

耐多药结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物体外交叉耐药及耐药性研究[△]

任丽娟*, 黄正谷, 王 丽, 陈雅婷(重庆市公共卫生医疗救治中心, 重庆 400036)

中图分类号 R969.1;R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)11-1488-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.11.16

摘要 目的:了解结核分枝杆菌对5种抗结核氟喹诺酮类药物之间的交叉耐药性,促进临床合理用药。方法:临床采集耐多药结核(MDR-TB)菌株培养,分别测定5种氟喹诺酮类药物(环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、司帕沙星、莫西沙星)的最低抑菌浓度(MIC)的变化,定性判断是否存在交叉耐药,得出实验室研究数据。结果:各氟喹诺酮类药物对临床分离出异烟肼利福平耐药株耐药率均>70%,耐药率接近,差异无统计学意义($P>0.05$);各氟喹诺酮类药物之间存在不完全交叉耐药性。结论:临床医师在为患者选择药物治疗方案时,应综合参照药敏试验结果、患者疾病史、用药史等,选择有效的氟喹诺酮类药物治疗MDR-TB。该体外试验可为进一步的体内试验及临床研究氟喹诺酮类药物MDR-TB中的交叉耐药性提供基础。

关键词 结核分枝杆菌;氟喹诺酮类药物;交叉耐药;最低抑菌浓度

Drug Resistance and Cross Resistance of Multi-drug Resistant Mycobacterium Tuberculosis to Fluoroquinolones *in vitro*

REN Li-juan, HUANG Zheng-gu, WANG Li, CHEN Ya-ting (Chongqing Public Health Medical Center, Chongqing 400036, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze cross drug resistance of 5 kinds of anti-tuberculosis fluoroquinolones via *in vitro* experiments. METHODS: The multi-drug resistant mycobacterium tuberculosis (MDR-TB) strain were isolated and cultured in the clinic, and MIC of 5 kinds of fluoroquinolones (ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin) were tested for analyzing drug resistance and cross resistance to obtain laboratory data. RESULTS: The resistance rates of isoniazid and rifampin resistant isolates to various fluoroquinolones were all over 70%; drug resistances of them were close to each other; there was no statistical significance ($P>0.05$). There were partial cross resistances among the five fluoroquinolones. CONCLUSIONS: These results could help clinicians choose effective fluoroquinolones for the treatment of MDR-TB by referring to the result of drug sensitivity test, disease history, medication history and so on. The data provides the basis for future *in vivo* experiments and clinical study of cross resistance of MDR-TB to fluoroquinolone.

KEYWORDS Mycobacterium tuberculosis; Fluoroquinolones; Cross resistance; MIC

氟喹诺酮类药物母体结构相似,具有相同的抗菌作用机制,因此在理论上存在完全交叉耐药性。有文献报道了嗜麦芽窄食单胞菌、解脲脲原体(Uu)敏感株对氟喹诺酮类药物交叉耐药^[1-2];2006年3月首次出现的广泛耐药结核(XDR-TB)即在耐异烟肼及利福平基础上对二线抗结核药物注射剂以及氟喹诺酮类也耐药^[3]。国外很多学者从分子水平对氟喹诺酮类药物在治疗结核病中产生耐药的机制作了研究^[4-5]。但是,目前还没有结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物交叉耐药的研究报道。本试验旨在为临床合理使用氟喹诺酮类药物抗MDR-TB提供循证医学依据,促进临床合理用药。

1 材料

1.1 菌株来源

(1)结核分枝杆菌标准株H37RV;(2)本实验室分离出的结核分枝杆菌异烟肼利福平耐药株14株。

1.2 培养基

(1)改良罗氏固体培养基;(2)Middlebrook 7H9液体培养基。具体配方及制备方法参考《结核病临床技术操作规范》^[6]、《临床实验诊断学》^[7]。

1.3 药物

环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星纯粉由重庆科瑞制药有限公司生产;司帕沙星纯粉由四川珍珠制药有限公司生产;莫西沙星纯粉由拜耳医药保健股份公司生产。

2 方法

分别用改良罗氏固体培养基、7H9液体培养基测定环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、司帕沙星、莫西沙星对H37RV以及结核分枝杆菌异烟肼利福平耐药株的最低抑菌浓度(MIC)。

