

· 临床论著 ·

利福布汀对非结核分枝杆菌抗菌活性的初步探讨

李艳静 彭勋 韩喜琴 张天哲

【摘要】 目的 观察利福布汀对非结核分枝杆菌的抗菌活性,探讨利福布汀对常见致病性非结核分枝杆菌的实验室耐药临界浓度,为临床合理应用利福布汀治疗非结核分枝杆菌病提供依据。**方法** 采用液体培养基倍比稀释法检测利福布汀和利福平对 50 株非结核分枝杆菌 (NTM) 的最低抑菌浓度 (MIC)。**结果** (1) 对 34 株鸟分枝杆菌复合群的 MIC: 76.5% (26/34) 菌株的利福平 MIC $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, 而利福布汀 MIC 有 85.3% (29/34) 分布在 $0.125 \sim 2 \mu\text{g/ml}$, 其中在 $0.125 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 的有 25 株; (2) 6 株偶然分枝杆菌的 MIC: 利福平的 MIC 多 $> 8 \mu\text{g/ml}$, 而利福布汀的 MIC 为 $1 \sim 8 \mu\text{g/ml}$; (3) 5 株脓肿分枝杆菌的 MIC: 利福平的 MIC $> 64 \mu\text{g/ml}$, 利福布汀的 MIC 为 $2 \sim 32 \mu\text{g/ml}$; (4) 其他非结核分枝杆菌: 利福平和利福布汀对蟾蜍分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、戈登分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、不产色分枝杆菌的 MIC 分别为 $> 64 \mu\text{g/ml}$ vs $1 \mu\text{g/ml}$, $2 \mu\text{g/ml}$ vs $0.25 \mu\text{g/ml}$, $8 \mu\text{g/ml}$ vs $1 \mu\text{g/ml}$, $4 \mu\text{g/ml}$ vs $1 \mu\text{g/ml}$, $4 \mu\text{g/ml}$ vs $1 \mu\text{g/ml}$ 。**结论** 初步得出利福布汀对常见致病性非结核分枝杆菌的实验室耐药临界浓度为 $4 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ 。利福布汀对鸟分枝杆菌复合群、堪萨斯分枝杆菌的抗菌活性优于利福平; 蟾蜍分枝杆菌、戈登分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、不产色分枝杆菌对利福平体外 MIC 值达到临床耐药浓度时, 利福布汀对其仍有体外抗菌活性。

【关键词】 非结核分枝杆菌; 微生物敏感性试验; 利福布汀; 利福平

Study on activity of rifabutin against non-tuberculous mycobacteria LI Yan-jing, PENG Xun, HAN xi-qin, ZHANG tian-zhe. The Third Hospital of Qin huangdao, Qin huangdao 66001, China

Corresponding author: Han Xi-qin, Email: hanxiqin@126.com

【Abstract】 Objective To study the bactericidal effect of rifabutin against non-tuberculosis Mycobacterium and determine the critical concentration of rifabutin to provide laboratory data for rifabutin in treatment of non-tuberculosis Mycobacterium. **Methods** The minimal inhibitory concentrations (MICs) of rifampin and rifabutin to 50 clinical non-tuberculosis Mycobacterium isolates were detected through Middlebrook 7H9 media. **Results** (1) The MICs of rifampin against Mycobacterium avium

complex (MAC) were $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ for 76.5% (26/34) strains, while the MICs of rifabutin ranged from 0.125 $\mu\text{g/ml}$ to 2 $\mu\text{g/ml}$ for 85.3% (29/34) strains. (2) The MICs of rifampin and rifabutin against 6 strains of *Mycobacterium fortuitum* were mainly $> 8 \mu\text{g/ml}$ and 1 $\mu\text{g/ml}$ to 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively. (3) The MICs of rifampin and rifabutin against *Mycobacterium abscessus* were $> 64 \mu\text{g/ml}$ and 2 $\mu\text{g/ml}$ to 32 $\mu\text{g/ml}$, respectively. (4) The MIC of rifampin and rifabutin against *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium gordonii*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, non-photochromogens were $> 64 \mu\text{g/ml}$ vs 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ vs 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$ vs 1 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$ vs 1 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$ vs 1 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Conclusions Rifabutin is more effective than rifampin in vitro against MAC and *Mycobacterium kansasii*. Some rifampin resistant strains still show susceptibility to rifabutin, which suggests rifabutin may be effective in treatment of rifampin resistant non-tuberculous mycobacterial.

