

夫西地酸联合抗生素抑制脓肿分枝杆菌的研究

何志群¹, 滕 飞², 高 超³, 曾雪婷⁴, 许馨月¹,
杜佳依¹, 李树华¹, 曾菊梅¹, 汪 川¹

(1. 四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院 中毒、检验与精准防治研究转化中心, 成都 610041;
2. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041;
3. 四川大学华西医院人类疾病与免疫治疗实验室, 成都 610041;
4. 陆军军医大学陆军特色医学中心药剂科, 重庆 400042)

摘 要: 为了探究针对脓肿分枝杆菌的抑菌方案, 本研究采用 MABA 法测定夫西地酸等药物对脓肿分枝杆菌标准菌株及临床分离株的最小抑菌浓度 MICs, 棋盘稀释法测定联合抑菌作用, 以及平板涂布法测定最小杀菌浓度 MBCs. 结果表明, 单用夫西地酸、阿奇霉素、头孢曲松钠、贝达喹啉对脓肿分枝杆菌标准株的 MIC₉₀ 与 MBC 分别为 50、6.25、3.13、3.13 $\mu\text{g/mL}$ 与 50、12.5、3.13、6.25 $\mu\text{g/mL}$, 夫西地酸联用阿奇霉素的协同指数 FICI 从 0.09~2.0 不等; 夫西地酸对脓肿分枝杆菌具有良好的体外抑菌活性, 且夫西地酸与阿奇霉素联用后对标准株与临床株表现出明显的协同效应, 相比单药作用极大地降低药物的 MIC 及 MBC; 其与头孢曲松钠联用后对标准株与临床株分别表现出协同、相加作用; 与贝达喹啉联用后对标准株与临床株分别表现出相加、无关作用.

关键词: 脓肿分枝杆菌; 夫西地酸; 阿奇霉素; 最小抑菌/杀菌浓度; 协同作用

中图分类号: R378.91 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.066001

Study on antibacterial effect of fusidic acid combined with antibiotics against *Mycobacterium abscessus*

HE Zhi-Qun¹, TENG Fei², GAO Chao³, ZENG Xue-Ting⁴, XU Xin-Yue¹,
DU Jia-Yi¹, LI Shu-Hua¹, ZENG Ju-Mei¹, WANG Chuan¹

(1. Research Center for Poisoning Treatment, Laboratory Science & Precision Prevention, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
3. Laboratory of Human Diseases and Immunotherapies, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
4. Department of Medicament, Army Characteristic Medical Center, Army Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: In order to explore the new antibacterial strategy against *Mycobacterium abscessus*, this study used the microplate alamar blue assay (MABA) method to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of fusidic acid and other drugs on the standard strains and clinical isolates. The checker-board method was used to determine the antibacterial effect of fusidic acid combined with drugs, while the minimum bactericidal concentrations (MBCs) were determined by the plate coating method. The re-

收稿日期: 2021-03-01
基金项目: 国家自然科学基金(31870065); 四川大学中央高校基本科研业务费(YJ201985); 四川大学大学生创新创业训练计划(C2021115212)
作者简介: 何志群(1996-), 女, 四川巴中人, 硕士研究生, 研究方向为微生物/公众健康与检验. E-mail: 18224493020@163.com
通讯作者: 汪川. E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

sults showed that the MIC_{90} of fusidic acid, azithromycin, ceftriaxone sodium, bedaquiline alone against the standard strain of *M. ab* was 50 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 3.13 $\mu\text{g/mL}$, and 3.13 $\mu\text{g/mL}$, respectively. And the MBCs of those alone against the standard strain of *M. ab* were 50, 12.5, 3.13, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The fractional inhibitory concentration index (FICIs) of fusidic acid combined with azithromycin ranged from 0.09~2.0. Fusidic acid has good antibacterial activity against *M. ab* *in vitro*, and the combination of fusidic acid with azithromycin showed an obvious synergistic effect *in vitro* bacteriostatic effect on both standard and clinical strains of *M. ab*, which significantly reduced the MICs and MBCs of the drug, and the combination with ceftriaxone sodium showed synergistic on standard strains and additive effect on clinical strains. After combined with bedaquiline, it showed additive effects on standard strains while irrelevant effects on clinical strains.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*; Fusidic acid; Azithromycin; Minimum inhibitory/bactericidal concentrations; Synergistic effect

1 引言

脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*, *M. ab*)是一种具有多重天然耐药性的快生型非结核分枝杆菌(Nontuberculous mycobacteria, NTM),引起人体严重的呼吸道、皮肤和粘膜感染.感染主要通过伤口(导管或其他暴露的表面)与环境或受污染的设备(手术器械等)直接接触而发生^[1-3].近年来,脓肿分枝杆菌在临床感染的患者人数迅速增加,而可供选择的治疗药物相对匮乏,已经成为了不可忽视的临床问题.

