

多黏菌素联合替加环素对多重耐药鲍曼不动杆菌的作用

余广琼¹, 邹颜娇², 刘航¹, 何林林¹, 张利沙¹, 方菀琪¹

1. 成都大学附属德阳市第二人民医院医学检验科, 四川 德阳 618000

2. 成都中医药大学附属德阳医院检验科, 四川 德阳 618000

摘要: **目的** 探讨多黏菌素联合替加环素(tigecyclin)对多重耐药鲍曼不动杆菌体外抗菌的效果。**方法** 收集临床分离的50株多重耐药鲍曼不动杆菌,采用微量肉汤稀释法、棋盘法分别检测替加环素、多黏菌素单独及联合使用的最低抑菌浓度(MIC),并计算药物联合使用抑菌浓度(FIC)指数,利用FIC指数判定替加环素和多黏菌素联用时对多重耐药鲍曼不动杆菌体外抗菌的效果。荧光定量PCR检测外排泵基因表达水平。**结果** 替加环素联合多黏菌素能显著降低各自MIC值,表现为协同作用的菌株占70%,表现为相加作用的占14%,表现为无关作用的占6%,拮抗作用则为10%。对联合用药不敏感的菌株,其外排泵基因(abeB, abeJ, abeG, abeM)表达水平显著高于敏感型($P < 0.05$)。**结论** 替加环素联合多黏菌素可对多重耐药鲍曼不动杆菌的感染进行治疗。

关键词: 替加环素; 多黏菌素; 多重耐药; 鲍曼不动杆菌

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)07-1312-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.031

Synergistic effect of a combination of colistin and tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

YU Guangqiong¹, ZOU Yanjiao², LIU Hang¹, HE Linlin¹, ZHANG Lisha¹, FANG Wanqi¹

1. Clinical Laboratory Medicine Department of Chengdu University Affiliated Second People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, China

2. Laboratory Medicine Department of Deyang Hospital Affiliated to Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Deyang 618000, China

Abstract: Objective The objective of this study was to evaluate the combination of colistin and tigecycline in vitro antibacterial effect of multidrug resistant baumannus. **Methods** Collect clinical separation 50 multiple drug-resistant strains of acinetobacter baumannii, trace broth dilution method, board method is used respectively for ring element, polymyxin b alone and combination of the minimum bacteriostatic concentration (MIC), and calculate the drug combination of bacteriostatic concentration (FIC) index, using the FIC index determination for ring element and polymyxin b when the combination of multiple drug resistance of acinetobacter baumannii in vitro antibacterial effect. **Results** The interaction between colistin and tigecycline, when used in combination, was 70% synergistic, 14% additive, 6% indifferent, and 10% antagonistic. For strains that are not sensitive to combination therapy, the expression level of efflux pump gene (abeB, abeJ, abeG, abeM) was significantly higher than that of sensitive type ($P < 0.05$). **Conclusion** Our results suggest that the synergistic effect of the colistin-tigecycline combination is sufficient to make it an optimal treatment choice.

Key words: Tienocycline; Polymyxin; Multiple resistance; Baumann's acinetobacter

鲍曼不动杆菌是院内感染中常见、重要的病原菌。该菌可引起多种疾病,如呼吸道感染、菌血症、脑膜炎、皮肤、软组织和泌尿道感染等^[1]。鲍曼不动杆菌极易对各种抗生素产生耐药性,且可在无机

表面存活,鲍曼不动杆菌感染对于临床医师是一个挑战。有研究表明,多重耐药不动杆菌感染率为47%~93%,死亡率则为30%~75%^[2]。多黏菌素发现于多黏杆菌(*Bacillus polymyxa*)培养液中的抗菌

收稿日期: 2018-01-09

第一作者: 余广琼(1983—),女,四川内江人,本科,主管检验师,研究方向为微生物学检验。E-mail: yuguangqiong_1983@papmedline.com

性多肽,对鲍曼不动杆菌有一定抗菌作用^[3],患者长期使用多黏菌素仍会产生耐药性。目前药物治疗多重耐药鲍曼不动杆菌的选择相当有限,主要原因是缺乏对多重耐药菌株有效的新型特异抗生素。然而,联合用药的效果优于单药治疗^[4-5]。因此,本研究目的为评估替加环素联合多黏菌素对耐药鲍曼不动杆菌的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂 Muller-Hinton 肉汤(浙江杭州天和微生物试剂有限公司);血琼脂平板(郑州安图生物工程股份有限公司,批号 20170126B)。VITEK-2 型细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)。注射用替加环素(浙江海正药业股份有限公司,规格每支 50 mg,批号 20161125);多黏菌素(上海上药第一生化药业有限公司,规格为每瓶 50 mg,生产批号 037K1477)。

