

文章编号 1006-8147(2020)03-0276-04

论著

替加环素联合5种抗菌药物对耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌体外抗菌作用的研究

郎磊¹, 李娜¹, 陈露¹, 芦晓庆¹, 朱立勤^{1,2}, 张坚磊³

(1.天津医科大学一中心临床学院药剂科,天津 300192;2.天津市第一中心医院药剂科,天津 300192;3.天津市第一中心医院检验科,天津 300192)

摘要 目的:评价替加环素分别联合磷霉素等多种抗菌药物对耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌(CRKP)的作用。方法:采用E-test法测定替加环素分别联合不同机制抗菌药物对临床分离的CRKP的最低抑菌浓度(MIC),并计算部分抑菌浓度指数(FICI)。结果:替加环素和复方新诺明对CRKP显示是敏感,其余耐药。替加环素联合复方新诺明,在体外复方新诺明对替加环素的抗菌作用表现出局部协同作用,替加环素其他联合方案对CRKP显示无相关作用。结论:替加环素联合复方新诺明在体外对CRKP具有一定抗菌效应。

关键词 替加环素;复方新诺明;联合用药;耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌

中图分类号 R978

文献标志码 A

In vitro antibacterial activity study of tigecycline combined with 5 antibacterial agents against CRKP

LANG Lei¹, LI Na¹, CHEN Lu¹, LU Xiao-qing¹, ZHU Li-qin^{1,2}, ZHANG Jian-lei³

(1.Department of Pharmacy, The First Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2.Department of Pharmacy, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; 3.Department of Clinical Laboratory, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract Objective: To evaluate the effects of tigecycline combined with fosfomycin and other antibacterial agents on carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*(CRKP). **Methods:** E-test was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of tigecycline combined with different mechanisms of antibacterial agents for clinically isolated CRKP, and the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated. **Results:** Tigecycline and cotrimoxazole were sensitive to CRKP and the rest were resistant. The antibacterial effect of tigecycline combined with sulfamethoxazole showed local synergy *in vitro*, and other combinations of tigecycline showed no correlation with CRKP. **Conclusion:** Tigecycline combined with sulfamethoxazole has a certain antibacterial effect on CRKP *in vitro*.

Key words tigecycline; co-trimoxazole; combination therapy; CRKP

近年,临床上普遍使用广谱抗菌药物,并不科学的用药方案等,这些因素都会让细菌表现出耐药性。替加环素主要用于解决抗菌药物耐药相关的问题^[1]。替加环素本质上属于一种抑菌剂,体外及体内试验均证明具有广泛的抗菌谱^[2]。一些学者研究指出,在治疗过程中若仅采用了替加环素,在这种背景下肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌就会受到影响,进而对替加环素有着相对更低的敏感性,而联合用药可以有效的解决该问题^[3]。不过现阶段,替加环素联合其他抗菌药物对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌体外活性的研究较多,而抗菌药物联合药敏试验对耐碳青霉烯类抗菌药物的肠杆菌科细菌(carbapenem-

resistant enterobacteriaceae, CRE)的联合药敏试验较少^[4-5]。在张艳君等^[6]及冯旭慧等^[7]的研究中,在临床收集的CRE的菌株中,根据统计结果可知,耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)的检出率居首位。

CRKP广泛存在于自然界的土壤和水中,容易定植于住院患者的肠道和呼吸道。CRKP作为一种院内感染常见的条件致病菌,在患者免疫力低下时,可以导致血液、消化道、泌尿道、下呼吸道皮肤软组织以及手术切口等多个部位的感染^[8]。CRKP被定义为对任何碳青霉烯类药物敏感性降低的CRKP分离株(MIC \geq 2 mg/L),CRKP对多种抗生素耐药,临床上用于治疗CRKP的抗菌药包括多粘菌素、氨基糖苷类、替加环素。随着抗菌药物的广泛使用,CRKP对替加环素等药物的敏感性在逐渐降低^[9-10]。选择有效的抗菌药物治疗CRKP的感染已经称为迫切的问题。因此,在本研究中使用E-test法评价替加环

基金项目 天津市临床重点学科建设资助项目(津卫科教(2018)268号)

作者简介 郎磊(1986-),男,硕士在读,研究方向:药理学;通信作者:朱立勤,E-mail: zliq0713@aliyun.com;张坚磊,E-mail: 570184102@qq.com。