【Key words】 Non-tuberculous mycobacteria; Microbial sensitivity test; Rifabutin; Rifampin

非结核分枝杆菌病是指由非结核分枝杆菌 (non-tuberculous mycobacteria, NTM) 引起的疾病。分枝杆菌属内除结核分枝杆菌复合群 (包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、田鼠分枝杆菌) 和麻风分枝杆菌以外统称为非结核分枝杆菌。目前全球耐多药结核病 (multi-drug resistance tuberculosis, MDR-TB) 患者急剧增多, 据世界卫生组织估计, 目前全球约有 100 万 MDR-TB 患者, 每年新增患者达 30 万 ~ 60 万^[1]。我国目前 MDR-TB 患者约 20 万, 约占世界 MDR-TB 患者 1/4^[2], MDR-TB 患者常合并 NTM 感染。随着近 20 年 AIDS 的流行, 播散性 NTM 感染日趋增多, NTM 所致疫情呈上升趋势。多数 NTM 对抗结核药物耐药, 以往抗 NTM 药物种类较少, 主要有乙胺丁醇、链霉素及利福平。近年来才出现利福布汀、利福喷丁、KRM-1648、喹诺酮类等。我国结核病患者较多, 随着国内耐药结核病患者增多, NTM 感染率增加, 从目前已有抗结核药物中筛选出对 NTM 有明显抗菌活性的药物成为当务之急。本研究采用 7H9 培养基检测利福布汀对 NTM 常见致病菌的最低抑菌浓度 (MIC), 检测利福布汀 (RFB rifabutin) 对 NTM 的 MIC, 同时以利福平作为对照, 旨在研究利福布汀对 NTM 常见致病菌的体外抗菌活性, 为临床合理用药提供依据。

材料与方法

一、菌株

非结核分枝杆菌 50 株, 其中含 34 株鸟分枝杆菌复合群, 6 株偶然分枝杆菌, 5 株脓肿分枝杆菌, 堪萨斯分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、戈登分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、不产色菌各 1 株。全部菌株已采用绝对浓度按 WHO 标准进行菌种鉴定实验。结核分枝杆菌标准株 H37Rv 作为对照。所有菌株均由北京市结核病胸部肿

瘤研究所参比实验室提供。

二、药物与试剂配制

1. 7H9 培养基的配制:称取 7H9 (Difco) 4.7 克,溶于 900 ml 蒸馏水中,加甘油 4 ml,分装后 15 lbf/in² (磅力每平方英寸) 高压 10 分钟,4℃ 保存。使用前加入 10% 体积 OADC (Becton Dickinson) (小牛血清)。

2. 利福布汀和利福平的准备:以二甲基甲酰胺溶解利福布汀干粉及利福平干粉,终浓度为 64 mg/dl,置于 -70℃ 备用。应用时以 7H9 液体培养基稀释至工作浓度。

3. 96 孔无菌培养板为美国康宁公司产品。

4. 显色剂 (Alamar Blue: 5% Tween-80 = 2:5)。

三、方法

1. 质量控制:每次同一菌株,设立平行对照,对照组间结果不一致者重复试验,并且每次试验设立空白对照板观察 NTM 菌生长情况,以结核分枝杆菌标准株 H37Rv 作为药物质量监控。

2. 菌悬液的制备:非结核分枝杆菌临床分离株经 7H9 液体培养基 (含有 0.5% Tween-80) 传代后培养 2~3 周,偶然分枝杆菌和脓肿分枝杆菌培养 1 周,NTM 菌株的新鲜培养物配制成 1 个麦氏浓度 (1 mg/ml) 的菌悬液,1 个麦氏浓度的菌悬液稀释 100 倍,含菌量相当于 1×10^6 cfu/ml。

