

· 临床论著 ·

三种碳青霉烯类抗菌药物联用头孢哌酮舒巴坦 对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的抗菌活性分析

于亮 王梅

【摘要】目的 探讨亚胺培南、美罗培南、厄他培南3种碳青霉烯类抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用, 对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的抗菌活性。**方法** 分别检测亚胺培南、美罗培南、厄他培南对36株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的最小抑菌浓度(MIC)值, 及3种抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用的部分抑菌浓度(FIC)指数, 计算3种碳青霉烯抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用累计抑菌率曲线。**结果** 36株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌, 亚胺培南、美罗培南MIC₅₀为16 mg/L, 亚胺培南MIC₉₀为64 mg/L; 美罗培南MIC₉₀为128 mg/L。厄他培南MIC₅₀为32 mg/L, MIC₉₀为256 mg/L。亚胺培南、美罗培南、厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联用, FIC指数 ≤ 0.5 、 $0.5\sim 1$ 、 $1\sim 2$ 和 > 2 者分别为1株、16株、14株、5株; 1株、17株、13株和5株; 0株、1株、30株和5株。三种药物与头孢哌酮舒巴坦联用后, 亚胺培南累计抑菌率曲线左移, 美罗培南累计抑菌率曲线改变不明显; 厄他培南联用后, 累计抑菌率曲线轻度右移。**结论** 亚胺培南、美罗培南与头孢哌酮舒巴坦联用对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌多数呈相加或无关作用, 厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联用呈无关作用; 3种碳青霉烯抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦对部分耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌具有拮抗作用。

【关键词】 碳青霉烯抗菌药物; 头孢哌酮舒巴坦; 耐碳青霉烯类; 鲍曼不动杆菌; 抑菌浓度指数

The antibacterial activity of three carbon carbapenem antibiotics combined with cefoperazone sulbactam against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* YU Liang, WANG Mei. Department of Respiratory ICU, Central Hospital of Taian, Taian 271000, China

Corresponding author: YU Liang, Email: liangy1996@126.com

【Abstract】Objective To investigate antibacterial activity of the imipenem, meropenem and ertapenem with cefoperazone sulbactam against the carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Methods** The minimal inhibitory concentration (MIC) values of imipenem, meropenem and ertapenem against 36 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* were detected, and the fractional inhibitory concentration (FIC) index and cumulative inhibition rate curve of three antibiotics with cefoperazone sulbactam were calculated. **Results** Against 36 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, the MIC₅₀ of imipenem, meropenem and ertapenem were 16 mg/L, 16 mg/L and 32 mg/L, MIC₉₀ were 64 mg/L, 128 mg/L and 256 mg/L, respectively. The number of strains with different FIC indexes (≤ 0.5 , $0.5\sim 1$, $1\sim 2$ and > 2) after imipenem, meropenem, ertapenem combined with cefoperazone sulbactam were 1, 16, 14, 5 strains and 1, 17, 13, 5 strains and 0, 1, 30, 5 strains, respectively. The cumulative inhibition rate curves of cefoperazone sulbactam with imipenem turned to left, with ertapenem turned to right slightly, and with meropenem had no significantly change. **Conclusions** The antibacterial activity of the imipenem or meropenem with cefoperazone sulbactam were additive or unrelated, and ertapenem with cefoperazone sulbactam were unrelated in the antibacterial effect against the carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Three carbapenem antibiotics with cefoperazone sulbactam were antagonistic for some carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.

【Key words】 Carbapenem antibiotics; Cefoperazone sulbactam; Carbapenem-resistance; *Acinetobacter baumannii*; Inhibitory concentration index

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.024

作者单位: 271000 泰安市, 山东省泰安市中心医院呼吸重症科

通讯作者: 于亮, Email: liangy1996@126.com

近年来,碳青霉烯类抗菌药物联合头孢哌酮舒巴坦有效治疗耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌屡有报道^[1-3]。临床上使用的碳青霉烯类抗菌药物种类较多,如亚胺培南、美罗培南和厄他培南等,在杀菌机制方面,碳青霉烯类抗菌药物均是通过碳青霉烯类抗菌药物作用方式都是抑制胞壁黏肽合成酶,即青霉素结合蛋白(penicillin-binding proteins, PBPs),从而阻碍细胞壁黏肽合成,使细菌胞壁缺损,菌体膨胀致使细菌胞浆渗透压改变和细胞溶解而杀灭细菌,但3种抗菌药物对于不同细菌的抗菌效率有一定差别^[4]。对于不同碳青霉烯类抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联合应用,对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌抗菌效果的差别,目前尚鲜见报道。本研究对亚胺培南、美罗培南、厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联合应用对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的抗菌作用进行了初步研究,现报道如下。

