

· 临床论著 ·

药物对美罗培南抑制耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌的影响

于亮 王梅 姜梅杰 李玉臣 刘爱华

【摘要】 目的 探讨体外药物对美罗培南抑制耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌的影响。**方法** 采用 PCR 法对 6 株耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌产生碳青霉烯酶进行鉴定;微量肉汤稀释法观察大蒜素、头孢哌酮/舒巴坦和美罗培南的最小抑菌浓度值(MIC),计算大蒜素、头孢哌酮/舒巴坦分别与美罗培南两药联用的部分抑制浓度指数(FIC)。检测维生素 C 联用美罗培南和单用美罗培南的抑菌率。**结果** 鲍曼不动杆菌 IMP、OXA-23 型碳青霉烯酶基因 PCR 扩增阳性。大蒜素、美罗培南、头孢哌酮/舒巴坦对 6 株耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌的 MIC 值分别为 512 mg/L、128 mg/L 和 1024 mg/L,大蒜素联用美罗培南的 FIC 值为 0.25,头孢哌酮/舒巴坦联合美罗培南的 FIC 值为 1.25。亚抑菌状态下,相同浓度美罗培南联合维生素 C 后,其抑菌率显著降低。**结论** 头孢哌酮/舒巴坦联用美罗培南对本研究组中的耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌无协同作用;大蒜素联用美罗培南对本研究组中的耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌具有体外协同作用;维生素 C 可降低美罗培南的抑菌率。

【关键词】 碳青霉烯酶;鲍曼不动杆菌;美罗培南;维生素 C;头孢哌酮/舒巴坦;大蒜素

Antibacterial effects of some drugs on meropenem against the carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro YU Liang, WANG Mei, JIANG Mei-jie, LI Yu-chen, LIU Ai-hua. Department of RICU, The Central Hospital of Taian, Shandong 271000, China

Corresponding author: YU Liang, Email: Liangy1996@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the antibacterial effects of some drugs on meropenem against the carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro. **Methods** The carbapenemase genotypes produced by *Acinetobacter baumannii* were identified by PCR. Bio-detection microplate assay were applied to determine MIC values for *Acinetobacter baumannii* to the allicin, meropenem and cefoperazone sulbactam, and calculated the FIC indexes of cefoperazone sulbactam with meropenem and allicin combined with meropenem. The inhibitory rates of meropenem alone and meropenem combined with vitamin C were also detected by microplate assay. **Results** All resistant *Acinetobacter baumannii* produced IMP and OXA-23 typed carbapenemases. MIC values of allicin, cefoperazone sulbactam and meropenem were 512 mg/L, 128 mg/L and 1024 mg/L, respectively. FIC values of allicin combined with meropenem and cefoperazone sulbactam combined with meropenem were 0.25 and 1.25, respectively. The rate of bacterial inhibition reduced significantly after the same concentration of meropenem combined with vitamin C in sub-MIC mode. **Conclusions** Allicin had antibiotic synergy effects with meropenem in vitro for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, which did not occur for cefoperazone sulbactam. vitamin C could decrease the bacterial inhibitory rate of meropenem.

【Key words】 Carbapenemases; *Acinetobacter baumannii*; Meropenem; Vitamin C; Cefoperazone sulbactam; Allicin

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是目前临床上较为常见的条件致病菌。研究表明其耐药性尤其是对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性近年来增长迅速^[1],甚至出现了仅对黏菌素敏感而对其他抗菌

药物均耐药的菌株^[2],如何有效地治疗耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌成为目前临床上一项重要的课题。联合抗菌药物治疗耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌是临床上推荐的指导原则^[3]。文献报道,碳青霉烯类抗菌药物与舒巴坦联用,对耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌具有协同杀灭作用^[4]。为进一步了解碳青霉烯类抗菌药物与其他药物联合使用对耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌抗菌活性

的影响。本研究对头孢哌酮/舒巴坦、大蒜素和维生素 C 分别与美罗培南联用后,对耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌抗菌活性进行了研究,结果报道如下。

资料和方法

一、实验材料

1. 临床分离细菌菌株 6 株,其中均为对碳青霉烯类抗菌药物耐药的鲍曼不动杆菌,细菌耐药性分析采用菌株鉴定,用 Walk Away 40 全自动鉴定仪及其配套药敏测定板测定最小抑菌浓度值(minimum inhibitory concentration, MIC)值。判断标准按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)2007 年推荐的方法及标准,以敏感(S)、中介(I)和耐药(R)报道结果。