3. MIC 测定:采用 7H9 液体培养基倍比稀释法测定 MIC: (1) 应用倍比稀释法稀释,药物浓度梯度为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.12、0.06 μ g/ml。 (2) 接种:接种 0.1 ml 浓度为 0.01 mg/ml 的菌液至各药物梯度及无药对照培养基中,最终接种量为 1×10^5 cfu/ml。 (3) 接种 5 天后加入显色剂 (无细菌生长的显现蓝色,有细菌生长的变为粉色),由蓝变粉的为其 MIC。

4. 统计学处理:所有统计分析采用 SPSS13.0 统计软件完成,应用秩和检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

一、结核分枝杆菌标准株的 MIC

对于结核分枝杆菌标准株 H37Rv,利福平在 7H9 液体培养基上的 MIC 为 0.25 μ g/ml,而利福布汀 MIC 为 0.13 μ g/ml。这表明利福布汀对结核分枝杆菌敏感株的杀菌效力为利福平的 2 倍。

二、34 株鸟胞复合群分枝杆菌的体外 MIC

利福布汀与利福平对 34 株鸟胞复合群分枝杆菌的 MIC 分布见表 1。有 76.5% 菌株的利福平 MIC ≥ 1 μ g/ml,而利福布汀 MIC 更多分布在药物浓度较低的区域,0.125~2 μ g/ml 占近 85.3%。经秩和检验可知二者分布差异有统计学意义 ($Z = -3.963, P = 0.001$),利福布汀体外抗菌活性较利福平强。

表 1 34 株鸟胞复合群分枝杆菌的利福布汀及利福平 MIC 分布(7H9 液体培养基)(株)

药物	菌株	MIC(μg/ml)									
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>64
利福布汀	34	9	5	4	7	4	1	0	1	3	0
利福平	34	1	3	4	8	2	1	0	3	4	8

注:秩和检验: $Z = -3.963, P = 0.001$

三、6 株偶然分枝杆菌的体外 MIC

利福布汀与利福平对 6 株偶然分枝杆菌的体外 MIC 见表 2。利福布汀的 MIC 为 1~8 μg/ml,利福平的 MIC 多 >8 μg/ml,经秩和检验可知二者分布差异有统计学意义($Z = -2.594, P = 0.009$),利福布汀体外抗菌活性较利福平强。

表 2 6 株偶然分枝杆菌的利福布汀及利福平 MIC 分布(7H9 液体培养基)(株)

药物	菌株	MIC(μg/ml)									
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>64
利福布汀	6	0	0	0	2	1	2	1	0	0	0
利福平	6	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2

注:秩和检验: $Z = -2.594, P = 0.009$

四、5 株脓肿分枝杆菌的体外 MIC

利福布汀与利福平对 5 株脓肿分枝杆菌的体外 MIC 见表 3。利福布汀的 MIC 为 2~32 μg/ml,利福平的 MIC >64 μg/ml,经秩和检验可知二者分布差异有统计学意义($Z = -2.785, P = 0.005$),利福布汀体外抗菌活性较利福平强。

表 3 5 株脓肿分枝杆菌的利福布汀、利福平 MIC 分布(7H9 液体培养基)(株)

药物	菌株	MIC(μg/ml)									
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>64
利福布汀	5	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
利福平	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

注:秩和检验: $Z = -2.785, P = 0.005$

五、其他非结核分枝杆菌的 MIC

利福平及利福布汀对蟾蜍分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、戈登分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、不产色分枝杆菌的 MIC 分别为 >64 μg/ml vs 1 μg/ml、2 μg/ml vs 0.25 μg/ml、8 μg/ml vs 1 μg/ml、4 μg/ml vs 1 μg/ml、4 μg/ml vs 1 μg/ml。

本研究数据研究显示利福布汀对非结核分枝杆菌的 MIC 为 4~8 μg/ml 的菌株数最少,初步得出利福布汀对常见致病性非结核分枝杆菌的实验室耐药临界浓度为 4~8 μg/ml。

