

# 头孢西丁等8种抗菌药物单用或联用对产ESBLs肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性比较

丁力<sup>1\*</sup>, 王宪德<sup>2</sup>, 高扬<sup>1</sup>, 张志清<sup>1#</sup>, 樊德厚<sup>1</sup>(1.河北医科大学第二医院药学部, 石家庄 050000; 2.河北医科大学第二医院心脏外科, 石家庄 050000)

中图分类号 R446.5; R978.1; R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)02-0216-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.02.25

**摘要** 目的:探讨头孢西丁等8种抗菌药物单用或联用对产ESBLs肺炎克雷伯菌体外抗菌活性的影响。方法:收集2013年7月—2014年1月我院收治的患者痰、血、尿液、大便标本,从中分离得到50株产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)的肺炎克雷伯菌,采用微量肉汤稀释法、棋盘法分别测定哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林/舒巴坦、异帕米星、美罗培南、头孢他啶、头孢噻肟、左氧氟沙星与头孢西丁单独及联用时对临床分离的50株产ESBLs肺炎克雷伯菌的最低抑菌浓度(MIC),计算联合抑菌浓度(FIC)指数,应用FIC指数来计算及判读抗菌药物联用对产ESBLs肺炎克雷伯菌体外抗菌作用的效果。结果:哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林/舒巴坦与头孢西丁联合应用后,能显著降低各自的MIC值,分别有62.5%与53.5%的菌株表现为协同作用;37.5%与46.5%的菌株表现为相加作用。结论:对产ESBLs肺炎克雷伯菌的感染,可使用哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林/舒巴坦与头孢西丁进行联合治疗。  
**关键词** 肺炎克雷伯菌;超广谱 $\beta$ -内酰胺酶;耐药性;联合用药

## Comparison of *in vitro* Antibacterial Activity of 8 Antibacterial Drugs as Cefoxitin Alone or Combined Use against ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae*

DING Li<sup>1</sup>, WANG Xian-de<sup>2</sup>, GAO Yang<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-qing<sup>1</sup>, FAN De-hou<sup>1</sup>(1. Dept. of Pharmacy, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Dept. of Cardiac Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate *in vitro* antibacterial activity of 8 kinds of antibacterial drugs as cefoxitin alone or combined use against ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae*. METHODS: The sputum, blood, urine and stool specimens of patients in our hospital from Jul. 2013 to Jan. 2014 were collected to obtain 50 isolated strains of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs)-producing *K. pneumoniae*. Broth dilution technique and checkerboard method were used to test minimum inhibitory concentration (MIC) of piperacillin/tazobactam, mezlocillin/sulbactam, isepamicin, meropenem, ceftazidime, cefotaxime sodium and levofloxacin use alone or combined with cefoxitin against 50 strains of ESBLs-producing *K. pneumoniae* to calculate fractional inhibitory concentration (FIC) index. The *in vitro* antibacterial effect of combined use of antibacterial drugs against ESBLs-producing *K. pneumoniae* was calculated and interpreted on the basis of FIC index. RESULTS: Piperacillin/tazobactam or mezlocillin/sulbactam combined with cefoxitin could reduce their MIC significantly; 62.5% and 53.5% strains showed a synergistic effect and 37.5% and 46.5% showed an additive effect. CONCLUSIONS: ESBLs-producing *K. pneumoniae* infection can be treated with piperacillin/tazobactam or mezlocillin/sulbactam combined with cefoxitin.

**KEYWORDS** *Klebsiella pneumoniae*; Extended spectrum  $\beta$ -lactamase; Drug resistance; Drug combination

近年来,随着抗生素的广泛应用,细菌耐药日益成为医药界非常重视的问题。患有基础疾病的老龄患者、免疫低下的

新生儿及长期使用广谱抗生素的患者,由于感染了产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯菌,导致对多种抗生素耐药,甚

- [1] 肖树华, 吴惠敏, 王翀. 三苯双脒: 一种新的广谱抗肠道蠕虫新药[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22(5): 312.
- [2] Yuan G, Xu J, Qu T, et al. Metabolism and disposition of tribendimidine and its metabolites in healthy chinese volunteers[J]. *Drugs RD*, 2010, 10(2): 83.
- [3] Yuan GY, Wang BJ, Wei CM, et al. LC-MS determination of p-(1-dimethylamino ethylimino) aniline: a metab-

- olite of tribendimidine in human plasma[J]. *Chromatographia*, 2008, 68(1/2): 139.
- [4] 袁桂艳, 魏春敏, 王本杰, 等. 人尿液三苯双脒代谢物浓度测定及其排泄动力学研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(9): 667.
- [5] Xue J, Xiao SH, Xu LL, et al. The effect of tribendimidine and its metabolites against *Necator americanus* in golden hamsters and *Nippostrongylus braziliensis* in rats [J]. *Parasitol Res*, 2010, 106(4): 775.
- [6] 于广华, 徐平. 利用威布尔模型研究药物的尿排泄[J]. 数理医药学杂志, 2000, 13(4): 291.

