

头孢哌酮/舒巴坦、美罗培南与左氧氟沙星联合应用对鲍曼不动杆菌防耐药突变浓度的影响

孙成春^{1*},荆得乐²,公衍文³(1.济南军区总医院药剂科,济南 250031;2.淄博市妇幼保健院药剂科,山东 淄博 255000;3.济南军区总医院实验诊断科,济南 250031)

中图分类号 R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3496-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.14

摘要 目的:研究头孢哌酮/舒巴坦(CFS)或美罗培南(MRP)与左氧氟沙星(LVX)联用对鲍曼不动杆菌防耐药突变浓度(MPC)的影响,为防止细菌耐药的产生提供试验依据。方法:将实验分为CFS、MRP、LVX单用组和CFS+LVX、MRP+LVX联用组。采用琼脂二倍稀释法,分别测定各组对鲍曼不动杆菌标准菌株ATCC 19606和36株临床分离菌株的最低抑菌浓度(MIC),并计算部分抑菌浓度(FIC)指数;采用琼脂平板稀释法,测定各组对鲍曼不动杆菌的防耐药突变浓度(MPC),并计算相应的选择指数(SI)。结果:CFS或MRP与LVX联用后,协同作用所占的比例分别为55%(20/36)和50%(18/36)。对标准菌株ATCC 19606,CFS+LVX、MRP+LVX联用后MPC由联用前32.0、4.0 mg/L降为1.8、0.8 mg/L;对36株临床分离菌株,CFS+LVX、MRP+LVX联用后MPC分别由联用前8.0~32.0、1.0~2.0 mg/L降为0.25~1.0、0.25~0.5 mg/L;联用后SI均明显下降。结论:CFS或MRP与LVX联用后,均可降低其单用时对鲍曼不动杆菌的MPC,缩小耐药突变选择窗。

关键词 头孢哌酮/舒巴坦;美罗培南;左氧氟沙星;联合用药;鲍曼不动杆菌;防耐药突变浓度;耐药突变选择窗

The Effects of Combined Use of Cefoperazone/sulbactam, Meropenem with Levofloxacin on Mutant Prevention Concentration for *Acinetobacter baumannii*

SUN Cheng-chun¹, JING De-le², GONG Yan-wen³(1.Dept. of Pharmacy, Jinan Military General Hospital, Jinan 250031, China;2.Dept. of Pharmacy, Zibo Maternal and Child Health Hospital, Shandong Zibo 255000, China; 3.Dept. of Laboratory Diagnosis, Jinan Military General Hospital, Jinan 250031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of combined use of cefoperazone/sulbactam (CFS), meropenem (MRP) with levofloxacin (LVX) on mutant prevention concentration for *Acinetobacter baumannii* so as to provide a experimental foundation for preventing bacterial drug resistance. METHODS: In the test, there were groups of single use of CFS, MRP and LVX, and groups of combined use of CFS+LVX and MRP+LVX. Double dilution agar method was used to respectively detect minimal inhibitory concentration (MIC) for standard *Acinetobacter baumannii* strains ATCC 19606 and 36 clinically isolated strains in all groups, and then the index of fraction inhibitory concentration (FIC) was calculated. Agar dilution method on plates was employed to detect mutant prevention concentration (MPC) for *Acinetobacter baumannii* in all groups, and then corresponding selection index (SI) was calculated. RESULTS: After combined use of CFS or MRP with LVX, synergistic effect accounted for 55% (20/36) and 50% (18/36). For standard strain ATCC 19606, after combined use of CFS+LVX and MRP+LVX, MPC reduced from 32.0 and 4.0 mg/L to 1.8 and 0.8 mg/L; For 36 clinically isolated strains, after combined use of CFS+LVX and MRP+LVX, MPC reduced from 8.0-32.0 and 1.0-2.0 mg/L to 0.25-1.0 and 0.25-0.5 mg/L. SI were all obviously reduced after combination. CONCLUSIONS: The combination of CFS or MRP with LVX can reduce MPC for *Acinetobacter baumannii* more significantly than the single use, and narrow mutant selection window.