讨 论

对人体有主要危害的非结核分枝杆菌^[3]有堪萨斯分枝杆菌、鸟-胞内分枝杆

菌、猿分枝杆菌、海鱼分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、蟾分枝杆菌、戈登分枝杆菌、偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌。海鱼分枝杆菌主要侵犯皮肤,瘰癧分枝杆菌侵犯淋巴结,其他菌种侵犯肺内,肺外少见。但因本实验室 NTM 菌株种类有限,本研究对象仅为以下几种 NTM^[4]:鸟复合分枝杆菌、偶然分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、戈登分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、不产色分枝菌,并根据其不同的繁殖周期决定其培养时间。多数 NTM 具有耐药性,其耐药机制^[5]包括天然的细胞壁屏障、药物泵出系统障碍、药物作用靶点变异或缺失、质粒介导等。利福布汀为一种新的半合成药物,类似于利福平的利福霉素衍生物。对结核分枝杆菌和胞内分枝杆菌有活性,对勘萨斯分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、偶然分枝杆菌也有一定的抗菌作用^[6]。

本研究基于 7H9 液体培养基,通过 Alamar blue 染色测定利福布汀对非结核分枝杆菌的活性。MABA (Alamar blue susceptibility test) 法是目前国际上比较常用的一种体外测定药物敏感性的方法,其可靠性得到了广泛认可。

本研究结果显示:(1)对于结核分枝杆菌标准株,利福布汀的杀菌效力为利福平的 2 倍。与陈勇川等^[7]报道的利福布汀对结核分枝杆菌的体外抗菌活性是利福平的 2~4 倍相符合。与端木宏谨等^[8]报道的利福平在 7H9 培养基上的 MIC 为 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 相近。(2)对 MAC 的抗菌活性:实验数据分析表明利福布汀对 MAC 的体外抗菌活性是利福平的 2~8 倍^[9],而 Nash^[10]研究表明利福布汀对 MAC 的 MIC 约为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。利福平对 MAC 的 MIC 为 0.25 $\mu\text{g/ml}$,对偶然分枝杆菌的 MIC 为 8 $\mu\text{g/ml}$ ^[11]。国外研究资料显示尽管利福布汀的抗菌谱及抗菌机制与利福平相似,但其药效学与药代动力学却明显优于利福平,如其 MIC 为利福平的 1/16~1/8,对非结核分枝杆菌尤其是鸟-胞内分枝杆菌有较强的活性^[12]。本研究亦表明利福布汀较利福平有更强的抗 MAC 活性。(3)对偶然分枝杆菌和脓肿分枝杆菌的抗菌活性:数据分析显示利福布汀体外抗菌活性较强,但菌株数较少,说服力小,有待进一步验证。杨致邦等^[13]对龟分枝杆菌脓肿进行抗生素敏感性测定,结果表明其对多种抗结核药物耐药且 MIC > 64 $\mu\text{g/ml}$ 。说明该菌对抗生素的敏感性差异较大,需结合药物敏感试验以指导临床治疗。(4)其他非结核分枝杆菌:冯雨苗等^[14]测定利福平对 3 株瘰癧分枝杆菌的体外 MIC 分别为 0.25、0.5、4 $\mu\text{g/ml}$ 。国外文献报道的利福布汀和利福平对堪萨斯分枝杆菌的 MIC 分别为 0.06~4 $\mu\text{g/ml}$, 0.12~8 $\mu\text{g/ml}$ ^[15]。2000~2007 年 Van Ingen 等^[16]对 2275 种 NTM 的 MIC 进行检测,结果显示利福布汀对鸟胞分枝杆菌、胞内分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、勘萨斯分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、戈登分枝杆菌、偶然分枝杆菌、脓肿分枝杆菌的 MIC 分别为 2 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、 ≤ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 、 ≤ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 、 ≤ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 、> 5 $\mu\text{g/ml}$ 、> 5 $\mu\text{g/ml}$,利福平的相应 MIC 分别为 > 5 $\mu\text{g/ml}$ 、> 5 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.2 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.2 $\mu\text{g/ml}$ 、> 5 $\mu\text{g/ml}$ 、> 5 $\mu\text{g/ml}$ 。本研究显示利福布汀对 NTM 的 MIC 为 4~8 $\mu\text{g/ml}$ 的菌株最少,结合国内外相关文献报道,初步得出利福布汀对常见致病性 NTM 的实验室耐药临界浓

