

• 论 著 •

2 种方法检测热毒宁与头孢哌酮钠/舒巴坦钠对广泛耐药鲍曼不动杆菌协同作用的比较*

李 新, 杨桂芳, 陈化禹, 耿 洁, 贾志杰

(天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

摘要:目的 观察微量肉汤棋盘稀释法与纸片扩散法检测体外环境中中药热毒宁联合头孢哌酮钠/舒巴坦钠(SCF)对广泛耐药鲍曼不动杆菌(XDR-AB)协同作用的结果,比较两者的符合性,以指导临床用药。方法 筛选 2015 年该院住院患者感染的 XDR-AB 共 12 株,将菌株培养传代,先采用微量肉汤棋盘稀释法检测 SCF 和热毒宁单独及联合使用时的最低抑菌浓度(MIC),通过计算判断是否有协同作用,再使用纸片扩散法检测抑菌环直径和药物的协同作用。结果 微量肉汤棋盘稀释法检测热毒宁与 SCF 联合用药时,与单独用药时相比, MIC 均有不同程度下降,热毒宁与 SCF 联合用药时的抑菌浓度指数均小于或等于 0.5,具有协同作用。纸片扩散法测定出热毒宁原液的抑菌环直径为 10 mm,不同 XDR-AB 菌株对 SCF 的抑菌环直径有所差异,其中 5 株为 15 mm,3 株为 16 mm,4 株为 17 mm。但当热毒宁与 SCF 联合作用时,抑菌环直径扩大,12 株也都出现了协同作用。结论 体外环境下,热毒宁联合 SCF 对 XDR-AB 有很好的协同作用,2 种方法结果一致,虽然纸片法更加简便,但结果判断带有一定主观性,需要有经验的人员操作。

关键词:广泛耐药鲍曼不动杆菌; 热毒宁; 头孢哌酮钠/舒巴坦钠; 微量肉汤棋盘稀释法; 纸片扩散法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)06-0723-03

Comparison of two methods testing synergistic action of Reduning and cefoperazone sodium/sulbactam sodium on extensive drug resistant *Acinetobacter bauman**

Li Xin, Yang Guifang, Chen Huayu, Geng Jie, Jia Zhijie

(The First Affiliated Hospital of Chinese Traditional Medical University of Tianjin, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective To observe the results of broth dilution method and disc diffusion method to test the synergistic effect of Reduning and cefoperazone sodium / sulbactam sodium(SCF) on extensive drug resistant *Acinetobacter bauman* (XDR-AB) in vitro environment, and compare their compliance to guide the clinical medication. **Methods** A total of 12 strains of XDR-AB from infection patients in our hospital in 2015 were collected, the strain was sub cultured. Firstly, observe the minimum inhibitory concentration (MIC) of SCF and Reduning on XDR-AB alone and in combination by broth dilution method. And then judge the synergy effects through calculation. Secondly, the inhibition ring diameter and the synergy effects was detected using the disc diffusion method. **Results** The MIC of Reduning and SCF in combination on XDR-AB was declined compared with them alone. The Fractional inhibitory concentration of Reduning and SCF in combination on XDR-AB were equal or less than 0.5, they had synergistic effect on XDR-AB. The inhibition ring diameter of Reduning was 10 mm tested by disk diffusion method. Different strains of XDR-AB on SCF bacteriostatic annulus diameter difference, 5 strains were 15 mm, 3 strains were 16 mm, and 4 strains were 17 mm. Reduning and SCF appeared synergistic effect according to the inhibition ring diameter expanded when they effected on XDR-AB in combination. **Conclusion** In vitro, Reduning combined with SCF on XDR-AB has good synergistic effect. Compared with broth microdilution checkerboard dilution method, disk diffusion method is more simple and convenient, but it has a certain subjective on judging results, which is better to operate by experienced person.