已经有证据表明,脓肿分枝杆菌感染可能通过气溶胶或接触污染物的方式在人与人之间传播^[4-5].脓肿分枝杆菌因其固有的多重天然耐药性导致对大多数常规抗生素及抗结核化合物广泛耐药,治疗时药物选择比较局限.分离菌株的体外药敏结果以及患者用药史是选择联合用药方案的重要参考:克拉霉素、阿奇霉素、头孢西丁、阿米卡星、替加环素、亚胺培南/西司他丁等药物对脓肿分枝杆菌具有较好的体外抑菌活性,临床上选择上述药物联合使用治疗脓肿分枝杆菌感染.脓肿分枝杆菌药敏试验与临床疗效相关性不确定以及获得性耐药使得治疗效果更不理想,治愈率仅 30%~50%.其中新型大环内酯类药物对大多数 NTM 治疗比较有效,但脓肿分枝杆菌因其单拷贝靶标基因突变容易产生克拉霉素(23S rRNA 基因)和阿米卡星(16S rRNA 基因)的获得性抗性突变,产生耐药,导致治疗失败.头孢西丁联合治疗快生分枝杆菌患者确实能够提高治愈率,但在临床菌株中检测到该药物敏感性下降^[6-7].其他治疗脓肿分枝杆菌的药物在临床上也存在不同程度的获得性耐药现象发

生,导致患者无法获得长期的痰培养转阴结果以及临床症状的改善^[8].在目前的抗生素选择下,脓肿分枝杆菌感染对大多数患者来说是一种难以治愈的慢性感染.因此寻找新的抗菌药物策略包括老药新用以及联合用药对于选择抗脓肿分枝杆菌药物尤其重要.

夫西地酸(Fusidic acid, $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_6$)对革兰氏阳性球菌尤其对葡萄球菌高度敏感,对某些革兰氏阴性菌有一定的抗菌作用,也可抗厌氧菌感染,与其它抗生素无交叉耐药性,常用于细菌性治疗.多项体内外研究^[9-12]表明夫西地酸联用其他抗生素对葡萄球菌协同抗菌作用显著,能够明显缩窄金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌的耐药突变选择窗,抑制耐药突变体的产生.另外夫西地酸联用氨基糖苷或粘菌素对耐药铜绿假单胞菌具有协同抗菌作用,夫西地酸联用策略能够一定程度逆转菌株对药物由耐药变为敏感状态^[13-14].已经发现部分分枝杆菌对夫西地酸具有一定程度的敏感性,包括堪萨斯分枝杆菌,麻风分枝杆菌,以及结核分枝杆菌.计算机成功模拟预测分枝杆菌 FtsZ (Filamentous temperature-sensitive mutant Z)是夫西地酸作用的有效靶点^[15].

本研究首先开展了夫西地酸对脓肿分枝杆菌的抑菌活性研究,首次发现夫西地酸对脓肿分枝杆菌具有较好的体外抑菌活性;然后进一步开展了夫西地酸联合阿奇霉素等药物对脓肿分枝杆菌的抑菌活性研究,得到具有良好协同作用的两种药物组合,为临床开发新的治疗脓肿分枝杆菌感染药物方案提供参考.

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 实验菌株: 脓肿分枝杆菌标准菌株(ATCC 19977);脓肿分枝杆菌临床分离株7株(MAB-S1、MAB-S2、MAB-S3、MAB-R1、MAB-R2、MAB-R3、MAB-R4)由四川大学华西第四医院微生物室提供。

2.1.2 药物与培养基 夫西地酸由四川大学生物治疗国家重点实验室余洛汀教授课题组提供;阿奇霉素(Azithromycin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, 批号:C11104216)和头孢曲松钠(Ceftriaxone sodium, $C_{18}H_{17}N_8NaO_7S_3$, 批号:C11330323)均购自上海麦克林生化科技有限公司;贝达喹啉(Bedaquiline, $C_{32}H_{31}BrN_2O_2$, 批号:B349211337769)购自美国APEXBIO公司;7H9肉汤/琼脂培养基(BD-Difco)均严格按照说明配制,4℃保存备用;Resazurin(麦克林生化科技),二甲基亚砜DMSO(MP Bio-medicals),Tween 80(Sigma-Aldrich)。

2.2 实验方法

2.2.1 脓肿分枝杆菌的准备 接种环挑取复苏活化后的单个菌落在10 mL 7H9肉汤培养基中,37℃摇床恒温振荡至菌液生长到对数生长期;以7H9肉汤培养基作空白对照管,测得OD在600 nm波长下吸光度约为0.5时,取菌液与新鲜7H9肉汤培养基稀释制备菌悬液备用(约 1×10^4 CFU/mL)。

2.2.2 药物准备 夫西地酸溶解于DMSO,头孢曲松钠溶解于无菌水,阿奇霉素溶解于无水乙醇,三种药物均配制为10 mg/mL的储存浓度;贝达喹啉溶解于无菌水,配制为5 mg/mL的储存浓度,经0.22 μm滤膜过滤除菌后-20℃冻存备用。

