

· 临床研究 ·

## 头孢吡肟对多重耐药铜绿假单胞菌体外联合药物敏感试验研究

龚美亮<sup>1</sup>, 邹琳<sup>2\*</sup>, 刘云霞<sup>2</sup>

(解放军总医院第二医学中心:<sup>1</sup> 检验科,<sup>2</sup> 保健科,北京 100853)

**【摘要】目的** 探讨头孢吡肟(FEP)分别与美罗培南(MEM)和环丙沙星(CIP)联合应用对多重耐药铜绿假单胞菌(MDRPA)的体外抑菌作用的影响,为临床治疗MDRPA提供依据。**方法** 采用棋盘法设计,通过琼脂平板稀释法测定抗菌药物对58株临床分离的MDRPA的最低抑菌浓度(MIC),通过计算分级抑菌浓度指数评价药物体外联合抑菌效果。**结果** FEP与MEM联合后,表现为协同作用的为32.8%,相加作用的为46.6%,无关作用的为20.6%,无拮抗作用;FEP与CIP联用后,表现为协同作用的为20.7%,相加作用的为51.7%,无关作用的为27.6%,无拮抗作用。联合应用的药物组合,各药MIC<sub>50</sub>均明显降低,浓度-累积抑菌率曲线均表现为左移。**结论** FEP分别与MEM和CIP联用均可以提高各自对MDRPA抗菌作用的敏感性。

**【关键词】** 头孢吡肟;美罗培南;环丙沙星;铜绿假单胞菌;多重耐药;联合用药;药物敏感试验

**【中图分类号】** R446.5

**【文献标志码】** A

**【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2020.12.205

## Combined drug sensitivity test of cefepime for multidrug resistant *pseudomonas aeruginosa* *in vitro*

GONG Mei-Liang<sup>1</sup>, ZOU Lin<sup>2\*</sup>, LIU Yun-Xia<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Clinical Laboratory; <sup>2</sup>Department of Health Care, Second Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the combined inhibitory effect of cefepime (FEP) and meropenem (MEM), FEP and ciprofloxacin (CIP) respectively on clinically isolated multidrug resistant *pseudomonas aeruginosa* (MDRPA) strains *in vitro*. **Methods** Combined inhibitory effect of FEP and MEM, FEP and CIP *in vitro* was assayed by detecting the minimum inhibitory concentration (MIC) and calculating the fractional inhibitory concentration index for 58 MDRPA strains with the agar dilution method. **Results** Combined FEP and MEM showed 32.8% synergic effect, 46.6% additive effect, 20.6% unrelated effect, no antagonistic effect on MDRPA strains. Combined FEP and CIP displayed 20.7% synergic effect, 51.7% additive effect, 27.6% unrelated effect and no antagonistic effect on MDRPA strains. The MIC<sub>50</sub> of these drugs was significantly lower when they were used in combination, with their concentration-accumulative inhibition curves shifted to the left. **Conclusion** FEP combined with either MEM or CIP, compared with respective use, shows an elevated drug sensitivity for MDRPA strains *in vitro*.

**【Key words】** cefepime; meropenem; ciprofloxacin; *pseudomonas aeruginosa*; multidrug resistant; drug combination; drug sensitivity test

This work was supported by Military Logistics Research Project (CWS12J131)

Corresponding author: ZOU Lin, E-mail: meryl301@aliyun.com

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)为医院常见条件致病菌,常分离自患者的痰液、尿液、血液、脑脊液以及其他分泌物中,是导致感染性疾病的重要因素。铜绿假单胞菌耐药机制复杂,包括天然耐药及获得性耐药。随着广谱抗生素的广泛应用,多重耐药铜绿假单胞菌(multidrug resistant *pseudomonas aeruginosa*, MDRPA)的检出率逐年攀升,如何针对这些MDRPA所致感染进行有

效治疗,已成为广大医务工作者面临的棘手问题。老年患者作为一个特殊群体,具有气管切开及管路留置率高、基础疾病多、免疫力低下及反复住院率高的特点,这些会增加老年患者感染PA的风险,且有研究表明假单胞菌在老年病房内检出率占首位<sup>[1,2]</sup>。本研究对老年病房分离的MDRPA菌株进行体外联合药物敏感试验,以期临床合理用药提供科学依据。