Key words: extensive drug resistant *Acinetobacter bauman*; Reduning; cefoperazone sodium/sulbactam sodium; broth microdilution checkerboard dilution method; disc diffusion method

鲍曼不动杆菌已经成为我国院内感染最重要的病原菌之一^[1],常引起呼吸道感染、泌尿系统感染、败血症、继发性脑膜炎等。近年来,随着广谱抗菌药物在临床的广泛应用,鲍曼不动杆菌的耐药性不断增加,出现了广泛耐药鲍曼不动杆菌(XDR-AB),其对常用抗菌药物几乎全部耐药,仅对多黏菌素和替加环素敏感^[2],给临床治疗带来了很大挑战,开发新的治疗方案和新型药物迫在眉睫。本研究观察了热毒宁与头孢哌酮钠/舒巴坦钠(SCF)联合使用对 XDR-AB 的体外抑菌作用,

并对两种方法进行了比较,旨在更好地为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 12 株 XDR-AB 分离自 2015 年 1~6 月本院住院患者,其中 10 株来源于痰液标本,2 株来源于尿液标本。根据《全国临床检验操作规程(第 3 版)》选用法国梅里埃公司 Vitek-2 Compact 全自动微生物分析系统及配套的分析卡进行菌种鉴定和药敏试验。药敏结果按 2012 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)标准判断。质控菌株为大肠埃希菌

* 基金项目:天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题项目(13065)。 作者简介:李新,女,副主任技师,主要从事临床微生物研究。

ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。SCF 由美国辉瑞公司提供,商品名为舒普深注射剂,热毒宁注射液由江苏康缘药业提供,药敏纸片为辉瑞公司提供的 SCF(75/30 μg)纸片。

1.2 方法

1.2.1 SCF 对 XDR-AB 的最小抑菌浓度(MIC) 将 XDR-AB 菌株培养传代,分离单个菌落,用比浊仪配制细菌悬液 1×10^8 CFU/mL,再用水解酪蛋白(M-H)肉汤以 1:100 稀释(含菌量约 10^6)备用。用 M-H 肉汤将 SCF 原液倍比稀释成浓度为 256、128、64、32、16、8、4、2 μg/mL 的药液,分别取各浓度药液 50 μL,依次由低浓度到高浓度加到 96 孔板中并做好标记。取备用菌液 50 μL 分别加入已加药的孔中,使最终接种菌量约 5×10^5 CFU 每孔。另设无菌对照孔(孔内只加 M-H 肉汤 100 μL)和无药对照孔(孔内只加 M-H 肉汤和菌液各 50 μL),振荡 1 min 混匀后,35 °C 恒温培养箱孵育 20 h,肉眼观察结果,记录 MIC^[3]。

1.2.2 热毒宁对 XDR-AB 的 MIC 配备终浓度为原液的 1.00、0.80、0.64、0.51、0.41、0.33、0.26、0.21、0.17 倍的热毒宁,分别取各浓度药液 50 μL,依次由低浓度到高浓度加到 96 孔板中并做好标记。分别取备用菌液 50 μL 加入已加药的孔中。另设无菌对照孔(孔内只加 M-H 肉汤 100 μL)和无药对照孔(孔内只加 M-H 肉汤和菌液各 50 μL),振荡 1 min 混匀后,35 °C 恒温培养箱孵育 20 h,肉眼观察结果,记录 MIC。

1.2.3 微量肉汤棋盘稀释法测定热毒宁联合 SCF 对 XDR-AB 的抑菌作用 称量并配制 2 倍 MIC 的药物,将 SCF 倍比稀释成 8 个浓度,方法同 1.2.1,热毒宁配制浓度方法同 1.2.2。

在 96 孔板上做好标记,SCF 从上到下依次递减,热毒宁从左到右浓度依次递减,另设无菌对照孔和无药对照孔。在 96 孔板中,每个对应孔加两种药液各 50 μL 和菌液 100 μL 后,振荡 1 min 混匀,35 °C 孵育 20 h,观察抑菌浓度指数(FICI)。

