

• 基础实验研究 •

头孢哌酮联合 β -内酰胺酶抑制剂体外抗菌活性分析

刘强¹, 张蕾蕾¹, 宋晓勇[△], 肖鑫¹

(1. 河南大学淮河医院检验科,河南开封 475000; 2. 河南大学淮河医院药剂科,河南开封 475000)

摘要:目的 评价头孢哌酮联合不同含量酶抑制剂对临床常见致病菌的体外抗菌活性。方法 用琼脂稀释法检测药物对临床分离的318株革兰阴性杆菌的MIC值,分析其耐药率。结果 头孢哌酮/他唑巴坦(8:1)、头孢哌酮/舒巴坦(1:1)、头孢哌酮/舒巴坦(2:1)联合较头孢哌酮单用对大肠埃希菌(包括产ESBLs)、肺炎克雷伯菌(包括产ESBLs)、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌的MIC₅₀/MIC₉₀分别降低2~32和2~8倍。对于肠杆菌科产ESBLs大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌,头孢哌酮/他唑巴坦(8:1)的抗菌活性优于头孢哌酮/舒巴坦(1:1和2:1);对于非发酵菌铜绿假单胞菌三者MIC₅₀/MIC₉₀为8/64、16/64、16/64 μg/mL,鲍曼不动杆菌对三者的MIC₅₀/MIC₉₀为64/128、16/32、16/64 μg/mL。不同病原菌对抗菌药物显示不同的耐药性。结论 头孢哌酮与他唑巴坦或舒巴坦联合应用可不同程度地提高头孢哌酮的体外抗菌活性,对于临床常见致病菌头孢哌酮/他唑巴坦(8:1)体外抗菌活性优于头孢哌酮/舒巴坦(1:1)和(2:1)。而对于泛耐药鲍曼不动杆菌,头孢哌酮/舒巴坦(1:1)抗菌活性最高。

关键词:头孢哌酮; 他唑巴坦; 舒巴坦; 抑菌浓度**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.031**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)03-0324-03

In vitro analysis of antibacterial activity of cefoperazone sodium combined with β -lactamase inhibitors

Liu Qiang¹, Zhang Leilei¹, Song Xiaoyong[△], Xiao Xin¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pharmacy, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng Henan 475000, China)

Abstract: Objective To evaluate the in vitro antibacterial effect of cefoperazone combined with different contents of β -lactamase inhibitors against clinical pathogens. **Methods** Agar dilution method was used to detect MIC value of cefoperazone, cefoperazone/tazobactam(8:1), cefoperazone/sulbactam (1:1) and cefoperazone/sulbactam (2:1) on 318 strains of clinical isolates of gram-negative bacilli, and the resistance rate was analyzed. **Results** The MIC₅₀/MIC₉₀ value of Escherichia coli (including strains producing ESBLs), Klebsiella pneumoniae (including strains producing ESBLs), Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii on the combined application of cefoperazone/tazobactam (8:1), cefoperazone/sulbactam (1:1), cefoperazone/sulbactam (2:1) were decreased with 2~32 and 2~8 times than the separate applications of cefoperazone, respectively. For Enterobacteriaceae, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae, producing ESBLs, and Enterobacter cloacae, cefoperazone/tazobactam (8:1) of the antibacterial activity were better than cefoperazone/sulbactam (1:1 and 2:1). For non-fermenting bacteria Pseudomonas aeruginosa, the MIC₅₀/MIC₉₀ of cefoperazone/tazobactam(8:1), cefoperazone/sulbactam (1:1), cefoperazone/sulbactam (2:1) were 8/64, 16/64 and 16/64 μg/mL. For Acinetobacter baumannii, the MIC₅₀/MIC₉₀ were 64/128, 16/32 and 16/64 μg/mL. The resistance to antibiotics was quite different. **Conclusion** Combination of cefoperazone and sulbactam or tazobactam could improve the antibacterial activity of cefoperazone. For the common clinical pathogens, cefoperazone/tazobactam (8:1) had more excellent in vitro antibacterial activity than cefoperazone/sulbactam (1:1) and (2:1). As for the pan-resistant Acinetobacter baumannii, cefoperazone/sulbactam (1:1) had the highest antimicrobial activity.