2.1 预试验

经过预试验确定本试验中标准菌株及耐异烟肼利福平菌株MIC测定的浓度梯度。环丙沙星、氧氟沙星:1、2、4、8、16、32 μg/ml;左氧氟沙星:0.5、1、2、4、8、16 μg/ml;司帕沙星:0.25、0.5、1、2、4、8 μg/ml;莫西沙星:0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2 μg/ml。

2.2 药物的溶解与稀释

用灭菌蒸馏水分别溶解、定溶、稀释左氧氟沙星、莫西沙星,加入培养基中,使得培养基中的药物终浓度如上所示;用少量二甲亚砜分别溶解环丙沙星、氧氟沙星、司帕沙星,用灭菌蒸馏水定溶、稀释后加入培养基中,使得培养基中的药物终浓度如上所示。

2.3 菌悬液的制备

用传代后培养2~3周的新鲜培养物,以0.5%吐温80生理

[△] 基金项目:重庆市卫生局医学科研计划项目(No.2008-2-292)

* 副主任药师。研究方向:临床药学。电话:023-65500280。E-mail:renlj@sina.com

盐水磨菌配置成1 mg/ml的菌悬液,10倍稀释至0.01 mg/ml。

2.4 接种

分别接种浓度为0.01 mg/ml的菌悬液0.1 ml,置无药对照和各含药培养基中,最终接种菌量为0.001 mg。

2.5 结果判定

(1)固体培养基:接种后第28天报告无药对照和含药培养基上菌落生长情况,在无药对照培养基生长旺盛的前提下,以能够抑制99%结核分枝杆菌生长的最低浓度作为该药对试验菌的MIC。(2)液体培养基:接种后第28天报告结果,在无药对照培养基生长旺盛的前提下,将含药培养管中液体清晰、无细菌生长的最低浓度,确定为该药物对试验菌的MIC。(3)药敏试验耐药临界值参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)的推荐标准,环丙沙星、氧氟沙星和左氧氟沙星的耐药临界值为 $\geq 4 \mu\text{g/ml}$,莫西沙星和司帕沙星为 $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ [8]。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学处理,数据分析采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 耐药性

临床分离出异烟肼利福平耐药株对各氟喹诺酮类药物MIC的分布见表1。

表1 临床分离出异烟肼利福平耐药株对各氟喹诺酮类药物MIC的分布

Tab 1 MIC distribution of isoniazid and rifampicin resistant isolates to various fluoroquinolone

培养基	药物	试验菌株数	MIC, $\mu\text{g/ml}$				
			0.25	0.5	1	2	$\geq 4^*$
改良罗氏固体培养基(12株)	环丙沙星	14	0	0	3	1	10
	氧氟沙星	14	0	0	0	0	14
	左氧氟沙星	14	1	1	0	0	12
7H9液体培养基(2株)	司帕沙星	14	0	1	2	0	11
	莫西沙星	14	0	2	0	0	12

注: * 7H9液体培养基的MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

Note: * 7H9 liquid culture medium MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

由表1可知,本试验中环丙沙星耐药率为71.42%(10/14);氧氟沙星耐药率为100%(14/14);左氧氟沙星耐药率为85.71%(12/14);司帕沙星耐药率为78.57%(11/14);莫西沙星耐药率为85.71%(12/14)。试验中各氟喹诺酮类药物对临床分离出异烟肼利福平耐药株耐药率均 $> 70\%$,各氟喹诺酮类药物耐药率接近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2 交叉耐药分析比较

本试验中,对环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、司帕沙星、莫西沙星5种药物同时耐药的占50.00%(7/14);对环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、莫西沙星4种药物同时耐药的占14.28%(2/14);对氧氟沙星、左氧氟沙星、司帕沙星、莫西沙星4种药物同时耐药的占21.43%(3/14);对环丙沙星、氧氟沙星、莫西沙星3种药物同时耐药的占7.14%(1/14);对氧氟沙星、左氧氟沙星2种药物同时耐药的占7.14%(1/14)。可见,有7株试验菌株对氟喹诺酮类药物完全交叉耐药,7株试验菌株存在部分交叉耐药,各氟喹诺酮类药物之间存在不完全交叉耐药。临床分离出异烟肼利福平耐药株对各氟喹诺酮类药物耐药分布见表2。