资料和方法

一、一般资料

临床分离细菌菌株36株,为对碳青霉烯类抗菌药物耐药的鲍曼不动杆菌(简称耐药菌)。细菌耐药性分析采用菌株鉴定用WalkAway 40全自动鉴定仪。M-H琼脂为法国生物梅里埃公司产品。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)、耐药(R)报告结果。亚胺培南-西司他丁(0.5 g + 0.5 g)和厄他培南(1.0 g)为默沙东(杭州)制药有限公司产品;美罗培南(0.5 g)为住友(苏州)制药有限公司;亚胺培南-西司他丁、厄他培南、美罗培南药敏试纸片(OXIOAD, 10 µg)。M-H肉汤和M-H琼脂(美国Difco公司);比浊仪(法国生物梅里埃公司);八道微量加样器(美国Eppendorf公司);96孔平板(国产)。琼脂糖购自英国OXOID公司;2倍浓度Taq PCR MasterMix和核酸分子量标记(DNA size marker) II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。PCR扩增仪(MJ公司PTC-200,美国),电泳仪(BioRad公司,美国),凝胶成像分析系统(英国UVI)。

二、微量肉汤稀释法检测亚胺培南、美罗培南、厄他培南与头孢哌酮舒巴坦的FIC值

微量肉汤稀释法将亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢哌酮舒巴坦和以灭菌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该抗菌药物按棋盘法设计,两两组合加入96孔平板中,每种抗菌药物取50 µl,再将 5×10^5 CFU/ml的菌液100 µl加入孔中,37 °C过夜培养。观察结果,记录单独应用两药的最低抑菌浓度MIC_{甲药单用}和MIC_{乙药单用},并选择两药联用的MIC_{甲药联用}和MIC_{乙药联用},相加值最小数值作为最佳组合,计算部分抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数。 $FIC = MIC_{甲药联用} / MIC_{甲药单用} + MIC_{乙药联用} / MIC_{乙药单用}$,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。

三、浓度-累积抑菌率曲线

分别统计亚胺培南和头孢哌酮舒巴坦、美罗培南和头孢哌酮舒巴坦、厄他培南和头孢哌酮舒巴坦单用及联合应用对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌各个浓度点的累积抑菌率,以累积抑菌率为纵坐标,以浓度为横坐标绘制曲线。

四、琼脂板K-B法检测药物的相互作用

将MH营养琼脂加热溶解后,在琼脂培养基冷却冷却待用。分别取菌液浓度为 1.5×10^8 CFU的菌株0.2 ml,用医用棉签均匀涂布琼脂培养基表面,置室温3~5 min后,用无菌镊子贴加亚胺培南和头孢哌酮舒巴坦纸片、美罗培南和头孢哌酮舒巴坦纸片、厄他培南和头孢哌酮舒巴坦纸片,间距5 mm,然后将平皿置于37 °C恒温培养箱培养24 h后,测定头孢哌酮舒巴坦纸片周围抑菌环直径的大小。

五、PCR方法检测耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因

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12 h。菌液用3 ml MH肉汤,比浊仪下校正浊度至0.5麦氏单位,再用MH肉汤稀释至 1.5×10^8 CFU/L。根据试剂盒说明进行操作分别提取细菌基因组DNA和质粒。采用PCR方法以基因组DNA为模板,扩增IMP型、VIM型及OXA型碳青霉烯酶基因,PCR产物纯化后测序。PCR反应总体积20 µl,其中引物各1.5 µl,2倍浓度Taq PCR MasterMix 10 µl, DNA模板1 µl,加水补足20 µl。扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳。扩增所用的引物、反应条件参照文献^[5-7]进行。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'-AGTG GTGAGTAT-CCGACAG-3',反义链:5'-ATGAAAGTG-CGTGGAGAC-3',PCR产物261 bp;OXA-23正

义链: 5'-GATGTGTCATAGTATTCGTCG-3',
反义链: 5'-TCACAACAACATAAAGCACTG-3',
PCR产物为1067 bp; OXA24正义链: 5'-
GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3', 反义链: 5'-
TTCCCCTAACATGAATTTGT-3'。

结 果

一、碳青霉烯酶OXA-23的PCR扩增结果

研究组碳青霉烯酶OXA-23 PCR扩增均扩增阳性结果, 见图1, 其他碳青霉烯酶基因未能扩增出。

二、亚胺培南、美罗培南、厄他培南和头孢哌酮舒巴坦对36株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌MIC值

亚胺培南对36株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌MIC₅₀: 16 mg/L, MIC₉₀ 64 mg/L; 美罗培南MIC₅₀: 16 mg/L, MIC₉₀: 128 mg/L; 厄他培南为MIC₅₀: 32 mg/L, MIC₉₀: 256 mg/L; 头孢哌酮舒巴坦对36株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌MIC₅₀: 16 mg/L, MIC₉₀: 128 mg/L。