\* 副主任药师。研究方向: 临床药学。电话: 0311-66002773。E-mail: dingli1972@163.com

# 通信作者: 主任药师。研究方向: 临床药学。电话: 0311-66002771

(收稿日期: 2014-11-12 修回日期: 2014-12-10)

(编辑: 李 劲)

至多重耐药,造成临床治疗上的困难<sup>[1]</sup>。面对严重肺炎克雷伯菌感染,使用单一抗生素已很难奏效,因此合理的抗生素联合应用是临床上重要的治疗手段<sup>[2]</sup>。用药方案的制订,常需参考体外联合药敏试验结果,部分抑菌指数(FIC moldx)是评价抗菌药物联合效应的重要参数<sup>[3]</sup>。应用体外试验呈协同或相加效应的抗菌药物组合,可望得到较高的临床治愈率。本课题组研究了头孢西丁、哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林/舒巴坦、异帕米星、美罗培南、头孢他啶、头孢噻肟、左氧氟沙星单用或联合应用对我院ICU病房检出的产ESBLs肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性的影响,为临床上控制产ESBLs肺炎克雷伯菌感染提供联合用药的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

河北医科大学第二医院检验科从临床感染患者痰、血、尿液、大便等临床标本分离出的120株肺炎克雷伯菌,鉴定其中50株产ESBLs。所有菌株鉴定及ESBLs测定确证试验均按美国临床实验室标准化协会(CLSI)2010推荐标准实施<sup>[4]</sup>。质控菌株:大肠埃希菌(ATCC 25922)1株,肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)1株。

### 1.2 试验器材

20 ml 试管 20 支、高压灭菌锅、无菌吸管、锥形瓶、250B 生化培养箱、冷藏冰箱、HFsafe 操作安全柜、Tissue Culture Plate 96 Well、10 μl 移液枪、50 μl 移液枪、100 μl 移液枪、200 μl 移液枪、1 000 μl 移液枪。西门子 MicroScan Walk Away40 Plus 全自动微生物分析仪,革兰阴性菌鉴定药敏板。

### 1.3 试验药品

注射用头孢他啶(葛兰素史克集团公司,批号:2045);注射用头孢噻肟(标准品,中国食品药品检定研究院提供);注射用哌拉西林/他唑巴坦(珠海联邦制药有限公司,批号:40608601);注射用美洛西林/舒巴坦(瑞阳制药有限公司,批号:14012501);注射用美罗培南(标准品,中国食品药品检定研究院提供);注射用头孢西丁(广州白云山天心药业股份有限公司,批号:H19990365);异帕米星(标准品,中国食品药品检定研究院提供);左氧氟沙星(标准品,中国食品药品检定研究院提供)。

### 1.4 培养基

MuellerHinton(M-H)肉汤、Mueller-hinton(M-H)琼脂,由法国 bioMerieux 公司提供。

### 1.5 菌悬液的配制

用生长法制备菌悬液。取冷藏的产ESBLs肺炎克雷伯菌,接种在M-H肉汤中在35℃下培养20h,然后取出来分别进行涂片,革兰染色,显微镜下观察,再分别接种在有编号的含有M-H肉汤的试管中,温箱培养18~24h,对比浑浊度,得到所需要浓度的菌悬液。

### 1.6 单药的药敏试验

用微量肉汤倍比稀释法与棋盘法检测50株肺炎克雷伯菌对8种抗菌药单用时的MIC。实验方法及结果判断标准参照CLSI 2010年版。<sup>①</sup>抗菌药物配制:抗菌药物原液均配制成1 024 mg/L,试验中采用倍比稀释法稀释,依次得到,1~512

mg/L 12个试验浓度。<sup>②</sup>试验操作:取实验用的96孔培养板,横向编号依次为阳性对照,0.5、1、2、4、8、16、32、64、128、256、512、1 024 mg/L;阴性对照,纵向为菌株编号。取100 μl药液分别加入到各自编号下的孔中,在再各孔中依次加入100 μl菌悬液,写好编号即可。<sup>③</sup>孵化:将加好液的培养板放入生化培养箱中35℃培养18~24h。<sup>④</sup>观察结果和报告:读取无抗生素的对照孔,从低浓度到高浓度逐一比较,以肉眼观察无细菌生长孔为最低抑菌浓度(MIC)。