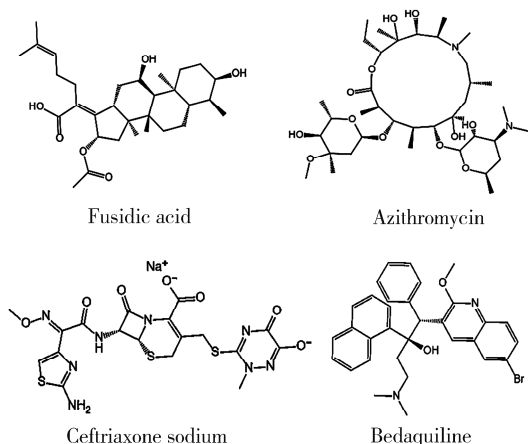


图1 药物结构示意图

Fig. 1 The structure of Chemicals

2.2.3 单独药物的最小抑菌浓度(MIC)测定 采用96孔板(平底)微量稀释法测定药物的最小抑菌浓度^[16]。以第一孔作抑菌对照,第十二孔作生长对照,第二至第十一孔依次为二倍稀释的10个药物浓度梯度实验组。浓度依次是100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20 μg/mL,每个浓度设置复孔。将接种好的微孔板放置于5% CO₂培养箱37℃培养1 d后测试生长对照,加入1%的Resazurin溶液培养过夜,观察颜色是否已由蓝色变为红色,此时在剩余所有孔中加入1%的Resazurin溶液培养过夜^[17]。采用多功能微孔板分析仪测定540/590 nm处的荧光值,以抑菌对照为本底,计算药物不同浓度下对标准脓肿分枝杆菌的生长抑制率,抑制率大于等于50%对应的最低药物浓度为该药对细菌的MIC₅₀,抑制率大于等于90%对应的最低药物浓度为该药对细菌的MIC₉₀。计算公式如下:

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{试验孔荧光值} - \text{抑菌对照荧光值}}{\text{生长对照荧光值} - \text{抑菌对照荧光值}}$$

2.2.4 药物协同作用的最小抑菌浓度(MIC)测定

采用棋盘稀释法^[18-19]在96孔微孔板中测定夫西地酸与阿奇霉素、头孢曲松钠和贝达喹啉3种抗生素分别联用对标准脓肿分枝杆菌的体外协同抑菌作用。垂直方向对倍稀释的是夫西地酸,浓度分别为:100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0 μg/mL;水平方向为另一种药物的对倍稀释,即阿奇霉素或头孢曲松钠或贝达喹啉从25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10、0 μg/mL;在96孔板上得到两种药物不同浓度的组合。每孔体积200 μL,每板设抑制对照和生长对照各8孔。其余操作及测定荧光值计算生长抑制率同2.3中MIC测定。根据药物单独作用和联用时MIC计算部分抑菌浓度(Fractional Inhibitory Concentration, FIC)以及协同指数(FIC index, FICI)。FIC是药物联合作用时MIC除以单药作用时MIC;FICI是联用的两种药物的FIC总和,即 $FICI = \frac{MIC_A \text{药联用}}{MIC_A \text{药单用}} + \frac{MIC_B \text{药联用}}{MIC_B \text{药单用}}$,两药联用抑菌效果判定标准:FICI ≤ 0.5为协同作用,0.5 < FICI ≤ 1为相加作用,1 < FICI ≤ 2为无关作用,FICI > 2为拮抗作用。

2.2.5 最小杀菌浓度(MBC)测定 96孔板微量稀释药敏试验培养后,分别取各药物单独作用和药物联用MIC₉₀及MIC₉₀以上三孔(无明显细菌生长孔)的孔中50 μL菌液(包括生长对照菌液)作

10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释后均匀涂布到无药物的 7H9 琼脂培养基上,一式三份,平板于 5% CO_2 培养箱 37℃ 倒置培养 3 d,进行菌落计数.规定能够杀灭培养基内 99.9% 的细菌(与无药生长对照孔平板培养后菌落数比较)的最小药物浓度作为该药的最小杀菌浓度 MBC.

2.2.6 脓肿分枝杆菌临床株验证药物协同作用
采用 2.2.4 中方法先在 96 孔微孔板中测定夫西地酸与阿奇霉素、头孢曲松钠、贝达喌啉 4 种药物单独作用临床脓肿分枝杆菌的体外抑菌作用,获得各药物针对临床株的单独 MIC.结合各药物联用抑制标准株的结果,设置药物两两联用浓度梯度检测联用方案对临床株的体外抑菌活性,比较脓肿分枝杆菌标准株与临床株对联合用药方案的体外敏感情况.夫西地酸联用阿奇霉素的浓度为:200/50、100/25、50/12.5、25/6.25、12.5/3.13、6.25/1.56、3.13/0.78、1.56/0.39、0.78/0.20、0.39/0.10 $\mu\text{g/mL}$;夫西地酸联用头孢曲松钠的浓度为:200/50、100/25、50/12.5、25/6.25、12.5/3.13、

6.25/1.56、3.13/0.78、1.56/0.39、0.78/0.20、0.39/0.10 $\mu\text{g/mL}$ (个别不敏感菌株从 200/400 或 400/200 起始浓度向下 2 倍梯度稀释);夫西地酸联用贝达喌啉的浓度为:200/3.13、100/1.56、50/0.78、25/0.39、12.5/0.20、6.25/0.10、3.13/0.05、1.56/0.02、0.78/0.01、0.39/0.006 $\mu\text{g/mL}$;在 96 孔板上得到两种药物不同浓度的组合,按照上述操作测定各浓度组合下对脓肿分枝杆菌临床株的生长抑制率.根据药物单独作用和联用时 MIC 计算 FICI 值,评估分析不同药物组合联用对临床株的抑菌效果.

3 结果与分析

3.1 药物的最低抑菌浓度

微孔板二倍稀释法测定 MIC 实验结果表明,针对脓肿分枝杆菌的体外抑菌活性测定,单独使用夫西地酸、阿奇霉素、头孢曲松钠和贝达喌啉时 MIC₅₀ 分别为 6.25、1.56、1.56 和 0.78 $\mu\text{g/mL}$,MIC₉₀ 分别为 50、6.25、3.13 及 3.13 $\mu\text{g/mL}$ (结果见图 2).