KEYWORDS Cefoperazone/sulbactam; Meropenem; Levofloxacin; Combined drug use; *Acinetobacter baumannii*; Mutant prevention concentration; Mutant selection window

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)在非发酵菌中的分离率仅次于铜绿假单胞菌,是医院内感染最常见的革兰阴性细菌之一^[1]。随着广谱抗菌药的广泛使用,鲍曼不动杆菌耐药率逐年增高。据研究报道,鲍曼不动杆菌已成为我国院内感染最重要的病原菌之一,甚至出现了对多种抗菌药物同时耐药的三重耐药菌株、泛耐药菌株和全耐药菌株,使得临床医师选择有效的抗菌药物变得越来越困难^[2]。因其耐药机制广泛,因此临床治疗极其困难,极易造成医院感染暴发流行^[3]。因此,如何控制其耐药性进一步蔓延、延长抗菌药物的临床使用

寿命,越来越受到人们的关注^[4-5]。

防耐药突变浓度(MPC)和突变选择窗(MSW)理论^[6]的提出,为有效抑制细菌耐药及制订应对策略提供了新的思路和参考依据。MSW是指最低抑制浓度(MIC)到MPC之间的范围(或MIC₉₀到MPC₉₀之间的范围),MPC是防止耐药突变菌株被选择性富集扩增所需的最低抗菌浓度,也是评价抗菌药物防耐药能力的新指标。该理论的提出既着眼于控制感染,又考虑到药物的限制耐药突变能力。基于该理论,当2种或2种以上药物联合应用时,细菌需要同时突变2次或多次才能产生突变菌株,但这种概率非常低,从而使MSW缩小甚至关闭。本研究通过测定头孢哌酮/舒巴坦(CFS)、美罗培南(MRP)单

* 教授,硕士。研究方向:临床药理学、临床药学。电话:0531-51666963。E-mail:yaolike295@126.com

用及分别与左氧氟沙星(LVX)联用时对鲍曼不动杆菌MPC的影响,为临床合理使用现有抗菌药物、防止耐药菌快的产生提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

Vitek-2全自动微生物分析仪、Vitek比浊仪(法国生物梅里埃公司);GB11241-89电热恒温培养箱(山东潍坊精鹰医疗器械有限公司);XK96-3微量振荡器(姜堰市新康医疗器械有限公司);LDZM-80KCS立式高压蒸汽消毒器(上海申安医疗器械厂);HZQ-X100振荡培养箱(哈尔滨东联技术开发有限公司);B160A医用低速离心机(河北白洋淀仪器厂);FA1004电子分析天平(上海天平仪器厂);MDF-U3286S超低温冰箱(日本三洋电器有限公司)。

1.2 药品与试剂

注射用CFS(辉瑞制药有限公司,批号:1039466,规格:1.5 g/支);注射用MRP[住友制药(苏州)有限公司,批号:2089C,规格:0.5 g/支];LVX注射液[第一三共制药(北京)有限公司,批号:1105E62,规格:0.5 g/支];Mueller-Hinton(MH)琼脂培养基、大豆胰酶琼脂、MH肉汤(英国Oxoid公司,批号:976878、245975、597351)。

1.3 菌株

鲍曼不动杆菌标准菌(ATCC 19606)购于中国食品药品检定研究院;36株临床标本分离的对CFS、MRP、LVX敏感的鲍曼不动杆菌,经Vitek-2全自动微生物分析仪鉴定,采用纸片扩散法进行药敏试验;质控菌株铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、大肠埃希菌(ATCC 25922)均购自济南奥克赛生物技术有限公司。