1.1.2 菌株来源 从住院患者送检的标本中分离所得多重耐药鲍曼不动杆菌 50 株,所有多重耐药鲍曼不动杆菌均经 VITEK-2 细菌鉴定仪鉴定。质控菌株为铜绿假单胞菌(ATCC27853)和大肠埃希菌(ATCC25922)。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的配制 将多重耐药鲍曼不动杆菌菌株接种于血琼脂培养基上,并置于(35±2)℃的温箱中,培养 16~18 h 后,挑取合适的菌落放于 2 mL 无菌生理盐水中,并利用比浊仪校正浊度,随后,利用无菌生理盐水将 0.5 麦氏浊度的菌液稀释至 3×10⁵ cfu/mL,备用。

1.2.2 抗菌药物的配制 精密称取替加环素和多黏菌素(1:1),使用无菌生理盐水和 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液稀释,备用。

1.2.3 单药最低抑菌浓度(MIC)的测定 微量肉汤倍比稀释法,检测步骤如下:无菌操作,取微量肉汤加入 96 孔板中,每孔 100 μL。将浓度为 2 048

μg/mL 的替加环素药液按每横排方式加入无菌 96 孔板中,每孔 100 μL,每横排的第 1 孔加入抗菌药物原液 100 μL,混匀,然后吸取 100 μL 至第 2 孔,混匀后再吸取 100 μL 至第 3 孔,如此连续倍比稀释至第 11 孔,并从第 11 孔中吸取 100 μL 弃去,第 12 孔为不含药物的生长对照。多黏菌素同上操作。

1.2.4 联合药物敏感性试验 根据“1.2.3”的测定结果,确定本次联合抗菌试验的药物稀释浓度。将替加环素和多黏菌素分别按倍比稀释,按横向及纵向分别加入 96 孔板中,横向为多黏菌素的降梯度,共为 12 个浓度梯度;纵向为替加环素的降梯度,共为 8 个浓度梯度。分别将两种抗菌药物以 50 μL 体积两两组合加入 96 孔板中,并逐一加入 100 μL 3×10⁵ cfu/mL 菌液。最后,将 96 孔板放置于(35±2)℃的温箱中过夜,孵育时间为 18~24 h,观察并计算两药联合应用时各药的 MIC。

1.2.5 联合抑菌指数(FIC)的确定 根据药物单独应用时及联用后的 MIC,计算出两种药物联用的 FIC。相互作用解释:FIC≤0.5 时,代表两药物之间具有协同作用;0.5<FIC≤1 时,代表两药物之间具有相加作用;1<FIC≤2 时,代表两药物之间具有无关作用;FIC>2 时,代表两药物之间具有拮抗作用^[6]。

1.2.6 PCR 测定外排泵基因 培养细菌,加入 RNA iso plus 抽提细菌中的 RNA,反转录得到 cDNA 后进行荧光定量 PCR 扩增,扩增目的基因为外排泵基因 *abeB*、*abeJ*、*adeG*、*abeM*,内参基因为 β -actin。

2 结果

2.1 单用与联用时药物的 MIC 结果

替加环素联合多黏菌素能显著降低各自 MIC 值,见表 1 和 2。

2.2 联合用药的 FIC 分布

替加环素和多黏菌素联用,表现为协同作用的菌株占 70%,表现为相加作用的占 14%表现为无关作用的占 6%,拮抗作用则为 10%,见表 3。

表 1 替加环素和多黏菌素单用对多重耐药鲍曼不动杆菌 MIC

Table 1 MIC of single drug use of tegacycline and polymyxin for multidrug-resistant *Acinetobacter Bauman*

抗菌药物	MIC/(μg·mL ⁻¹)	MIC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	MIC ₉₀ /(μg·mL ⁻¹)
替加环素	0.25~1.00	0.50	1.00
多黏菌素	32~128	64	128

表2 替加环素和多黏菌素联用对多重耐药鲍曼不动杆菌 MIC

Table 2 MIC of combination of tegafacycline and polymyxin for multidrug-resistant *Acinetobacter Bauman*

联合药物	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MIC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MIC ₉₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
替加环素	0.125~0.50	0.25	0.50
多黏菌素	16~64	32.00	64.00

表3 替加环素和多黏菌素联用时的 FIC 分布 (n=50)

Table 3 FIC distribution in combination of tegafacycline and polymyxin (n=50)

FIC 分布	n/例	占比/%
FIC $\leq$ 0.5	35	70
0.5<FIC $\leq$ 1	7	14
1<FIC $\leq$ 2	3	6
FIC>2	5	10

