维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)03－0237－04

环丙沙星及亚胺培南体内、外诱导交叉耐药铜绿假单胞菌

袁　喆,肖永红,王其南

(重庆医科大学临床学院传染科　重庆　400016)

【摘　要】目的:研究环丙沙星及亚胺培南体内、外诱导铜绿假单胞菌交叉耐药的耐药诱导性。方法:以铜绿假单胞菌临床分离敏感株 PA5,利用含药琼脂平板法(MH 琼脂)及小鼠铜绿假单胞菌腹膜炎动物模型,研究两药体内、外诱导交叉耐药情况。结果:体外环丙沙星及亚胺培南在 1×MIC、2×MIC 浓度可诱导耐药菌产生,交叉耐药率 9.2% 及 20.8%。体内环丙沙星诱导产生交叉耐药率为 3.8%。结论:铜绿假单胞菌交叉耐药菌均可经环丙沙星或亚胺培南在体内、外诱导选择产生。体外环丙沙星与亚胺培南诱导选择耐药突变频率及交叉耐药率无明显差异,体内交叉耐药菌的产生与药物剂量相关。

【关键词】铜绿假单胞菌;环丙沙星;亚胺培南;交叉耐药

【中国图书分类法分类号】R978.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000－12－01

Cross resistance of Pseudomonas aeruginosa induced by ciprofloxacin and imipenem in vitro and in vivo

YUAN Zhe, et al

(Department of Infectious Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To investigate ciprofloxacin and imipenem in vitro and in vivo inducibility on Pseudomonas aeruginosa cross resistance. ***Methods***: The cross resistance mutant strains in vitro and in vivo were selected with clinically isolated sensitive strain of P. aeruginosa PA5 by passage on MH agar containing different concentrations of ciprofloxacin or imipenem and experimental murine peritonitis. ***Results***: The cross resistance rate of P. aeruginosa selected by 1 or 2×MIC ciprofloxacin and imipenem were 9.2% and 20.8%. The 4 strains of cross resistance mutants were obtained when ciprofloxacin therapeutic dosage were 10～25mg/kg. The 2 strains of cross resistance mutants were obtained when imipenem therapeutic dosage were 5～10mg/kg. ***Conclusion***: The cross resistance mutants for ciprofloxacin and imipenem could be induced and selected in vitro and in vivo with both agents. There is no difference in resistance mutation frequency and cross resistance rate between ciprofloxacin and imipenem in vitro. The in vivo cross resistance is related with dosage.

【Key words】 Pseudomonas aeruginosa; Ciprofloxacin; Imipenem; Cross resistance

铜绿假单胞菌是常见院内感染菌之一,氟喹诺酮类及亚胺培南作为主要治疗药物受到广泛认同。近年来,对氟喹诺酮类及亚胺培南耐药铜绿假单胞菌已有报道[1]。我们在实验室利用含药琼脂平板法及小鼠铜绿假单胞菌腹膜炎模型,以临床分离的环丙沙星及亚胺培南敏感铜绿假单胞菌 PA5 为亲株,在体内、外诱导筛选交叉耐药菌,调查两类药物诱导铜绿假单胞菌交叉耐药发生情况及相互影响,为临床合理应用抗菌药物提供重要依据。

1　材料和方法

1.1　菌株

铜绿假单胞菌 PA5 为我院 1998 年临床病人血培养分离所得对环丙沙星及亚胺培南敏感株(环丙沙星 MIC 为 0.03μg/ml,亚胺培南 MIC 为 4μg/ml)。

1.2　药物

作者介绍:袁　喆(1965－),男,主治医师,博士,主要研究方向:传染病学及抗菌药物临床研究。

基金项目:1996 年卫生部国际交流中心联沙东科研基金资助。

维普资讯 http://www.cqvip.com

环丙沙星标准品由重庆制药六厂提供。体外环丙沙星诱导浓度为 1×MIC(0.03μg/ml)、2×MIC(0.06μg/ml)及 4×MIC(0.0125μg/ml)。亚胺培南为默沙东公司产品。体外亚胺培南诱导浓度为 1×MIC(4μg/ml)、2× MIC(8μg/ml)及 4×MIC(16μg/ml)。