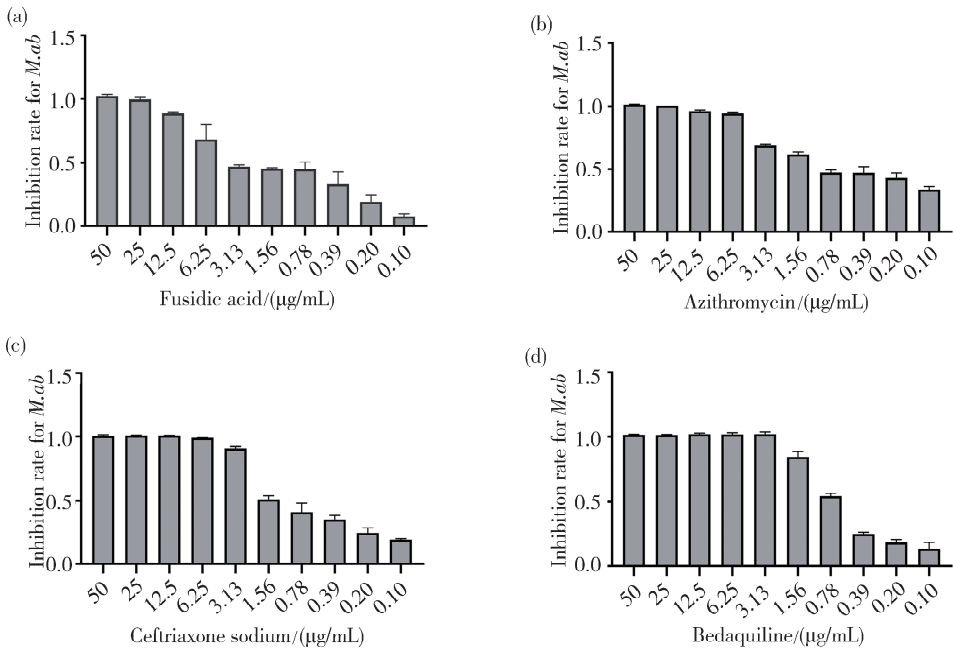


图 2 MABA 法测定药物单用对脓肿分枝杆菌的 MIC 结果

(a) 夫西地酸, (b) 阿奇霉素, (c) 头孢曲松钠, (d) 贝达喌啉. 各药物浓度范围为 0.10~50 $\mu\text{g/mL}$

Fig. 2 The MIC of individual drugs against *Mycobacterium abscessus* by MABA

(a) Fusidic acid, (b) azithromycin, (c) ceftriaxone sodium, (d) bedaquiline. The concentration range of each drug was 0.10~50 $\mu\text{g/mL}$

3.2 夫西地酸分别联用三种药物的协同效应

夫西地酸分别联用阿奇霉素、头孢曲松钠和贝达喌啉对标准脓肿分枝杆菌的抑菌作用,随着药物联用浓度不同而表现出不同的抑菌效果(结果见图 3).夫西地酸与阿奇霉素联用表现出协同作用,当

12.5 $\mu\text{g/mL}$ 夫西地酸联用 0.39 $\mu\text{g/mL}$ 阿奇霉素(或 3.13 $\mu\text{g/mL}$ 夫西地酸联用 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 阿奇霉素)对脓肿分枝杆菌抑菌作用效果最佳,表现出协同的抗菌作用,夫西地酸联用剂量降低为单用的 1/4,同时阿奇霉素联用剂量降低为单用的 1/16.

夫西地酸与头孢曲松钠联用同样表现出协同作用, 当 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 夫西地酸联用 0.39 $\mu\text{g/mL}$ 头孢曲松钠对脓肿分枝杆菌抑菌作用效果最佳, 表现出协同的抗菌作用, 夫西地酸联用剂量降低为单用的 1/8, 同时头孢曲松钠联用剂量降低为单用的 1/8; 夫西地酸与抗结核药物贝达喌啉联用表现出相加作用, 即 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 夫西地酸联用 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 贝达喌啉效果最佳, 夫西地酸联用剂量降低为单用

的 1/8, 贝达喌啉联用剂量降低为单用的 1/2.

上述结果表明, 夫西地酸与三种药物联用皆能够表现出良好的协同或相加作用; 三种组合中, 夫西地酸与大环内酯类抗生素阿奇霉素或与头孢菌素类药物头孢曲松钠联用协同抑菌效应良好, 与二芳基喹啉类抗结核药物贝达喌啉仅表现出相加作用, 无协同作用(结果见表 1).