素分别联合妥布霉素等,后续就需要对抑菌浓度指数进行选择,保证联合用药是最为科学的,基于此实现对 CRKP 感染有效控制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 在此次实验中主要选用了 KPC-2 型碳青霉烯酶的 CRKP, 该类型菌具体由天津市第一中心医院检验科实现分离,药敏测定的标准质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922。使用法国生物梅里埃公司 Vitek MS 质谱仪对细菌进行鉴定并与标准数据库进行对比,判定标准为待测菌株与标准菌株图谱一致性的百分比可信值。

1.1.2 培养基和药敏试纸条 此实验中需要用到 MH 琼脂培养基(一次性),哥伦比亚血琼脂培养基,(上海科玛嘉微生物技术有限公司),替加环素药敏试纸条,妥布霉素药敏试纸条,哌拉西林/他唑巴坦药敏试纸条,磷霉素药敏试纸条,复方新诺明药敏试纸条,左氧氟沙星药敏试纸条(以上均来自温州市康泰生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器设备 细菌多点接种仪,Vitek MS 质谱仪,细菌标准比浊仪,微量移液枪以及 Panasonic 细菌培养箱。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 在哥伦比亚血琼脂培养基中接种,后续就需要将其转移到培养箱中,相应的温度条件为 35℃,同时相应空气条件为 5% CO₂,基于此实现过夜培养。

1.2.2 细菌鉴定 基于 Vitek MS 质谱仪对单个细菌菌落来实现菌种鉴定,这一过程中主要应用了直接涂布法。在采集完成了图谱数据后,后续就需要将其对比标准数据库,在判定待测菌株图谱与标准菌株图谱所表现一致性的过程中,此次实验主要基于百分比可信值来实现。若该值所存在的范围为 60.0%~99.9%,意味着有着非常可靠的鉴定结果,若出现了小于 60.0%的情况,意味着有着极不可靠的鉴定结果。

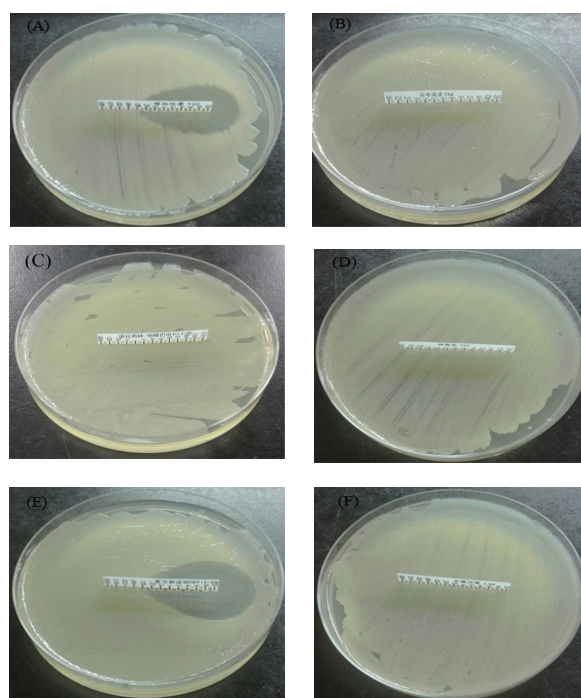
1.2.3 E-test 法测定单药的 MIC 值 E-test 试验按说明书操作测定 MIC。基于 CLSI 2016 年来判读药敏结果。详述如下:(1)抑菌环尖所对应的方向处于齿轮间,这种情况下所选择的值要尽量大一些。(2)试条侧环尖有着不同的高度,这种情况下所选择的值要尽量大一些。(3)菌落存在于抑菌环中,此时 MIC 值的确定主要考虑 MRS。基于折点标准来测定替加环素、磷霉素所表现出的敏感性,该项标准主要源自于欧洲药敏试验委员会。