1.2.4 纸片扩散法检测热毒宁及 SCF 单独的抑菌环直径 将经培养基传代后的细菌配制成相当于 0.5 麦氏比浊管浓度的菌悬液,用无菌棉签取配制好的细菌悬液均匀涂布于 M-H 琼脂培养基表面,放置 10 min 待平板表面菌液吸收,用直径 7 mm 的无菌打孔器在每个涂菌的固体培养基上垂直均匀打 2 个孔,分别加入热毒宁原液和注射用水各 200 μL。在距热毒宁孔 2 cm 以外贴 SCF 纸片,35 °C 培养 20 h。用游标卡尺测量每个抑菌环的直径,抑菌环边缘以肉眼看不到细菌明显生长为限^[3]。中药抑菌圈直径:<8 mm 为不敏感(-),8~<13 mm 为低度敏感(+),13~<19 mm 为中度敏感(++),≥19 mm 为高度敏感(+++)。SCF 抑菌环直径:≤15 mm 为耐药,16~20 mm 为中介,≥21 mm 为敏感。

1.2.5 纸片扩散法测定联合抑菌作用 同样的方法检测 SCF 和热毒宁的联合作用。检测两者协同作用时,最好控制在大于两药抑菌环半径之和 2 mm 结果较理想,以两种药物之间的敏感区域增加为有协同现象。

1.3 统计学处理 采用 Excel2007 软件进行数据处理及统计学分析。

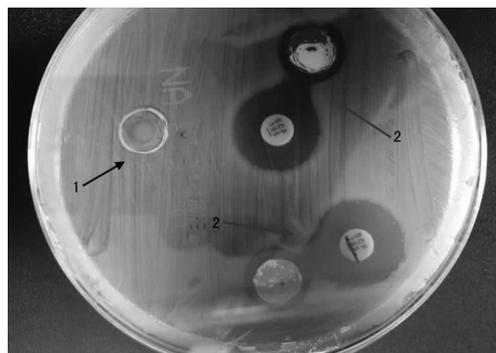
2 结果

2.1 热毒宁与 SCF 单独用药时 MIC 及两者联合时 FICI 热毒宁与 SCF 联合用药时的 FICI 均小于或等于 0.5,说明两者有协同作用。见表 1。

表 1 热毒宁与 SCF 单独用药时 MIC 及两者联合用药时 FICI

菌株数(n)	单独用药		联合用药		FICI
	SCF 的 MIC(μg/mL)	热毒宁的 MIC(原液的倍数)	SCF 的 MIC(μg/mL)	热毒宁的 MIC(原液的倍数)	
5	128	0.51	2	0.17	0.345
3	64	0.64	2	0.26	0.437
4	32	0.80	2	0.26	0.384

2.2 热毒宁与 SCF 的协同作用 经纸片扩散法测定出热毒宁原液的抑菌环直径为 10 mm,不同 XDR-AB 菌株对 SCF 的抑菌环直径有所差异,其中 5 株为 15 mm,3 株为 16 mm,4 株为 17 mm。当热毒宁与 SCF 联合使用时,出现了协同作用。见图 1。



