

• 基础研究论著 •

倍丙酯与抗生素联合抗多重耐药鲍曼不动杆菌作用研究*

蔡燕^{1,2,3}, 彭乙华⁴, 凌保东⁵, 黄义山^{1,3}, 蒋红², 赖明晞^{1,3}, 刘青松^{1,2,3}, 谢文光^{2△}

(川北医学院附属医院: 1. 检验科; 2. 风湿免疫研究所, 四川南充 637000; 3. 川北医学院检验系, 四川南充 637000; 4. 川北医学院附属医院内分泌科, 四川南充 637000; 5. 川北医学院药物研究所, 四川南充 637000)

摘要:目的 探讨倍丙酯与临床上常用抗生素(头孢他啶、环丙沙星和阿米卡星)对多重耐药鲍曼不动杆菌的联合抑菌作用。方法 根据临床药敏结果选取 9 株鲍曼不动杆菌多重耐药菌株和鲍曼不动杆菌标准菌株 ATCC19606 作为实验对象, 用棋盘滴定法测定倍丙酯分别与头孢他啶、环丙沙星和阿米卡星的联合抑菌效应。结果 除鲍曼不动杆菌标准菌株外, 9 株鲍曼不动杆菌多重耐药菌株对三种抗生素皆耐药, 倍丙酯对各株细菌均有一定的抑制作用, 且对耐药株和标准菌株的最低抑菌浓度(MIC)基本相同; 倍丙酯分别与头孢他啶、环丙沙星、阿米卡星联用后抑菌作用表现为相加。结论 倍丙酯对鲍曼不动杆菌生长具有抑制作用, 与抗生素联用后抗菌活性增加。

关键词: 倍丙酯; 鲍氏不动杆菌; 棋盘滴定法; 多重耐药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1281-02

Antibacterial effects of propyl gallate combined with antibiotics against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii**

Cai Yan^{1,2,3}, Peng Yihua⁴, Ling Baodong⁵, Huang Yishan^{1,3}, Jiang Hong²,
Lai Mingxi^{1,3}, Liu Qingsong^{1,2,3}, Xie Wenguang^{2△}

(the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College: 1. Department of Clinical Laboratory; 2. Institute of Rheumatism Immunity, Nanchong 637000, China; 3. Faculty of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 4. Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 5. Institute of Materia Medica, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: Objective To investigate the antibacterial effects of propyl gallate combined with clinically used antibiotics (ceftazidime, ciprofloxacin and amikacin) on multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Methods** Nine clinical strains of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*, selected according to results of drug susceptibility tests, and standard strain ATCC19606 were enrolled in this study. Chessboard titration method was used to detect the inhibitory effects of propyl gallate respectively combined with ceftazidime, ciprofloxacin and amikacin. **Results** Except standard strain, nine clinical strains of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* were resistant to the three antibiotics mentioned above. Propyl gallate could inhibit all enrolled strains for certain degree, with close minimum inhibitory concentration (MIC) on clinical strains and standard strain. There was synergistic antibacterial effect between propyl gallate and the three antibiotics mentioned above. **Conclusion** Propyl gallate might be with antibacterial effects against *Acinetobacter baumannii*, which could be enhanced when being combined with other antibiotics.

Key words: propyl gallate; *Acinetobacter baumannii*; chessboard titration; multidrug resistance

鲍曼不动杆菌是一类广泛分布于自然环境和医院中的革兰阴性非发酵条件致病菌, 主要引起烧伤、烫伤等伤口感染以及呼吸道感染, 其多次成为院内感染暴流流行的主要细菌, 严重影响患者安全^[1-5]。近年来随着其耐药性的增加, 抗鲍曼不动杆菌感染已成为临床上非常棘手的问题, 当前迫切需要研发新的抗菌药物来治疗其引起的重症感染。中国中草药资源丰富, 不少药物具有抗菌作用, 本课题组在前期研究中发现倍丙酯能抑制临床上分离的多重耐药鲍曼不动杆菌生长^[6], 故本实验拟探讨其与临床上常用抗生素(头孢他啶、环丙沙星和阿米卡星)的联合抑菌作用, 为将倍丙酯用于临床治疗耐头孢他啶鲍曼不动杆菌感染提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 溶液配制 药物: 倍丙酯注射液(60 毫克/瓶, 购自福建省闽东力捷迅药业有限公司)、头孢他啶(0.5 克/瓶)、环丙沙星(2 mg/mL)和阿米卡星(0.2 克/支)均由本院药房提供, 倍丙酯、头孢他啶和阿米卡星用生理盐水稀释至 1.28 mg/mL 备用, 环丙沙星稀释至 500 μg/mL 备用。