1.3 体外诱导铜绿假单胞菌耐药株

将细菌原液稀释为大致 0.1×10^9CFU/ml,吸取 0.1ml 菌液,均匀涂布于含环丙沙星或亚胺培南的琼脂平板,37℃孵育 24～48h 后,收集耐药变异株;同时按倍比稀释法计数原液菌量、计算耐药突变频率及交叉耐药率。

1.4 体内诱导铜绿假单胞菌耐药性

1.4.1 小鼠铜绿假单胞菌腹膜炎模型的建立

纯系 NIH 小鼠 48 只,雌、雄各半,体重 35～45g/只,由本校实验动物中心提供(动物许可证号:医动字第 24301042 号)。按文献报告方法建立实验小鼠铜绿假单胞菌腹膜炎模型,即用 0.9%的生理盐水稀释过液生长 PA5 菌肉汤至 0.1×10^6CFU/ml 及 0.1×10^9CFU/ml,注射 1ml 菌液入小鼠腹腔,制成小鼠腹膜炎。一组同时加入滑石粉($Mg_3Si_4O_{10}[OH]_2$),浓度为 125μg/ml,另一组不加滑加粉,比较滑石粉($Mg_3Si_4O_{10}[OH]_2$)作为异物时对腹水量及腹水中细菌量的影响。并检测腹水中细菌量的变化。该浓度的滑石粉不会影响环丙沙星或者亚胺培南的抗菌活性,但可作为异物诱发小鼠铜绿假单胞菌腹膜炎的发生[2]。

1.4.2 抗菌药物治疗小鼠腹膜炎及耐药菌筛选

小鼠腹膜炎制成后 2h,以不同剂量环丙沙星(10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg)和亚胺培南(5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg)皮下注射治疗,每剂量组 6 只小鼠,雌、雄各半,采用单剂量给药。注射药物 22h 后,麻醉小鼠致死。通过髂骨旁切口,收集腹水,将腹水接种至 MHA 琼脂平板,37℃孵育 24－48h 后收集生长细菌,测定 MIC 值。

1.5 药物敏感实验

以试管双倍稀释法测定抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)。以细菌对环丙沙星和亚胺培南 MIC 同时 4 倍以上增加为交叉耐药菌。

2 结 果

2.1 体外诱导铜绿假单胞菌耐药菌株

当细菌接种量为 0.1×10^9CFU/ml 时,体外环丙沙星诱导产生耐药菌 43 株。其中 1×MIC 浓度环丙沙星诱导产生耐药菌 17 株,2×MIC 浓度环丙沙星诱导产生耐药菌 26 株,4×MIC 浓度时,没有诱导产生耐药菌。耐药突变频率分别为 1.7×10^{-7}及 2.6×10^{-7}。

当细菌接种量为 0.1×10^9CFU/ml 时,体外亚胺培南诱导产生耐药菌 24 株。其中 1×MIC 浓度亚胺培南诱导产生耐药菌 4 株,2×MIC 浓度亚胺培南诱导产生耐药菌 20 株,4×MIC 浓度时,没有诱导产生耐药菌。耐药突变频率分别为 4×10^{-8}及 20×10^{-8}。

2.2 体外诱导耐药菌 MIC 测定

体外环丙沙星诱导产生耐药菌 43 株,其中同时对环丙沙星及亚胺培南交叉耐药菌 4 株。编号分别为 RP1、RP2、RP3、RP4。其中 RP3 在 1×MIC 诱导浓度时诱导产生,RP1、RP2、RP4 在 2×MIC 诱导浓度时诱导产生。交叉耐药菌与亲株 PA5 比较,环丙沙星对交叉耐药菌 MIC 从 0.03μg/ml 增加到 0.5－1μg/ml,亚胺培南 MIC 从 4μg/ml 增加到 16－128μg/ml(表 1)。