收稿日期:2020-03-15; 接受日期:2020-04-24

基金项目:军队后勤科研项目(CWS12J131)

通信作者:邹琳, E-mail: meryl301@aliyun.com

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选取2015年1月至2016年12月解放军总医院老年病房分离的MDRPA共58株。对同一患者相同部位分离的菌株不重复计算,所有菌株均经VITEK-2 Cmpact全自动微生物鉴定药敏分析系统鉴定。MDRPA是指对三类或三类以上抗菌药物中的每一类抗菌药物至少一种药物获得性不敏感的PA<sup>[3]</sup>。患者年龄81~96(88.52±3.65)岁。质控菌株铜绿假单胞菌ATCC27853,大肠埃希菌ATCC35218,大肠埃希菌ATCC25922。

### 1.2 仪器及试剂

恒温培养箱、低温冰箱(赛默飞世尔,美国);比浊仪(生物梅里埃,法国里昂);电子天平(赛多利斯,德国);无菌96孔平板(康宁公司,纽约);无菌瓶(浙江拱东医疗科技有限公司,台州);半自动多点接种仪(佐久间制作所,日本);MH琼脂干粉(赛默飞世尔,美国);一次性使用培养皿(金典生化器材有限公司,青岛);美罗培南(meropenem, MEM)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)及头孢吡肟(cefepime, FEP)标准品(中国食品药品检定研究院,北京)。

### 1.3 菌悬液配置

菌株分纯并37℃过夜培养,从MH琼脂平板上挑取3~5个菌落,在灭菌生理盐水中制作菌悬液。菌液用比浊仪校正至0.5 MacFarland。

### 1.4 琼脂平板稀释法

将FEP、MEM及CIP分别倍比稀释成12个浓度值,三种药物浓度均为2560、1280、640、320、160、80、40、20、10、5、2.5、1.25 μg/ml。其中FEP稀释液为磷酸盐缓冲液,pH 6.0,0.1 mol/L;MEM和CIP稀释液均为无菌水。

单药平板制备:每个浓度抗生素溶液取2 ml加入18 ml MH琼脂溶液(约50℃)。联合抗生素平板制备:将FEP分别与MEM及CIP按棋盘法设计两两组合加入无菌瓶中,每种抗菌药物1 ml,再将联合药物加入融化并冷至50℃左右的18 ml MH琼脂中制成药平板。将配置好的菌液取200 μl加入96孔板中,用半自动多点接种仪接种至药平板。37℃过夜培养。观察指标,记录单独应用各药的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),包括MIC甲药单用和MIC乙药单用,并选择最佳组合效应两药联用时各自MIC(MIC甲药联用和MIC乙药联用),以计算分级抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数。

## 1.5 FIC指数计算和判读标准<sup>[4]</sup>

FIC指数= MIC甲药联用/MIC甲药单用+MIC乙药联用/MIC乙药单用。FIC指数≤0.5,协同作用;0.5<FIC≤1.0,相加作用;1.0<FIC≤2.0,无关作用;FIC>2.0,拮抗作用。

## 2 结果

### 2.1 药物联用前后对MDRPA的MIC比较

FEP与MEM联用后,FEP的MIC<sub>50</sub>与MIC<sub>90</sub>均为单药的1/4;MEM的MIC<sub>50</sub>为单药的1/2,MIC<sub>90</sub>为单药的1/4。FEP与CIP联用后,FEP的MIC<sub>50</sub>与MIC<sub>90</sub>均为单药的1/2;CIP的MIC<sub>50</sub>与MIC<sub>90</sub>均为单药的1/4;表明各药物组合联用后有联合效应。详见表1。

表1 头孢吡肟与美罗培南及环丙沙星单用及联用对MDRPA的MIC

Table 1 MIC of FEP, MEM, CIP alone or combined for MDRPA (n = 58, μg/ml)

Antibiotic	Alone		Combined	
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
FEP+MEM				
FEP	16	64	4	16
MEM	16	64	8	16
FEP+CIP				
FEP	16	64	8	32
CIP	8	32	2	8

MDRPA: multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MIC: minimum inhibitory concentration; FEP: cefepime; MEM: meropenem; CIP: ciprofloxacin.