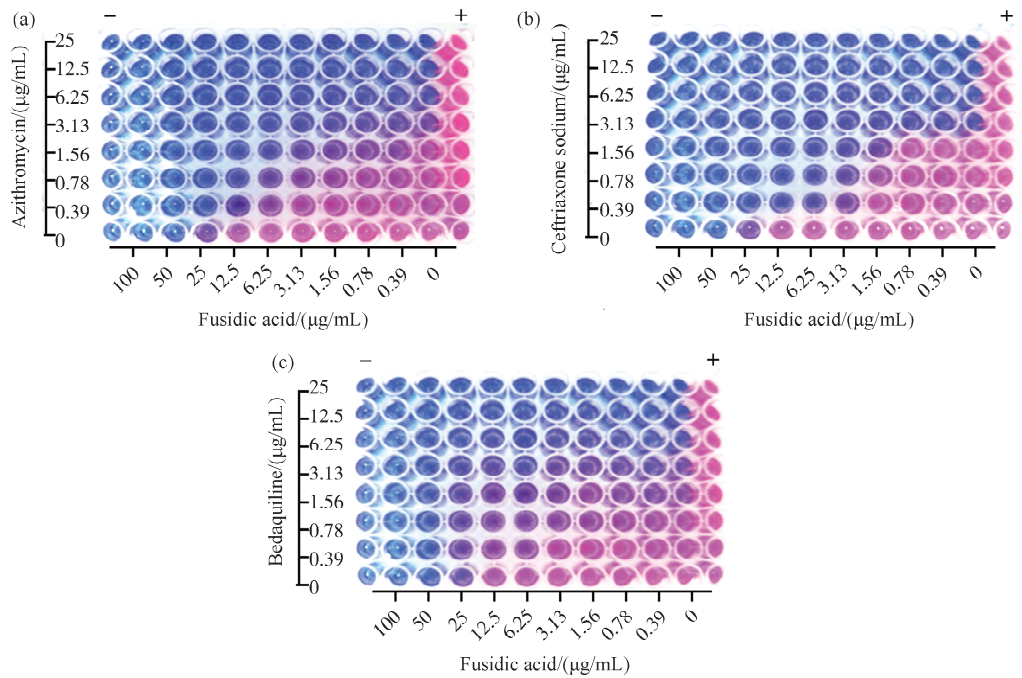


图 3 棋盘格法测定夫西地酸联用药物对脓肿分枝杆菌的抑菌结果
(a) 联用阿奇霉素, (b) 联用头孢曲松钠, (c) 联用贝达喌啉. 夫西地酸浓度为 0~100 $\mu\text{g/mL}$, 其余三种药物浓度为 0~25 $\mu\text{g/mL}$.
Fig. 3 The results of Fusidic acid in combination with antibiotics against *Mycobacterium abscessus* by checkerboard method
(a) combined with azithromycin, (b) combined with ceftriaxone sodium, (c) combined with bedaquiline. The concentration of fusidic acid was 0~100 $\mu\text{g/mL}$, and the concentration of azithromycin, ceftriaxone and bedaquiline was 0~25 $\mu\text{g/mL}$.

表 1 夫西地酸与药物联用作用于脓肿分枝杆菌标准株的协同 FICI

Tab. 1 Synergistic effect of fusidic acid in combination with three drugs in the *M. ab* ATCC 19977 strain

Drug	MIC ₉₀ /($\mu\text{g/mL}$)				FICI
	FA 单用	单用	FA 联用	联用	
Azithromycin	50	6.25	12.5	0.39	0.31
			12.5	0.78	0.37
			3.13	1.56	0.31
			0.79	3.13	0.51
Ceftriaxone sodium	50	3.13	6.25	0.39	0.25
			3.13	0.78	0.31
			3.13	1.56	0.56
Bedaquiline	50	3.13	6.25	1.56	0.62

(FA, fusidic acid)

3.3 药物的最小杀菌浓度

实验结果表明, 夫西地酸与阿奇霉素、头孢曲松钠和贝达喌啉对标准脓肿分枝杆菌的 MBC 分别为 50、12.5、3.13、6.25 $\mu\text{g/mL}$, 四种药物的单用 MBC 与 MIC 比值范围在 1.0~2.0, 说明对标准脓肿分枝杆菌具有良好的杀菌活性. 药物联用后 MBC 有所下降, 夫西地酸联用阿奇霉素后, 夫西地酸的 MBC 降低 4 倍, 阿奇霉素的 MBC 降低 16 倍; 夫西地酸联用头孢曲松钠后两者的 MBC 皆降低 8 倍. 结果表明夫西地酸联用上述两种药物能够增强其对脓肿分枝杆菌的杀菌作用, 降低药物的体外最小杀菌浓度, 夫西地酸与阿奇霉素联用能显著降低阿奇霉素的最小杀菌浓度 (结果见表 2).

表 2 夫西地酸及三种药物作用于脓肿分枝杆菌的 MBC 结果

Tab. 2 The MBC results of fusidic acid and three drugs against *Mycobacterium abscessus*

Organism	Drug	MBC/($\mu\text{g/mL}$)		SHIFT 倍数
		alone	combination	
Standard <i>M. abscessus</i>	Fusidic acid	50	12. 5	4
	Azithromycin	12. 5	0. 78	16
	Fusidic acid	50	6. 25	8
	Ceftriaxone sodium	3. 13	0. 39	8
	Fusidic acid	50	UN	UN
	Bedaquiline	6. 25	UN	UN

3. 4 联合用药对脓肿分枝杆菌临床株的协同作用

夫西地酸与阿奇霉素、头孢曲松钠和贝达喹啉对脓肿分枝杆菌临床株的最小抑菌浓度与标准株有所不同(结果见图 4). 夫西地酸对 S 型临床株的 MIC₉₀ 为 100 $\mu\text{g/mL}$, 对 R 型临床株的 MIC₉₀ 为 100~200 $\mu\text{g/mL}$, 相较于标准株(50 $\mu\text{g/mL}$) 有 1~2 倍升高; 阿奇霉素对 S 型和 R 型的 MIC₉₀ 分别为 3. 13~50 $\mu\text{g/mL}$ 及 1. 56~6. 25 $\mu\text{g/mL}$, 表明阿奇霉素对 R 型菌落更加敏感; 贝达喹啉对 S 型和 R 型的 MIC₉₀ 分别为 0. 20~0. 78 $\mu\text{g/mL}$ 及 0. 10~0. 20 $\mu\text{g/mL}$; 当夫西地酸联用阿奇霉素作用于脓肿分枝杆菌临床株后, 三个 S 型临床株的 FICI 值为 0. 09~0. 28, 皆小于 0. 5, 表现出协同作用. 其中 MAB-S1 株夫西地酸联用剂量降低为单用的 1/32, 同时阿奇霉素联用剂量降低为单用的 1/4. 类似地, 针对 MAB-S2 株夫西地酸联用剂量降低为单用的 1/16, 阿奇霉素联用剂量降低为单用的 1/16. 而针对 MAB-S3 株夫西地酸联用剂量也降低为单用的 1/16, 阿奇霉素联用剂量则降低为单用的 1/32; 另外四个 R 型临床株的 FICI 值为 0. 53~