表 1 环丙沙星及亚胺培南对体外环丙沙星诱导耐药菌 MIC(μg/ml)

交叉耐药菌编号	环丙沙星 MIC	亚胺培南 MIC
RP1	1	128
RP2	0.5	32
RP3	0.5	16
RP4	1	16

体外亚胺培南诱导产生耐药菌株 24 株,其中同时对环丙沙星及亚胺培南交叉耐药者 5 株。编号为 RP5、RP6、RP7、RP8、RP9。其中 RP5、RP9 在 1×MIC 诱导浓度时产生,RP6、RP7、RP8 在 2×MIC 诱导浓度时诱导产生。体外亚胺培南诱导产生交叉耐药菌 5 株,与 PA5 比较,环丙沙星对交叉耐药菌 MIC 从 0.03μg/ml 增加到 0.25～0.5μg/ml,亚胺培南 MIC 从 4μg/ml 增加到 32～128μg/ml(表 2)。

表 2 环丙沙星及亚胺培南对体外亚胺培南诱导耐药菌 MIC(μg/ml)

交叉耐药菌编号	环丙沙星 MIC	亚胺培南 MIC
RP5	0.25	32
RP6	0.25	128
RP7	0.25	64
RP8	0.5	128
RP9	0.5	32

2.3 小鼠腹膜炎模型的建立

从以上结果可以看出,当注射菌量为 0.1×10^6CFU 时,小鼠无腹水产生。当注射菌量为 0.1×10^9CFU 时,小鼠产生腹水量为 0.4～0.6ml,较注射菌量为 0.1×10^6CFU/ml 时明显增多,腹水量中的细菌数达 2.4×10^8～3.7×10^8CFU/ml。此外,在有异物存在时,腹水量及细菌量均较无异物时多,说明有异物时小鼠腹膜炎更为明显(表 3)。故在耐药菌

维普资讯 http://www.cqvip.com

筛选时均合用异物，注射菌时为 0.1×10^9CFU/ml。

表 3 小鼠腹膜炎模型

小鼠(只)	注射细菌量(CFU)	滑石粉	腹水量(ml)	腹水中的细菌量(CFU/ml)
6	0.1×10^6	−	0	0
6	0.1×10^6	+	0.1～0.2	5×10^6～7×10^6
6	0.1×10^9	−	0.4～0.6	2.4×10^8～3.7×10^8
6	0.1×10^9	+	1～1.2	1.25×10^{11}～2.0×10^{12}

表 4 体内诱导交叉耐药菌 MIC 测定

菌株及编号	环丙沙星 MIC (μg/ml)	亚胺培南 MIC (μg/ml)
环丙沙星体内诱导菌		
RP10	2	64
RP11	1	64
RP12	0.5	32
RP13	0.5	16
亚胺培南体内诱导菌		
RP14	2	32
RP15	2	16

2.4 体内诱导铜绿假单胞菌耐药菌产生情况

环丙沙星单剂治疗量在 10～25mg/kg 时，诱导产生交叉耐药菌 4 株，单剂治疗量在 50mg/kg 时，没有产生交叉耐药菌。亚胺培南单剂治疗量在 5～10mg/kg 时，诱导产生交叉耐药菌 2 株，单剂治疗量在 15mg/kg 时，没有产生交叉耐药菌。

体内环丙沙星诱导产生交叉耐药菌 4 株，环丙沙星对其 MIC 从 0.03μg/ml 增加到 0.5～2μg/ml，亚胺培南 MIC 从 4μg/ml 增加到 16～64μg/ml。体内亚胺培南诱导产生交叉耐药菌 2 株，环丙沙星对其 MIC 从 0.03μg/ml 增加到 2μg/ml，对亚胺培南 MIC 从 4μg/ml 增加到 16～32μg/ml(表 4)。104 株体内环丙沙星诱导的耐药株对环丙沙星 MIC 范围为 0.125～4μg/ml。203 株体内亚胺培南诱导的耐药株对亚胺培南 MIC 范围为 16～128μg/ml。

