

• 临床研究 •

万古霉素和利奈唑胺对 56 株 MRSA 耐药变异浓度的比较*

李 静¹, 赵建宏^{2,3,△}, 刘晓雷^{2,3}, 强翠欣³, 张庶民⁴

(1. 秦皇岛市海港医院检验科, 河北秦皇岛 066000; 2. 河北医科大学第二医院检验科, 石家庄 050000; 3. 河北省临床检验中心, 石家庄 050000; 4. 中国药品生物制品检定所血清室, 北京 100050)

摘要:目的 比较万古霉素和利奈唑胺对临床分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)耐药突变株选择的能力。方法 采用平板稀释法测定两种药物对 56 株临床分离 MRSA 的防耐药变异浓度(MPC)。结果 利奈唑胺和万古霉素对临床 56 株 MRSA 的 MPC₉₀ 分别为 4 μg/mL、20.5 μg/mL; MPC₉₀/MIC₉₀ 分别为 2、10.25 μg/mL。结论 利奈唑胺防 MRSA 菌株耐药突变的能力强于万古霉素。

关键词: 防耐药变异浓度; 利奈唑胺; 万古霉素; 金黄色葡萄球菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.23.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)23-3310-02

WHO 新型抗生素研发重点病原体清单, 耐药菌优先性列表分为三级, 其中优先 II 级(高度)就包括万古霉素中介金黄色葡萄球菌(VISA)和万古霉素耐药金黄色葡萄球菌(VRSA)。多年来万古霉素一直作为治疗 MRSA 的特效药在临床上广泛应用, 但万古霉素对 MRSA 敏感性的下降也成了感染控制新的威胁^[1-2]。利奈唑胺是首个用于临床的新型噁唑烷酮抗菌药^[3], 是目前治疗多重耐药革兰阳性球菌的“最后防线”^[4], 是治疗 MRSA 和 VRSA 引起严重感染的主要有效药物。尽管有研究称细菌对利奈唑胺产生耐药的速度会很慢, 但同时也已经有许多利奈唑胺耐药肠球菌和利奈唑胺耐药金黄色葡萄球菌的报道^[5-6]。

耐药突变选择窗(MSW)和防耐药变异浓度(MPC)理论结合药代动力学的应用在临床治疗中给出了新思路, 在实践中证明了其应用价值^[7-9]。MSW 是指药物浓度从能抑制敏感菌株生长的最低抑菌浓度(MIC)到抑制最不敏感第一步耐药突变体生长的 MPC 这一范围。当药物浓度落在 MSW 时, 敏感的细菌可以被杀死, 但第一步耐药突变体会存活下来并进一步产生耐药。该理论强调临床治疗时应减少血药浓度落在 MSW 的时间, 保持血药浓度高于 MPC, 将敏感菌和一步耐药突变体均杀死, 从而减少耐药突变株的产生^[10]。本研究通过测定万古霉素和利奈唑胺对石家庄地区 56 株临床分离 MRSA 的 MIC 及 MPC, 比较万古霉素和利奈唑胺限制临床分离 MRSA 耐药突变株能力。结合 MSW 理论和药代动力学临床应用以期能为临床用药策略的制定提供更加可靠的依据。

1 材料与与方法

1.1 试验菌株和抗菌药物 菌株来源于国家科技基础条件平台工作临床微生物项目河北省菌种库(HBMCC)中储存的 2012 年 12 月至 2015 年 3 月河北省石家庄地区临床分离 MRSA, 共 56 株。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和 ATCC29213(来源于中国药品生物制品检定所)。抗菌药物万古霉素(中国药品生物制品检定所), 利奈唑胺(辉瑞制药有限公司)。