2. 药物大蒜素注射液(规格:30 mg/10 ml,山东鲁抗辰欣药业有限公司产品,批准文号:国药准字 H20034159);维生素 C 0.5 g/ml(齐鲁制药),美罗培南 0.5 g(住友制药苏州有限公司),头孢哌酮/舒巴坦 2.0 g(舒普深,辉瑞制药)。水解酪蛋白(MH)琼脂、肉汤培养基和琼脂糖均购自英国 OXOID 公司;细菌质粒提取试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、 $2 \times Taq$ PCR Master Mix、DNA size marker II、III 均购于北京天根生化科技公司;引物合成及 PCR 产物测序由上海英骏公司完成。

3. 培养基与仪器:PCR 扩增仪(MJ 公司,美国),电泳仪(BioRad 公司,美国),凝胶成像分析系统(英国 UVI);比浊仪(法国生物梅里埃公司);连续微量加样器(美国 Eppendorf 公司);八道微量加样器(美国 Eppendorf 公司);96 孔平板(美国 Costar)。

二、方法

1. 质粒分析:采用经典的碱裂解法提取质粒 DNA,再配制 0.7% 的琼脂糖,按 60 V/cm 的电压电泳 1 h,观察结果。

2. PCR 扩增耐药基因:参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书,提取细菌基因组 DNA。PCR 反应总体积 20 μ l,其中引物各 1.5 μ l, $2 \times Taq$ PCR Master Mix 10 μ l, DNA 模板 1 μ l,加水补足 20 μ l。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。IMP、VIM 和 OXA 型碳青霉烯酶基因的 PCR 及序列分析,扩增所用的引物、反应条件参照文献进行^[5-8]。碳青霉烯酶 IMP 引物:正义链 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3', 反义链 5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3', PCR 产物为 587 bp;VIM:正义链 5'-AGTGGTGACTATCCGACAG-3', 反义链 5'-ATGAAAGTGGGTGGAGAC-3', PCR 产物为 261 bp;OXA-23:正义链 5'-GATGTGTCATAGTATT CGTCG-3', 反义链 5'-TCACAACAACATAAAGCACT

G-3', PCR 产物为 1067 bp;OXA24:正义链 5'-GTACT AATCAAAGTTGTGAA-3', 反义链 5'-TTCCCCTAACA TGAATTTGT-3', PCR 产物为 800 bp。整合子可变区域:正义链 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3', 反义链 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'。

3. 菌悬液配制:以经过分纯并过夜新鲜培养的细菌平板上挑取 4~5 个菌落,接种于 MH 肉汤中增菌 6 h。菌液用 3 ml MH 肉汤以比浊仪校正浊度 0.5 Mac Farland,再用 M-H 肉汤稀释至 1.5×10^5 CFU/ml。

4. 大蒜素储备液为 3 g/L,美罗培南储备液 1024 mg/L。头孢哌酮/舒巴坦储备液为 2048 mg/L,维生素 C 储备液为 0.3 g/ml。

5. 微量肉汤稀释法检测大蒜素注射液、美罗培南和头孢哌酮/舒巴坦的 MIC 值。

将大蒜素注射液、美罗培南;头孢哌酮/舒巴坦、美罗培南和以灭菌 M-H 肉汤倍比稀释成 11 个浓度,加入 96 孔平板中,每种抗菌药物取 50 μ l,再将 5×10^5 CFU/ml 的菌液 100 μ l 加入孔中,37℃ 过夜培养。观察结果,无细菌生长的最小药物浓度为该药物的 MIC 值。

6. 微量肉汤稀释法检测大蒜素注射液、美罗培南和头孢哌酮/舒巴坦、美罗培南部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration, FIC):将大蒜素注射液和美罗培南;头孢哌酮/舒巴坦和美罗培南以灭菌 M-H 肉汤倍比稀释成 11 个浓度,将配好的不同浓度的大蒜素与美罗培南,头孢哌酮/舒巴坦和美罗培南按棋盘法设计,两两组合加入 96 孔平板中,每种抗菌药物取 50 μ l,再将 5×10^5 CFU/ml 的菌液 100 μ l 加入孔中,37℃ 过夜培养。观察结果,记录单独应用两种药的最低抑菌浓度,即甲药单用和乙药单用的 MIC,并选择两药联用的 MIC,甲药联用和乙药联用的 MIC,相加值的最小数值作为最佳组合,计算 FIC 指数。FIC = 联合用药时甲药 MIC/单独应用甲药时 MIC + 联合应用乙药时 MIC/单独应用乙药时 MIC, FIC 指数为 ≤ 0.5 、 $> 0.5 \sim 1$ 、 $> 1 \sim 2$ 和 > 2 时分别表示协同、相加、无关和拮抗作用。