三、美罗培南、厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联用的FIC值

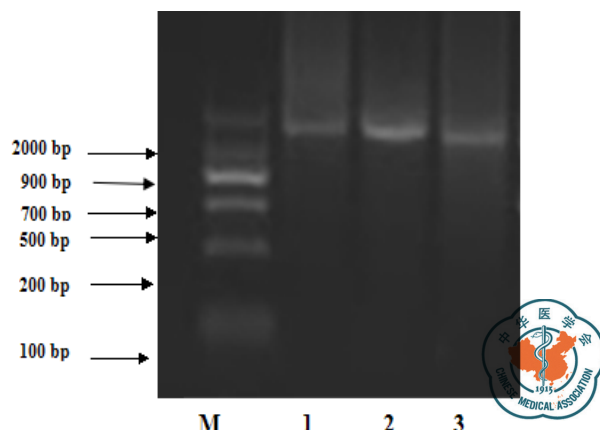
亚胺培南与头孢哌酮舒巴坦联用, FIC指数≤0.5、0.5~1、1~2、>2者分别为1株、16株、14株和5株。美罗培南与头孢哌酮舒巴坦联用, FIC指数≤0.5、0.5~1、1~2、>2者分别为1株、17株、13株和5株。厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联用, FIC指数≤0.5、0.5~1、1~2、>2者分别为0株、1株、30株和5株。

四、纸片法检测亚胺培南、美罗培南、厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联用后抗菌活性

根据纸片法药物相互作用判断标准^[8], 3种碳青霉烯抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用后的抗菌效果为: 亚胺培南与头孢哌酮舒巴坦联用后, 协同1株, 相加16株, 无关14株, 拮抗5株; 美罗培南与头孢哌酮舒巴坦联用后, 协同1株, 相加17株, 无关13株, 拮抗5株; 厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联用后, 协同1株, 无关30株, 拮抗5株, 图2为其中一株细菌检测的结果。

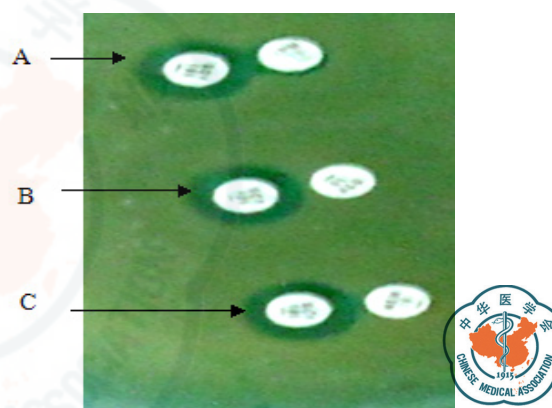
五、亚胺培南、美罗培南、厄他培南单用和头孢哌酮舒巴坦联用的累计抑菌率曲线

亚胺培南与头孢哌酮舒巴坦联用后, 累计抑菌率曲线均表现为左移, 美罗培南联用和单用累计抑菌率曲线有交叉。左移不明显; 厄他培南联用后, 累计抑菌率曲线右移, 见图3。



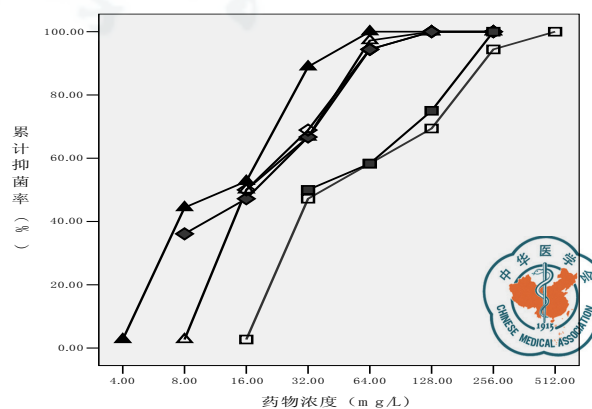
注: M: 分子量标记1~3为部分菌株碳青霉烯酶OXA-23 PCR扩增结果, 目的条带为1067 bp

图1 碳青霉烯酶OXA-23 PCR扩增结果



注: A: 头孢哌酮舒巴坦+亚胺培南; B: 头孢哌酮舒巴坦+厄他培南; C: 头孢哌酮舒巴坦+美罗培南。亚胺培南、美罗培南与头孢哌酮舒巴坦表现为相加作用, 亚胺培南>美罗培南, 厄他培南与头孢哌酮舒巴坦表现为无关作用

图2 3种碳青霉烯抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用后对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌抑菌效果



