

• 基础研究 •

粪肠球菌感染抗菌药物联合应用的体外效应研究

张永青 王睿 裴斐 王辰允 张健鹏

【摘要】 目的 评价万古霉素、奈替米星、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星和加替沙星 6 种抗菌药物分别与第一代头孢菌素头孢硫脒联合用药,对于临床分离的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, Ef)的体外联合抗菌效应。方法 采用棋盘法设计,微量肉汤稀释法测定。测定不同浓度组合的 6 组抗菌药物对 30 株临床分离的革兰阳性球菌的最低抑菌浓度,并计算 FIC 指数。FIC $\leq$ 0.5 为协同作用,0.5<FIC $\leq$ 1 为相加作用,1<FIC $\leq$ 2 为无关作用,FIC>2 为拮抗作用。结果 头孢硫脒对粪肠球菌的 MIC₅₀ 为 2~8mg/L,与万古霉素、奈替米星、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星联合应用后,其 MIC₅₀ 分别显著地降低至 0.125,0.25,0.25,0.25,0.25,0.25mg/L。FIC 指数分布:FIC $\leq$ 0.5 占 50%~86.7%;0.5<FIC $\leq$ 1 占 13.3%~36.7%;1<FIC $\leq$ 2 占 0~13.3%;FIC>2 为 0。结论 6 种抗菌药物与头孢硫脒分别联合用药后,对粪肠球菌基本表现为协同作用和相加作用,并以协同作用为主,无关作用较少,无拮抗作用。

【关键词】 肠球菌;微生物敏感性试验

Antibacterial effects of six antimicrobial agents combined with cefathiamidine on *Enterococcus faecalis*: an *in vitro* study

ZHANG Yongqing¹, WANG Rui², PEI Fei, WANG Chenyun², ZHANG Jianpeng¹

1. Department of Pulmonary Diseases, General Hospital of Armed Police Force, Beijing 100039 China

2. Department of Clinical Pharmacology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To evaluate the antibacterial effects of vancomycin, netilmicin, amikacin, ciprofloxacin, levofloxacin and gatifloxacin respectively combined with cefathiamidine on 30 strains of *Enterococcus faecalis*. Methods The protocol was designed with checkerboard method. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of cefathiamidine alone and combined with 6 antimicrobial agents against the 30 strains of *E. faecalis* were determined by broth dilution method and the FIC (fraction inhibitory concentration) index was calculated according to MICs results. Results The MIC₅₀ of cefathiamidine alone against *E. faecalis* was 2mg/L and the MIC₅₀ of cefathiamidine combined with vancomycin, netilmicin, amikacin, ciprofloxacin, levofloxacin or gatifloxacin was reduced to 0.25, 0.5, 0.25, 0.25, 0.25, 0.25mg/L, respectively. The percentages of the FIC index less than 0.5, from 0.5 to 1, from 1 to 2, and more than 2 were 50%-86.7%, 13.3%-36.7%, 0-13.3% and 0, respectively. Conclusions The FIC indexes indicate that cefathiamidine combined with vancomycin, netilmicin, amikacin, ciprofloxacin, levofloxacin or gatifloxacin respectively has synergic or additive antibacterial effect on 30 strains of *Enterococcus faecalis* and the primary action is synergism. There is little autonomy and no antagonism.

【Key words】 *Enterococcus faecalis*; Microbial sensitivity tests

作者单位:100039 北京,中国人民武装警察部队总医院呼吸科(张永青,张健鹏);100853 北京,中国人民解放军总医院临床药理研究室(王睿,裴斐,王辰允)

作者简介:张永青,女,医学学士,主治医师

通讯作者:张永青,电话:010-66937909,010-68212211-75525;

E-mail: yqzhangwj2000@yahoo.com.cn

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, Ef)是常见的医院感染致病菌,能引起败血症、尿路感染、呼吸道感染和心内膜炎等严重感染^[1],尤其是对老年患者,严重感染可诱发老年多器官功能衰竭(multiple organ failure in the elderly, MOFE)^[2]。近几年由于广谱抗生素大量使用,使耐药粪肠球菌的感染发生率