7. 维生素 C 对美罗培南抑菌率影响曲线测定:采用微孔板生物检测法,平底 96 微孔板上取 3 个微孔作为空白对照孔,每个微孔内分别将 1.5×10^5 CFU/ml 的菌液 250 μ l 加入孔中,取 3 个微孔作为菌液对照孔。每个微孔内分别装有 200 μ l 1.5×10^5 CFU/ml 的细菌培养液。美罗培南组:将美罗培南加入样品测定孔, 1.5×10^5 CFU/ml 的细菌培养液补充终体积为 250 μ l,终浓度分别为 64 mg/L、32 mg/L、16 mg/L 和 8 mg/L 美罗培南;美罗培南 + 维生素 C 组:将美罗培南和维生素 C 加入样品测定孔,

1.5×10^5 CFU/ml 的细菌培养液补充终体积为 250 μ l, 美罗培南终浓度分别为 64 mg/L、32 mg/L、16 mg/L 和 8 mg/L, 维生素 C 浓度为 0.25 g/L, 这些孔作为样品测定孔。于 37℃ 过夜培养, 酶标仪在波长 600 nm 下测定微孔板中各孔内培养液的吸光度值 (A), 计算各孔中样品的抑菌率。抑菌率计算公式为:

$$\text{抑菌率}\% = (A_R - A) / (A_R - A_B) \times 100\%$$

式中: A_R : 菌液对照孔的吸光值; A_B : 空白对照孔的吸光值; A : 样品测定孔的吸光值。分别统计美罗培南、美罗培南 + 0.25 g/L 维生素 C 的抑菌率。以抑菌率为纵坐标, 以浓度为横坐标绘制曲线。

三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行处理, 多组抑菌率比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、6 株耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌菌质粒的检测

6 株耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌质粒琼脂糖凝胶电泳结果显示分子量均 > 4500 bp, 分子量一致。见图 1。

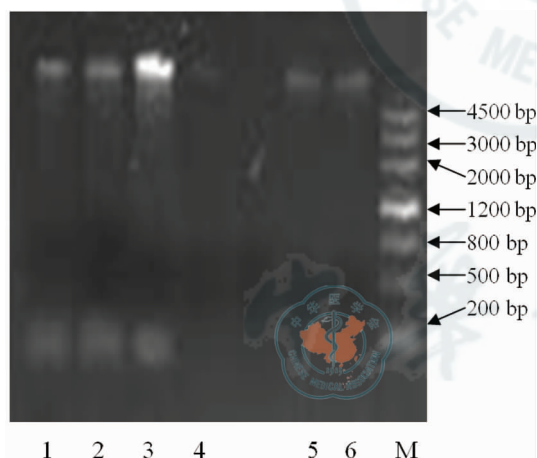


图 1 泛耐药鲍曼不动杆菌提取质粒琼脂糖电泳结果

注: M: 分子量标记, 1~6 分别为其中 6 株泛耐药鲍曼不动杆菌提取的质粒电泳结果, 分子量 > 4500 bp

二、耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌整合子 PCR 产物的电泳结果

6 株鲍曼不动杆菌 I 类整合子可变区 PCR 扩增阳性, 其中 4 株分子量约 3000 bp, 2 株分子量约 800 bp, 见图 2。

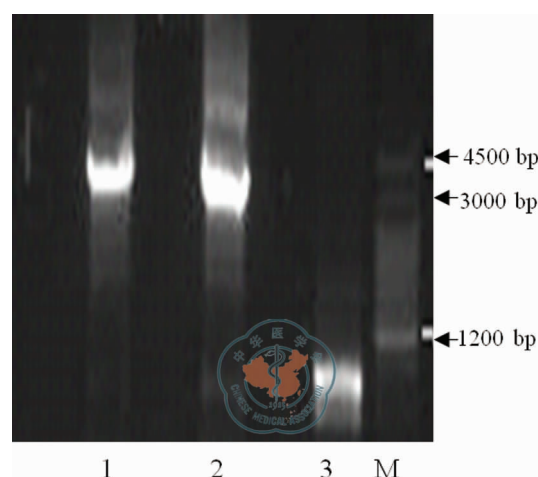


图 2 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌整合子 PCR 扩增结果

注: M: 分子量标记, 1、2、3 泳道为耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌整合子 PCR 扩增结果, 1、2 泳道分子量约 3000 bp; 3 泳道分子量接近 800 bp

三、耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌 IMP、OXA-23 型碳青霉烯酶基因的 PCR 扩增结果