### 1.7 联合药敏试验

用微量肉汤倍比稀释法与棋盘法测定头孢西丁分别联合哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林/舒巴坦、异帕米星、左氧氟沙星时的MIC,试验方法及结果判断标准参照CLSI 2010年版。<sup>①</sup>抗菌药物配制:将头孢西丁制成2、4、8、16 mg/L 4种浓度;将哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林/舒巴坦、异帕米星、左氧氟沙星分别配成2、4、8、16、32、64 mg/L 6种浓度。<sup>②</sup>试验操作:取试验用的96孔培养板,横向编号依次为阳性对照,2、4、8、16、32、64 mg/L;阴性对照,纵向编号依次2、4、8、16 mg/L,分别取50 μl哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林/舒巴坦、异帕米星、左氧氟沙星纵向加到对应浓度编号下,取50 μl头孢西丁横向加到对应浓度编号下,再取100 μl菌悬液分别加到含不同药物浓度的孔中。<sup>③</sup>孵化:将加好液的培养板放入生化培养箱中35℃培养18~24h。<sup>④</sup>观察结果和报告:读取无抗生素的对照孔,从低浓度到高浓度逐一比较,以肉眼观察无细菌生长孔为MIC。

### 1.8 联合抑菌浓度(FIC)指数的确定

FIC指数为对联合用药时各药的MIC值分别除以单药时MIC值的商的和。相互作用解释为:FIC≤0.5为协同作用;0.5<FIC≤1为相加作用;1<FIC≤2无关作用;FIC>2拮抗作用<sup>[4]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 单种抗菌药物的药敏试验

8种抗菌药物对50株产ESBLs肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性见表1。

表1 8种抗菌药物对50株产ESBLs肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性

Tab 1 Antibacterial activities of 8 kinds of antibacterial drugs against 50 strains of ESBLs-producing *K. pneumoniae* in

<i>vitro</i>			
药品名称	MIC <sub>50</sub> , mg/L	MIC <sub>90</sub> , mg/L	耐药率, %
头孢西丁	2	32	62
头孢他啶	2	64	78
头孢噻肟	32	128	100
美罗培南	<0.5	4	36
哌拉西林/他唑巴坦	32	128	80
美洛西林/舒巴坦	16	64	86
异帕米星	32	64	74
左氧氟沙星	32	128	100

由表1可知,除了碳青霉烯类的美罗培南耐药率低于50%,其他抗生素耐药率均较高,其中头孢噻肟和左氧氟沙星耐药率为100%。

### 2.2 联用抗菌药物的药敏试验

抗菌药物联用后对产ESBLs肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性见表2;抗菌药物联用后FIC值比较见表3。

表2 抗菌药物联用后对产ESBLs肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性

Tab 2 Antibacterial activities of combined use of antibacterial drugs against ESBLs-producing *K. pneumoniae* in vitro

联合应用方案	株数	MIC <sub>50</sub> ,mg/L	MIC <sub>90</sub> ,mg/L
哌拉西林/他唑巴坦+头孢西丁	50	2/0.5	4/4
美洛西林/舒巴坦+头孢西丁	50	4/1	16/2
异帕米星+头孢西丁	50	1/2	8/2
左氧氟沙星+头孢西丁	50	4/1	16/4

表3 抗菌药物联用后FIC值比较

Tab 3 Comparison of FIC index after combined use of antibacterial drugs

联合应用方案	FIC≤0.5	0.5<FIC≤1	1<FIC≤2	FIC>2
哌拉西林/他唑巴坦+头孢西丁	62.5	37.5	0	0
美洛西林/舒巴坦+头孢西丁	53.5	46.5	0	0
异帕米星+头孢西丁	23.8	29.7	37.6	0
左氧氟沙星+头孢西丁	39.8	60.2	0	0

由表2可知,头孢西丁与哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林/舒巴坦、异帕米星、左氧氟沙星联合后,MIC<sub>50</sub>与MIC<sub>90</sub>均有不同程度的下降。由表3可知,联合用药后,除了异帕米星与头孢西丁联用有37.6%表现出无关,其他联合用药都表现为协同与相加作用。