箭头 1:阴性对照;箭头 2~3:热毒宁与 SCF 的协同作用。

图 1 热毒宁与 SCF 的协同作用

3 讨论

鲍曼不动杆菌耐药现象十分严重,对氨基糖苷类、氟喹诺酮类及 β-内酰胺类等抗菌药物均产生了一定的耐药性,具有多重耐药基因^[4],给临床治疗造成了极大困难。本研究用微量肉汤棋盘稀释法及纸片扩散法探讨了中药热毒宁与 SCF 对 XDR-AB 的联合作用。本研究观察到热毒宁对 XDR-AB 抑菌环为 10 mm,有轻度抑菌作用,如果临床单独用热毒宁治疗 XDR-AB 感染可能不易取得满意结果。联合热毒宁后,菌株对 SCF 的敏感性明显提高。夏美玲等^[5]将黄芩、金银花与阿奇霉素联用,对金黄色葡萄球菌的抑菌效果比单用阿奇霉素明显增强。马东梅等^[6]发现双黄连对 XDR-AB 有抑制作用,其认为中药联合抗菌药物应用可降低抗菌药物使用量。SCF 对 XDR-AB 的 MIC 明显下降,下降浓度最高可达 1/64 MIC。不同 XDR-AB 菌株对 SCF 的抑菌环直径有所差异,其中 5 株为 15 mm,3 株为 16 mm,4 株为 17 mm,这 3 组 XDR-AB 的 MIC 分别为 128、64、32 μg/mL。不同菌株对 SCF 的敏感性不同。与热毒宁联合使用后,MIC 为 128 μg/mL 的一组,SCF 和热毒

宁的 MIC 下降幅度最大。可见中药热毒宁与 SCF 对 XDR-AB 有很好的协同作用。

纸片扩散法是根据抑菌环直径和抗菌药物 MIC 的负相关性设定的定性试验,由于该方法简便可靠,实用性强,仍是目前常规实验室普遍采用的定性试验,本研究在判断产超广谱 β 内酰胺酶(ESBLs)的纸片协同法的基础上^[3],参照管仲莹等^[7]的金银花抑菌作用研究,尝试用 SCF 纸片扩散联合热毒宁打孔的方法观察协同作用。SCF 选用浓度为 75/30 μg SCF 作为药敏纸片,热毒宁使用原液。双纸片协同试验影响因素较多,掌握好两药之间的距离很关键,经过多次摸索,最好控制在大于两药抑菌环半径之和 2 mm,与微量肉汤棋盘稀释 MIC 法比对,结果一致。但在操作过程中应注意设置对照,选择最佳的纸片间距。

微量肉汤棋盘稀释法联用两种药物,以二维棋盘纵横两个方向分别进行倍比稀释。药物相互作用效应通过计算最小部分 FICI 来判断。FICI=(联合用药时 SCF 的 MIC/单独用药时 SCF 的 MIC)+(联合用药时热毒宁的 MIC/单独用药时热毒宁的 MIC)。FICI≤0.5 为协同作用,0.5<FICI≤1.0 为相加作用,1.0<FICI≤2.0 为无关作用,>2.0 为拮抗作用^[8]。在采用 MIC 微量肉汤棋盘稀释法检测热毒宁联合 SCF 作用 XDR-AB 时,以无菌对照孔作为敏感的标准,以无药对照孔作为耐药的标准,分别记下两药单独和联合的 MIC,再计算 FICI。但由于热毒宁本身为棕褐色,敏感和耐药结果不是特别清晰,且操作繁琐,需要稀释不同浓度的 SCF 和热毒宁。热毒宁与 SCF 联合用药时的 FICI 均小于或等于 0.5,说明两者有协同作用,与纸片扩散法得到的结果一致。

综上所述,微量肉汤棋盘稀释法可以检测到 MIC,可以量

化观察两种药物对 XDR-AB 的联合作用,但很繁琐。而纸片扩散法简单易行,也可以直观地反映出两种药物的联合作用,结果判断带有主观性,需要有经验的人员操作。随着广泛耐药菌的出现,中西医结合治疗也是很好的治疗方案,笔者下一步将深入到分子生物学继续研究中草药联合应用的抗菌机制。