1. 06, 无协同作用. 夫西地酸联用头孢曲松钠对于脓肿分枝杆菌临床株并未表现出针对标准株相似的协同作用, S 型和 R 型的 FICI 指数均在 0. 5~1. 5 之间, 表现出相加或无关作用. 夫西地酸联用贝达喹啉对于临床株的 FICI 指数在 1. 12~1. 5 之间, 仅表现出无关作用.

体外联合药敏结果表明夫西地酸与三种药物联用也能够 在脓肿分枝杆菌临床株上一定程度表现出良好的协同或相加作用; 其中尤其以夫西地酸与阿奇霉素联用针对 S 型临床株协同效应最好, 极大地降低药物浓度(最高达 32 \times 16 倍). 与头孢曲松钠、贝达喹啉仅表现出相加或无关作用, 无协同作用(结果见表 3).

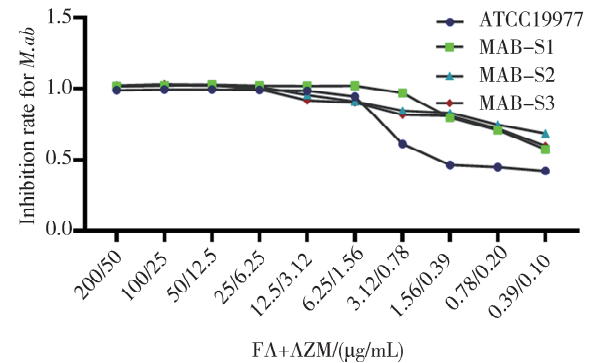


图 4 脓肿分枝杆菌临床株验证夫西地酸联用阿奇霉素的协同作用

夫西地酸浓度为 0. 39~200 $\mu\text{g/mL}$, 阿奇霉素浓度为 0. 10~50 $\mu\text{g/mL}$

Fig. 4 Clinical strains of *Mycobacterium abscessus* to verify the inhibitory effect of fusidic acid in combination with azithromycin

Fusidic acid concentration was 0. 39~200 $\mu\text{g/mL}$, azithromycin concentration was 0. 39~200 $\mu\text{g/mL}$

表 3 夫西地酸联合三种药物作用于脓肿分枝杆菌临床株结果

Tab. 3 Synergistic effect of fusidic acid in combination with three drugs in the *M. ab* clinical strains

Organism	MIC ₉₀ /(μg/mL)												
	alone				combination			combination			combination		
	FA	AZM	CS	BDQ	FA	AZM	FICI	FA	CS	FICI	FA	BDQ	FICI
MAB-S1	100	3. 13	25	0. 78	3. 13	0. 78	0. 28	50	12. 5	1. 0	50	0. 78	1. 5
MAB-S2	100	25	50	0. 39	6. 25	1. 56	0. 12	50	12. 5	0. 75	25	0. 39	1. 25
MAB-S3	100	50	100	0. 20	6. 25	1. 56	0. 09	50	100	1. 5	50	0. 78	1. 5
MAB-R1	100	6. 25	50	0. 20	12. 5	3. 13	0. 62	25	12. 5	0. 50	25	0. 39	1. 25
MAB-R2	200	3. 13	50	0. 20	12. 5	3. 13	1. 06	50	25	0. 75	25	0. 39	1. 12
MAB-R3	200	3. 13	100	0. 20	12. 5	3. 13	1. 06	200	100	2. 0	50	0. 78	1. 25
MAB-R4	100	1. 56	200	0. 10	3. 13	0. 78	0. 53	100	50	1. 25	25	0. 39	1. 25

(FA, fusidic acid AZM, azithromycin CS, ceftriaxone sodium BDQ, Bedaquiline)

4 讨 论

NTM 普遍存在于自然界土壤和水等环境中,人和动物均能被感染,全球 NTM 感染的发病率和患病率整体呈现动态增长趋势,在部分国家和地区甚至超过结核发病率.我国鸟分枝杆菌复合群和脓肿分枝杆菌复合群是引起 NTM 肺病最常见的病原体^[20-21].NTM 肺病属于慢性病,临床症状与结核病相似,对抗结核药物天然耐药,容易被误诊误治.脓肿分枝杆菌的固有广泛耐药性源于细胞壁的低渗透性、缺乏药物活化系统、外排泵的诱导和广泛的药物修饰酶的产生^[22-23].

夫西地酸是一种具有类甾体骨架的抗生素,从梭链孢酸脂球真菌中获得,通过干扰延长因子 G 阻止核糖体易位抑制细菌的蛋白质合成发挥抑菌或杀菌作用.夫西地酸自从 1962 年被提取出来后被多个国家批准于临床应用,不良反应轻,有组织穿透力强、药物浓度高以及更安全可靠等特点高效抗菌,因其独特的抑菌机制而不易与其它抗生素发生交叉耐药.本文探究夫西地酸对具有天然耐药性的脓肿分枝杆菌的抗菌活性,以及夫西地酸联合阿奇霉素等药物对脓肿分枝杆菌的协同抑菌作用.

