

磷霉素联合碳青霉烯类抗尿路感染耐药铜绿假单胞菌的体外协同作用研究^Δ

孙凤军^{1*},熊志坚²,冯伟¹,孙艺璇¹,夏培元^{1#}(1.第三军医大学第一附属医院药剂科,重庆 400038;2.八一电影制片厂门诊部,北京 100073)

中图分类号 R969.3;R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)20-2765-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.20.09

摘要 目的:探讨磷霉素(FOS)联合碳青霉烯类抗尿路感染耐药铜绿假单胞菌的体外协同作用。方法:采用琼脂平板倍比稀释法检测耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度,棋盘法测定其联合抑菌浓度指数,96孔板结晶紫法考察FOS与碳青霉烯类联用对其生物膜的影响。结果:12株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌对FOS及阿米卡星的敏感性较高,对亚胺培南和美罗培南的耐药率均达100%。FOS与亚胺培南联用时,4株(33.3%)为协同作用;FOS与美罗培南联用时,5株(41.7%)为协同作用;均未出现拮抗作用。FOS和碳青霉烯类联用对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的生物膜均有抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:FOS联合碳青霉烯类对部分耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌具体外协同作用,其机制可能与抑制细菌生物膜有关。

关键词 耐药铜绿假单胞菌;磷霉素;碳青霉烯类;尿路感染;协同作用

Synergistic Effect of Fosfomycin Combined with Carbapenems against Drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Urinary Tract Infections *in vitro*

SUN Fengjun¹, XIONG Zhijian², FENG Wei¹, SUN Yixuan¹, XIA Peiyuan¹(1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2.Outpatient Department, August First Film Studio, Beijing 100073, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate synergistic effect of carbapenems combined with fosfomycin (FOS) on carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections *in vitro*. METHODS: The minimum inhibitory concentration was detected using agar double dilution method. The fractional inhibitory concentration index was determined by checkerboard method. The effect of carbapenems combined with FOS on biofilm of *P. aeruginosa* isolates was determined using 96 crystal violet staining. RESULTS: 12 strains of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates were highly sensitive to FOS and amikacin, and were completely resistant to imipenem and meropenem. The combination of imipenem with FOS could induce a synergistic effect on 4 strains (33.3%); meropenem combined with FOS could induce a synergistic effect on 5 strains (41.7%); no antagonistic effect of carbapenems combined with FOS appeared. FOS combined with carbapenems could inhibit the biofilm of carbapenems-resistant *P. aeruginosa* ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: The combination of carbapenems with FOS possesses *in vitro* synergistic antibacterial effect on part of carbapenems-resistant *P. aeruginosa* isolates, the mechanism of which may be associated with inhibiting the biofilm.

KEYWORDS *Pseudomonas aeruginosa*; Fosfomycin; Carbapenems; Urinary tract infection; Synergistic effect

随着抗菌药物的广泛应用,细菌对抗菌药物的耐药率迅速增高,尤其是与细菌生物膜相关的感染,其耐药性较高^[1]。铜绿假单胞菌既可形成生物膜,其浮游菌的耐药性也不断增强其临床治疗也逐渐成为困扰医师的难题。由于氨基糖苷类抗菌药物具有较高的肾毒性,喹诺酮类抗菌药物会导致过敏及骨质疏松等不良反应,以碳青霉烯类为首的 β -内酰胺类抗菌药物成为治疗铜绿假单胞菌的首选,但是由于 β -内酰胺酶传播迅速,近年来铜绿假单胞菌对碳青霉烯类的耐药率持续上升,临床将面临无药可用的情况^[2-3]。磷霉素(Fosfomycin, FOS)是一种天然抗菌药物,可抑制细菌细胞壁的合成,破坏细胞壁的完整性,有利于协助其他抗菌药物进入细菌体内,以起到杀菌