Key words: cefoperazone; tazobactam; sulbactam; MIC

近年来,随着 β -内酰胺类抗生素的大量使用,产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)菌株呈逐年上升趋势^[1],临幊上 β -内酰胺酶抑制剂主要有舒巴坦、他唑巴坦和克拉维酸,目前,在临幊上以头孢哌酮为底物常用的有头孢哌酮/他唑巴坦(8:1)、头孢哌酮/舒巴坦(2:1)和(1:1)3种剂型。本研究报道了临幊常见病原菌对头孢哌酮、头孢哌酮/他唑巴坦(8:1)、头孢哌酮/舒巴坦(2:1)和(1:1)4种药物体外抗菌活性,旨在指导临幊合理用药。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集2010年6月至2011年1月河南大学淮河医院革兰阴性杆菌318株。受试菌均为产 β -内酰胺酶菌

株,包括大肠埃希菌90株,其中产ESBLs大肠埃希菌59株,不产ESBLs大肠埃希菌31株;肺炎克雷伯菌60株,其中产ESBLs肺炎克雷伯菌34株,不产ESBLs肺炎克雷伯菌26株;阴沟肠杆菌17株,铜绿假单胞菌85株,鲍曼不动杆菌66株。本次研究用菌株经美国BD Phoenix100鉴定。质控菌株大肠埃希菌ATCC25922、铜绿假单胞菌ATCC27853和肺炎克雷伯菌ATCC700603,购于卫生部生物制品检定所。

1.1.2 试验药物 头孢哌酮钠含量96.50%,批号20100505,海口奇立制药股份有限公司生产。他唑巴坦含量95.21%,批号20100505,海口奇立制药股份有限公司生产。注射用头孢哌酮钠/他唑巴坦钠(CPZ/TZB)(8:1)规格:1.125 g/瓶,批号20101003,海口奇立制药股份有限公司生产;注射用头孢哌酮

钠/舒巴坦钠(CPZ/SBT)(1:1)规格:1.0 g/瓶,含 CPZ500 mg,舒巴坦钠 500 mg,批号:1039380,辉瑞制药有限公司生产;注射用 CPZ/SBT(2:1)规格:2.25 g/瓶,批号:20110302,深圳致君制药有限公司生产。

1.1.3 培养基 MH 琼脂购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 β -内酰胺酶的测定 用 Nitrocephin 纸片测试细菌是否产 β -内酰胺酶, 凡在规定时间内显红色判断为产酶菌。

1.2.2 ESBLs 的检测 根据 CLSI 推荐的 ESBLs 酶抑制增效原理纸片确证法进行检测^[2]。

1.2.3 药敏试验参考方法 依据需氧菌琼脂稀释法药敏方法进行最低抑菌浓度(MIC)检测^[3]。将测试药物用无菌蒸馏水溶解, 对倍稀释后, 药物与 MH 培养基按比例混匀成浓度为 128~0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的一系列含药平板(共 12 个浓度)。然后, 用直接菌落悬液法配成 0.5 麦氏单位($10^8 \text{ CFU}/\text{mL}$)菌液, 再稀释 10 倍, 以多头接种器吸取(约为 1~2 μL)接种于琼脂平板表面, 形成直径为 5~8 mm 的菌斑, 每个菌斑菌数约为

10^4 CFU , 置 35 °C 孵育 16~20 h, 每批试验有相应标准菌株作对照。参考胡继红等^[4]文献, CPZ/SBT(2:1)、CPZ/SBT(1:1)、CPZ/SBT(8:1)的判定折点与单药相同, MIC $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为耐药, MIC = 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为中介, MIC $\leq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为敏感。

1.2.4 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计软件进行分析。

2 结 果

2.1 4 种药物对 318 株临床分离的产酶菌体外抗菌活性 表 1 显示, CPZ/SBT(8:1)、CPZ/SBT(1:1)、CPZ/SBT(2:1)联合对大肠埃希菌(包括产 ESBLs)、肺炎克雷伯菌(包括产 ESBLs)、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌的 MIC₅₀/MIC₉₀ 较 CPZ 单用明显降低, 分别降低 2~32 和 2~8 倍。产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌较不产 ESBLs 的 MIC₅₀/MIC₉₀ 高 2~4 倍; 对于肠杆菌科大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌(包括 ESBLs)及阴沟肠杆菌, CPZ/SBT(8:1)的抗菌活性优于 CPZ/SBT(1:1 和 2:1); 对于非发酵菌铜绿假单胞菌三者 MIC₅₀/MIC₉₀ 为 8/64、16/64、16/64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 鲍曼不动杆菌对三者的 MIC₅₀/MIC₉₀ 为 64/128、16/32、16/64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 4 种药物对 318 株临床分离的产酶致病菌体外抗菌活性比较($\mu\text{g}/\text{mL}$)