表2 临床分离出异烟肼利福平耐药株对各氟喹诺酮类药物耐药分布

Tab 2 Drug resistance distribution of isoniazid and rifampicin resistant isolates to various fluoroquinolone

试验菌株	药物				
	环丙沙星	氧氟沙星	左氧氟沙星	司帕沙星	莫西沙星
2株	R	R	R	S	R
1株	R	R	S	S	R
7株	R	R	R	R	R
3株	S	R	R	R	R
1株	S	R	R	S	S

注:R示耐药,S示敏感

Note: R means resistant; S means sensitive

4 讨论

耐药结核病尤其MDR-TB(至少对异烟肼和利福平耐药)已成为严重的公共卫生问题[9],对于MDR-TB,目前通常采用二线抗结核药物进行治疗。由于喹诺酮类药物具口服吸收好、不良反应小、价格低廉等优点,已被WHO纳入MDR-TB的临床治疗方案,成为联合治疗MDR-TB的核心药物之一。氟喹诺酮类药物与其他抗结核药物联合应用治疗结核病有20余年,在临床方面也已有较多报道证明含氟喹诺酮类药物的化疗方案对初治肺结核的良好疗效,对MDR-TB病也具有一定的治疗效果。在WHO制定的《耐药结核病规划管理指南》(2008)中把MDR-TB治疗的药品分为5组,氟喹诺酮类药物为抗结核药物第3组,包括左氧氟沙星、莫西沙星、氧氟沙星。氟喹诺酮类药物作为MDR-TB治疗中最主要的药物,其抗结核作用莫西沙星 $>$ 左氧氟沙星 $>$ 氧氟沙星。

结核分枝杆菌对喹诺酮类药物耐药性可以是先天性的也可以是获得性的,并且喹诺酮类药物之间存在交叉耐药[9]。喹诺酮类药物作用靶标均为结核分枝杆菌的DNA解旋酶,该酶为四聚体含两个A亚基和两个B亚基,分别由gyrA基因及gyrB基因编码,该基因突变与喹诺酮类药物耐药有关并造成喹诺酮类药物之间的交叉耐药。氟喹诺酮类药物作用机制和作用靶点相同,理论上存在完全交叉耐药性。本试验基于理论化的假设,认为分离出的结核菌株对5种氟喹诺酮类药物均敏感,而实际上临床分离出的MDR-TB菌株本身已经对部分甚至全部氟喹诺酮类药物耐药,这与结核患者本身的疾病史、用药史有很大关联。

有研究者通过耐药基因检测探讨了莫西沙星和左氧氟沙星对结核分枝杆菌的交叉耐药性[10],结果显示,莫西沙星的MIC比左氧氟沙星低4~8倍。莫西沙星和左氧氟沙星为不完全交叉耐药,因此对于耐药结核病,应根据药敏结果选择敏感药物组合的方案,对于氧氟沙星、左氧氟沙星低度耐药者可用莫西沙星治疗[11]。本试验研究结果与文献报道较为一致,氟喹诺酮类药物之间存在不完全交叉耐药性,临床医师在为患者选择药物治疗方案时,应综合参照药敏试验结果、患者疾病史、用药史等,选择有效氟喹诺酮类药物。

综上所述,本试验通过MDR-TB分枝杆菌对氟喹诺酮类药物体外交叉耐药及耐药性研究,对临床合理用药及进一步开展喹诺酮类药物交叉耐药试验研究具有一定指导意义,但本研究入选菌株较少,需加强多中心合作,扩大样本量,同时本试验还需进一步完善药敏试验方法,以获得更为科学可靠的试验数据。

重型地中海贫血患儿移植术后环孢素 A 血药浓度分析^Δ

张涛*,余晓霞,区杰彬,朱桦,邱凯锋[#](中山大学孙逸仙纪念医院,广州 510000)

中图分类号 R979.5;R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)11-1490-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.11.17