1.2 仪器 MIT-P 多点接种仪(日本佐久间制作所)。

1.3 MPC 测定 对 56 株临床分离 MRSA 进行了万古霉素和利奈唑胺的 MPC 测定, 方法参考文献^[7-11]。采用琼脂平板二倍稀释法, 将临床收集的 MRSA 菌株转种血平板上, 分离

出单个菌落后接种于 M-H 肉汤中过夜培养, 将菌液浓度调整为 3×10^{10} CFU/mL。分别取 100 μL 菌液用玻璃棒均匀涂布在含有抗菌药物的 MH 平板上, 每个浓度接种 4 个平板, 使每个药物浓度的细菌接种量达到 1.2×10^{10} CFU。37 °C 孵育, 观察菌落生长情况, 以 72 h 没有菌落生长的最低药物浓度为暂定 MPC(MPC_{pr})。以 MPC_{pr} 为基准, 药物浓度线性递减 20%, 重复 MPC_{pr} 的测定步骤, 最终以不出现菌落生长的最低药物浓度为 MPC。取接近 MPC 药物浓度筛选出的菌株接种于无抗菌药物平板上, 传代培养两次后, 再接种于原筛选浓度的抗菌药物平板上, 确保筛选出的菌株为耐药突变株。

2 结果

2.1 利奈唑胺和万古霉素对 56 株 MRSA 的 MPC 和 MSW 结果 两种药物对 56 株临床分离 MRSA 菌中 90% 菌株的 MIC(MIC₉₀)和 90% 菌株的 MPC(MPC₉₀)结合药代动力学参数的关系比较。本研究结果显示利奈唑胺对金黄色葡萄球菌的 MSW 比万古霉素的窄。见表 1、2。

2.2 较高万古霉素浓度筛选后 MRSA 的 MIC₅₀、MIC₉₀ 测定 将 MPC 测定过程中在较高万古霉素浓度仍存活的 MRSA 菌落收集起来, 重新进行 MIC 测定, 结果 MIC₅₀ 由原来的 1 μg/mL 增至 2 μg/mL, MIC₉₀ 由原来的 2 μg/mL 增至 4 μg/mL。

表 1 两种药物对 56 株临床分离 MRSA 的 MIC₉₀ 和 MPC₉₀ (μg/mL)

抗菌药物	MIC ₉₀	MPC 范围	MPC ₉₀	MPC ₉₀ /MIC ₉₀
万古霉素	2	8.0~25.6	20.5	10.3
利奈唑胺	2	4.0~8.0	4.0	2.0

表 2 两种药物药代动力学和 MPC 关系

抗菌药物	MPC ₉₀ (μg/mL)	C _{max} (μg/mL)	T _{1/2} (h)	MPC ₉₀ / C _{max}
万古霉素	20.5	39.0	6.5	0.53
利奈唑胺	4.0	12.9	4.4	0.31

注: C_{max} 表示血药峰浓度; T_{1/2}(h) 表示半衰期

* 基金项目: 国家科技基础条件平台工作重点项目(2005DKA21202-6); 河北省卫生厅医学重点课题(08075)。

△ 通信作者, E-mail: zhaojh_2002@yahoo.com。

3 讨 论

近年治疗耐药金黄色葡萄球菌的感染以及控制耐药克隆株的传播已经成为临床新的挑战,所以万古霉素以及新型抗耐药金黄色葡萄球菌药物的合理应用问题越来越重要,尤其是减缓细菌耐药性的形成,防止耐药克隆株的形成更加关键。

本研究中,石家庄地区临床分离的 56 株 MRSA 没有对万古霉素和利奈唑胺耐药的菌株出现。将 MPC 结合药代动力学参数可见两药 MPC 均小于 C_{max} ,血药浓度落在 MSW 之上,万古霉素和利奈唑胺对临床分离 MRSA 的 MPC₉₀ 均小于胡晖等^[12]测定的 22.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。合理推测本研究中的 56 株 MRSA 在万古霉素和利奈唑胺抗生素压力下不容易筛选出耐药突变株,这与时东彦等^[13]报道的河北地区万古霉素对 MRSA 在临床使用多年敏感性较好,VISA 和 VRSA 极少出现的现象是相符的。选择指数(MPC 与 MIC 之比)能用于比较抗菌药物抑制耐药突变体选择能力的大小,指数越小,抑制突变选择的能力越强,越不容易筛选出耐药突变株^[14]。由试验结果可见针对 MRSA 万古霉素的 MSW 要比利奈唑胺的宽,临床治疗时万古霉素使用中血药浓度更易落入 MSW 中,利奈唑胺对 MRSA 的选择指数明显小于万古霉素,推测利奈唑胺较万古霉素更不容易筛选出耐药突变株,利奈唑胺对 MRSA 相关的感染在临床治疗方面优于万古霉素,这与柯邵鹏^[15]等研究利奈唑胺与万古霉素治疗 MRSA 感染疗效及安全性荟萃分析结果显示利奈唑胺的临床及微生物疗效优于万古霉素的结论是相符的。