2 方法

2.1 MIC的测定

2.1.1 CFS、MRP、LVX单用时的MIC测定 采用琼脂二倍稀释法测定CFS、MRP、LVX单用时的MIC。分别精密称取64 mg CFS、MRP、LVX于25 ml量瓶中,用双蒸水溶解并定容至刻度,制备成质量浓度均为2.56 mg/ml的各抗菌药物贮备液。将上述贮备液用二倍稀释法,分别制备成质量浓度为0.015、0.03、0.06、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0、128.0 μg/ml的系列CFS、MRP及LVX抗菌药物溶液。分别在琼脂培养基中加入不同质量浓度的上述抗菌药物溶液,充分混匀后倾注平板,每一直径90 mm的平皿注入25 ml。将标准菌ATCC 19606用羊血溶解,传代培养后挑取单个的菌落调节至0.5个麦氏浓度(1.5×10^8 CFU/ml),然后按1:10稀释,用定量接种环将1 μl菌悬液接种至琼脂表面,最终每个接种点含接种菌量约 1×10^4 CFU。35℃孵育,16~20 h后读取结果,以无细菌生长的最低药物浓度为CFS、MRP及LVX的MIC(临床分离菌株MIC的测定方法与标准菌株相同)。按照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)2012年标准判读结果^[7]。

2.1.2 CFS、MRP和LVX联用时的MIC测定 按“2.1.1”项下方法测定CFS+LVX、MRP+LVX联用时的MIC。

2.2 部分抑菌浓度(FIC)指数的计算及判定标准^[8]

FIC指数 = $\text{MIC}_{\text{甲药联用}} / \text{MIC}_{\text{甲药单用}} + \text{MIC}_{\text{乙药联用}} / \text{MIC}_{\text{乙药单用}}$ 。判定标准:FIC指数 ≤ 0.5 ,协同作用; $0.5 < \text{FIC指数} \leq 2$,无关作用;FIC指数 > 2 ,拮抗作用。

2.3 MPC的测定^[9]

2.3.1 含单药琼脂平板的配制 按“2.1.1”项下方法制备含单药琼脂平板,同时配制不含抗菌药物的琼脂平板作为空白对照。在含药琼脂平板上按“2.1.1”项下方法接种质控菌株,以

对试验进行跟随质控。将平板划分为两个区域,以区别质控菌株铜绿假单胞菌ATCC 27853和大肠埃希菌ATCC 25922。每个浓度配制4个平板。

2.3.2 含联用药琼脂平板的配制 分别以3种药物的MIC、MPC为基准,配制含CFS+LEV、MEM+LEV两种联用药琼脂平板。琼脂平板中抗菌药物的浓度为固定每种组合中前者药物的MIC,后者药物浓度根据二倍稀释法从MIC开始梯度变化至MPC,配制一系列不同浓度的含联用药的琼脂平板,同时配制不含抗菌药物的MH琼脂平板作为空白对照。每个浓度配制4个平板。

2.3.3 菌悬液的制备 从传代培养的菌落中挑取生长良好的单菌落,接种于20 ml MH肉汤中,将MH肉汤置于振荡培养箱中过夜培养。以离心半径为5 cm、3 000 r/min离心20 min,弃掉上清液,将细胞悬浮于原培养液10倍体积的MH肉汤中振荡培养6 h。按上述离心条件离心后弃掉上清液,加60 ml灭菌生理盐水将菌液浓度调整为约 3×10^{10} CFU/ml。

2.3.4 MPC的测定 含单药、联用药的琼脂平板以及空白的琼脂平板每个浓度取4个平板,然后取100 μl菌悬液分别均匀涂抹,使接种量达到 1.2×10^{10} CFU。接种后室温放置,待接种液充分吸收后于 (35 ± 2) ℃孵育72 h,没有菌落生长的最低药物浓度即为MPC(标准菌株与临床分离菌株MPC的测定方法相同)。以MPC为基准,线性增减10%抗菌药物浓度,90%细菌生长受抑制药物浓度为 MPC_{90} 。根据MIC、MPC结果,计算 MIC_{90} (使90%菌株生长受抑制的MIC值)、 MPC_{90} (防止90%菌株耐药突变的药物浓度值)、选择指数(SI,对标准菌株, $\text{SI} = \text{MPC}/\text{MIC}$;对临床分离菌株, $\text{SI} = \text{MPC}_{90}/\text{MIC}_{90}$)、MSW(对标准菌株,MSW为 $\text{MIC} \sim \text{MPC}$;对临床分离菌株,MSW为 $\text{MIC}_{90} \sim \text{MPC}_{90}$)。