3 讨 论

铜绿假单胞菌为临床常见的条件致病菌之一，可致严重院内感染，氟喹诺酮类及亚胺培南对铜绿假单胞菌有可靠的抗菌活性。近年来，随着该两药广泛应用后，耐药细菌已有报道，耐药率也逐渐上升。更有甚者，两者交叉耐药也不断发生[3～6]。本研究显示，体外诱导耐药菌的产生，与药物诱导浓度相关。在接种 0.1×10^9CFU/ml 菌量至 1×MIC 及 2×MIC 浓度环丙沙星 MHA 平板时，可诱导产生环丙沙星耐药变异株。当体外环丙沙星诱导浓度增至 4×MIC 时，无环丙沙星耐药变异株产生。同样，在体外亚胺培南诱导耐药菌的情况下，1×MIC 及 2×MIC 浓度亚胺培南 MHA 平板可诱导产生亚胺培南耐药株，而在 4×MIC 的诱导浓度下，无亚胺培南耐药株产生。表明喹诺酮类及亚胺培南均可体外选择产生交叉耐药菌，两者对耐药性诱导作用强弱无明显差异。

Radberg 等[7]对体外诱导耐药菌耐药稳定性进行研究。将交叉耐药菌连续转种于无药的 MHB 中 10 次，每次转种后测定 MIC 值，观察耐药变异的稳定性，发现经过 10 次转种后，环丙沙星、亚胺培南交叉耐药菌耐药性稳定，仍然对环丙沙星及亚胺培南耐药。

在建立小鼠铜绿假单胞菌腹膜炎模型中发现，小鼠腹膜炎的发生与接种菌量及是否存在异物明显相关。且体内环丙沙星、亚胺培南诱导耐药突变与剂量依赖性有关。当环丙沙星治疗剂量为 10～25mg/kg 时，诱导产生 96 株耐药菌，交叉耐药菌 4 株；而治疗剂量在 50mg/kg 时，诱导产生 8 株耐药菌，无交叉耐药菌产生。当亚胺培南治疗剂量为 5～10mg/kg 时，诱导产生耐药菌株 189 株，交叉耐药菌 2 株；而治疗剂量在 15mg/kg 时，诱导产生耐药菌 14 株，无交叉耐药菌产生。体内两种药物耐药诱导无明显差异。

本研究证明，环丙沙星和亚胺培南均可体内外诱导选择交叉耐药菌。体内、外环丙沙星、亚胺培南诱导耐药突变是剂量依赖性。不严格地广泛应用环丙沙星及亚胺培南，不仅可诱导铜绿假单胞菌对其耐药，而且可使细菌对其他化学结构不相关的抗生素产生交叉耐药。为防治细菌耐药的产生，必须严

维普资讯 http://www.cqvip.com

格掌握用药的适应症，用抗菌药物前，应尽可能进行病原学的检查及进行药敏实验，作为调整用药的参考。掌握适当的剂量和疗程，要避免剂量过大造成药物浪费和毒性反应的出现，又要注意由于剂量不足而至病情迁延、复发及细菌耐药性的产生。

参 考 文 献

[1] Quinn JP, Dudek EJ, DiVincezo CA, et al. Emergence of resistance to imipenem during therapy for Pseudomonas aeruginosa infections[J]. J Infect Dis, 1986; 154 (2): 289 - 294.

[2] Hamzehpour MM, Auckenthaler R, Regamey P, et al. Resistance occurring after fluoroquinolone therapy of experimental Pseudomonas aeruginosa peritonitis [J] Antimicrob Agents Chemother, 1987; 31(11): 1803 - 1808.