1.1.2 菌株来源 从本院检验科微生物室 2010 年 5~7 月临床分离的鲍曼不动杆菌株中筛选出 9 株多重耐药菌株(采用美国德灵公司生产的 NC21 鉴定药敏板及配套试剂和 Vitek-32 进行菌株鉴定和药敏测定, 临床药敏结果显示 9 株菌株皆对阿

米卡星、头孢他啶、环丙沙星等耐药),以鲍曼不动杆菌标准菌株 ATCC19606(由川北医学院药物研究所凌保东教授馈赠)作为质控。

1.2 仪器与试剂 仪器:美国恒温空气浴摇床、恒温细菌培养箱和恒温振荡水浴培养箱。培养基:水解酪蛋白培养基即 MH (Mueller-Hinton, MH)肉汤,用去离子水稀释,高压灭菌备用。

1.3 方法

1.3.1 菌液制备 将临床分离的鲍曼不动杆菌接种于 MH 平板,35 °C 过夜培养,次日挑取单菌落用 MH 肉汤培养至 570 nm 处吸光度(OD)值 OD₅₇₀ 为 0.5,收集细菌,用生理盐水将各株鲍曼不动杆菌均调整浓度至 0.5 麦氏单位(约 1 × 10⁸ cfu/mL),再用 MH 肉汤稀释至 1 × 10⁶ cfu/mL 备用。

1.3.2 药物稀释 实验时各组中倍丙酯的终浓度分别为:128、64、32、16、8、4、2 μg/mL(前期研究显示倍丙酯对这 9 株细菌的最低抑药浓度为 64~128 μg/mL,故选择小于或等于 128 μg/mL 的倍丙酯浓度进行药物相互作用试验)。各组中头孢他啶和阿米卡星终浓度分别为:128、64、32、16、8 μg/mL。环丙沙星终浓度分别为:50、25、12.5、6.25、3.125 μg/mL。将高浓度的药物依次稀释为终浓度的 10 倍,各取 10 μL 加至 96 孔微量板相应孔中备用。

1.3.3 细菌培养 各取 90 μL 已稀释好的菌悬液接种到 96 孔微量板的相应孔中,其中每块板的第一列和第七列的第一孔不加药物,作为相应菌株的阳性对照,最后一列最后一孔不加药物和菌液作为空白对照,每块板接种 2 株细菌,均做 3 块复板,每次 15 块板,并重复 3 次。每孔总量为 100 μL,不足者以 MH 培养基补入。加样完毕后,将 96 孔板置恒温水浴振荡培养箱中(35 °C)低速振荡(50 r/min)培养。

1.3.4 结果检测 18 h 后观察,将肉眼观察无细菌生长的培养孔对应的药物浓度作为该药物对相应菌株的最低抑菌浓度(MIC)。分级抑制浓度(FIC) = A 药联用时的 MIC/A 药单用时的 MIC + B 药联用时的 MIC/B 药单用时的 MIC;分级抑制指数(FICI) = A 药的 FIC + B 药的 FIC;如果 FICI ≤ 0.5 为协同作用;0.5 < FICI ≤ 4 为相加作用;FICI > 4 为拮抗作用^[7]。

2 结果

2.1 各药物单用时的抑菌效果 四种药物对各株细菌均有不同程度的抑制作用,其中倍丙酯对各耐药株和标准株的抑制性基本一致,MIC 为 64~128 μg/mL;标准菌株在加有不同浓度的头孢他啶、阿米卡星和环丙沙星的培养孔中均未生长,头孢他啶和阿米卡星对各耐药菌株的 MIC 为 64~128 μg/mL,环丙沙星的 MIC 为 25~50 μg/mL。

表 1 倍丙酯与三种抗生素体外联合抑菌作用结果

菌株	药物联合	FIC		FICI	结果
		倍丙酯	其他药物		
68245	倍丙酯+头孢他啶	0.125	0.5	0.625	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.125	0.5	0.625	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.125	1.0	1.125	相加
68291	倍丙酯+头孢他啶	0.250	0.5	0.750	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.125	0.5	0.625	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.125	0.5	0.625	相加

