

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.023

文章编号: 1005-8982(2016)15-0119-04

万古霉素联合阿奇霉素对形成生物被膜耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体外抗菌效果分析

黄丽

(安徽省铜陵市立医院 检验科,安徽 铜陵 244000)

摘要:目的 探讨体外万古霉素与阿奇霉素联合应用对形成生物被膜的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的抗菌效果。**方法** 使用头孢西丁纸片扩散法和 MRSA 胶乳凝集实验确定 MRSA,采用刚果红培养基判断生物被膜的形成,通过肉汤稀释法将万古霉素和阿奇霉素进行棋盘格联合药敏试验,测出不同浓度下的抑菌指数(FIC),据此判定两药联用后所呈现出的相关效应。**结果** 万古霉素和阿奇霉素联用组最小抑菌浓度(MIC)明显低于各单药组,两药联用主要表现为相加作用(88.2%)和协同作用(11.8%),无无关作用和拮抗作用。相加作用时 FIC 为 0.5~1.0;协同作用时 FIC \leq 0.5。**结论** 万古霉素联用阿奇霉素对生物被膜形成的 MRSA 具有明显的体外抑菌效果,可以指导临床有效地降低药物使用剂量,减少毒副作用。

关键词: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;棋盘格稀释法;生物被膜;万古霉素/阿奇霉素

中图分类号: R378.11

文献标识码: B

In vitro antimicrobial effect of Vancomycin combined with Azithromycin on Methicillin-resistant *Staphylococci aureus* with biofilm

Li Huang

(Clinical Laboratory, Tongling Municipal Hospital, Tongling, Anhui 244000, China)

Abstract: Objective To explore the *in vitro* antimicrobial effect of Vancomycin combined with Azithromycin on Methicillin-resistant *Staphylococci aureus* (MRSA) with biofilm. **Methods** MRSA were detected using Cefoxitin disk diffusion method and MRSA latex agglutination test. Biofilm was detected using Congo red medium. Fractional inhibitory concentration (FIC) of Vancomycin combined with Azithromycin was detected by broth dilution checkerboard joint susceptibility testing, which could show the related effects. **Results** The minimal inhibitory concentration (MIC) of Vancomycin combined with Azithromycin was significantly lower than that of each drug alone; the combined medication showed additive effect (88.2%) and synergistic effect (11.8%), but no irrelevant or antagonism effect. Additive effect was decided when FIC value was 0.5-1.0. Synergistic effect was decided when FIC value was \leq 0.5. **Conclusions** The *in vitro* inhibitory effect of Azithromycin combined with Vancomycin against MRSA with biofilm is obvious, which can effectively reduce the clinical doses and the side effects of the drugs.

Keywords: MRSA; biofilm; checkerboard dilution method; Vancomycin; Azithromycin

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)已成为临床感染的主要病原菌,对大多数抗菌药物耐药。生物

被膜(BF)的形成也是导致金黄色葡萄球菌多重耐药的主要原因之一^[1]。万古霉素是治疗 MRSA 的首

收稿日期:2016-02-24

选药物,目前该药物的使用浓度已经呈现高度飘移的现象。联合使用现有的抗菌药物治疗临床多重耐药的细菌感染,能够有效地降低药物使用剂量、延缓细菌的耐药性。国内已有阿奇霉素对细菌生物被膜的抑制干扰作用的报道,但联合万古霉素用于生物被膜形成的革兰阳性球菌的报道较少见。本研究将万古霉素与阿奇霉素在不同浓度下联合使用,观察所表现出的体外相关效应,为临床上有效治疗生物被膜形成的 MRSA 感染提供科学用药的依据。

1 资料与方法

1.1 菌株

选取 2014 年 7 月~2015 年 6 月于铜陵市立医院临床分离的 17 株生物被膜形成的 MRSA,无重复菌株。质控菌株金黄色葡萄球菌(ATCC25923, ATCC29213),表皮葡萄球菌 ATCC12228 均购自卫生部临床检验中心。

1.2 仪器与试剂

Micro Scan 40 全自动微生物鉴定仪, M-H 琼脂、阳离子调整的 M-H 肉汤为英国 OXOID 产品, MRSA 胶乳凝集试剂购自梅里埃公司,药敏纸片万古霉素(VAN)、阿奇霉素(AZM)、头孢西丁(FOX)均为英国 OXOID 产品,刚果红培养基为上海远慕生物公司产品,棋盘格稀释法使用的阿奇霉素和盐酸去甲万古霉素分别购自浙江亚太制药公司和美国礼来公司。