的作用,临床主要用于敏感的革兰氏阴性菌引起的尿路、皮肤及软组织、肠道等部位的感染。国内外均有研究表明,磷霉素与氨基糖苷类、喹诺酮类药物联合应用对铜绿假单胞菌具有协同抗菌作用,且对其生物膜形成的抑制具有显著增效作用^[4-5]。因此,本研究在已有文献的基础上,以从临床送检的尿液标本中分离出的耐药铜绿假单胞菌为研究对象,从最低抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)、联合抑菌浓度指数(Fractional inhibitory concentration index, FICI)及细菌生物膜3个方面探讨FOS与碳青霉烯类的联合作用效果,为临床治疗耐药铜绿假单胞菌引起的尿路感染提供理论依据。

1 材料

1.1 菌株来源

12株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌(P1~P12)来源于我院尿路感染患者送检的尿液标本。质控菌株铜绿假单胞菌(ATCC 27853)由国家卫生计生委临床检验中心提供。

1.2 仪器

VITEK-2型全自动细菌分析仪(法国生物梅里埃公司);

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373451)

* 主管药师。研究方向:细菌耐药及致病机制。电话:023-68765991。E-mail: fengj_sun@163.com

通信作者:主任药师,教授,博士生导师。研究方向:细菌耐药及感染防治。电话:023-68754438。E-mail: peiyuan_xia2013@163.com

Multiskan 型酶标仪(芬兰 Thermo Fisher Scientific 公司); MIP-P 型多点接种仪(日本佐久间公司)。

1.3 药品与试剂

美罗培南[Meropenem(MEM),批号:130506-201403,纯度:100%]、阿米卡星(批号:130335-200204,纯度:98%)、氨基青(批号:130507-201102,纯度:95.5%)、头孢吡肟(批号:130524-201404,纯度 \geq 98%)、头孢他啶(批号:130484-201205,纯度:85.7%)、头孢哌酮(批号:130420-200304,纯度:96.5%)、庆大霉素(批号:130326-201015,纯度:99.9%)、妥布霉素(批号:130527-200402,纯度:91.4%)、环丙沙星(批号:130451-201203,纯度:84.2%)、左氧氟沙星(批号:130455-201106,纯度:97.1%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;亚胺培南[Imipenem(IMP),批号:64221-86-9,纯度:98%]、FOS(批号:23519-26-8,纯度 $>$ 98%)对照品均购自美国 Sigma 公司。

哥伦比亚血琼脂平板(重庆庞通公司,批号:15A2202); M-H 琼脂培养基(北京陆桥生物技术有限公司,批号:1302051); 自制 LB 培养基[含胰蛋白胨(英国 Oxoid 公司,批号:969801)、酵母提取物(英国 Oxoid 公司,批号:1213550-2)及氯化钠(重庆川东化工有限公司,批号:20110901)]。

1.4 方法

1.4.1 细菌培养与鉴定 铜绿假单胞菌的分离培养严格按照《全国临床检验操作规程》的常规技术进行操作,采用 VITEK-2 型全自动细菌分析仪进行鉴定。

1.4.2 MIC 的测定 以铜绿假单胞菌 ATCC 27853 为质控菌株,采用琼脂平板倍比稀释法测定 MIC^[6]。将菌株划线接种于哥伦比亚血琼脂平板上,37℃培养过夜。挑取菌落于 3~5 ml 生理盐水中,校正菌液浓度至 0.5 麦氏浊度单位(约 1.5×10^8 CFU/ml); 抗菌药物用无菌生理盐水按 2 倍比稀释成不同质量浓度。用多点接种仪将菌液接种至含不同质量浓度药物的 M-H 琼脂培养基中,于 37℃培养 16~20 h,观察结果。MIC 结果按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2010 年版标准判读,以肉眼观察无细菌生长的最低药物质量浓度为 MIC。

1.4.3 FICI 的测定与判断标准 采用棋盘法^[7]测定 FICI,分析抗菌药物的体外协同作用。FICI=碳青霉烯类联用时的 MIC/碳青霉烯类单独使用时的 MIC+FOS 联用时的 MIC/FOS 单独使用时的 MIC。判断标准为:FICI \leq 0.5,为协同作用;0.5<FICI \leq 4.0,为无关作用;FICI $>$ 4.0,为拮抗作用^[8]。