1.2.4 联合药敏试验 试验组合如下,A 组:替加环

素+妥布霉素;B 组:替加环素+哌拉西林/他唑巴坦;C 组:替加环素+磷霉素;D 组:替加环素+复方新诺明;E 组:替加环素+左氧氟沙星。首先,制备耐碳青霉烯类抗菌药物的肠杆菌科细菌的菌悬液以及琼脂平板,后续在琼脂上置 E-test 药敏测试条,具体形式为较差形式,MIC 的交叉点间所需要达到的角度为 90°角。分成两份,转移到平板中,选择在 37℃ 的温度条件下进行孵育,该环节所消耗的时间即 24 h,后续对水滴状抑菌环进行仔细的观察,环尖与某一浓度值相对应,在此基础之上也就获得了最低抑菌浓度,对 MIC_{A 药联合}和 MIC_{B 药联合}。进行分别记录,FICI 的计算主要采用了 MIC_{A 药联合}和 MIC_{B 药联合},详细如下 $FICI = MIC_{A 药联合} / MIC_{A 药单用} + MIC_{B 药联合} / MIC_{B 药单用}$ 。在判读 FICI 的过程中所需要遵循的标准:在 FICI ≤ 0.5 的情况下,此时就可以判断为存在着协同作用;在 FICI 在 0.5~1.0 的情况下,此时就可以判断为存在着部分协同作用;若存在着 FICI 在 1.0~4.0 的情况,此时就可以判断为不存在相关作用;若存在着 FICI > 4.0 的情况下,此时就可以判断为存在着拮抗作用^[11-12]。

2 结果

2.1 单药药敏试验结果 分析图 1 和表 1 能够了解到,对 CRKP,替加环素和复方新诺明表现出一定程度的敏感性,MIC 在此次实验中具体为 0.25 μg/mL,磷霉素等单药对 CRKP 的实验结果则呈现为耐药性。



注:A.替加环素;B.妥布霉素;C.哌拉西林/他唑巴坦;D.磷霉素;E.复方新诺明;F.左氧氟沙星

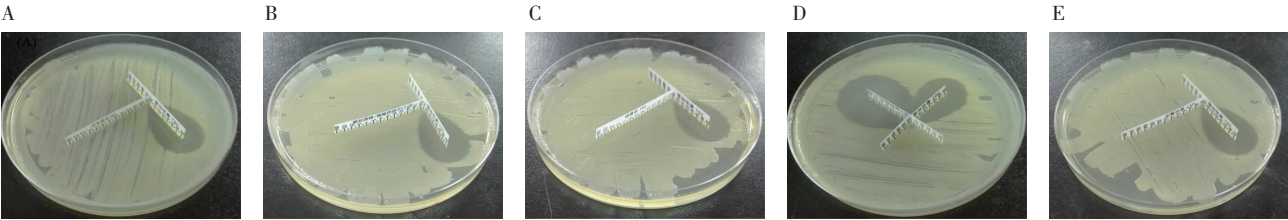
图1 单药药敏试验

Fig 1 The results of single drug sensitivity test

表 1 耐碳氢霉烯的 CRKP 对不同抗菌药物的敏感性试验结果
Tab 1 The results of sensitivity test of CRKP against different antibacterial agents

药物	MIC/ (μg/mL)	敏感性
替加环素	0.25	敏感
妥布霉素	>256	耐药
哌拉西林/他唑巴坦	>256	耐药
磷霉素	>256	耐药
复方新诺明	0.25	敏感
左氧氟沙星	>32	耐药

2.2 联合药敏试验结果 替加环素分别与 5 种不



注: A.妥布霉素; B.哌拉西林/他唑巴坦; C.磷霉素; D.复方新诺明; E.左氧氟沙星

图 2 替加环素联合药物方案对 CRKP 的作用

Fig 2 Effects of tigecycline combined with antibacterial agents against CRKP

表 2 替加环素与妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、磷霉素、复方新诺明、左氧氟沙星单用和联用对 CRKP 的 MIC

Tab2 The MIC of tigecycline with tobramycin, piperacillin/tazobactam, fosfomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, levofloxacin alone and in combination for CRKP

组合药物		单用 MIC/(μg/mL)	联用 MIC/(μg/mL)
替加环素+妥布霉素	替加环素	0.25	0.25
	妥布霉素	256	256
替加环素+哌拉西林/他唑巴坦	替加环素	0.25	0.25
	哌拉西林/他唑巴坦	256	256
替加环素+磷霉素	替加环素	0.25	0.25
	磷霉素	256	256
替加环素+复方新诺明	替加环素	0.25	0.125
	复方新诺明	0.25	0.125
替加环素+左氧氟沙星	替加环素	0.25	0.25
	左氧氟沙星	32	32