经 PCR 扩增后, 6 株多耐药鲍曼不动杆菌均携带 IMP (目的条带为 587 bp) 和 OXA-23 (目的条带为 1067 bp) 碳青霉烯酶基因, 而未能扩增出 VIM 和 OXA-24 基因, 见图 3、4。PCR 产物经纯化后测序与 IMP 和 OXA-23 碳青霉烯酶基因相同。

四、大蒜素注射液、美罗培南和头孢哌酮/舒巴坦的 MIC 值

大蒜素注射液、美罗培南和头孢哌酮/舒巴坦对 6 株耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌的 MIC 值分别为 512 mg/L、128 mg/L 和 1024 mg/L。

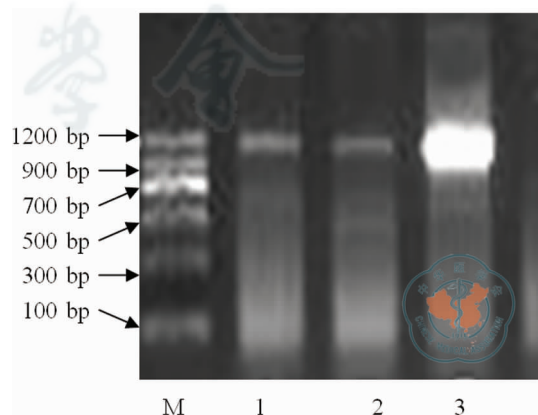


图 3 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌 OXA-23 碳青霉烯酶的 PCR 结果

注: M 分子量标记, 1、2、3 泳道为其中 3 株多耐药鲍曼不动杆菌 OXA-23 碳青霉烯酶 PCR 结果, 分子量为 1067 bp

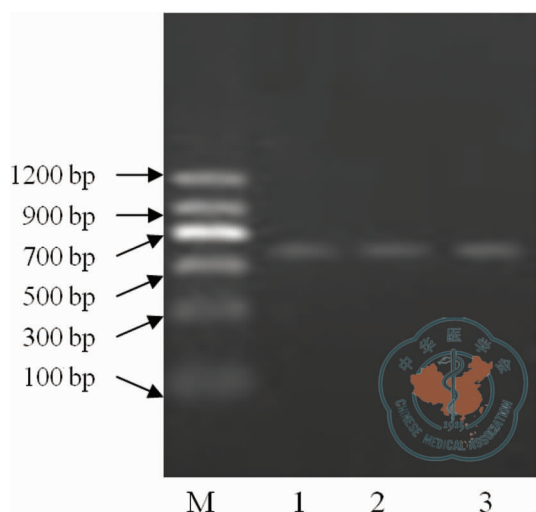


图 4 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌 IMP 碳青霉烯酶的 PCR 结果
注: M 分子量标记 1、2、3 泳道为其中 3 株多耐药鲍曼不动杆菌 IMP 碳青霉烯酶 PCR 结果, 分子量为 587 bp

五、大蒜素联合美罗培南以及头孢哌酮联合美罗培南的 FIC 指数检测

大蒜素联合美罗培南和头孢哌酮/舒巴坦联合美罗培南的 FIC 指数值分别为 0.25 和 1.25。

六、亚抑菌情况下维生素 C 对美罗培南抑菌率的影响

亚抑菌状态下, 较同浓度美罗培南单用相比, 不同浓度 (64 mg/L、32 mg/L、16 mg/L 和 8 mg/L) 美罗培南, 联合 0.25 g/L 维生素 C 后, 对细菌抑菌率显著降低, 见图 5。

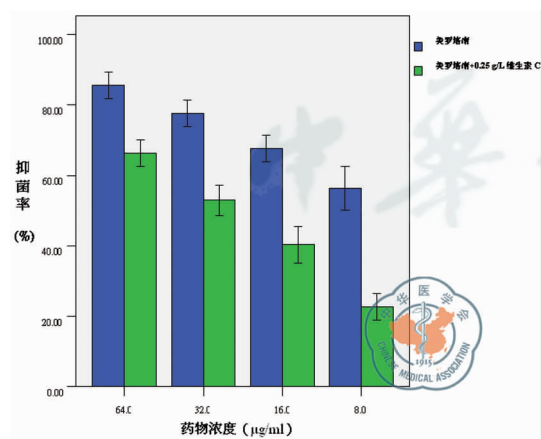


图 5 亚抑菌状态下维生素 C 对美罗培南抑菌率的影响

讨 论

碳青霉烯酶最大特点是可以水解碳青霉烯类抗菌药物。本研究通过对 6 株临床分离的对黏菌素敏感而对其他抗菌药物均耐药的鲍曼不动杆菌进行 IMP、VIM、OXA 型碳青霉烯酶基因的 PCR 分析, 发