1.3 方法

1.3.1 MRSA 的检出 ①头孢西丁纸片法(CLSI)。以 K-B 纸片法进行筛选,金黄色葡萄球菌 ATCC25923(敏感株)、ATCC29213(耐药株)作为质控菌株,按照 CLSI 2015 版标准判读抑菌圈结果:头孢西丁抑菌圈 ≤ 21 mm(MRSA),抑菌圈 ≥ 22 mm(MSSA)。②乳胶凝集试验。严格按照试剂说明书进行 PBP2a 提取。在 2 个试剂反应圈内分别加入含抗 PBP2a 单克隆抗体致敏的测试胶乳试剂 1 滴和阴性质控胶乳 1 滴,然后各滴加提取的上清液 50 μ l,均匀地涂布整个反应圈,摇动反应 3 min 后观察凝集现象。判断结果:测试乳胶反应圈内产生肉眼可见的凝集为 PBP2a 阳性(MRSA);反应圈内匀质分布,均无凝集为 PBP2a 阴性(MSSA)。

1.3.2 生物被膜形成株的检出 采用刚果红培养基法筛选生物被膜菌株^[2],染液刚果红可以与形成生物被膜的黏液膜、胞外多糖如黏附素(PIA)等因子发

生产色反应^[3]。将确定为 MRSA 的菌株接种于刚果红培养基,35 $^{\circ}$ C、48 h 后判断结果。以金黄色葡萄球菌 ATCC29213 产生的菌落形态为标准^[4],菌落为黑色或有干燥结晶并且周围培养基颜色淡化者判定为生物被膜形成阳性菌株,不变色者为生物被膜形成阴性。设表皮葡萄球菌 ATCC12228 为阴性对照组。

1.3.3 棋盘格稀释法联合药敏试验 ①菌液制备。选取血平板纯培养的新鲜菌落 4、5 个, M-H 肉汤增菌 6 h 后,配制成 0.5 麦氏单位的菌悬液,并用肉汤稀释成 5×10^5 CFU/ml 的菌液备用;②药物母液的配制。分别用无水乙醇和蒸馏水将阿奇霉素、万古霉素配制成浓度为 1 280 μ g/ml 的母液,置入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用;③检测时,先用 M-H 肉汤倍比稀释备用的药物母液,使母液的浓度递减,依次为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.500、0.250、0.125 和 0.0625 μ g/ml。先检测万古霉素和阿奇霉素的单用最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MIC),然后确定各药物 2 倍的 MIC 为该药物的最高浓度^[5],将选择好的 6 个稀释度依次对倍稀释。操作时,采取两两组合,将含有 2 种抗菌药物不同浓度的混合液 1 ml 分别加入 36 个试管中,各管加 50 μ l, 35 $^{\circ}$ C 温育 24 h 后观察结果。通过公式计算抑菌指数(FIC),依据标准判断万古霉素和阿奇霉素二者间的相关作用。

FIC 计算与判断标准:

$$FIC = \frac{\text{联合时甲药 MIC}}{\text{甲药单用 MIC}} + \frac{\text{联合时乙药 MIC}}{\text{乙药单用 MIC}}$$

判断标准:协同作用 $FIC \leq 0.5$; 相加作用 $0.5 < FIC \leq 1$; 无关作用 $1 < FIC \leq 2$; 拮抗作用 $FIC > 2$ 。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 联合药敏结果

17 株生物被膜形成的 MRSA, 万古霉素及阿奇霉素联合使用时的 MIC 比单独用药时降低, 两药物之间相加作用为 88.2% ($0.5 < FIC \leq 1$), 协同作用为 11.8% ($FIC \leq 0.5$), 确定无无关作用和拮抗作用。见表 1。

2.2 万古霉素与阿奇霉素单、联用结果

万古霉素与阿奇霉素单用及联用的组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 万古霉素联用后 MIC

由单用时的 1.21 mg/L 降至 0.38 mg/L,阿奇霉素联用后 MIC 由单用时的 60.24 mg/L 降至 18.94 mg/L,提示万古霉素与阿奇霉素联合使用时,对形成生物被膜的 MRSA 有较好的体外抗菌效果。见表 2。

表 1 万古霉素与阿奇霉素单、联用的 MIC 比较 (mg/L)

作用方式	万古霉素			阿奇霉素		
	≤0.5	1	≥2	≤8	16	≥32
单用(株)	3	8	6	0	1	16
联用(株)	13	4	0	5	7	5

表 2 万古霉素与阿奇霉素单、联用 MIC 比较 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	万古霉素	阿奇霉素
单用	1.21 ± 0.54	60.24 ± 35.79
联用	0.38 ± 0.32	18.94 ± 15.06
t 值	8.50	5.43
P 值	0.001	0.001

3 讨论

MRSA 的耐药机制主要是由 *mecA* 基因介导表达为青霉素蛋白 PBP2a,表现为低亲和力,与 β -内酰胺类药物很少或不与之结合,故表现为耐药。近年来还发现,*mecA* 基因与辅助基因及表控基因的共同作用,明显提高了 MRSA 对 β -内酰胺类药物的耐药性^[6],并且表现出多重耐药。

另外,对 MRSA 进行分子生物学观察,证实 MRSA 的另一个重要特性是形成生物被膜。生物被膜是细菌的自我保护形式,由多聚复合物包裹菌体形成,天然的被膜屏障和膜内的特殊微环境阻碍或延缓抗生素进入菌体,从而提高细菌的自身耐药性和免疫逃避性^[7]。由生物被膜细菌导致的持续性和反复性的严重感染已被公认为是抗感染的最为棘手的难题^[8]。