阿奇霉素为十五元大环内酯类抗生素,和克拉霉素被认为是近 20 年来治疗 NTM 病的重要新药.其作用机制是通过阻碍细胞核蛋白 50S 亚基的联结来抑制蛋白质合成从而发挥抑菌作用,脓肿分枝杆菌对其相对不易产生耐药.本研究中夫西地酸单独作用于脓肿分枝杆菌的 MIC 值较高,4 株 S 型菌株(包括标准株)与 4 株 R 型菌株的 MIC₉₀ 分别为 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 与 100~200 $\mu\text{g/mL}$.阿奇霉素单独作用于 4 株 S 型菌株与 4 株 R 型菌株的 MIC₉₀ 为 3.13~50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.56~6.25 $\mu\text{g/mL}$.S 型菌株中两株为阿奇霉素耐药,4 株 R 型菌株皆为阿奇霉素敏感或中度敏感.联合用药后标准株的夫西地酸与阿奇霉素 MIC₉₀ 降为 1/4 (12.5 $\mu\text{g/mL}$) 与 1/16 (0.39 $\mu\text{g/mL}$),临床株的夫西地酸与阿奇霉素 MIC₉₀ 降为 1/32 (3.13 $\mu\text{g/mL}$) 与 1/32 (1.56 $\mu\text{g/mL}$);夫西地酸联用阿奇霉素后可以极大地降低抗生素使用剂量,恢复阿奇霉素对耐药脓肿分枝杆菌(MAB-S2、MAB-S3)的敏感性.夫西地酸联合阿奇霉素用药组合对肺炎支原体以及耐药肺炎支原体也表现出体外协同抑菌作用^[24].脓肿分枝杆菌分为光滑型和粗糙型两种菌落形态,单用时 R 型菌落相比 S 型菌落对阿奇霉素更敏感,

推测可能与粗糙型脓肿分枝杆菌的细胞壁上糖肽磷脂类物质含量比较低,阿奇霉素药物更容易进入胞内有关;其次夫西地酸联用阿奇霉素仅在 S 型菌落上展现出优异的协同作用,可能因为夫西地酸作为类固醇抗生素,具有强大的脂溶性,良好的渗透力有助于阿奇霉素进入细胞内部作用于核蛋白发挥抑制脓肿分枝杆菌生长和繁殖的作用.同时 R 型菌落更容易高度聚集,群体抵抗阿奇霉素的能力相比 S 型更强;已有文献^[25]证明脓肿分枝杆菌 R 型菌落在人巨噬细胞中接受阿奇霉素处理后存活率较 S 型菌落显著更高,本次实验在临床株上也同这一现象一致.

头孢曲松钠是第三代头孢菌素类抗生素,属于 β -内酰胺抗生素,通过结合细菌的青霉素结合蛋白而抑制胞壁的合成达到抗菌作用.同样的,头孢曲松钠单用 MIC₉₀ 为 3.13 $\mu\text{g/mL}$,与夫西地酸联合用药后 MIC₉₀ 为 0.39 $\mu\text{g/mL}$.头孢曲松钠与夫西地酸联用,推测可能是头孢菌素作用于脓肿分枝杆菌细胞壁造成胞壁破损,更利于夫西地酸进入胞内作用于核糖体发挥作用,但是这一协同现象并未在临床株中观察到.贝达喹啉是一种二芳基喹啉抗结核新药,用于耐多药结核病联合治疗,通过抑制分枝杆菌 ATP 合酶阻断能量供应发挥作用.在体外对脓肿分枝杆菌有很好的抑菌活性,但其杀菌活性较弱^[26-27],本研究发现贝达喹啉单独的 MIC₉₀ 为 3.13 $\mu\text{g/mL}$,与夫西地酸联合用药后 MIC₉₀ 为 1.56 $\mu\text{g/mL}$,该结果与文献中趋势一致,且与夫西地酸联用也仅表现出相加的抑菌活性,无杀菌活性方面的改变,在临床株中联合用药结果与标准株大致一致,仅观察到相加与无关作用.

本研究结果可提示临床疑似脓肿分枝杆菌除进行分子菌种鉴定以外,还需进行必要的分离培养以便菌落分型,单药药敏辅以联合药敏试验,能为更有效地诊断和治疗脓肿分枝杆菌感染提供重要参考.针对类似阿奇霉素等抗生素出现临床分离菌株单药耐药情况时,可尝试与夫西地酸等不同抗菌机制的抗生素联用,一定程度上能够恢复对该药的敏感性,增加可供选择的治疗药物,同时也降低各药物使用剂量,减少单药耐药的产生.联合用药能为患者治疗带来除协同增加抗菌效能外更多的获益:降低毒副反应以及减少单药耐药发生,避免无药可治.老药新用策略正在成为发现常见病和罕见病药物的一种独特方法^[28].药物再利用的优势不仅是因为它们的细胞毒性、作用机制是已知的,而

且这些化合物的大部分不良反应都已经得到充分的证明,同时还能极大地降低药物开发成本。

夫西地酸及阿奇霉素的联合用药组合在体外对脓肿分枝杆菌标准株及临床株均具有良好的协同抑菌活性,该抑菌效果仍需在大量临床株中进行验证,建立动物模型研究体内药效、药代试验,以及开展完全随机对照的临床试验来进一步观察临床效果,并最终为临床治疗脓肿分枝杆菌感染联合用药做出指导。