续表 1 倍丙酯与三种抗生素体外联合抑菌作用结果

菌株	药物联合	FIC		FICI	结果
		倍丙酯	其他药物		
68313	倍丙酯+头孢他啶	0.500	0.5	1.000	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.125	0.5	0.625	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.125	0.5	0.625	相加
68340	倍丙酯+头孢他啶	0.250	0.5	0.750	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.500	0.5	1.000	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.125	0.5	0.625	相加
68439	倍丙酯+头孢他啶	0.063	1.0	1.063	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.063	0.5	0.563	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.500	0.5	1.000	相加
68822	倍丙酯+头孢他啶	0.125	1.0	1.125	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.125	0.5	0.625	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.500	0.5	1.000	相加
68865	倍丙酯+头孢他啶	0.125	1.0	1.125	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.063	0.5	0.563	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.500	0.5	1.000	相加
68883	倍丙酯+头孢他啶	0.125	1.0	1.125	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.125	0.5	0.625	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.500	0.5	1.000	相加
69122	倍丙酯+头孢他啶	0.063	1.0	1.063	相加
	倍丙酯+阿米卡星	0.500	1.0	1.500	相加
	倍丙酯+环丙沙星	0.500	0.5	1.000	相加

2.2 联合抑菌实验结果 倍丙酯与各抗生素联用后,各药物的 MIC 值均有一定程度的降低,其中倍丙酯的 MIC 值降为 8~64 μg/mL;头孢他啶降低为 32~64 μg/mL;阿米卡星降低为 32~64 μg/mL;环丙沙星降低为 12.5~25 μg/mL。倍丙酯与各抗生素联用后的 FICI 均为 0.5~4,提示倍丙酯与各抗生素间抑菌作用为相加,见表 1。

3 讨论

2010 年“超级细菌”这一概念的提出改变了人们以往对细菌耐药的漠视状态,许多国家或组织均采取一定的措施来控制细菌耐药的发生和传播^[8-9]。中国全国细菌耐药监测(Mohnarin)2009 年度报告显示全国收集的 54 566 株革兰阴性杆菌中共有 19 801 株鲍曼不动杆菌(36.3%),明显高于 2008 年的 29.3%^[10-11],而且对碳青霉烯类和头孢哌酮/舒巴坦等临床上常用抗鲍曼不动杆菌药物的耐药率明显增加,故应重视对鲍曼不动杆菌尤其是多重耐药菌株感染的治疗。传统中草药有不少药物具有抗菌活性^[12],而且极少产生耐药性,故从中草药中发掘抗菌药物或药物增效剂可能为控制细菌(尤其是耐药菌)感染提供新的途径。

倍丙酯是从中药赤芍中提取到的一种中药单体^[13],本课题组在前期工作中发现倍丙酯对鲍曼不动杆菌具有抑制作用,但其药物浓度较高,使其在临床的应用受限,头孢他啶、阿米卡星和环丙沙星曾是抗鲍曼不动杆菌的常用药物,目前临床上分离到的鲍曼不动杆菌大部分对这些药物具有(下转第 1285 页)

道, DHPLC 检测的 PCR 产物长度最好在 200~500 bp 范围内^[13], 而本次实验的 PCR 产物长度为 800 bp, 这可能是导致其敏感度降低的主要原因。另外引物的设计亦极为重要, 扩增的片段应涵盖所有可能的突变位点, 且片段长度不宜过长。

研究表明, DHPLC 技术应用于 TEM 型 ESBLs 基因检测具有经济、快捷、高通量和自动化的特点, 能快速识别 PCR 产物中的突变位点, 产生与基因型相对应的特异的洗脱峰型, 不需要进行测序, 使诊断成本明显降低, 可作为一种筛查方法用于产 ESBLs 菌的分子诊断及流行病学监测。

参考文献

- [1] Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, et al. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. J Microbiol Methods, 2005, 61(3): 399-412.
- [2] Xu L, Shabir S, Bodah T, et al. Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(3): 505-511.
- [3] Lu T, Stroot PG, Oerther DB. Reverse transcription of 16S rRNA to monitor ribosome-synthesizing bacterial populations in the environment[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(13): 4589-4598.
- [4] NCCLS. M100-S15 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteen informational supplement [S]. Wayne PA: NCCLS, 2005; 39.
- [5] Dallenne C, Da CA, Decre D, et al. Development of a set multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother,

2010, 65(3): 490-495.