1.4.4 FOS 联合碳青霉烯类对耐药铜绿假单胞菌生物膜的影响 参考文献^[9]采用 96 孔板结晶紫染色法。将菌株培养物稀释至 0.5 麦氏浊度单位,再用 LB 培养基稀释 100 倍。试验分为 IMP 处理组、MEM 处理组、IMP+FOS 处理组、MEM+FOS 处理组、空白对照组及 LB 空白组,每组设置 3 个复孔。除 LB 空白组(只加 LB 培养基 200 μ l)外,其余各组均在 96 孔板中加入菌液 200 μ l,各组均于 37℃培养 24 h 后,轻轻吸除浮游菌,用无菌的磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.2)冲洗 3 次。然后,IMP 处理组、MEM 处理组、IMP+FOS 处理组及 MEM+FOS 处理组分别于各孔中加入相应的抗菌药物 200 μ l,使其最终质量浓度为 2 \times MIC^[10];空白对照组和 LB 空白组加入 LB 培养基 200 μ l,各组均于 37℃培养 24 h 后,用 PBS 冲洗去除浮游菌,置通风阴凉处进行风干。然后用 1% 结晶紫溶液染色,用水冲洗 3 次后再次倒置风干。最后,于各孔中加入 30% 冰醋酸溶液 100 μ l,采用酶标仪在 590 nm 处测定吸光度值(OD 值)。各组细菌生物膜的 OD 值=各组的平均 OD 值-LB 空白组的平均 OD 值。

1.4.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件处理所得数据。铜绿假单胞菌生物膜数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,抗菌药物对细菌生物膜影响的组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIC 的测定结果

12 株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌除对 FOS 及阿米卡星敏感性较高外,对其他抗菌药物均具有较高的耐药性,其中对 IPM、MEM、头孢哌酮、环丙沙星及左氧氟沙星的耐药率分别达到 100%、100%、66.7%、66.7% 和 66.7%。耐药铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药性见表 1。

表 1 耐药铜绿假单胞菌对常见抗菌药物的耐药性

Tab 1 Resistance of drug-resistant *P. aeruginosa* to common antimicrobial agents

抗菌药物	耐药标准 ^① , μ g/ml	耐药率, %	MIC, μ g/ml											
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
阿米卡星	≥ 64	25.0	2	16	4	1	8	16	0.5	8	128	256	8	256
氨基青	≥ 32	58.3	64	32	128	< 0.25	16	4	4	64	64	64	16	64
头孢吡肟	≥ 32	41.7	64	4	16	2	8	32	0.25	4	16	128	32	128
头孢他啶	≥ 32	50.0	8	4	128	0.5	32	64	0.5	8	16	256	64	128
头孢哌酮	≥ 64	66.7	64	16	256	2	64	> 256	1	32	64	> 256	256	> 256
庆大霉素	≥ 16	41.7	32	2	2	32	8	4	0.5	4	32	64	2	64
妥布霉素	≥ 16	41.7	32	2	1	16	4	4	0.5	4	16	64	4	64
环丙沙星	≥ 4	66.7	32	1	16	8	0.5	1	4	1	16	8	16	4
左氧氟沙星	≥ 8	66.7	64	2	32	16	1	2	8	4	32	16	32	8
IPM	≥ 16	100	16	64	128	32	16	64	16	32	32	128	256	128
MEM	≥ 16	100	32	64	128	64	16	128	16	64	32	256	128	128
FOS	≥ 256	16.7	16	128	32	4	64	256	128	16	64	> 256	4	64

2.2 FOS 和碳青霉烯类联用的 FICI 测定结果

FOS 与 IMP 联用时,12 株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌中有 4 株菌株为协同作用,占 33.3%;FOS 与 MEM 联用时,5 株菌株为协同作用,占 41.7%;均未出现拮抗作用。FOS 和碳青霉烯类联用的 FICI 分布见表 2。