参考文献:

- [1] Johansen M D, Herrmann J L, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus* [J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18: 392.
- [2] Chan E D, Bai X, Kartalija M, et al. Host immune response to rapidly growing mycobacteria, an emerging cause of chronic lung disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43: 387.
- [3] Park I, Olivier K. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2015, 36: 217.
- [4] Bryant J M, Grogono D M, Greaves D, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study [J]. Lancet, 2013, 381: 1551.
- [5] Bryant J M, Grogono D M, Rodriguez-Rincon D, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium [J]. Science, 2016, 354: 751.
- [6] 方勇, 沙巍. 头孢西丁治疗快速生长型非结核分枝杆菌肺病的疗效分析[J]. 同济大学学报: 医学版, 2013, 34: 51.
- [7] 庞慧, 冀晓芳, 刘益萍, 等. 脓肿分枝杆菌对头孢类抗生素的药物敏感性分析[J]. 长治医学院学报, 2016, 30: 331.
- [8] 秦中华, 景晔, 杜岩青, 等. 339 株非结核分枝杆菌临床分离株菌种鉴定及耐药性分析[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42: 104.
- [9] Hall H, Gadhok R, Alshafi K, et al. Eradication of respiratory tract MRSA at a large adult cystic fibrosis centre [J]. Respir Med, 2015, 109: 357.
- [10] McGhee P, Clark C, Credito K, et al. *In vitro* activity of fusidic acid (CEM-102, sodium fusidate) against *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patients and its effect on the activities of tobramycin and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55: 2417.
- [11] 李耘, 薛峰, 刘健, 等. 夫西地酸体外抗菌活性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29: 34.
- [12] 徐丽丽, 陈春林, 刘桢宇, 等. 夫西地酸联合头孢类抗生素缩小金黄色葡萄球菌耐药突变选择窗的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21: 995.
- [13] Wane H, Li F, Ciofu O, et al. ePS06.7 Antibiotic treatment strategy with fusidic acid on colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis [J]. J Cyst Fibros, 2016, 15: S49.
- [14] 常玲薇, 李娜, 陈春林, 等. 夫西地酸联用氨曲南对碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌的抗菌作用及机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53: 1401.
- [15] Akinpelu O I, Lawal M M, Kumalo H M, et al. Drug repurposing: Fusidic acid as a potential inhibitor of *M. tuberculosis* FtsZ polymerization-Insight from DFT calculations, molecular docking and molecular dynamics simulations [J]. Tuberculosis, 2020, 121: 101920.
- [16] Zeng J, Platig J, Cheng T Y, et al. Protein kinases PknA and PknB independently and coordinately regulate essential *Mycobacterium tuberculosis* physiologies and antimicrobial susceptibility [J]. PLoS Pathog, 2020, 16: e1008452.
- [17] Mir M, Prisis S, Kang C M, et al. Mycobacterial gene *cuvA* is required for optimal nutrient utilization and virulence [J]. Infect Immun, 2014, 82: 4104.
- [18] Bajaksouzian S, Visalli M A, Jacobs M R, et al. Activities of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with amikacin, against acinetobacters as determined by checkerboard and time-kill studies [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41: 1073.
- [19] Sweeney M T, Zurenko G E. *In vitro* activities of linezolid combined with other antimicrobial agents against *Staphylococci*, *Enterococci*, *Pneumococci*, and selected Gram-Negative organisms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 1902.
- [20] Du J, Pang Y, Liu Y, et al. Survey of tuberculosis hospitals in China: current status and challenges [J]. PLoS One, 2014, 9: e111945.
- [21] Cowman S, van Ingen J, Griffith D E, et al. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease [J]. Eur Respir J, 2019, 54: 1900250.
- [22] Lopeman R C, Harrison J, Desai M, et al. *Mycobacterium abscessus*: environmental bacterium turned

clinical nightmare [J]. Microorganisms, 2019, 7: 90.

[23] Luthra S, Rominski A, Sander P. The role of antibiotic-target-modifying and antibiotic-modifying enzymes in *Mycobacterium abscessus* drug resistance [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2179.

[24] 蔚然, 史大伟, 窦海伟, 等. 夫西地酸对肺炎支原体及耐药肺炎支原体的体外抗菌作用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33: 787.

[25] Clary G, Sasindran S J, Nesbitt N, *et al.* *Mycobacterium abscessus* smooth and rough morphotypes form antimicrobial-tolerant biofilm phenotypes but are killed by acetic acid [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62: e01782.

[26] Aguilar-Ayala D A, Cnockaert M, Andre E, *et al.* *In vitro* activity of bedaquiline against rapidly growing nontuberculous mycobacteria [J]. J Med Microbiol, 2017, 66: 1140.

[27] Pang Y, Zheng H W, Tan Y J, *et al.* *In vitro* activity of bedaquiline against Nontuberculous mycobacteria in China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61: e02627.

[28] Pushpakom S, Iorio F, Eyers P A, *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18: 41.

引用本文格式:

中文: 何志群, 滕飞, 高超, 等. 夫西地酸联合抗生素抑制脓肿分枝杆菌的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 066001.

英文: He Z Q, Teng F, Gao C, *et al.* Study on antibacterial effect of fusidic acid combined with antibiotics against *Mycobacterium abscessus* [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2021, 58: 066001.