

· 论 著 ·

磺胺类药物对结核分枝杆菌体外抗菌活性的研究*

王 静^{1,2}, 李同心², 聂晓平², 丁显平^{1△}

(1. 四川大学生命科学院遗传医学研究所特色生物资源研究与利用川渝共建重点实验室, 四川成都 610064; 2. 重庆市公共卫生医疗救治中心检验科, 重庆 400036)

摘要:目的 评价磺胺甲噁唑(SMZ)和甲氧苄啶(TMP)对结核分枝杆菌(MTB)的体外抑菌作用, 为临床应用提供依据。**方法** 应用微孔板观察法, 测定 TMP/SMZ 对 MTB 敏感标准株 H37Rv、临床敏感菌株(20 株)和临床耐多药(MDR)菌株(30 株)的最小抑菌浓度(MIC)。结果 标准株 H37Rv 的 MIC 值为 0.5 μg/mL TMP+9.5 μg/mL SMZ。40 株(80%)临床分离 MTB 可以被 MIC 值为 1 μg/mL TMP+19 μg/mL SMZ 的复合制剂抑制生长, 其中包含 17 株敏感菌株、23 株 MDR 菌株。结论 TMP 联合 SMZ 对 MTB 菌株有较好的体外抑菌活性。

关键词: 磺胺甲噁唑; 甲氧苄啶; 结核分枝杆菌; 体外抗菌活性; 最小抑菌浓度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)23-3383-02

Study on in vitro activities of sulfamethoxazole combined with trimethoprim against *Mycobacterium tuberculosis**

Wang Jing^{1,2}, Li Tongxin², Nie Xiaoping², Ding Xianping^{1△}

(1. Sichuan-Chongqing Joint Key Laboratory for Bio-resource Research and Utilization, Institute of Medical Genetics, School of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Infectious Disease Medical Center, Chongqing 400036, China)

Abstract: Objective To evaluate the bacteriostasis of sulfamethoxazole(SMZ) combined with trimethoprim(TMP) against *Mycobacterium tuberculosis*(MTB) in vitro, so as to provide basis for clinical application. **Methods** The minimal inhibitory concentration(MIC) value of TMP/SMZ against MTB, including standard sensitive strain(H37Rv), clinical sensitive strains(20 strains) and clinical multiple-drug-resistance strains(MDR,30 strains), was detected by using MPP observation method. **Results** The MIC value of standard strain H37Rv was TNP(0.5 μg/mL)+SMZ(9.5 μg/mL). The growth of 40 strains(accounted for 80%) of clinical isolates, including 17 sensitive strains and 23 MDR strains, could be inhibited by TMP(1 μg/mL)+SMZ(19 μg/mL) compound.

Conclusion TMP combined with SMZ may has good antibacterial activity for strains of MTB in vitro.

Key words: sulfamethoxazole; trimethoprim; *Mycobacterium tuberculosis*; in vitro antibacterial activities; minimal inhibitory concentration

耐多药结核病(MDR-TB)及广泛耐药结核病(XDR-TB)是世界范围内结核病控制的主要难点。世界卫生组织《2012年全球结核报告》及相关调查均指出, 我国耐药结核在逐年增加^[1-2], 如果不采取行之有效的措施, 将会给公众造成巨大的健康威胁。但现有的抗结核药物对耐药结核的疗效并不理想, 而一种新药从实验室研究到临床应用平均需要 12~15 年, 耗费约 5 亿美元。因此, 甄选现有的抗结核药物, 以提高对耐药结核的疗效是当务之急。近年来有研究表明, 某些已被遗忘或废弃的药物, 仍然对结核治疗有效, 磺胺类药物就是其中之一^[3]。本研究旨在了解磺胺类药物对结核分枝杆菌(MTB)临床分离株的体外抗菌活性, 为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 H37Rv(ATCC27294)来源于中国疾病预防控制中心国家结核病参比实验室; 50 株 MTB 临床分离菌株来源于重庆市公共卫生医疗救治中心结核实验室, 均由绝对浓度法(罗氏含药培养基)药敏试验确定, 包括耐多药(MDR)菌株 30 株, 敏感株 20 株。

1.2 试剂与药粉 磺胺甲噁唑(SMZ, S7507, 10 g)、甲氧苄啶(TMP, T7883, 5 g)、7H9 培养基均购自美国 Sigma 公司; 96 孔细胞培养板购自美国 Corning 公司, 使用前经紫外线照射 1 h