细菌	n	抗生素	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MICrange
大肠埃希菌(不产 ESBLs)	31	CPZ	32	64	2~128
		CPZ/TZB(8:1)	1	16	0.5~128
		CPZ/SBT(1:1)	2	32	0.5~128
		CPZ/SBT(2:1)	2	32	0.5~128
大肠埃希菌(产 ESBLs)	59	CPZ	64	128	4~>128
		CPZ/TZB(8:1)	4	32	1~128
		CPZ/SBT(1:1)	8	32	2~128
		CPZ/SBT(2:1)	8	64	1~128
肺炎克雷伯菌(不产 ESBLs)	26	CPZ	32	64	4~128
		CPZ/TZB(8:1)	2	8	0.25~64
		CPZ/SBT(1:1)	4	16	0.25~128
		CPZ/SBT(2:1)	4	16	0.25~128
肺炎克雷伯菌(ESBLs)	34	CPZ	64	128	8~>128
		CPZ/TZB(8:1)	4	32	0.25~64
		CPZ/SBT(1:1)	8	64	0.5~128
		CPZ/SBT(2:1)	8	64	1~128
阴沟肠杆菌	17	CPZ	32	128	4~>128
		CPZ/TZB(8:1)	2	32	0.5~>128
		CPZ/SBT(1:1)	4	64	2~>128
		CPZ/SBT(2:1)	4	64	2~>128
铜绿假单胞菌	85	CPZ	16	128	2~>128
		CPZ/TZB(8:1)	8	64	1~128
		CPZ/SBT(1:1)	16	64	2~>128
		CPZ/SBT(2:1)	16	64	2~>128
鲍曼不动杆菌	66	CPZ	128	>128	16~>128
		CPZ/TZB(8:1)	64	128	4~>128
		CPZ/SBT(1:1)	16	32	2~>128
		CPZ/SBT(2:1)	16	64	2~>128

2.2 4 种药物对 318 株病原菌的耐药率 结果见表 2。表 2 显示, CPZ 联合酶抑制剂较 CPZ 单用对研究中 7 种革兰阴性杆菌的耐药率均明显降低, 特别是对于产 ESBLs 的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 CPZ 单用耐药率达到 96.6% 和 94.1%, 而

当与酶抑制剂联用后, 耐药率最低降到 6.8% 和 8.8% (χ^2 值分别为 156.310 和 74.242, $P < 0.001$)。此外, 对于鲍曼不动杆菌, CPZ/SBT(1:1)复合制剂的耐药率为 6.1%, 远小于 CPZ 单用(63.6%) ($\chi^2 = 48.182, P < 0.001$), 此耐药率与国内学者报

道的7.1%稍微偏低^[5],可能与不同地区用药情况有关。

表2 MIC法检测318株病原菌对4种药物的耐药率

耐药率(%)	CPZ	CPZ/TZB (8:1)	CPZ/SBT (1:1)	CPZ/SBT (2:1)
大肠埃希菌(不产ESBLs)	9.7	3.2	3.2	3.2
大肠埃希菌(产ESBLs)	96.6	6.8	8.5	13.6
肺炎克雷伯菌(不产ESBLs)	11.5	7.7	7.7	7.7
肺炎克雷伯菌(产ESBLs)	94.1	8.8	14.7	17.6
阴沟肠杆菌	41.2	17.6	17.6	17.6
铜绿假单胞菌	45.9	18.8	23.5	23.5
鲍曼不动杆菌	63.6	57.6	6.1	24.2

3 讨 论

β -内酰胺酶的产生是革兰阴性杆菌对 β -内酰胺类抗菌药物产生耐药的主要机制,由于近年来超广谱抗生素的广泛使用,产ESBLs、多重耐药菌及泛耐药菌呈逐年上升趋势^[6], β -内酰胺酶抑制剂(TZB、SBT及克拉维酸)可以阻断超广谱酶的活性,使产生超广谱酶的细菌对一些 β -内酰胺酶抑制剂与 β -内酰胺类抗生素联合制剂敏感。本研究以豫东地区临床分离的常见革兰阴性杆菌为检测对象,以了解目前CPZ、CPZ/SBT(8:1)、CPZ/SBT(1:1和2:1)体外抗菌活性。数据显示,CPZ对大肠埃希菌、产ESBLs大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、产ESBLs肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌的MIC₅₀/MIC₉₀为32/64、64/128、32/64、64/128、32/128、16/128、128/>128 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明CPZ对临床常见菌株存在不同程度的耐药。

研究发现,对于肠杆菌科的产ESBLs大肠埃希菌、产ESBLs肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、复方制剂比单方CPZMIC₅₀/MIC₉₀分别降低8~16和2~4倍,其中CPZ/SBT(8:1)的抗菌活性优于CPZ/SBT(1:1和2:1),可能与近年来CPZ/SBT长期使用和TZB的特点有关,TZB是SBT的衍生物,是一种竞争性不可逆 β -内酰胺酶抑制剂,其结构是在SB的基础