表4 外排泵基因相对表达水平

Table 4 Relative expression level of the outer row pump gene

类型	n/株	abeB	abeJ	abeG	abeM
敏感型	20	2.32 $\pm$ 1.18	8.25 $\pm$ 3.64	0.89 $\pm$ 0.82	8.21 $\pm$ 4.38
不敏感型	10	6.26 $\pm$ 2.01*	14.57 $\pm$ 2.97*	10.11 $\pm$ 2.85*	19.58 $\pm$ 4.89*

与敏感型比较: *P<0.05

*P<0.05 vs sensitive strain

3 讨论

鲍曼不动杆菌是造成医院感染的常见病原菌,其在医院的环境中分布很广且可长期存活,严重威胁了综合性重症监护室(ICU)和免疫功能低下患者的生命健康。此外,其耐药性日益严重且感染增多,已成为一个日益严重的全球威胁^[7]。耐药性产生的原因有不合理使用广谱抗生素,拥挤,卫生不良及全球旅行等^[8]。

多黏菌素呈浓度相关性杀菌活性,对于多重耐药鲍曼不动杆菌仍然非常有效。特别是联合用药时^[9-10]。之所以会产生耐药性,和其药动学和药效学特性有关^[11]。替加环素是一种广谱抗生素,能有效拮抗革兰阴性、革兰阳性、厌氧菌和非典型细菌感染^[12]。其主要缺点是,给予患者标准的 100 mg 负荷剂量后,患者血清浓度较低,这可能会导致治疗期间产生耐药性^[13]。抗生素易感性研究表明,不动杆菌属对多黏菌素和替加环素敏感,与多黏菌素/替加环素和碳青霉烯类抗生素联用相比,多黏菌素和替加环素联用的拮抗作用最低。综上所述,多黏菌素与替加环素联用可能是治疗多重耐药鲍曼不动杆菌感染的最佳选择。

2.3 外排泵基因表达水平分析

根据药敏试验结果,将多重耐药不动杆菌分为敏感型和不敏感型,有研究表明外排泵基因过度表达可导致鲍曼不动杆菌耐药,因此采取荧光定量 PCR 检测外排泵基因表达水平,结果表明对联合用药不敏感的菌株,其外排泵基因表达水平显著高于敏感型 (P<0.05)。见表 4。

本研究中,70%为协同作用,14%为相加作用,6%为无关作用,10%则为拮抗作用。与此前的研究结果并一致^[14-15]。笔者认为这是由于使用方法不一致,以及检测时没有完全按照符合制造商操作导致相互作用范围的变化较大(0%~25%)。

参考文献

- [1] Maragakis L L, Perl T M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(8): 1254-1263.
- [2] Clark N M, Zhanel G G, Lynch J R. Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat [J]. Curr Opin Crit Care, 2016, 22(5): 491-499.
- [3] Yahav D, Farbman L, Leibovici L, et al. Colistin: new lessons on an old antibiotic [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(1): 18-29.
- [4] Sopirala M M, Mangino J E, Gebreyes W A, et al. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(11): 4678-4683.
- [5] Deveci A, Coban A Y, Acicbe O, et al. *In vitro* effects of

- sulbactam combinations with different antibiotic groups against clinical *Acinetobacter baumannii* isolates [J]. J Chemother, 2012, 24(5): 247-252.
- [6] 王宁江. 泛耐药鲍曼不动杆菌肺部感染 80 例抗感染治疗分析 [J]. 中国药业, 2015, 24(23): 239-240.
- [7] Kempf M, Rolain J M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(2): 105-114.
- [8] Kapoor R. *Acinetobacter* infection [J]. N Engl J Med, 2008, 358(26): 2845-2846, 2846-2847.
- [9] Park G C, Choi J A, Jang S J, et al. *In vitro* interactions of antibiotic combinations of colistin, tigecycline, and doripenem against extensively drug-resistant and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Ann Lab Med, 2016, 36(2): 124-130.
- [10] Sohail M, Rashid A, Aslam B, et al. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* clinical isolates and emerging antibiogram trends for nosocomial infection management [J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2016, 49(3): 300-304.
- [11] Cai Y, Chai D, Wang R, et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(7): 1607-1615.
- [12] Pankey G A. Tigecycline [J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(3): 470-480.
- [13] Doi Y, Murray G L, Peleg A Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2015, 36(1): 85-98.
- [14] Petersen P J, Labthavikul P, Jones C H, et al. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and time-kill kinetic analysis [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(3): 573-576.
- [15] Ozbek B, Senturk A. Postantibiotic effects of tigecycline, colistin sulfate, and levofloxacin alone or tigecycline-colistin sulfate and tigecycline-levofloxacin combinations against *Acinetobacter baumannii* [J]. Chemotherapy, 2010, 56(6): 466-471.