万古霉素是糖肽类抗菌药物的代表药物,早已成为全世界治疗 MRSA 引起的重症感染的首选抗菌药物^[9]。如何合理地使用万古霉素,并联合其他抗菌药物以应对由于万古霉素 MIC 值的爬升所导致 MRSA 菌株对万古霉素的敏感性下降^[10],最大限度地降低万古霉素临床使用中严重的毒副作用成为新的研究热点。

大环内酯类药物因具有调节机体免疫功能和良好的抗生物被膜特性而被广泛用于临床重症感染的

治疗。已有研究表明,阿奇霉素能够有效地抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成,并且对已形成生物被膜的金黄色葡萄球菌具有较好的抗菌活性和抗毒素作用^[4]。群体信号感应系统(QS)调控细菌生物被膜形成,而且还参与细菌毒力因子释放的调控^[11]。阿奇霉素在一定程度上抑制 QS 调控相关基因的表达,导致藻酸盐的合成减少,抑制细菌的早期粘附,抑制生物被膜的形成、成熟、甚至破坏已形成的生物被膜。因此,万古霉素和阿奇霉素联合使用治疗 MRSA 引起的生物被膜细菌感染,具有重要的理论意义。

本研究通过体外万古霉素与阿奇霉素联合药物敏感试验,根据两药物之间的相关作用来判断对生物被膜形成的 MRSA 是否具有较好的抗菌活性。试验所涉及的 17 株生物被膜形成的 MRSA 样本,是经过头孢西丁纸片法和乳胶凝集法同时鉴定确证。运用棋盘格稀释法检测万古霉素和阿奇霉素联合药敏时的 MIC。棋盘格法联合药敏操作简单易行,重复性较好,但工作量大,不适用于临床实际工作中大批量的标本检测。试验数据显示,两药联合时相加作用占 88.2%,协同作用占 11.8%,确定无无关作用和拮抗作用。万古霉素联用后 MIC 由单用时的 1.21 mg/L 降至 0.38 mg/L,阿奇霉素联用后 MIC 由单用时的 60.24 mg/L 降至 18.94 mg/L,差异有统计学意义,提示万古霉素与阿奇霉素联合使用时,对形成生物被膜的 MRSA 有较好的体外抗菌效果,临床上可以考虑适当降低两药物的治疗浓度。综合分析,在两药联用过程中,阿奇霉素抑制 MRSA 菌的多糖合成,降低细菌间的黏附,破坏已形成的生物被膜,提高进入细菌细胞内的通透性,万古霉素进入菌体后破坏细胞壁,抑制细菌蛋白质的合成,从而达到联合杀菌作用。

在实际工作中,还需要进行更多的具有科学性和安全性的试验,研究体外药物的抗菌活性与临床联合用药的相关性,扩大抗菌谱,减小药物的使用剂量以减少毒副作用,预防和延缓细菌耐药性的发生。

参 考 文 献:

- [1] 韩善桥,刘瑾红.细菌耐药的产生机制与控制措施[J].实用预防医学,2010,17(4):831-832.
- [2] SHARMA M, VISAI L, BRAGHERI F, et al. Toluidine Blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(1): 299-305.
- [3] MATARACI E, DOSLER S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against

- methicillin-resistant staphylococcus aureus biofilms[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 6(12): 6366-6371.
- [4] 邢明勋, 贾生美, 袁鹏, 等. 阿奇霉素对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用[J]. *中国药科大学学报*, 2012, 43(6): 553-559.
- [5] 周庭银, 倪语星, 胡继红, 等. 临床微生物检验标准化操作(ISO15189 认可指导书)[M]. 第 3 版. 上海: 科学技术出版社, 2015: 477-478.
- [6] 贾明, 周晔, 邵涓涓, 等. 心脏外科重症监护病房革兰阳性球菌医院感染状况及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(3): 424-426.
- [7] 濮燕屏, 程惠娟, 段强军, 等. 鱼腥草素钠联合阿奇霉素对金黄色葡萄球菌生物被膜早期黏附的影响[J]. *中成药*, 2015, 37(8): 1813-1817.
- [8] 孔晋亮, 张东伟, 陈一强, 等. 同源性金黄色葡萄球菌生物被膜形成能力比较[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(3): 481-483.
- [9] 邹琳, 刘长庭. 利奈唑胺在老龄老年患者中的临床应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(3): 399-401.
- [10] 祝进, 陆军, 陈衍, 等. 甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌万古霉素最低抑菌浓度分布及不同药敏试验方法比较[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(12): 1103-1104.
- [11] 乔瑞红, 谢鲲鹏, 谢明杰. 葡萄球菌生物被膜的基因调控机制研究进展[J]. *微生物学报*, 2015, 55(10): 1238-1244.

(申海菊 编辑)