现 6 株鲍曼不动杆菌均产生碳青霉烯酶, 而且其碳青霉烯酶为 IMP、OXA-23 型, 而其他如 VIM 和 OXA-24 均未能扩增出产物。

研究发现整合子系统与抗菌药物的耐药直接或间接相关。此外, 整合子阳性菌株还存在更广泛的多药耐药谱, 进一步证明整合子系统与细菌多重耐药的相关性^[8]。通过对本组鲍曼不动杆菌整合子进行 PCR 分析, 发现两株细菌整合子 PCR 扩增产物差距较大, 提示两株细菌在整合子水平存在一定差异, 但整合子分子量在 800 bp 左右的菌株, 其耐药性与分子量接近 4000 bp 菌株比较, 并无显著性差异, 可能与分子量较小的耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌 I 类整合子可移动性更强, 且具有同大分子量整合子一样的整合能力有关, 其更易造成宿主菌的耐药性^[9]。

研究发现, 舒巴坦与美罗培南联合应用后, 可有效治疗耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌所引起的感染^[4]。而本研究体外实验发现, 头孢哌酮/舒巴坦与美罗培南联用后, 对耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌的 FIC 值为 1.25。确诊的耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌感染的 2 例患者疗效分析结果显示, 此 2 例患者在应用头孢哌酮/舒巴坦和美罗培南后, 临床治疗效果并不显著, 患者感染持续加重, 提示头孢哌酮/舒巴坦联合美罗培南对上述耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌的杀菌效果不佳。

大蒜素 (allicin) 又名大蒜新素, 化学名为二烯丙基三硫化物, 是从蒜的球形鳞茎中提取的挥发性油状物, 是大蒜的主要有效成分。近年来, 国内外学者对大蒜的化学、药理和临床进行了多方面的研究, 证实大蒜素具有卓越的功效, 其杀菌力强, 抗菌谱广^[10]。通过两种药物抑菌率的比较, 证实大蒜素和美罗培南的联合应用, 不但可显著降低两种药物对耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌的 MIC 值, 而且亚抑菌状态下其抑菌率也明显提高, 提示抑菌率与大蒜素的浓度相关, 在大蒜素达到 64 mg/L 以上浓度时, 美罗培南在 2 mg/L 时仍能达到 70% 以上的抑菌率, 较单纯使用美罗培南的抑菌率显著增加。

本研究发现, 维生素 C 在亚抑菌状态的情况下对美罗培南的抑菌率有显著抑制作用, 加用 0.25 g/L 的维生素 C 后, 美罗培南各亚抑菌状态下抑菌率均下降 20% 以上, 而为何联用维生素 C 后美罗培南的抑菌率下降, 目前尚无确切解释, 需进一步研究。

综上所述, 头孢哌酮/舒巴坦与美罗培南联用对本研究中的耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌并无体外协同作用, 而大蒜素与美罗培南联用对本研究中的耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌有体外协

同作用;另外,维生素 C 可降低美罗培南的对耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌的抑菌率。

参 考 文 献

- 1 于亮,王梅,袁军,等. 2007-2010 年临床主要病原菌分布及两种主要非发酵菌的耐药分析. 中华临床医师杂志:电子版:2011,5(16):4766-4769.
- 2 杨莉,韩立中,孙景勇,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌仅黏菌素敏感菌株分子流行病学研究. 中华医学杂志,2006,86(9):592-595.
- 3 陈柏义,何礼贤,胡必杰,等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识. 中华医学杂志,2012,92(2):76-85.
- 4 王韧韬,余丹阳. 碳青霉烯类抗生素联合舒巴坦治疗耐药鲍曼不动杆菌导致的医院获得性肺炎. 军医进修学院学报,2011,32(7):687-689.
- 5 Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, et al. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. J Clin Microbiol,1996,34(12):2909-2913.
- 6 Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, et al. Outbreak of infectious caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J Clin Microbiol,2000,38(3):1290-1292.
- 7 Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother,2001,45(2):583-588.
- 8 Lévesque C, Piché L, Larose C, et al. PCR mapping of integrons reveals several novel combination of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother,1995,39(1):185-191.
- 9 谢瑶瑶,楼杨方,谭焕腾,等. 整合子介导的鲍曼不动杆菌耐药机制研究. 温州医学院学报,2011,41(1):13-17.
- 10 梅四卫,朱涵珍. 大蒜素的研究进展. 中国农学通报,2009,25(9):97-101.

(收稿日期:2012-01-03)

(本文编辑:孙荣华)

于亮,王梅,姜梅杰,等. 药物对美罗培南抑制耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(6):611-615.

中华医学会