日益增多。而对耐药菌引起的严重感染,单一抗菌药物治疗作用有限,易诱导细菌耐药,合理的抗菌药物联合应用可增强抗菌药物的抗菌作用,提高疗效。作者拟研究对革兰阳性球菌有效的万古霉素(vancomycin)、氨基糖苷类、新一代氟喹诺酮类等 6 种抗菌药物分别与头孢硫脒(cefathiamidine)联合抗菌效应,以期为临床联合用药治疗严重粪肠球菌感染提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株 30 株临床分离的粪肠球菌,经 VITEK 重新鉴定,粪肠球菌标准菌 ATCC14506。

1.1.2 培养基 Muller-Hinton(MH)肉汤和 Muller-Hinton(MH)琼脂,美国 Difco 公司产品。

1.1.3 抗菌药物 万古霉素(美国礼来公司,批号:No.657);奈替米星(netilmicin,中国药品生物制品检定所,批号:0355-200001);阿米卡星(amikacin,中国药品生物制品检定所,批号 0335-9403);环丙沙星标准品(ciprofloxacin,中国药品生物制品检定所,含量:84.2%,批号:0451-9701);左氧氟沙星(levofloxacin,浙江省药品检验所,批号:990908);甲磺酸加替沙星标准品(gatifloxacin mesylate,中国药品生物制品检定所,含量:77.9%,批号:00-66);头孢硫脒(广州白云山制药总厂,批号:0202561)。

1.1.4 仪器 比浊仪(法国梅里埃公司);连续微量加样器(美国 Eppendorf 公司);八道微量加样器(美国 Eppendorf 公司)。96 孔平板(国产)。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液配制 从已分纯并过夜新鲜培养的细菌平板上挑取 4~5 个菌落,接种于 MH 肉汤中增菌 6h。菌液用 3ml MH 肉汤以比浊仪校正浊度至 0.5 MacFarland,再用 MH 肉汤稀释至 1.5×10^8 cfu/L。

1.2.2 抗菌药物储备液配制 万古霉素用无菌蒸馏水配制,奈替米星、阿米卡星用 pH 7.8 磷酸缓冲液配制,环丙沙星、左氧氟沙星、甲磺酸加替沙星用 pH 7.0 磷酸缓冲液配制,头孢硫脒用 pH 6.0 磷酸缓冲液配制,储备液浓度均为 1920mg/L。

1.2.3 微量肉汤稀释法^[3] 将头孢硫脒和其他 6 种抗菌药物以灭菌 MH 肉汤倍比稀释成 11 个浓度,分别为 64、32、…、0.063 mg/L。将配好的不同浓度的两种抗菌药物按棋盘法设计,两两组合加入 96 孔平板中,每种抗菌药物取 50 μ L,再将 1.5×10^8 cfu/L

的菌液 100 μ L 加入孔中,37℃ 过夜培养。观察结果,记录单独应用两药的最低抑菌浓度(minimum inhibition concentration, MIC),MIC_{甲药单用} 和 MIC_{乙药单用},并选择最佳组合效应时两药联合时各自的 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。

1.2.4 FIC 指数计算与判读标准^[4]

$$\text{FIC 指数} = \text{MIC}_{\text{甲药联合}} / (\text{MIC}_{\text{甲药单用}} + \text{MIC}_{\text{乙药联合}} / \text{MIC}_{\text{乙药单用}})$$

FIC 指数 ≤ 0.5 , 协同作用;

$> 0.5 \sim 1$, 相加作用;

$> 1 \sim 2$, 无关作用;

> 2 , 拮抗作用。

2 结果

2.1 6 种抗菌药物分别与头孢硫脒联合应用对粪肠球菌革兰阳性球菌的 MIC (表 1)