消毒灭菌。

1.3 方法

1.3.1 微孔板法 SMZ、TMP 用适量二甲基甲酰胺(DMF)溶解配成高浓度贮备液, 上述药物浓度均由最高浓度进行倍比稀释, 每种药物组合包括 8 个梯度浓度, 药物的终浓度为 0.031 μg/mL TMP+0.6 μg/mL SMZ 至 4 μg/mL TMP+76 μg/mL SMZ(TMP : SMZ=1 : 19)^[4]。

1.3.2 药敏试验 选取罗氏培养基生长 2~3 周的新鲜菌落, 用含有玻璃珠的磨菌管磨菌, 稀释至 1 个麦氏浓度(相当于 3×10^7 CFU/mL)。再以 1 : 100 倍稀释后加入微孔板, 菌液的终浓度约为 3×10^5 CFU/mL。每个菌株设 1 个不含药物的生长对照孔(阳性对照)和只含有 7H9 液体培养基不含药物和菌液的无菌对照孔(阴性对照), 以及含 10% 和 1% 菌液浓度的生长对照孔。各菌株平行进行 2 次测试。将接种后的 96 孔板于 37 °C 孵育 7~14 d, 每天观察阳性对照孔的生长情况, 阳性对照孔有灰白色菌落沉淀生长即可记录报告药敏结果, 菌落大小未超过 1/100 对照孔判为未生长, 未见明显生长的最小药物浓度孔为对应最小抑菌浓度(MIC)值(TMP : SMZ=1 : 19)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据处理与统计分析, 计数资料以例数或百分率表示, 百分率的比较采用

* 基金项目: 重庆市卫生局医学科研计划项目(2013-2-142)。 作者简介: 王静, 女, 副主任技师, 主要从事病原微生物研究。 △ 通讯作者, E-mail: brainding@scu.edu.cn。

χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结核标准敏感株(H37Rv)的 MIC H37Rv 的 MIC 值为 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $9.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ。

2.2 临床敏感株和耐药株的 MIC 分布 17 株敏感菌株(85%)可以被“ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $19 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”抑制生长, 23 株 MDR 菌株(77%)可以被“ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $19 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”抑制生长, 两者差异无统计学意义($\chi^2 = 0.13, P > 0.05$)。纳入的 50 株临床分离株中, 共 40 株(80%)可以被“ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $19 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”抑制生长。两组菌株的 MIC 值(TMP : SMZ = 1 : 19)主要集中在“ $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $9.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”和“ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $19 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”, 3 株 MIC 值为“ $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $38 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”, 3 株 MIC 值为“ $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $76 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”, 4 株 MIC 值大于“ $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP + $76 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”。不同类型 MTB 的 MIC 值分布见表 1。

表 1 不同类型 MTB 的 MIC 值分布

TMP 联合 SMZ 的 MIC 值*	敏感菌株		MDR 菌株	
	株数(n)	构成比(%)	株数(n)	构成比(%)
0.031/0.6	0	0.00	0	0.00
0.0625/1.19	0	0.00	0	0.00
0.125/2.38	0	0.00	0	0.00
0.25/4.75	1	5.00	2	6.67
0.5/9.5	6	30.00	8	26.67
1/19	10	50.00	13	43.33
2/38	1	5.00	2	6.67
4/76	1	5.00	2	6.67
>4/76	1	5.00	3	10.00
合计	20	100.00	30	100.00

* : TMP/SMZ, TMP/SMZ 的浓度单位均为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨 论

SMZ 是一种广谱抗菌药物, 其抗菌机制与抑制细菌叶酸合成有关。SMZ 与对氨基苯甲酸(PABA)化学结构类似, 而 PABA 是 MTB 合成二氢叶酸的必需成分, SMZ 与 PABA 竞争 MTB 二氢叶酸的合成酶, 影响二氢叶酸合成, 使 MTB 生长和繁殖受抑制。TMP 为广谱抗菌药, 抗菌谱与磺胺类药物相似, 有抑制二氢叶酸还原酶的作用, 但细菌较易产生耐药性, 很少单独使用。二者合用可使 MTB 叶酸合成受到双重阻断作用, 因而抗菌作用大幅度提高, 故有磺胺增效剂之称, 并可减少抗药菌株的出现。目前已有磺胺类药物治疗结核病取得初步效果的报道^[4-8]。