(上接第323)

CD59者可有严重的溶血^[7,10]。本研究修饰前后红细胞CD59的差异显著,修饰后CD59的表达严重下降,其表达率几乎为零,修饰后红细胞CD59的缺失可能提高红细胞对补体的敏感性并进一步影响红细胞的保存性能。

应用mPEG-SPA修饰红细胞有效地解决了不规则抗体和自身抗体所致的配血困难,但修饰后红细胞的保存性能下降,这表明修饰过程中的反复洗涤可能造成红细胞的损伤并可能进一步导致修饰红细胞的保存性能下降,红细胞CD59的降低也可能是mPEG-SPA对CD59的修饰、遮蔽作用所致。如何提高修饰后红细胞的保存性能并保证输入体内红细胞的存活率,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李璐,顾光煜.聚乙二醇及其衍生物在检验医学中的应用[J].临床检验杂志,2008,26(6):469-471.
- [2] Scott MD, Murad KL, Koumpouras F, Talbot M, Eaton JW. Chemical camouflage of antigenic determinants: "Stealth" erythrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(14):7566-7571.

上增加一个三氮唑环,提高了抑酶活性。在CPZ/SBT(1:1和2:1)两者间比较,对产ESBLs菌株CPZ/SBT(1:1)抗菌活性更高,其MIC₅₀/MIC₉₀基本降低2倍。

CPZ/SBT(8:1)、CPZ/SBT(1:1和2:1)对非发酵菌铜绿假单胞菌均有一定程度的耐药,其MIC₅₀/MIC₉₀为8/64、16/64、16/64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而鲍曼不动杆菌的MIC₅₀/MIC₉₀为64/128、16/32、16/64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其中CPZ/SBT(1:1)抗菌活性最高。现有情况下,多重耐药与泛耐药菌的迅速增加^[1,7],已经给临床治疗感染带来了极大困难,由于非发酵菌耐药机制极为复杂,细菌大多数携带多种 β -内酰胺酶,除分子分类中A组、B组、D组碳青霉烯酶外,还可带有ESBLs、AmpC、aac(6')-Ib-cr以及细菌外膜蛋白缺乏和外排泵机制等。鲍曼不动杆菌对CPZ/SBT(1:1和2:1)和CPZ/SBT(8:1)的耐药率为6.1%、24.2%、57.6%,这与SBT具有直接抑菌和抑酶双重功效有关^[4],这与本研究结果是一致的。

参考文献

- [1] 汪复,朱德妹,胡付品,等.2009年中国CHINET细菌耐药性检测[J].中国感染与化疗杂志,2010,10(5):325-334.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, eighteenth informational supplement, M100-S18[S]. Wayne, PA: CLSI, 2008.
- [3] 陈东科,孙长贵.实用临床微生物学检验与图谱[M].北京:人民卫生出版社,2011:775-777.
- [4] 胡继红,张楠,高振详,等.头孢哌酮-舒巴坦药敏纸片中舒巴坦量对药敏结果的影响[J].中华检验医学杂志,2010,33(3):231-235.
- [5] 金红,曹银光.神经外科病房鲍曼不动杆菌耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(10):1159-1160.
- [6] 田新村,吴文哲,张静,等.老年人下呼吸道感染常见病原菌与G-杆菌耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(6):696-697.
- [7] 刘强,张蕾蕾,张红梅,等.鲍氏不动杆菌产AmpC酶的检测与耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2010,20(23):3776-3777.
- [8] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:168-171.
- [9] 李璐,李平,顾光煜,等.甲氧基聚乙二醇修饰红细胞解决自身免疫性疾病所致配血困难研究[J].临床检验杂志,2009,27(2):94-96.
- [10] 鲍国强,俎爱忠.红细胞衰亡信号通路研究进展[J].中国实验血液学杂志,2009,17(4):1097-1100.
- [11] 周柏发,吴炜书.镰状细胞性贫血患者的输血[J].北京医学,2010,32(10):841-842.
- [12] 张之南,李蓉.红细胞疾病基础与临床[M].北京:科学技术出版社,2000:16-22,47-50,143-174.
- [13] Solá E, Vayá A, Martínez M, et al. Erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure in obesity[J]. Obesity, 2009, 17(2):318-322.
- [14] 和迎春,宋建新,张群智.CD55、CD59在特发性血小板减少性紫癜发病中的研究[J].国际检验医学杂志,2010,31(3):238-239.
- [15] 袁育康.医学免疫学[M].北京:科学出版社,2010:281-283.

(收稿日期:2011-10-09)

(收稿日期:2011-10-09)