### 2.2 浓度-累积抑菌率曲线

FEP与MEM、CIP联用后,三种药物的浓度-累积抑菌率曲线均表现为左移,表明联用药物组合具有联合效应(图1,2)。

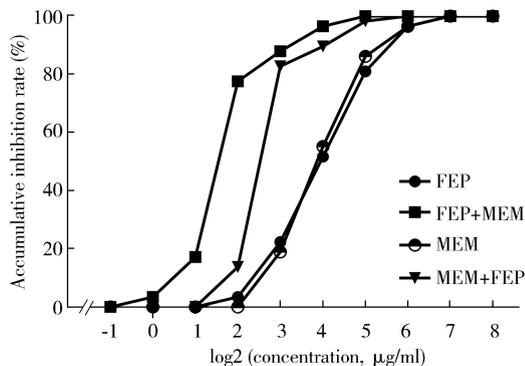


图1 头孢吡肟与美罗培南联用的浓度-累积抑菌率曲线

Figure 1 Concentration-accumulative inhibition rate curves for FEP combined with MEM  
FEP: cefepime; MEM: meropenem.

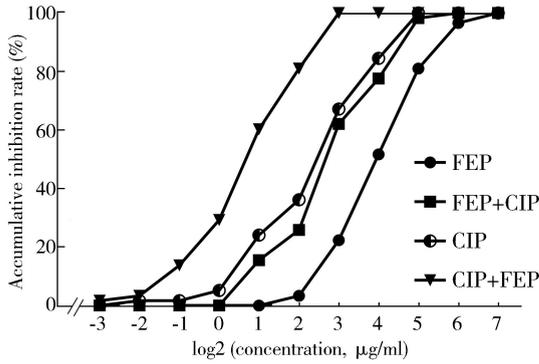


图2 头孢吡肟与环丙沙星联用的浓度-累积抑菌率曲线  
Figure 2 Concentration-accumulative inhibition rate curves for FEP combined with CIP  
FEP: cefepime; CIP: ciprofloxacin.

### 2.3 FIC 分布情况

FEP 与 MEM 联用时,表现为协同作用 32.8%,相加作用 46.6%;FEP 与 CIP 联用时,表现为协同作用 20.7%,相加作用 51.7%。表明上述两种组合均有一定的联合效应。各组药物联用对 MDRPA 的 FIC 指数分布详见表 2。

表 2 头孢吡肟分别与美罗培南、环丙沙星联用对 MDRPA 的 FIC 指数

Table 2 FIC indices of FEP combined with MEM or CIP [n=58, n(%)]

Antibiotic	FIC ≤ 0.5	0.5 < FIC ≤ 1.0	0.1 < FIC ≤ 2.0	FIC > 2.0
FEP+MEM	19 (32.8)	27 (46.6)	12 (20.7)	0 (0.0)
FEP+CIP	12 (20.7)	30 (51.7)	16 (27.6)	0 (0.0)

MDRPA: multidrug resistant *pseudomonas aeruginosa*; FIC: fractional inhibitory concentration; FEP: cefepime; MEM: meropenem; CIP: ciprofloxacin.

### 3 讨论

PA 广泛存在于自然界和医院环境内,环境适应力极强,为重要的院内条件致病菌,老年病房内更为普遍。PA 耐药机制复杂,几乎具有目前所知细菌的主要耐药机制。老年患者在 PA 感染率高的同时,大剂量和高频率的应用广谱抗生素,更易选择出多重耐药菌株<sup>[5]</sup>。随着 PA 的耐药率逐年升高,传统的单药治疗模式已经很难收到良好效果,联合用药可降低单一用药剂量,从而减少不良反应<sup>[6]</sup>,两种甚至更多种抗生素联合应用已成为趋势。

FEP 为第四代头孢菌素,与第三代头孢菌素相比,抗菌谱更广,可更快速穿透革兰阴性杆菌细胞膜,结合多种青霉素结合蛋白发挥作用;对细菌产生的 β-内酰胺酶具有更高稳定性以及更低诱导作用,