文献[4]报道 1 例免疫失调结核病患者仅用甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(TMP-SMZ)治疗, 发热消退, 表明对结核治疗有效。笔者继而对 44 株 MTB(包括 4 例 MDR-TB)做药敏试验, 发现在 TMP $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$, SMZ 为 $19 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 43 株菌株 80% 生长被抑制。Ong 等^[5]随后验证了 Forgacs 等^[4]的结论, 12 株 MTB 在 SMZ $\leq 38 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时都敏感。而早在 1953 年国外就有关于磺胺类药物用于结核病治疗取得疗效的报道, 但缺乏实验证据支持。本研究显示, 纳入研究的 50 株 MTB 临床分离株有 80% 可以被“ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ TMP 联合 $19 \mu\text{g}/\text{mL}$ SMZ”抑制生长, 为临床应用提供了实验室依据。刘碧翠等^[6]报道, 应用复方磺胺甲噁唑联合常规雾化治疗支气管结核, 疗效快、效果显著, 细菌转阴时间短, 不良反应低, 安全性可靠。Vilchèze 等^[7]研究表明, 口服“960 mg TMP + 4.8 g SMZ”剂量的复方制剂后 TMP 的血药浓度可以达到 $4.4 \mu\text{g}/\text{mL}$, SMZ 的血药浓度可以达到 $81.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。Alsaad 等^[8]研究表明, 10 例采用复方磺

胺甲噁唑进行抗结核治疗的 MDR-TB 患者, 口服 480 mg 的复方磺胺甲噁唑后取得良好的疗效。本研究与上述研究结果基本一致, 但鉴于各国流行菌株耐药情况的差异, 以及所采用的培养基不同, 敏感度还存在一定的差异。

Huang 等^[9]报道, 对 1995~2006 年分离的 116 株 MTB(包括 28 株敏感菌株, 52 株 MDR 菌株, 36 株混合耐药菌株)及 1 株 2009 年分离的 XDR 菌株做 SMZ 联合 TMP 的药敏试验。SMZ 对 117 株 MTB 抑制 80% 的 MIC 值为 $9.5 \mu\text{g}/\text{L}$, 抑制 99% 的 MIC 值为 $38 \mu\text{g}/\text{L}$, SMZ 的 MIC 值在 12 年内无明显差异。TMP $\geq 8 \mu\text{g}/\text{L}$ 对 117 株 MTB 都无作用, 合用(TMP : SMZ = 1 : 19)无协同作用。Vilchèze 等^[7]发现, TMP/SMZ 与异烟肼(INH)、利福平(RIF)合用具有杀菌作用。而 Macingwana 等^[10]则发现 SMZ 浓度为 $4.75 \mu\text{g}/\text{L}$ 时可抑制 80% MTB 的生长而 TMP 无作用, TMP 与 SMZ 合用无协同作用, 而 SMZ 与 RIF 有明显协同作用, 与 INH 无协同作用。于霞等^[11]系统地分析和评价了磺胺类药物对 MTB 的体外抑菌作用, 认为 TMP 联合 SMZ 有较好的抗 MTB 活力, 并且这种活力与细菌对其他药物是否耐药无关; SMZ 与其他常用抗结核药的相互作用主要表现为无关。

因此, 理论上 SMZ 可以抑制体内 MTB 的生长, 有希望成为潜在的抗结核治疗药物, 但需要更多的体内和体外试验对其抗结核疗效进行系统的评价。

参 考 文 献

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2012[R]. Geneva: WHO, 2012.
- Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. N Engl J Med, 2012, 366(23): 2161-2170.
- Nguyen L. Targeting antibiotic resistance mechanisms in Mycobacterium tuberculosis: recharging the old magic bullets[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012, 10(9): 963-965.
- Forgacs P, Wengenack NL, Hall L, et al. Tuberculosis and trimethoprim-sulfamethoxazole [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(11): 4789-4793.
- Ong WA, Leslie DE. Mycobacterium tuberculosis and sulfamethoxazole susceptibility[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 54(6): 2748-2749.
- 刘碧翠, 翟仕鹤, 余新华. 复方磺胺甲噁唑联合常规雾化治疗支气管结核的临床疗效观察[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(4): 155-160.
- Vilchèze C, Jacobs WR. The combination of sulfamethoxazole, trimethoprim, and isoniazid or rifampin is bactericidal and prevents the emergence of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(10): 5142-5148.
- Alsaad D, Van Altena R, Pranger AD, et al. Evaluation of co-trimoxazole in treatment of multidrug-resistant tuberculosis[J]. Euro Respir J, 2012, 42(8): 829-837.
- Huang TS, Kunin CM, Yan BS, et al. Susceptibility of mycobacterium tuberculosis to sulfamethoxazole, trimethoprim and their combination over a 12 year period in Taiwan[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(3): 633-637.
- Macingwana L, Baker B, Ngwane AH, et al. Sulfamethoxazole enhances the antimycobacterial activity of rifampicin[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(12): 2908-2911.
- 于霞, 赵立平, 姜广路, 等. 磺胺类药物对结核分枝杆菌的体外抑菌作用及与其他抗结核药物相互作用的研究[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(6): 433-438.