等.鸡源性大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的多重耐药性[J].畜牧兽医学报,2003,34(4):398-404.
- [2] 陈杖榴.兽医药理学[M].北京:中国农业出版社,2002:220-250.
- [3] 肖华平,黄忍.阿莫西林与阿米卡星对沙门氏菌的体外联合药敏试验[J].中国兽药杂志,2006,40(9):34-36.
- [4] Johnson V M, Allanson J P, Causon R C. Determination of the cephalosporin antibiotic cephradine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. Chromatogr B Biome Sci Appl, 2000, 740(1):71-80.
- [5] 王祥领,余自成. β -内酰胺类和大环内酯类抗生素的联合应用[J].世界临床药物,2007,28(7):390.
- [6] 戴自英.实用抗菌药理学[M].上海:上海科学技术出版社,1992:7-11.
- [7] 俞树荣.微生物学和微生物学检验[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1997:27-28.
- [8] Soback S, Ziv G, Kurta B *et al*. Clinical pharmacokinetics of five oral cephalosporins in calves[J]. Res Vet Sci, 1987, 43(2):166-172.
- [9] 殷凯生,殷民生.实用抗感染药物手册[M].北京:人民卫生出版社,2002:201.
- [10] 桂炳东,孙敬,徐建民,等.细菌药物敏感性试验测定手册[M].南昌:江西科学技术出版社,2001.
- [11] 马越,姚蕾,陈鸿波,等.临床常见细菌的耐药性问题[J].中国抗生素杂志,2002,27(3):129.