2.2 6 种抗菌药物与头孢硫脒单用和分别联合应用浓度-累积抑菌百分率曲线(图 1~图 6)

图 1~图 6 结果表明,6 种抗菌药物分别与头孢硫脒联合应用后其浓度-累积抑菌百分率曲线比单独应用明显左移,效应增强。

2.3 6 种抗菌药物分别与头孢硫脒联合应用的 FIC 指数分布(表 2)

结果表明,6 种抗菌药物分别与头孢硫脒联合应用,对粪肠球菌多数呈协同和相加作用,并以协同作用为主(50%~86.7%),无关作用较少(0~13.3%),无拮抗作用。

3 讨论

粪肠球菌是肠球菌属中的主要菌种。近年报道,肠球菌属已成为医院感染的重要病原菌,在引起医院内感染因素中占第 4 位^[5]。由于肠球菌属对抗生素的耐药性增加,给临床治疗造成了极大困难。粪肠球菌是近年来老年呼吸道感染的主要病原菌之一^[6],而肺部感染在 MOFE 的发病诱因中最为多见。老年患者,由于机体免疫力低下,器官的储备功能和代偿能力均明显减低,一旦并发感染便以此为动因导致链锁反应,引起功能上密切相关的其他器官相继或序贯出现功能不全,发生 MOFE,病情凶险,病死率高^[7]。因此,选用高效、低毒的抗生素控制感染,对减少 MOFE 的发生,降低死亡率至关重要。

表 1 6 种抗菌药物分别与头孢硫脒联用对粪肠球菌($n=30$)的最低抑菌浓度(mg/L)

组合药物	单 用			联 用		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC _G	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC _G
1. 头孢硫脒	2	32	3.73	0.125	1	0.21
万古霉素	2	8	1.82	0.125	2	0.29
2. 头孢硫脒	4	64	4.29	0.25	8	0.39
奈替米星	16	64	22.50	4.00	32	5.53
3. 头孢硫脒	4	64	3.82	0.25	1	0.27
阿米卡星	8	32	6.35	0.50	8	0.68
4. 头孢硫脒	8	64	5.04	0.25	4	0.40
环丙沙星	4	32	4.81	0.50	2	0.55
5. 头孢硫脒	2	64	4.09	0.25	2	0.34
左氧氟沙星	2	16	4.59	0.50	1	0.59
6. 头孢硫脒	4	32	4.49	0.25	1	0.27
加替沙星	2	8	2.24	0.125	1	0.21