度为 4 ~ 8 $\mu\text{g/ml}$ 。

本研究部分实验数据与相关国内外报道不完全一致,分析原因可能如下:(1)NTM 菌株数量少,样本小,代表性差;(2)国内外地域差异大;(3)同类菌株对抗生素的敏感性也存在差异;(4)应用的培养基不同(如 7H9、苏通、7H10 等琼脂培养基),即使同种培养基 pH 值不同,结果也可能不一致。

实验数据表明对利福平敏感的 NTM,利福布汀具有比利福平更强的杀菌效力;而对利福平体外耐药的 NTM,利福布汀仍对部分菌株具有一定的体外活性。这提示临床上对利福平低耐药的 NTM 感染者使用利福布汀可能有效,具体还应参考药敏结果和临床反应。本研究初步为使用利福布汀治疗 NTM 提供了实验依据。

由于本研究进行菌种鉴定的患者较少,临床获得每种 NTM 的菌株数(除 30 多株 MAC 外)均较少,样本量小,代表性差。因此还需要扩大样本数据以一步证实。

参 考 文 献

- 1 World Health Organization Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. 2006.
- 2 徐瑛. 耐多药结核病研究进展. 预防医学情报杂志,2008,24(4):290-293.
- 3 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与处理指南. 中华结核和呼吸杂志,2000,23,(11):650-653.
- 4 马屿等主编. 结核病. 北京:人民卫生出版社. 2006.
- 5 董国安. 现代耐药结核病学. 北京:中国科学技术出版社. 2005,286-287.
- 6 于守汎. 利福布汀的药效学和药物动力学特点. 国外医药·抗生素分册,2000,21(6):262-265.
- 7 陈勇川,高振同. 利福布汀的药理作用及临床应用. 国外医药抗生素分册,2001,22(5):220.
- 8 端木宏谨,刘宇红,姜广路,等. 结核分枝杆菌对利福喷汀与利福平交叉耐药的实验研究. 中华结核和呼吸杂志,2005,28(3):192-194.
- 9 段鸿飞,土井教生,李琦,等. 鸟分支杆菌复合群对 16 种抗感染药物敏感试验的分析. 中华结核和呼吸杂志,2010,33(5):359-362.
- 10 Nash KA. Effect of drug concentration on emergence of macrolide resistance in *Mycobacterium avium*. Antimicrob Agents Chemother,2001,45(6):1607-1614.
- 11 Wallace RJ Jr, Nash DR, Steele LC, et al. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. J Clin Microbiol,1986,24(6):976-981.
- 12 Dickinson JM, Mitchison DA. In vitro activity of new rifamycins against rifampicin-resistant *M. tuberculosis* and MAIS-complex mycobacteria. Tubercle,1987(3),68:177-182.
- 13 杨致邦,张碧霞,陈清风,等. 龟分枝杆菌脓肿亚种药物敏感性及其耐药性. 中华医学杂志,2001,81,(1):56.
- 14 冯雨苗,王洪生,胡中义,等. 慢生型分枝杆菌体外抗菌药物敏感性试验研究. 中国麻风皮肤病杂志,2009,25(5):327-329.
- 15 Da Silva Telles MA, Chimara E, Ferrazoli L, et al. *Mycobacterium kansasii*: antibiotic susceptibility and PCR-restriction analysis of clinical isolates. J Med Microbiol,2005,54(10):975-979.
- 16 Van Ingen J, van der Laan T, Dekhuijzen R, et al. In vitro drug susceptibility of 2275 clinical non-tuberculous *Mycobacterium* isolates of 49 species in The Netherlands. Int J Antimicrob Agents,2010,35(2):169-173.

(收稿日期:2011-04-03)

(本文编辑:孙荣华)

李艳静,彭勋,韩喜琴,等. 利福布汀对非结核分枝杆菌抗菌活性的初步探讨[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5(3):333-338.