注: ▲亚胺培南联用, △亚胺培南单用; ◆美罗培南联用, ◇美罗培南单用; □厄他培南联用, ■厄他培南单用

图3 3种碳青霉烯类抗菌药物联合头孢哌酮舒巴坦累计抑菌率曲线

讨 论

鲍曼不动杆菌的耐药机制非常复杂,包括产生多种 β -内酰胺酶、氨基糖苷类药物修饰酶、外膜蛋白丢失、青霉素结合蛋白改变和泵出等^[9]。随着碳青霉烯类抗菌药物在临床重症感染治疗中的广泛应用,陆续发现了数种新型的碳青霉烯酶。Wang等^[10]报道,在收集的来自1999至2005年我国不同地区11家教学医院的221株亚胺培南耐药不动杆菌中,97.7%的菌株含有OXA-23样基因,提示OXA-23在我国广泛分布。本研究也证实,本组细菌均携带OXA-23碳青霉烯酶基因,而其他VIM、IMP和Oxa-24等均未扩增成功,初步证实本组菌株不携带VIM、IMP和Oxa-24碳青霉烯酶基因。

亚胺培南、厄他培南、美洛培南的体外抗菌作用比较,美洛培南对革兰阴性杆菌体外抗菌较亚胺培南强2~8倍^[11]。厄他培南对革兰阳性菌活性不及亚胺培南^[12]。厄他培南对铜绿假单胞菌、不动杆菌属的敏感性明显较亚胺培南和环丙沙星为低,对其他非发酵菌的抗菌作用亦较差^[4]。但本研究结果发现,对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的抗菌活性,亚胺培南优于美罗培南,两者又均优于厄他培南。亚胺培南、美罗培南与头孢哌酮舒巴坦联合应用时的抗菌效果,并未表现出明显的协同作用,多数仅表现为相加作用。而厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联合使用,多数表现为无关作用,且累计抑菌率曲线右移。提示厄他培南对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌治疗效果较差,与头孢哌酮舒巴坦联合,无相加或协同作用。

本研究中分别有5株细菌表现为对3种碳青霉烯抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用呈拮抗作用,目前报道的国内外文献当中并未见类似报道。有报道碳青霉烯类抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用多为协同或相加作用^[13-14],临床上也有关于碳青霉烯类抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用较单用头孢哌酮舒巴坦单用可以更有效地治疗耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌感染的报道^[15],但本研究结果提示,对于以上碳青霉烯抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联合使用治疗耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌临床上应当慎重,对于两种药物发生拮抗的菌株,联合使用可能造成感染的加重,应当在进一步明确菌株对于两种抗菌药物是否拮抗后,方可决定是否使用。

综上,亚胺培南、美罗培南与头孢哌酮舒巴坦

联用对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌多数呈相加或无关作用,厄他培南与头孢哌酮舒巴坦联用呈无关作用;3种碳青霉烯抗菌药物与头孢哌酮舒巴坦联用对部分耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌呈拮抗作用。

参 考 文 献

- 1 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.
- 2 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.军事进修学院学报,2011,32(7):687-689.
- 3 Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. Int J Antimicrob Agents,2011,37(2):102-109.
- 4 贺蓓,杜毅鹏.碳青霉烯类抗生素相互间的区别与临床应用价值.中华结核和呼吸杂志,2008,31(2):154-157.
- 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, Pourmaras 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 管远志,王艾琳,李坚主编.医学微生物学实验技术.化学工业出版社:北京.2001:119-121.
- 9 Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther,2010,8(1):71-93.
- 10 Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem resistant *Acinetobacter spp* from Chinese hospitals. Antimicrob Agents Chemother,2007,51(11):4022-4028.
- 11 梅亚宁,文怡,陈友华,等.美罗培南和亚胺培南-西司他丁对100株革兰氏阴性杆菌体外抗菌活性的比较.中国感染与化疗杂志,2006,6(1):55-56.
- 12 石和鹏,冯彩虹,金洁,等.新型1 β -甲基碳青霉烯类抗生素厄他培南.中国新药杂志,2004,13(12):1172-1175.
- 13 宋洁,余双江,王春兰.联合应用抗菌药物对耐药鲍曼不动杆菌体外抗菌活性的影响.西南国防医药,2011,21(11):1170-1172.
- 14 罗光辉,刘漪,王翔.亚胺培南联合头孢哌酮舒巴坦与单用头孢哌酮舒巴坦治疗多重耐药鲍曼不动杆菌的疗效观察.中国医药指南,2012,10(29):449-450.
- 15 徐雅萍,龚美亮,夏静静,等.美罗培南与米诺环素及头孢哌酮/舒巴坦对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的联合药敏研究.中华医院感染学杂志,2012,22(6):1251-1253.

(收稿日期:2013-04-19)

(本文编辑:孙荣华)