56 株受试菌经万古霉素 MPC 测定后筛选出的耐药突变株,本课题组重新进行了 MIC 测定,结果 MIC₅₀ 由原来的 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增至 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,MIC₉₀ 由原来的 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增至 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。可见筛选出的耐药突变株的万古霉素敏感性减低。这进一步验证了 MSW 理论,并提示我们如果血药浓度长期处于 MPC 以下,落在 MSW 内,会造成这些药物敏感性减低菌株的富集,从而加速细菌耐药的进程。

根据 MSW 理论^[16]当药物浓度处于 MSW 时,敏感菌被杀死而第一步耐药菌存活下来,导致耐药突变体的选择性扩增。本研究中较高浓度万古霉素琼脂平板筛选出的菌落恰好落在 MIC 和 MPC 之间即 MSW 内。此耐药突变体可能在基因型和生化特性上都存在多样性,而这些菌株的富集很可能会加速耐药性的产生。因此针对细菌耐药我们一方面要不断的研究细菌的耐药机制从分子水平上找到突变位点,研制新药,阻断耐药;另一方面更应该结合药代动力学从用药策略上下手,限制耐药突变体的产生。基于 MSW 理论的用药策略是保持血药浓度长时间高于 MPC,此浓度下耐药突变体的选择性富集将很难发生。临床应用中我们应该结合药代动力学和 MSW 理论,尽可能保持血药浓度高于 MPC,或采用联合用药的策略减少血药浓度落在 MSW 的时间,从而减少耐药菌的富集,延缓耐药的进程。

参考文献

[1] Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, et al. Reduced Vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains; resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications[J]. Clin Mi-

crobiol Rev, 2010, 23(1):99-139.

[2] Friaes A, Resina C, Manuel V, et al. Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe[J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(4):745-748.

[3] 孙长蛟,周勇刚. 关节置换术后耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(12):3118-3120.

[4] 姚伟明,陈重,蒲彰雅,等. 全基因测序分析耐甲氧西林金黄色葡萄球菌利奈唑胺耐药相关变异位点[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(1):1-5.

[5] Ikeda-Dantsuji Y, Hanaki H, Sakai F, et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan[J]. Kansenshogaku Zasshi, 2015(13):8-14.

[6] Yu D, Stach LM, Newland JG. Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children with cystic fibrosis[J]. J Pediatric Infect Dis Soc, 2015, 4(4):163-165.

[7] 崔俊昌,刘又宁,王睿,等. 4 种氟喹诺酮类药物对金黄色葡萄球菌的防耐药变异浓度[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(22):1863-1866.

[8] Pan AJ, Mei Q, Ye Y, et al. Validation of the mutant selection window hypothesis with fosfomycin against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro and in vivo comparative study[J]. J Antibiot (Tokyo), 2017, 70(2):166-173.

[9] DIEz-Aguilar M, Morosini MI, Tedim AP, et al. Antimicrobial Activity of Fosfomycin-Tobramycin Combination against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Assessed by Time-Kill Assays and Mutant Prevention Concentrations [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10):6039-6045.

[10] 李静,时东彦,赵建宏. 抗菌药物耐药突变选择窗的研究进展[J]. 临床荟萃, 2010, 25(2):164-166.

[11] 李朝霞,刘又宁,王睿,等. 几种抗菌药物在不同浓度时对金黄色葡萄球菌耐药突变株选择的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(2):163-167.

[12] 胡晖,唐清. 万古霉素和利奈唑胺对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌防耐药变异浓度的测定[J]. 实用预防医学, 2010, 17(2):374-375.

[13] 时东彦,赵建宏,李志荣,等. 2013 年河北省细菌耐药监测网三级甲等医院细菌耐药性监测[J]. 临床荟萃, 2015, 30(9):965-969.

[14] 豆梅琴. 氟喹诺酮类药物对鲍曼不动杆菌防突变浓度及分子耐药机制研究[D]. 泰安:泰山医学院, 2009.

[15] 柯邵鹏,刘江福,苏智军,等. 利奈唑胺与万古霉素治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染疗效及安全性荟萃分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(6):1281-1284.

[16] Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(5):681-688.