### 3 讨论

肺炎克雷伯菌广泛存在于自然界中,是肠道正常菌种之一。作为条件致病菌,其可引起皮肤、软组织、呼吸道、泌尿道和其他器官的感染,近年来成为仅次于大肠埃希菌的最重要的条件致病菌。该菌对目前使用的多种抗菌药物耐药,且耐药性有不断增高的趋势,其产生的ESBLs为主要耐药机制<sup>[5-6]</sup>,对常用抗生素耐药性较高,使得抗菌药物的选择范围更狭窄。由于该类菌具有多重耐药性和经质粒传播迅速的特点,给临床治疗带来了极大难度,有可能造成严重的院内交叉感染和院外耐药菌播散,是现代医学中一个最具挑战性的潜在威胁<sup>[7]</sup>。

本研究结果显示,单用一种抗生素对抗产ESBLs肺炎克雷伯菌,只有碳青霉烯类的美罗培南有较高的敏感率,与文献报道的一致<sup>[8]</sup>;其次是头霉素类的头孢西丁和氨基糖苷类的异帕米星;含酶抑制剂的青霉素类抗生素的耐药率比较高;最应该引起大家关注的是作为第三代头孢菌素的头孢噻肟耐药率达100%。国内文献报道,肺炎克雷伯菌检出前用过第三代头孢菌素的治疗组对第三代头孢菌素的耐药性均高于先期未用过第三代头孢菌素组,说明第三代头孢菌素的滥用是肺炎克雷伯菌产生耐药性的重要因素之一<sup>[9]</sup>。如果常规用碳青霉烯类抗生素,长时间后不排除肺炎克雷伯菌对其耐药而导致暴发流行,而且已有文献报道<sup>[10]</sup>发现产耐碳青霉烯类抗生素的肺炎克雷伯菌(CRKP)出现。总之,呼吸道感染病原菌的耐药性普遍存在,且由于广谱抗菌药物的使用促使耐药基因改变及

新耐药基因产生,多药耐药细菌的检出率呈上升趋势,对临床的治疗造成极大困难。不同病原菌表现出不同程度的耐药性,故医护人员在临床上应用抗生素更需经常进行细菌耐药性监测,及时掌控耐药性变迁动态,及时有效地合理调整抗菌药物的使用。对于病情较重的ICU患者,革兰阴性细菌的耐药性日益严重,在未获得细菌学及药敏结果之前,应先根据近期本地区本单位药敏耐药性结果,改变给药方法,尽早接受有效抗菌药物治疗,有助于克服细菌耐药的限制。本文将头孢西丁与美洛西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、异帕米星、左氧氟沙星联合后进行体外抗菌活性试验,得出:头孢西丁与哌拉西林/他唑巴坦或美洛西林/舒巴坦联合应用,MIC都有很大程度的降低,FIC表现为协同和相加作用,效果很好。因此,建议临床治疗肺炎克雷伯菌时,为避免产生ESBLs肺炎克雷伯菌,不要一上来先使用第三代头孢菌素,也不要马上用碳青霉烯类抗生素,选用头孢西丁与哌拉西林/他唑巴坦或美洛西林/舒巴坦联用,既能达到抗菌治疗目的,又不易产生耐药菌。

### 参考文献

- [1] 周蓉,朱卫民.肺炎克雷伯菌分子流行病学及耐药机制研究进展[J].国外医药抗生素分册,2012,33(1):1.
- [2] 吴娜,褚云卓,田素飞,等.抗菌药物对产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌接种效应的研究[J].中国感染与化疗杂志,2011,11(1):31.
- [3] 倪语星,尚红.临床微生物学与检验[M].4版.北京:人民卫生出版社,2007:63.
- [4] CLSI.Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;twentieth informational supplement[M].Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010: M100-S20.
- [5] 余娴,袁斌,雷军.产“超-超广谱”β-内酰胺酶革兰阴性杆菌的耐药表型及基因分析[J].中国抗生素杂志,2011,36(1):56.
- [6] 张阮章,卢月梅,李红林,等.大肠埃希菌质粒介导AmpC酶基因检测及耐药性分析[J].中国抗生素杂志,2011,36(1):53.
- [7] 安福成,李鹏飞.基层医院住院患者下呼吸道临床分离病原菌分布及耐药性分析[J].中国临床医生,2014,42(1):41.
- [8] 胡祥英,吴礼循,王开梅.小儿肺炎产超广谱β-内酰胺酶细菌耐药性分析[J].中国病原生物学杂志,2012,7(1):61.
- [9] 文细毛,任南,吴安华,等.全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J].中华医院感染学杂志,2011,21(2):350.
- [10] 万琼,陈芸.耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌的耐药状况分析[J].实用临床医学,2014,15(6):20.

(收稿日期:2014-09-19 修回日期:2014-10-08)

(编辑:余庆华)