表 2 FOS 和碳青霉烯类联用的 FICI 分布[株(%)]

Tab 2 FICI distribution of FOS combined with carbapenems [stain(%)]

抗菌药物联用	协同作用	无关作用	拮抗作用
FOS+IMP	4(33.3)	8(66.7)	0(0)
FOS+MEM	5(41.7)	7(58.3)	0(0)

2.3 FOS 联合碳青霉烯类对耐药铜绿假单胞菌生物膜的影响

IPM 和 MEM 均能抑制铜绿假单胞菌成熟生物膜。与空白对照组比较,IPM 处理组耐药铜绿假单胞菌生物膜减低了 8%~19%,联合使用 FOS 后其生物膜减低了 18%~49%,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与空白对照组比较,MEM 处理组耐药铜绿假单胞菌生物膜减低了 10%~21%,联合使用 FOS 后其生物膜减低了 24%~50%,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示 FOS 联合碳青霉烯类对耐药铜绿假单胞菌生物膜有一定的抑制作用。FOS 联合碳青霉烯类对耐药铜绿假单胞菌生物膜的影响见图 1。

3 讨论

铜绿假单胞菌是复杂尿路感染常见的致病菌之一,其感染可增加患者的病死率^[12]。由铜绿假单胞菌敏感菌株引起的尿路感染患者的病死率为 23%,而由多重耐药菌株引起的病死率高达 67%^[13]。近年来,由于广谱抗菌药物的广泛使用及复杂尿路感染患者的增多,导致铜绿假单胞菌的分离率逐年增高,且多重耐药铜绿假单胞菌的出现给尿路感染患者的治疗带来了巨大挑战。本研究结果显示,我院尿液标本中检出的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌对大多数抗菌药物具有较高的耐药性,而对 FOS 和阿米卡星具有较高的敏感性,其原因可能是由于这两种药物在我院临床使用较少,提示临床应根据药敏结果慎重选择抗菌药物。

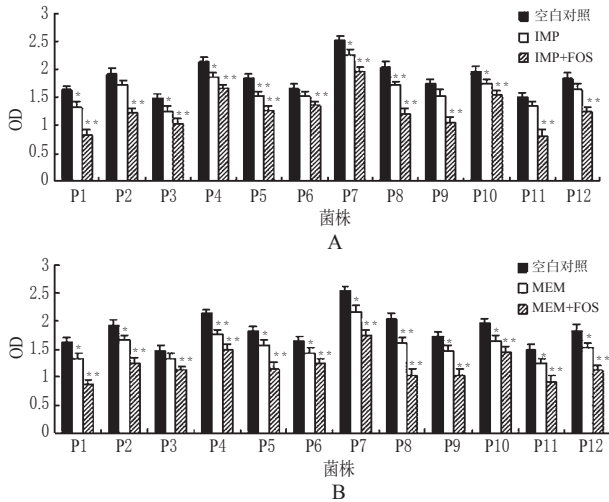


图1 FOS联合碳青霉烯类对耐药铜绿假单胞菌生物膜的影响
A.IMP;B.MEM

注:与空白对照组相比: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig 1 Effect of FOS combined with carbapenems on biofilm of drug-resistant *P. aeruginosa*
A.IMP; B.MEM

Note: vs. blank control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

FOS作为一种广谱抗菌药物,临床上主要用于治疗敏感菌引起的轻、中度感染,由于FOS与其他抗菌药物无交叉耐药性,且具有良好的协同作用,故中度以上尤其是重度感染应选择FOS与其他抗菌药物联合使用的方式^[14]。碳青霉烯类抗菌药物因其极强的抗菌活性是目前治疗铜绿假单胞菌感染最好的药物之一。虽然厄他培南、比阿培南等碳青霉烯类均具有较优的抗菌活性,由于我院临床上仅使用IMP和MEM,为了更好地指导临床医师合理使用抗菌药物,故本研究仅选择这两种抗菌药物与FOS联合用药,考察其体外协同作用。本研究表明,FOS与碳青霉烯类抗菌药物联合应用对13的耐药铜绿假单胞菌具有协同作用,其余为无关作用,未出现拮抗作用,与国外的报道相似^[15],这表明抗菌药物的联合应用对耐药铜绿假单胞菌的抑制作用显著优于单一抗菌药物,提示对于多重耐药铜绿假单胞菌引起的尿路感染,在没有敏感药物进行治疗的情况下,可选择FOS与碳青霉烯类药物联合治疗。