2.4 统计学处理

数据采用SPSS 16.0统计软件对相关数据进行配对秩和检验。

3 结果

3.1 抗菌药物对标准菌株的MIC、MPC、SI值

CFS、MRP单用或分别与LVX联用时对标准菌株ATCC 19606的MIC、MPC、SI值见表1。结果显示,LVX和MRP的MIC、MPC基本接近,CFS的MPC、SI均较高;CFS与LVX联用后的MPC由32 mg/L降为1.8 mg/L,MRP与LVX联用后MPC由4.0 mg/L降为0.8 mg/L,SI值均明显降低。

表1 不同抗菌药物对标准菌株ATCC 19606的MIC、MPC、SI值(mg/L)

Tab 1 MIC, MPC and SI value of different antibiotics against standard strains ATCC 19606(mg/L)

抗菌药物	MIC	MPC	SI	MSW
LVX	1.0	4.0	4.0	1.0~4.0
CFS	2.0	32.0	16.0	2.0~32.0
MRP	1.0	4.0	4.0	1.0~4.0
CFS+LVX	0.5	1.8	3.6	0.5~1.8
MRP+LVX	0.25	0.8	3.2	0.25~0.8

3.2 抗菌药物对36株临床分离菌株的MIC、MPC、SI值

对36株临床分离菌株,CFS与LVX联用后的MPC范围由8.0~32.0 mg/L降为0.25~1.0 mg/L,MRP与LVX联用后的MPC由1.0~2.0 mg/L降为0.25~0.5 mg/L,SI值均明显降低,结果见表2。

3.3 CFS、MRP与LVX联用的作用类型

CFS、MRP与LVX联用后,对36株临床分离菌株的协同

作用所占比例分别为55% (20/36)和50% (18/36),其余为无关作用,未见拮抗作用,结果见表3。

表2 不同抗菌药物对36株临床分离菌株的MIC、MPC、SI值 (mg/L)

Tab 2 MIC, MPC and SI value of different antibiotics against 36 clinically isolated strains (mg/L)

抗菌药物	MIC范围	MIC ₉₀	MPC范围	MPC ₉₀	SI	MSW
LVX	0.125~0.5	0.5	0.5~2.0	2.0	4.0	0.5~2.0
CFS	2.0~8.0	4.0	8.0~32.0	16.0	4.0	4.0~16.0
MRP	0.125~0.5	0.5	1.0~2.0	2.0	4.0	0.5~2.0
CFS+LVX	0.03~0.25	0.25	0.25~1.0	0.5	2.0	0.25~0.5
MRP+LVX	0.015~0.125	0.25	0.25~0.5	0.5	2.0	0.125~0.5

表3 CFS或MRP与LVX联合用药后对临床分离菌株的作用类型(株)

Tab 3 Action types of combined use of CFS or MRP with LVX against clinically isolated strains (strain)

抗菌药物	FIC≤0.5	0.5<FIC≤2	FIC>2	菌株总数
CFS+LVX	20	16	0	36
MRP+LVX	18	18	0	36

4 讨论

鲍曼不动杆菌是条件致病菌,易在住院患者皮肤、结膜、口腔、呼吸道、胃肠道及泌尿生殖道等部位定植,当患者的抵抗力减弱或者有创伤时,就会引发感染^[10]。临床上常用的抗菌药物CFS、LVX、MRP对鲍曼不动杆菌的耐药率不断升高^[11]。当两种不同作用机制的抗菌药物联合应用,并同时处于各自的MIC以上时,细菌需要同时突变2次或多次才能产生突变菌株,但这种概率非常低,从而达到防止耐药菌产生及减少不良反应的目的。Cai Y等^[12]报道了多黏菌素联合LVX或妥布霉素可缩小其对多耐药鲍曼不动杆菌的MSW,防止多黏菌素耐药菌株出现。国内其他研究报道也支持这个结果。本研究根据MSW能阻断耐药突变体产生的理论,联合使用不同作用机制的抗菌药物,将临床常用的CFS或MRP分别与LVX联合后,各自MPC明显降低、MSW缩小、SI值也明显降低,说明联合用药后不但使抗菌作用增强,而且可以防止耐药细菌突变的产生^[13]。