参考文献

[1] 朱德妹,汪复,胡付晶,等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2011,11(5):321-329.
 [2] 曾春晖,杨柯,徐明光,等. 广西藤茶总黄酮与 B-内酰胺类抗菌药物合用的体外抗菌活性研究[J]. 医药导报,2013,32(3):292-297.
 [3] 徐英春,金岩,王澎,等. 三种方法检测超广谱 β 内酰胺酶敏感性比较[J]. 中华医学检验杂志,1999,22(6):355-357.
 [4] 周玉,丛玉隆,曲芬. 鲍曼不动杆菌耐药机制及治疗策略研究进展[J]. 传染病信息,2014,27(3):184-188.
 [5] 夏美玲,冯海英,刘野. 中西药联合体外抑菌试验的研究[J]. 医学研究杂志,2010,39(10):100-102.
 [6] 马冬梅,陶庆春,齐宏伟,等. 中药双黄连对广泛耐药鲍曼不动杆菌的体外抑菌实验研究[J]. 实用临床医药杂志,2014,18(16):109-111.
 [7] 管仲莹,赵金明,林巧智. 金银花提取物抑菌作用的实验研究[J]. 中医中药,2009,47(15):150-153.
 [8] Lin E, Stanek RJ, Mufson MA. Lack of synergy of erythromycin combined with penicillin or cefotaxime against Sreptococcus pneumonia in vitro[J]. Antimicrob Agents Chem, 2003, 47(3): 1151-1153.

(收稿日期:2015-12-28)

(上接第 722 页)

抗真菌药物的滥用导致吡咯类药物产生不同程度的耐药,应从分子水平、生物膜形成等方面进一步探究药物作用靶位,或探索更好的联合用药方案,如李丰霞等^[10]发现汉防己甲素对氟康唑抗菌活性有增强作用,Zhu 等^[11]发现氟康唑和小檗碱联合用药可通过阻断 CDR1 转录因子结合药物作用元件达到抗菌作用。主动外排泵蛋白基因过度表达在多药耐药产生中的作用已逐渐被重视,本文对生殖道白色念珠菌耐药分子机制的研究有助于发现新的作用靶位点和研制泵抑制性抗真菌药物。

参考文献

[1] Ge SH, Wan Z, Li J, et al. Correlation between Azole susceptibilities, genotypes and ERG11 mutations in Candida albicans isolates associated with vulvovaginal candidiasis in China[J]. Antimicrob Agents Chem, 2010, 54(8):3126-3131.
 [2] Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of Candida glabrata collected during a hospital survey of antifungal resistance[J]. Antimicrob Agents Chem, 2005, 49(2):668-679.
 [3] 赵辩. 临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2001:123-124.
 [4] 温汪荣,戴庚孙. 念珠菌耐药性的研究进展[J]. 国外医学临床生

物化学与检验学分册,2001,22(1):38-39.

[5] 陈乌娜,程金妹,陈贻错,等. 呼吸道白色念珠菌耐药基因 CDR1、CAMDR1 的研究[J]. 中国人兽共患病学报,2008,24(10):951-955.
 [6] 邵俊国,魏媛媛,张金艳,等. 白念珠菌耐药基因 CDR1、CDR2、MDR1 表达与氟康唑耐药的相关性分析[J]. 重庆医学,2014,43(3):270-272.
 [7] 满旭,刘原君,李春莉,等. 白念珠菌锌簇转录因子编码基因表达与氟康唑耐药的关系[J]. 中国皮肤性病学杂志,2013,27(2):131-133.
 [8] 李倩璐,徐韞健,谭皓妍,等. 白假丝酵母菌吡咯类药物相关耐药基因的突变和表达[J]. 广东医学,2015,36(1):63-66.
 [9] 张丽梅,谭皓妍,徐韞健,等. 耐药基因 CDR1、CDR2、ERG11、CaMDR1 和 FLU1 在白假丝酵母菌株中的分布情况[J]. 山东医药,2013,53(25):20-22.
 [10] 李丰霞,张宏. 汉防己甲素对氟康唑抗白念珠菌活性的增效作用[J]. 中华皮肤科杂志,2006,39(8):454-456.
 [11] Zhu SL, Yan L, Zhang YX, et al. Berberine inhibits fluphenazine-induced up-regulation of CDR1 in Candida albicans[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(2):268-273.

(收稿日期:2016-01-26)