且对可分解第三代头孢菌素的 AmpC 酶有良好作用。FEP 因其高效性成为研究的热点,有研究表明其治疗老年呼吸道感染有效性高<sup>[7]</sup>。MEM 属于碳青霉烯类抗生素,曾是治疗 PA 感染的杀手锏,能够通过抑制细菌细胞壁的合成而对 PA 产生抗菌作用,故本研究选取上述两种药物作为联合药敏组合。上述两种药物联合应用后, MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 均较单药应用明显下降,浓度-累积抑菌百分率曲线左移,相加及协同作用达到 79.4%,证明两种药物适合联合应用。亓芳等<sup>[8]</sup>认为 MEM 与其他药物联合治疗 MDRPA 效果较好,与本研究结论一致。在安全性方面,张巧趁<sup>[9]</sup>曾报道 MEM 联合头孢类抗生素治疗临床效果确切,不良反应小,安全性较高。而本研究随着浓度-累积抑菌百分率曲线左移,两种药物治疗浓度均相应下降,也保证了联合用药的安全性。

喹诺酮类药物作用的靶酶为细菌的 DNA 回旋酶及拓扑异构酶 IV,抑制细菌的 DNA 复制而导致细菌死亡<sup>[10]</sup>。但随着喹诺酮类药物使用的增加,耐药率也随之升高。因为细菌 DNA 螺旋酶 *gyrA* 基因和拓扑异构酶 IV *parC* 基因中某些保守区域的单个基因突变可造成氟喹诺酮类药物耐药。有研究表明<sup>[11]</sup>*gyrA* 和 *parC* 基因突变都与细菌对 CIP 高水平耐药 (MIC ≥ 16 µg/ml) 相关,本研究所选的部分 MDRPA 对 CIP 高水平耐药,可能与此机制相关。FEP 与 CIP 联合后,相加及协同作用共为 72.4%,取得了很好的效果,并且在联合用药后, MIC<sub>50</sub> 及 MIC<sub>90</sub> 明显下降。而在刘春都等<sup>[12]</sup>研究中上述两种药物联合后主要表现为无关作用。可能由于所选菌株虽同为 MDRPA,但具体耐药机制仍有差异。亦有研究表明在我国不同地区用药不同,细菌耐药性亦存在较大差异<sup>[13]</sup>。

综上,本研究将 FEP 分别与 MEM 和 CIP 联合对临床分离的 MDRPA 进行体外药物敏感试验发现,FEP 分别与二者联合用药后主要表现为协同及相加作用,比单独应用时 MIC<sub>50</sub> 和 MIC<sub>90</sub> 明显下降,相加及协同作用均在 70%以上,表明上述药物组合对 MDRPA 具有很好的体外抗菌活性,可作为参考。但由于不同地区细菌耐药性存在差异,故应重视临床药敏结果。目前多种抗生素联合应用已成为应对 MDRPA 感染的一个有效手段,愿老年患者能在我们的不断探索中获益。