摘要 目的:探讨术后时间、性别及移植抗宿主病(GVHD)与重型地中海贫血患儿环孢素A(CsA)血药浓度的关系。方法:对35例在我院行异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)的重型地中海贫血患儿881例/次CsA谷浓度监测结果进行回顾性分析。结果:CsA血药浓度随术后时间的延长而逐渐降低,术后6个月内CsA血药浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。手术1个月后,女性患儿的CsA平均血药浓度略低于男性患儿,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。GVHD发生率随CsA血药浓度增加而降低,CsA血药浓度 $<50\mu\text{g/L}$ 组发生GVHD比例显著高于其他组($P<0.05$)。结论:重型地中海贫血患儿allo-HSCT术后CsA血药浓度 $>550\mu\text{g/L}$ 能有效减少GVHD发生率。术后患儿CsA血药浓度个体差异大,监测血药浓度对CsA的安全使用具有重要意义。

关键词 地中海贫血;患儿;环孢素A;血药浓度监测;移植抗宿主病

Analysis of Blood Concentration of Cyclosporine A in Children with Thalassemia Major after Transplantation

ZHANG Tao, YU Xiao-xia, QU Jie-bin, ZHU Hua, QIU Kai-feng (Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the correlation of post-transplantation time, gender and graft-versus-host disease (GVHD) with blood concentration of cyclosporine A (CsA) in children with thalassemia major. METHODS: 881 cases of CsA trough concentration monitoring in 35 children with thalassemia major underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) were analyzed retrospectively. RESULTS: The blood concentration of CsA decreased gradually with time after transplantation, but no significant difference was found within 6 months after transplantation ($P>0.05$). The average blood concentration of CsA in female group was slightly lower than in male group, but there was no significant difference ($P>0.05$). The incidence of GVHD increased as the blood concentration of CsA decreased; the proportion of GVHD in CsA $<50\mu\text{g/L}$ group was significantly higher than in other groups ($P<0.05$). CONCLUSIONS: The incidence of GVHD can be reduced significantly when CsA blood concentration is greater than $50\mu\text{g/L}$ in children with thalassemia major after allo-HSCT. Significant individual difference exists in blood concentration of CsA after allo-HSCT. It is important for the safety of drug use to monitor the blood concentration of CsA.

KEYWORDS Thalassemia; Children; Cyclosporine A; Blood concentration monitoring; Graft-versus-host disease

参考文献

- [1] 林益强,姚艺辉,宋秀宇,等.嗜麦芽窄食单胞菌对8种氟喹诺酮类抗生素的交叉耐药性及耐药现状的探讨[J].中国实验诊断学,2007,11(1):90
- [2] 许阳,骆丹,朱正华,等.体外诱导解脲脲原体对喹诺酮类药物交叉耐药的研究[J].中华皮肤科杂志,2007,40(2):71.
- [3] Umubyeyi AN, Rigouts L, Shamputa IC, et al. Limited fluoroquinolone resistance among Mycobacterium tuberculosis isolates from Rwanda: results of a national survey [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(5): 1 031.
- [4] Sulochana S, Narayanan S, Paramasivan CN, et al. Analysis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from India[J]. *J Chemother*, 2007, 19(2): 166.
- [5] Wang JY, Lee LN, Lai HC, et al. Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(5): 860.
- [6] 中华医学会.临床技术操作规范:结核病分册[M].北京:人民军医出版社,2004:29-35.
- [7] 叶应妩,李健斋,王玉琛.临床实验诊断学:下[M].北京:人民卫生出版社,1991:1 871.
- [8] Aziz MA, Wright AI, Aszlo A, et al. Epidemiology of anti-tuberculosis drug resistance: the Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance: an updated analysis[J]. *Lancet*, 2006, 368(9553): 2 142.
- [9] 赵兰,乐军,王明贵.结核分枝杆菌对喹诺酮类药物耐药及机制研究进展[J].中国临床感染病杂志,2008,1(5): 307.
- [10] 初乃惠,黄学锐.氟喹诺酮类药物在结核病治疗中的应用[J].中华临床医师杂志:电子版,2010,4(7):905.
- [11] 赵伟杰,李菟,陆宇.莫西沙星与左氧沙星对结核分枝杆菌的交叉耐药性研究[J].结核病与胸部肿瘤,2008,12(4):246.

^Δ 基金项目:广东省药学会科学研究基金(No.2014A005)
* 药师,硕士。研究方向:临床药理学。电话:020-81332427。E-mail:1203105341@qq.com

[#] 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:020-81332451。E-mail:feng.qk@163.com

(收稿日期:2014-07-08 修回日期:2014-08-04)
(编辑:李劲)