注: MIC_G 为受试菌对各实验药 MIC 的几何均数, 表示受试菌对各实验药 MIC 的平均水平。

抗菌药物的单一用药对严重的耐药菌感染作用有限, 易诱导细菌耐药性, 甚至延误病情, 而合理的联合用药可提高抗菌药物的疗效, 减少毒性较大药

物的剂量, 降低不良反应, 避免诱导细菌产生耐药性^[8]。对于 MOFE 患者, 肝肾功能常常严重受累, 合理的抗菌药物联合应用可避免进一步损害肝肾功能。

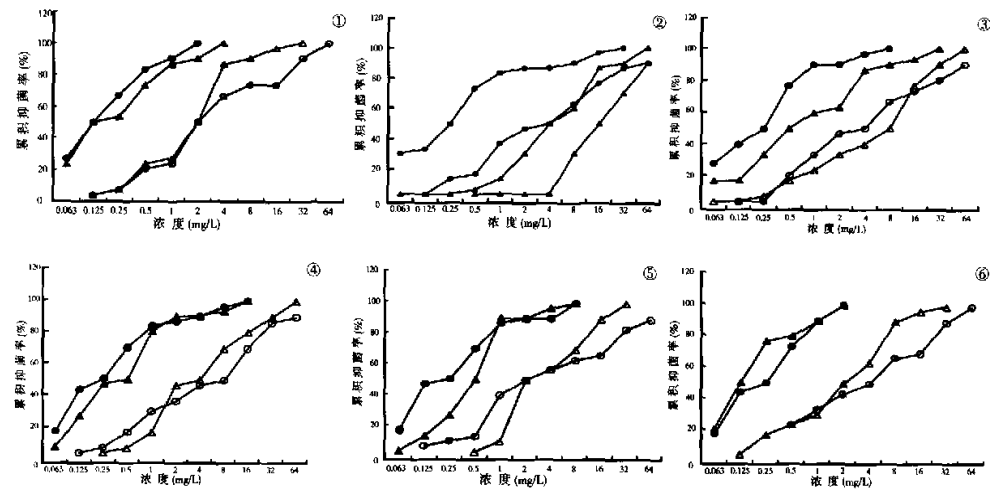


图 1 万古霉素与头孢硫脒单用与联用对粪肠球菌($n=30$)浓度-累积抑菌百分率曲线 注: $\triangle$ 万古霉素单用, $\blacktriangle$ 万古霉素联用, $\bigcirc$ 头孢硫脒单用, $\bullet$ 头孢硫脒联用

图 2 奈替米星与头孢硫脒单用与联用对粪肠球菌($n=30$)浓度-累积抑菌百分率曲线 注: $\triangle$ 奈替米星单用, $\blacktriangle$ 奈替米星联用, $\bigcirc$ 头孢硫脒单用, $\bullet$ 头孢硫脒联用

图 3 阿米卡星与头孢硫脒单用与联用对粪肠球菌($n=30$)浓度-累积抑菌百分率曲线 注: $\triangle$ 阿米卡星单用, $\blacktriangle$ 阿米卡星联用, $\bigcirc$ 头孢硫脒单用, $\bullet$ 头孢硫脒联用

图 4 环丙沙星与头孢硫脒单用与联用对粪肠球菌($n=30$)浓度-累积抑菌百分率曲线 注: $\triangle$ 环丙沙星单用, $\blacktriangle$ 环丙沙星联用, $\bigcirc$ 头孢硫脒单用, $\bullet$ 头孢硫脒联用

图 5 左氧氟沙星与头孢硫脒单用与联用对粪肠球菌($n=30$)浓度-累积抑菌百分率曲线 注: $\triangle$ 左氧氟沙星单用, $\blacktriangle$ 左氧氟沙星联用, $\bigcirc$ 头孢硫脒单用, $\bullet$ 头孢硫脒联用

图 6 加替沙星与头孢硫脒单用与联用对粪肠球菌($n=30$)浓度-累积抑菌百分率曲线 注: $\triangle$ 加替沙星单用, $\blacktriangle$ 加替沙星联用, $\bigcirc$ 头孢硫脒单用, $\bullet$ 头孢硫脒联用

表 2 6 种抗菌药物分别与头孢硫脒联合应用对粪肠球菌的 FIC 指数分布

抗菌药物	FIC 指数分布构成比 (%)			
	≤0.5	0.5~1	1~2	>2
万古霉素	50.0	36.7	13.3	0
奈替米星	66.7	26.7	6.6	0
阿米卡星	56.7	26.7	6.6	0
环丙沙星	86.7	13.3	0	0
左氧氟沙星	66.7	33.3	0	0
加替沙星	86.7	13.3	0	0