### 【参考文献】

[1] 岳媛媛,金亮,郭忠伟,等. 老年病区铜绿假单胞菌感染临床分

- 析[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(7): 839-842. DOI: 10.13753/j. issn. 1007-6611. 2018. 07. 019.
- Yue YY, Jin L, Guo ZW, et al. Clinical analysis of *pseudomonas aeruginosa* infection in the geriatric area[J]. J Shanxi Med Univ, 2018, 49(7): 839-842. DOI: 10.13753/j. issn. 1007-6611. 2018. 07. 019.
- [2] 姚瑶, 高辉, 黄云昆, 等. 昆明地区某三甲医院 2018 年老年科呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(2): 166-169. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-8689. 2020. 02. 011.
- Yao Y, Gao H, Huang YK, et al. Distribution and drug resistance of pathogens in respiratory tract infection in geriatrics department of a major hospital in Kunming in 2018[J]. Chin J Antibio, 2020, 45(2): 166-169. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-8689. 2020. 02. 011.
- [3] 徐雅萍, 霍瑞, 闫中强, 等. MDR, XDP, PDR 细菌: 国际专家关于获得性耐药暂行定义的提案[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(1): 231-240. DOI: 10.11816/cn. ni. 2016-162935.
- Xu YP, Huo R, Yan ZQ, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. Chin J Nosocomiol, 2017, 27(1): 231-240. DOI: 10.11816/cn. ni. 2016-162935.
- [4] Gulin JEN, Eagleson MA, López-Muñoz RA, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of voriconazole and benzimidazole combination on *trypanosoma cruzi* infection models[J]. Acta Trop, 2020, 211: 105606. DOI: 10.15887/j. cnki. 13-1389/r.
- [5] 蒙光义, 周丽娟, 梁翠玲, 等. 铜绿假单胞菌耐药率与抗菌药物使用强度的相关性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(1): 87-91. DOI: 10.13286/j. cnki. chinhosppharmacy. 2019. 01. 20.
- Meng GY, Zhou LJ, Liang CL, et al. Correlation between drug resistance of *pseudomonas aeruginosa* and antibacterial use density[J]. Chin J Hosp Pharm, 2019, 39(1): 87-91. DOI: 10.13286/j. cnki. chinhosppharmacy. 2019. 01. 20.
- [6] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 7(6): 481-491. DOI: 10.16718/j. 1009-7708. 2017. 05. 001.
- Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance across China: report in 2016 [J]. Chin J Infect Chemother, 2017, 7(6): 481-491. DOI: 10.16718/j. 1009-7708. 2017. 05. 001.
- [7] 姜君. 头孢吡肟治疗老年呼吸道感染的有效性分析与评定[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(18): 5-7. DOI: 10.14164/j. cnki. cn11-5581/r. 2017. 18. 003.
- Jiang J. Analysis and evaluation of the effectiveness of cefepime in the treatment of senile respiratory tract infection[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2017, 11(18): 5-7. DOI: 10.14164/j. cnki. cn11-5581/r. 2017. 18. 003.
- [8] 元芳, 朱立勤, 刘薇, 等. 美罗培南治疗天津地区常见病原菌所致肺部感染的疗效评价[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(10): 792-795. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-8689. 2016. 10. 014.
- Qi F, Zhu LQ, Liu W, et al. Evaluation of meropenem dosage regimens for pulmonary infection caused by common pathogens in Tianjin[J]. Chin J Antibio, 2016, 41(10): 792-795. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-8689. 2016. 10. 014.
- [9] 张巧趁. 头孢哌酮舒巴坦联合美罗培南治疗老年重症肺炎的临床效果观察[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(11): 65-67. DOI: 10.15887/j. cnki. 13-1389/r. 2020. 11. 038.
- Zhang QZ. Clinical effect of cefoperazone sulbactam combined with meropenem in the treatment of elderly patients with severe pneumonia[J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2020, 13(11): 65-67. DOI: 10.15887/j. cnki. 13-1389/r. 2020. 11. 038.
- [10] 魏新素, 刘永太, 舒颖. 环丙沙星耐药的铜绿假单胞菌临床特征及耐药机制[J]. 海南医学, 2019, 30(3): 323-326. DOI: 10.3969/j. issn. 1003-6350. 2019. 03. 016.
- Wei XS, Liu YT, Shu Y. Clinical characteristics and resistance mechanism of ciprofloxacin-resistant *pseudomonas aeruginosa* [J]. Hainan Med J, 2019, 30(3): 323-326. DOI: 10.3969/j. issn. 1003-6350. 2019. 03. 016.
- [11] 郑来煜, 刘敏, 王占黎, 等. 氟喹诺酮耐药肠球菌 *gyrA* 和 *parC* 基因突变特征及其与环丙沙星耐药相关性分析[J]. 现代预防医学, 2020, 47(14): 2672-2676.
- Zheng LY, Liu M, Wang ZL, et al. Mutations and characterization in *gyrA* and *parC* genes among fluoroquinolone-resistant *Enterococcus* associated with ciprofloxacin resistance [J]. Mod Prev Med, 2020, 47(14): 2672-2676.
- [12] 刘春都, 朱叶飞. 多重耐药铜绿假单胞菌联合药敏分析[J]. 医学综述, 2019, 25(12): 4568-4572. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-2084. 2019. 22. 039.
- Liu CD, Zhu YF. Drug sensitivity analysis of multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* [J]. Mod Prev Med, 2019, 25(12): 4568-4572. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-2084. 2019. 22. 039.
- [13] 刘宝, 封红艳, 赵德军, 等. 贵州省七家医院细菌分布情况对比及我院耐药性监测报告[J]. 国外医药(抗生素分册), 2020, 41(2): 139-144.
- Liu B, Feng HY, Zhao DJ, et al. Comparison of bacterial resistance among 7 hospitals in Guizhou province and analysis of the results of bacterial resistance monitoring in our hospital[J]. World Notes Antibiot, 2020, 41(2): 139-144.

(编辑: 温玲玲)