铜绿假单胞菌对碳青霉烯类耐药的一个重要原因是由于细菌外层细胞壁的特异外膜通道蛋白(OprD)丢失,造成细胞壁具有低渗透性,使碳青霉烯类抗菌药物无法进入细菌体内,从而导致细菌对此类药物耐药^[15]。而FOS可增加细胞壁的渗透作用,因此,两者联用对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌能发挥增效协同作用,可能会提高尿路感染患者的治疗效果。

耐药铜绿假单胞菌的细胞膜能产生富有黏附性的生物膜,可阻止或抑制抗菌药物等进入菌体杀死致病菌,而FOS具有破坏耐药铜绿假单胞菌生物膜或抑制其形成的作用^[16]。本研究发现,FOS和碳青霉烯类抗菌药物联用可以显著降低和分解铜绿假单胞菌已经成熟的生物膜,提示两者联用有治疗铜绿假单胞菌生物膜相关感染的可能。本研究发现,FOS和碳青霉烯类联用具有一定体外协同作用,但其具体效果尚需动物实验及临床试验加以证实,其机制也有待进一步的研究。

参考文献

[1] Sun F, Qu F, Ling Y, et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies[J]. *Future Microbiol*, 2013,8(7):877.
[2] Louie A, Bied A, Fregeau C, et al. Impact of different

carbapenems and regimens of administration on resistance emergence for three isogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains with differing mechanisms of resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010,54(6):2638.

[3] Yousefi S, Farajnia S, Nahaei MR, et al. Detection of metallo- β -lactamase-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010,68(3):322.
[4] 范燕,王睿.磷霉素与氨基糖苷类药物联用对铜绿假单胞菌生物被膜的影响[J]. *中国药物警戒*,2012,9(9):520.
[5] 宋洁,何召云,宫海燕,等.环丙沙星联用磷霉素抗尿路感染耐药铜绿假单胞菌的协同作用体外研究[J]. *中国药业*,2015,24(2):36.
[6] 孙凤军,陈盛,枉前,等.亚抑菌浓度莫匹罗星对烧伤创面分离铜绿假单胞菌生物膜的影响[J]. *中国药房*,2015,26(14):1939.
[7] Yamada S, Hyo Y, Ohmori S, et al. Role of ciprofloxacin in its synergistic effect with fosfomycin on drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Chemotherapy*, 2007,53(3):202.
[8] Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52(1): 1.
[9] 徐巧玲,孙凤军,冯伟,等.DNase I对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. *南方医科大学学报*,2015,35(9):1356.
[10] Kunakonvichaya B, Thirapanmethee K, Khuntayaporn P, et al. Synergistic effects of fosfomycin and carbapenems against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 45(5):556.
[11] Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement*[S]. 2010-01-30.
[12] Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, et al. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview[J]. *J Infect Public Health*, 2009,2(3):101.
[13] Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, et al. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options[J]. *Pharmacotherapy*, 2005,25(10):1353.
[14] Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, et al. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, enterobacteriaceae infections: a systematic review[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010,10(1):43.
[15] 陈瑞,唐英春,朱家馨,等.铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制—耐药株外膜蛋白OprD₂缺失[J]. *中国抗感染化疗杂志*,2001,1(4):200.
[16] Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, et al. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2009,34(2):111.

(收稿日期:2015-07-27 修回日期:2016-04-15)

(编辑:张媛媛)