注:甲药均为头孢硫脒,乙药为上述 6 种抗生素之一

本实验所采用的万古霉素、奈替米星、阿米卡星、环丙沙星和左氧氟沙星 5 种抗菌药物均为临床治疗革兰阳性球菌较为常用的抗菌药物,加替沙星是新一代氟喹诺酮类抗生素,对革兰阳性球菌有较好的抗菌活性^[9]。头孢硫脒属第一代头孢菌素,其抗菌特点是对革兰阳性球菌作用较强,尤其是对葡萄球菌和肠球菌具有很强的抗菌活性^[10,11]。但对于老年粪肠球菌感染,由于粪肠球菌有较高的耐药率,对抗生素的耐药现象比较复杂,既有天然性耐药,又可产生获得性耐药^[12],单一用药效果有限,万古霉素虽然作用较强,但是在治疗剂量时有较大肾毒性和耳毒性,同样氨基糖苷类药物奈替米星、阿米卡星也有较大的肾毒性和耳毒性。本实验结果表明,6 种抗菌药物与头孢硫脒联用效果以协同效应和相加效应为主,抗菌活性有较大幅度的提高。分析其原因,可能与各类药物不同的作用靶点和作用机制有关。万古霉素抑制粘肽合成第二步,抑制粘肽聚合酶,而头孢菌素抑制粘肽合成第三步,主要作用于转肽酶,两者从不同靶点干扰细胞壁的合成;氨基糖苷类影响细菌蛋白质的合成;喹诺酮类是抑制细菌 DNA 旋转酶^[13]。联合用药后分别作用于细菌的不同靶点,抑制细菌的不同环节从而起到协同杀菌作用。根据实验结果,对粪肠球菌感染的治疗可有多种组合,在上述组合中可考虑减少万古霉素与氨基糖苷类药物剂量,降低其严重的耳毒性和肾毒性发生率,提高用药的安全耐受性。

编者按:针对细菌耐药率的增加,如何采取应对策略是临床医师十分关注的问题。本文评价了多种抗菌药物联合应用的体外效应,证明 6 种抗菌药物分别与头孢硫脒联合应用,对粪肠球菌具有协同和相加作用,值得重视。但本文只是体外试验,尚不知体内的效果如何?也不知耐药联用后对人体肾、肝等重要脏器的毒性是否有协同或相加作用?联合应用作为治疗方案正式推荐于临床应用之前,尚须做更多更深入的研究。

本刊编辑部

总之,6 种抗菌药物分别与头孢硫脒联合应用,能够提高药物的联合抗菌活性,减少毒副作用,对临床治疗严重粪肠球菌感染,选择安全有效用药具有一定指导意义。但体外实验和临床实际应用存在一定的差距,目前国内尚缺乏相关的临床资料,还有待于进一步研究。

参考文献

- 程庆群. 粪肠球菌对 10 种抗生素的耐药分析. 中国煤炭工业医学杂志, 2000, 3: 848-849.
- 王士雯, 韩亚玲, 钱小顺, 等. 1605 例老年多器官功能衰竭的临床分析. 中华老年多器官疾病杂志, 2002, 1: 7-10.
- Sahm DF, Washington II JA. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution Methods. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. 1995. 1117.
- Eliopoulos M, Moellering C, Jr. Antimicrobial Combinations. Antibiotics in Laboratory Medicine. 4th ed, 1996: 330.
- 张群智, 周惠平. 肠球菌的耐药性及脉冲场凝胶电泳分型研究. 中华医学检验杂志, 1998, 21: 73-75.
- 陈晓燕. 老年呼吸道感染临床分析. 中华医院感染学杂志, 2001, 11: 113-114.
- 王士雯. 老年多器官功能衰竭的临床特征. 中华医学杂志, 1988; 68: 187-190.
- 祝勇梅. 抗菌药物的联合应用. 见: 王睿, 主编. 临床抗菌治疗手册. 北京: 人民军医出版社, 1994. 36-41.
- Hosaka M, Yasue T, Fukuda H, et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. Antimicrob Agents Chemother, 1992, 38: 2108-2177.
- 戴自英. 临床抗菌药理学. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 150.
- 戴自英, 汪复, 张志林, 等. 硫脒头孢菌素的实验和临床研究. 上海医学, 1978, 32: 36.
- 王清涛, 徐英春, 王辉, 等. 肠球菌耐药现状调查及抗感染用药探讨. 中华医学检验杂志, 1999, 22: 154-156.
- 王睿. 抗菌药物作用机制. 见: 王睿, 主编. 临床抗菌治疗手册. 北京: 人民军医出版社, 1994. 10-15.

(收稿日期: 2002-08-09)

(本文编辑 周宇红)