[3] Bouza E, Garnote FG, Cercenado E, et al. Pseudomonas aeruginosa: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999; 43(4): 981 - 982.

[4] Cambu E, Perina E, Dib C, et al. Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of Pseudomonas aeruginosa susceptible or resistant to imipenem[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995; 39(10): 2248 - 2252.

[5] Masuda N, Ohya S. Cross - resistance to meropenem, cephems, and quinolones in Pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992; 36(8): 1847.

[6] Carmell Y, Troillet N, Eliopoulos GM, et al. Emergence of antibiotic - resistant Pseudomonas aeruginosa: comparison of risks associated with different antiseudomonal agents[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999; 43(6): 1379.

[7] Radberg G, Nillsson LE, Svensson S. Development of quinolone - imipenem cross resistance in Pseudomonas aeruginosa during exposure to ciprofloxacin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1990; 34(11): 2142.

(上接第 230 页)

本文在体外对人的白血病细胞株 K562 进行了初步探讨，认为，B7 转化的白血病细胞株同野生型细胞株相比，能激发有效的细胞免疫应答，但用于临床治疗，尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] ChenL, McGowan, P, Ashe S, et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 co - stimulation on T cell mediated tumor immunity [J]. J Exp Med, 1994; 179: 523 - 532.

[2] *Hirano, Takahashi, Ohtake, et al.* Expression of costimulatory molecules in human leukemias[J]. Leukemia, 1996; 10 (7): 1168 - 1176

[3] J 萨姆布鲁克，等著. 金冬雁，黎孟枫，等译. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 科学出版社，1996.

[4] John J Donnelly, Jeffrey B, W Schiver, et al. DNA vaccines[J]. Annu Rev Immunol, 1997; 15: 617 - 648.

[5] Joannopoulos, Weinstein, Nickerson, et al. Irradiated B7.1 transduced primary acute myelogenous leukemia(AML) cells can be used as therapeutic vaccines in murine AML[J]. Blood, 1996; 87(7): 2938 - 2946.

[6] Hirano, Takahashi, Azuma, et al. Protective and therapeutic immunity against leukemia induced by irradiated B7.1 - transduced leukemia cells[J]. Hum Gene Ther, 1997; 8(11): 1375 - 1384.

[7] Hirst, Buggin, Darling, et al. Enhanced immune costimulatory activity of primary acute myeloid leukemia blasts after retrovirus - mediated gene transfer of B7.1[J]. Gene Ther, 1997; 4(7): 691 - 699.

[8] Matulonis, Dosiou, Lamont, et al. Role of B7.1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells[J]. Blood, 1995; 85(9): 2507 - 2515.

(上接第 236 页)筛选试验。本实验显示肝癌细胞分泌物对正常血浆的外源性凝血无明显影响，但凝血功能不良时，可通过影响外源性凝血系统，使凝血功能更差；本实验还显示肝癌细胞分泌物使 TT 延长，这也许是由于肿瘤细胞分泌溶解纤维蛋白原的物质和抗凝物质[4]所致。

总之，肝癌细胞分泌物可直接影响凝血功能，在不同凝血状况下，影响不同凝血系统，促成截然相反的结果。

参 考 文 献

[1] 王振义，李家增，阮长耿. 血栓与止血基础理论与临床[M]. 第 2 版. 上海：上海科学技术出版社，1997; 546 - 554.

[2] Hu T, Bach RR, Horton R, et al. Procoagulant activity in cancer cells is dependent on tissue factor expression [J]. Oncol Res, 1994; 6(7): 321 - 327.

[3] Gordon SG, Mielicki WP. Cancer procoagulant: a factor X activator, tumor marker and growth factor from malignant tissue [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 1997; 8(2): 73 - 86.

[4] 沈 迪，凌柱三. 临床出血病学[M]. 第 1 版. 北京：科学技术文献出版社，1996; 379 - 383.