本研究结果显示,CFS或MRP联合LVX协同作用占55%、50%,无拮抗作用,表明两药联用可增强抑菌效果。依据传统的药效学标准设计的给药方案往往使药物浓度落入MSW内,从而使耐药突变体选择性地富集,因此根据MIC理论用药,仅可阻止大部分敏感菌的生长。一旦选择性扩增的耐药突变体转移到新的宿主身上发生传播,耐药突变体就会成为新的优势菌群从而对药物产生耐药。MPC是一个反映抗菌药物抗菌活性及药物抑制耐药突变株选择能力的药效学参数,MPC越小,说明该药物限制该种细菌耐药突变株选择的能力越强。MSW理论表明,当药物浓度高于MPC时,病原菌必须突变2次或更多次才能生存,而这种突变的概率非常低^[12,14]。豆梅琴等^[9]通过测定4种氟喹诺酮类抗菌药物的MPC,认为当其浓度高于MPC时,可有效防止鲍曼不动杆菌耐药突变体的产生。但是,单药使用欲保持血药浓度大部分时间维持在高于MPC的水平,势必要增加用药剂量,这使药品不良反应的发生几率大大增加。

MSW理论为抗菌药物给药方案、临床合理使用现有抗菌药物、防止耐药菌产生提供了理论支持,具有临床指导意义。本研究对CFS或MRP分别与LVX联用后治疗鲍曼不动杆菌

感染进行了初步探讨,但是由于药物在体内的环境较为复杂,如何将体外研究结果应用于体内研究尚需进一步探讨。

参考文献

- [1] Zheng W, Yuan S, Li L. Analysis of hospital departmental distribution and antibiotic susceptibility of acinetobacter isolated from sputum samples[J]. *Am J Infect Control*, 2013, 41(8):e73.
- [2] 康俊辉,王文平,杨富强,等.鲍氏不动杆菌的临床分布及药敏分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(3):542.
- [3] Wiwanitkit V. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infection in the intensive care unit[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2014, 67(2):153.
- [4] Villar M, Cano ME, Gato E, et al. Epidemiologic and clinical impact of Acinetobacter baumannii colonization and infection: a reappraisal[J]. *Medicine*, 2014, 93(5):202.
- [5] 陈叶红,张林,张生大,等.鲍氏不动杆菌耐药性变迁及抗菌药物应用分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(21):5299.
- [6] Sun CC, Hao JW, Dou MQ, et al. Mutant prevention concentrations of levofloxacin, pazufloxacin and ciprofloxacin for A. baumannii and mutations in gyrA and parC genes[J]. *J Antibiot*, 2014, doi:10.1038/ja.2014.150.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition*[S]. 2012-01.
- [8] Tan TY, Lim TP, Lee WHL, et al. In vitro antibiotic synergy in extensively drug-resistant acinetobacter baumannii: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and etest methods[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(1):436.
- [9] 豆梅琴,孙成春,公衍文.氟喹诺酮类药物对鲍氏不动杆菌防耐药变异浓度测定[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(5):849.
- [10] 杨凤春,任爱民.主动外排泵系统介导鲍氏不动杆菌多耐药机制的研究进展[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(11):2478.
- [11] 杨爽,王宇.我院2009—2012年1735株鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J]. *中国药房*, 2014, 25(6):528.
- [12] Cai Y, Yang J, Kan Q, et al. Mutant prevention concentration of colistin alone and in combination with levofloxacin or tobramycin against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(5):477.
- [13] 张欣悦,孙成春,公衍文,等.莫西沙星联合头孢哌酮/舒巴坦对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌防耐药突变浓度的研究[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(6):825.
- [14] Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies[J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 33(Suppl 3):S147.

(收稿日期:2014-10-13 修回日期:2015-01-07)

(编辑:林静)