- [6] 李岷, 李克涓, 赵苏瑛, 等. 大肠埃希菌和克雷伯菌 ESBLs 及 AmpC 酶的检测[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1122-1123.
- [7] Dhillon RH, Clark J. ESBLs: a clear and present danger? [J]. Crit Care Res Pract, 2012, 625170.
- [8] 段辉丽, 刘文恩. 变性高效液相色谱对 ESBLs 基因分型的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1082-1083, 1085.
- [9] Omaruddin RA, Chaudhry MA. Detection of genomic DNA methylation with denaturing high performance liquid chromatography [J]. Hum Cell, 2010, 3(2): 41-49.
- [10] Battochio A, Mohammed S, Winthrop D, et al. Detection of c-KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumors: comparison of DHPLC and DNA sequencing methods using a single population-based cohort[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(1): 149-155.
- [11] Wagner AO, Malin C, Illmeretal P. Application of denaturing high-performance liquid chromatography in microbial ecology: fermentor sludge, compost, and soil community profiling[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(4): 956-964.
- [12] Xu L, Evans J, Ling T, et al. Rapid genotyping of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. Antimicrob Agents Chemotherapy, 2007, 51(4): 1446-1454.
- [13] 叶建伟, 丁洁. 变性高效液相色谱分析的技术特征及其在应用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(2): 197-200.

(收稿日期: 2011-09-16)

(上接第 1282 页)

耐药性, 故本实验用较小浓度的倍丙酯分别与三种药物联用, 探讨倍丙酯是否可作为药物增效剂用于临床治疗鲍曼不动杆菌感染。实验结果显示倍丙酯与三种抗生素之间虽然没有协同作用, 添加倍丙酯后 9 株多重耐药菌株对头孢他啶、阿米卡星和环丙沙星仍然耐药, 但倍丙酯的抗菌浓度明显降低, 有的菌株(如 68439、68865、69122)其 MIC 值由联用前的 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低到 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 提示倍丙酯与其他抗生素联用后其抗菌活性增加。说明倍丙酯是一种抗鲍曼不动杆菌的潜在新药, 其毒副作用和体内实验将在下一步工作中进行探讨。

(致谢: 由衷感谢川北医学院药物研究所凌保东老师和川北医学院附院检验科微生物室各位老师对本实验的支持和指导。)

参考文献

- [1] Morovat T, Bahram F, Mohammad E. Distribution of different carbapenem resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals[J]. New Microbiol, 2009, 32(3): 265-271.
- [2] Caricato A, Montini L, Bello G, et al. Risk factors and outcome of *Acinetobacter baumannii* infection in severe trauma patients[J]. Intensive Care Med, 2009, 35(11): 1964-1969.
- [3] Ran YC, Ao XX, Liu L, et al. Distribution and drug resistance of pathogenic bacteria isolated from infected wounds of children after Wenchuan earthquake[J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2009, 47(5): 332-336.

- [4] 杨丽梅, 蔡红, 班武娟, 等. 肺部疾病患者鲍曼不动杆菌的分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 161-162.
- [5] 胡巧娟, 胡志东. 多重耐药鲍曼不动杆菌的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1121-1123.
- [6] 蔡燕, 彭乙华, 凌保东, 等. 倍丙酯对多重耐药鲍曼不动杆菌生长的影响[J]. 中华临床医生杂志: 电子版, 2011, 5(6): 1647-1650.
- [7] Nuryastuti T, van der Mei HC, Busscher HJ, et al. Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(21): 6850-6855.
- [8] Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al. CNSE working group (2010): carbapenem-non-susceptible enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts[J]. Euro Surveill, 2010, 18, 15(46): 19711-19726.
- [9] 赵敏. 细菌耐药现状及治疗——从超级细菌谈起[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(2): 104-108.
- [10] 李耘, 吕媛. Mohnairn 2009 年度报告: 非发酵革兰阴性杆菌耐药监测[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(5): 348-351.
- [11] 胡云建. Mohnarin 2006~2007 年度报告: 非发酵革兰阴性杆菌耐药性监测[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(10): 597-601.
- [12] 蔡燕, 邢艳, 谢文光. 中药抗菌作用研究进展[J]. 中国医药导报, 2011, 8(6): 9-10.
- [13] 蒋跃绒, 段惠军, 陈可翼, 赤芍 801 研究现状[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 760-763.

(收稿日期: 2011-09-07)