3 讨论

CRKP 首次分离于 1996 年, 导致了医院感染, 该问题开始被关注^[13-15]。据国家卫生和计划生育委员会全国耐药监测网报道显示 CRKP 株的临床检出率呈逐年增高的趋势, 对常见抗菌药物的耐药率也随之增加^[16]。临床研究指出, 在治疗过程中若仅采用了替加环素, CRKP 和鲍曼不动杆菌就会受到影响, 进而对替加环素有着相对更低的敏感性, 而联合用药则不存在该问题^[1-2]。CRAB 研究偏多, 要远多于 CRE^[4-5]。因此需要对临床分离的耐碳青霉烯类抗菌药物的肠杆菌科细菌进行联合药敏试验, 以指导

同的抗菌药物联用后, 抗菌药物单用与联用后的 MIC 值见表 2、图 2。从表 2 中可以看到, 替加环素在与复方新诺明联用后, 替加环素 MIC 值表现出下降趋势, 而与妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、磷霉素、左氧氟沙星联用后没有观察到替加环素 MIC 值的下降, 见图 2。替加环素与复方新诺明进行联合用药试验中, FICI 经过试验后确定为 1, 这种情况下就可以判定为部分协同作用; 而妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、磷霉素和左氧氟沙星的联合方案的 FICI 值为 2, 属无相关作用。

临床有效控制 CRKP 的感染并提供更多合理可行的抗生素联用方案。

本研究药敏结果显示, 替加环素和复方新诺明 MIC 均为 0.25 μg/mL, 妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦和磷霉素的 MIC 均>256 μg/mL, 对 CRKP 表现耐药, 左氧氟沙星 MIC 为>32 μg/mL, 对 CRKP 耐药, 与宋国蓉等^[17]报道相似。张艳君等^[9]在 2013-2014 年分离的 538 株 CRE 基础之上, 采用常用抗菌药物来探究其耐药情况, CRKP 对替加环素仅有着 4.5% 的耐药率, 其他要高一些。Kanerva 等^[18]则从 KPC-KP 敏感性角度展开研究, 结果显示敏感的仅为替加环素以及复方新诺明, 显示耐药的则为妥布霉素。同样地, Ozbek 等^[19]在研究中展开了体外敏感性实验, 研究对象为 40 株 CRE, 研究用药则为替加环素, 结果显示敏感的 CRE 占 90%, MIC 为 0.125~8 μg/mL。

很多方法可监测 MIC, E-test 法有直观结果, 不过成本高^[20]。国产插入式药敏试纸条有相对较低的价格, 表现出非常出色的一致性, 高灵宝等^[21]认为, 使用国产插入式试纸条所获得的 MIC 结果在很大程度上接近于进口平贴式 E-test 试纸条 (94.7%), 高灵宝和陈亚宝^[22]的一项研究结果显示, 阿米卡星、头孢唑啉、头孢西丁、氨苄西林、亚胺培南插入式 E-test 药敏条与 5 种进口 E-test 药敏条测定 50 株细菌 MIC 符合率分别为 100%、98%、98%、98% 和 96%。刘亚丽等^[23]研究结果显示 5 种国产 E-test 药敏条 (青霉素、氯霉素、万古霉素、两性霉素 B、氟康唑)

与进口 E-test 药敏条的基本一致(essential agreement, EA)率均>90%。本实验采用了国产插入式药敏试纸条。

替加环素与细菌核糖体的 30S 亚基有效的结合,转移 RNA 进入核糖体的 A 位点可被阻断,对细菌蛋白质合成具有一定的抑制作用^[24]。复方新诺明可以抑菌,两者表现出协同作用。

深入研究目前的抗菌药物,探索不同合用方案,有利于对 CRE 感染更好的治疗。不过当前只能展开体外实验,对于体外药敏试验来讲,其在很大程度上不同于体内药物疗效^[25]。不过体外联合药敏实验依然有着较高的价值,可以拓展治疗思路,同时可以让合用药治疗方案变得更加合理。

最终结果显示,替加环素和复方新诺明对 CRKP 是敏感的,在此次实验中采用磷霉素等单药来治疗 CRE 的结果显示并不存在任何的关联性,而替加环素联合复方新诺明在体外对 CRKP 具有一定抗菌效应,在体内所能达到的治疗效果是好与坏还无法明确,这一方面是有待深入研究验证的。

参考文献:

- [1] Choi M J, Peck K R, Ko K S. Mutant prevention concentration of tigecycline for *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(2):621
- [2] Vouillamoz J, Moreillon P, Giddey M A. *In vitro* activities of tigecycline combined with other antimicrobials against multidrug-resistant Gram-positive and Gram-negative pathogens[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(2):371
- [3] Kongsanae K, Naenna P, Dhiraputra C, et al. *In vitro* antimicrobial activity of colistin in combination with rifampicin against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Int J Infect Dis, 2012, 16(2):e421
- [4] Principe L, Capone A, Mazzarelli A A, et al. *In vitro* activity of doripenem in combination with various antimicrobials against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: possible options for the treatment of complicated infection[J]. Microb Drug Resist, 2013, 19(5): 407
- [5] Lim T P, Tan T Y, Lee W, et al. *In-vitro* activity of polymyxin B, rifampicin, tigecycline alone and in combination against Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore[J]. PLoS One, 2011, 6(4):e18485
- [6] 张艳君,秦琴,李虎,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的分布特点与耐药性分析[J].中华医院感染学杂志, 2016, 26(2):245
- [7] 冯旭慧,袁春儿,陈捷.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床分布及耐药性[J].中国微生态学杂志, 2016, 28(3):312
- [8] 吴丹丹,蔡加昌,刘进.耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的感染现状[J].中国抗生素杂志, 2011, 36(1):1
- [9] Van Duin D, Cober E D, Richter S S, et al. Tigecycline therapy for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) bacteriuria leads to tigecycline resistance [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(12):1117
- [10] Sader H S, Farrell D J, Flamm R K, et al. Variation in potency and spectrum of tigecycline activity against bacterial strains from U.S. medical centers since its approval for clinical use (2006 to 2012)[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(4):2274
- [11] 白艳,孙艳,王瑾,等.多黏菌素 E 联合其他抗菌药物对多重耐药鲍曼不动杆菌的体外抗菌活性研究[J].中国药理学杂志, 2015, 50(5):427
- [12] Timurkaynak F, Can F, Azap O K, et al. *In vitro* activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units[J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 27(3):224
- [13] Tumbarello M, Trecarichi E M, Tumietto F, et al. Predictive models for identification of hospitalized patients harboring KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(6):3514
- [14] Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, et al. KPC-like carbapenemase-producing enterobacteriaceae colonizing patients in Europe and Israel[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 60(3):1912
- [15] Albiger B, Glasner C, Struelens M J, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015[J]. Euro Surveill, 2015, 20(45):1
- [16] 胡志军,潘晓龙,周东升,等.肺炎克雷伯菌感染的临床分布及耐药性监测[J].中华医院感染学杂志, 2014, 24(12):2865
- [17] 宋国蓉,吴晓燕,冯雪君.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌体外抗菌活性分析[J].中国微生态学杂志, 2016, 28(5):524
- [18] Kanerva M, Skogberg K, Ryyanen K, et al. Coincidental detection of the first outbreak of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* colonisation in a primary care hospital, Finland, 2013[J]. Euro Surveill, 2015, 20(26):21172
- [19] Ozbek B, Mataraci-Kara E, Er S, et al. *In vitro* activities of colistin, tigecycline and tobramycin, alone or in combination, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae strains[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2015, 3(4):278
- [20] 张智洁,马洁,孙继梅,等. E-test 法检测医院感染主要病原菌的耐药率[J].中国现代医学杂志, 2008, 18(23):3479
- [21] 高灵宝,陈亚宝,沙鸭云.插入式 E 试验监测烧伤创面甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌对万古霉素敏感性的变化[J].中华烧伤杂志, 2012, 28(2):119
- [22] 高灵宝,陈亚宝.一种插入式 E-test 药敏试条的临床应用 [J].现代检验医学杂志, 2010, 25(6):108
- [23] 刘亚丽,张戈,徐英春,等.5 种国产与进口 E-test 药敏条的一致性比较[J].临床检验杂志, 2016, 34(11):827
- [24] 王健,沈继录.替加环素耐药机制的研究现状[J].中国感染与化疗杂志, 2017, 17(2):219
- [25] 吴敏,范柳青,覃开羽.抗菌药物体内疗效与体外药敏试验不符的原因分析[J].抗感染药学, 2007, 4(3):145

(2019-09-26 收稿)