

王 静,单 奇,利 斌,等. 头孢喹肟对金黄色葡萄球菌防突变浓度的研究[J]. 华南农业大学学报,2014,35(4):7-10.

头孢喹肟对金黄色葡萄球菌防突变浓度的研究

王 静^{1†},单 奇^{1,2†},黎菊凤³,利 斌¹,张少威¹,曾振灵¹

(1 华南农业大学 兽医学院/国家兽药残留基准实验室,广东 广州 510642;

2 中国水产科学研究院 珠江水产研究所,广东 广州 510380; 3 暨南大学 附属第一医院,广东 广州 510630)

摘要:【目的】为兽医临床合理用药,进行头孢喹肟对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)和防突变浓度(MPC)研究。【方法】采用标准琼脂二倍稀释法,测定头孢喹肟对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MIC₉₉(抑制 99% 接种细菌生长的最低抑菌浓度);使用肉汤法富集 10¹⁰ CFU/mL 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 和 37 株金黄色葡萄球菌临床分离菌,采用标准琼脂平板稀释法测定头孢喹肟对金黄色葡萄球菌的 MPC,并计算选择指数(SI)。【结果和结论】头孢喹肟对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MIC 和 MIC₉₉ 分别是 0.5 和 0.4 μg/mL, MPC 为 1.6 μg/mL, SI (MPC/MIC₉₉) 为 4。头孢喹肟对 37 株临床分离的金黄色葡萄球菌的 MIC₅₀、MIC₉₀ 和 MPC₉₀ 分别是 0.50、1.00 和 5.12 μg/mL; SI (MPC₉₀/MIC₉₀) 为 5.12。头孢喹肟对金黄色葡萄球菌具有较强的抗菌活性, SI 也较小, 通过调整给药方案可以减少耐药突变株的产生。

关键词: 头孢喹肟; 金黄色葡萄球菌; 防突变浓度; 选择指数

中图分类号:S859.7 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2014)04-0007-04

A study on mutant prevention concentration of cefquinome against *Staphylococcus aureus*

WANG Jing^{1†}, SHAN Qi^{1,2†}, LI Jufeng³, LI Bin¹, ZHANG Shaowei¹, ZENG Zhenling¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/

National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues Guangzhou 510642, China;

2 The Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

3 The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】The minimal inhibitory concentration (MIC) and the mutant prevention concentration (MPC) of cefquinome against *Staphylococcus aureus* were measured for the rational use in veterinary medicine. 【Method】The MIC and MIC for 99% of input cells (MIC₉₉) of cefquinome against *S. aureus* were determined by agar two-fold dilution method. The *S. aureus* strains were enriched in broth, and the bacterial concentrations were adjusted to 10¹⁰ colony forming units (CFU) per milliliter. The MPC of cefquinome against *S. aureus* was determined by agar plates dilution method, and the selection index (SI) was calculated. 【Result and conclusion】The MIC, MIC₉₉, MPC and SI (MPC/MIC₉₉) of cefquinome against *S. aureus* strain ATCC 29213 were 0.5, 0.4, 1.6 μg/mL and 4, respectively. The MIC₅₀, MIC₉₀, MPC₉₀ and SI (MPC₉₀/MIC₉₀) of cefquinome against *S. aureus* clinical isolates were 0.50, 1.00, 5.12 μg/mL and 5.12, respectively. The results show that cefquinome has a higher activity against

收稿日期:2013-10-29 优先出版时间:2014-06-03
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7671/j.issn.1001-411X.2014.04.002.html>
作者简介:王 静(1986—),女,硕士研究生,E-mail:wjscau1987@163.com;单 奇(1983—),男,助理研究员,博士,E-mail:shanqi1983@163.com;†对本文贡献相同;通信作者:曾振灵(1963—),男,教授,博士,E-mail:zljeng@scau.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金(31372480);广东省自然科学基金研究团队项目(S2012030006590)

S. aureus and a smaller SI. Resistant mutant strains can be reduced by adjusting the dosage regimen.

Key words: cefquinome; *Staphylococcus aureus*; mutant prevention concentration; selection index

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是比较常见和复杂的致病细菌,它可以引起多种多样的疾病,从轻微的皮肤感染到食物中毒,甚至到危及生命的疾病如心内膜炎、败血症等^[1].近年来,由于抗菌药物的不合理使用,使大多数临床分离的金黄色葡萄球菌耐药性问题逐渐加剧.头孢喹肟(Cefquinome)作为第4代动物专用的头孢菌素类药物,具有优良的药代动力学特征和广谱的抗菌活性,对金黄色葡萄球菌有较强的杀菌能力,国外已将其广泛应用于猪、牛及马的临床治疗^[2-4].为了在兽医临床上更有效且持久地使用该药,人们逐渐重视并思考在临床用药时如何避免或减少细菌耐药性的发生.

Drlica^[5]和Zhao等^[6]提出了防突变浓度(Mutant prevention concentration, MPC)、突变选择窗(Mutant selection window, MSW)及选择指数(Selection index, SI)的理论.该理论同时对控制感染和细菌耐药突变株富集能力进行了考虑,为减少或避免细菌耐药的发生提供了新的临床治疗方法和理论依据^[5-7].MPC是指防止菌株产生耐药突变的最低药物浓度.MPC理论提示通过抑制最不敏感的耐药突变菌株的选择性富集扩增,可限制细菌耐药性的进一步发生^[8].MSW是指MPC与最低抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)之间的范围.但是,目前临床基于MIC的治疗方案,在血清或组织液中药物浓度极有可能处于MSW内,这种情况虽然可以抑制或杀灭大部分敏感细菌,但极易出现耐药突变菌株选择性富集扩增而导致细菌耐药,从而造成临床治疗失败.本试验研究头孢喹肟对金黄色葡萄球菌的MIC和MPC,分析SI,并参考已报道的头孢喹肟的药代动力学参数,可以为兽医临床合理使用头孢喹肟提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 头孢喹肟对照品,效价80.1%,批号k0320906,为中国兽药药品监察所产品;硫酸头孢喹肟原料药,效价83.09%,批号118443-89-3,由济南顺兴兽药有限公司惠赠.

1.1.2 菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213,购自中国兽药药品监察所;37株临床分离的金黄色葡萄球菌均来源于华南农业大学兽医学院药理实验室采样

分离鉴定获得.

1.2 方法

1.2.1 MIC和MIC₉₉的测定 采用琼脂平板二倍稀释法测定头孢喹肟对金黄色葡萄球菌的MIC,药敏结果以CLSI标准^[9]判读.

依据Zhao等^[6]报道的方法测定头孢喹肟对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的MIC₉₉(抑制99%接种细菌生长的最低抑菌浓度):抗菌药物浓度以MIC为基线,线性递减(20%)至1/2 MIC,制备不同浓度的含药琼脂平板.用新鲜MH肉汤将对数期的菌液浓度稀释为 3×10^7 CFU/mL,再用新鲜的MH肉汤10倍倍比稀释至 3×10^2 CFU/mL,最后将不同浓度的菌液各取0.1 mL分别接种在每个含药琼脂平板上,37℃过夜培养后,选择合适菌液浓度的点进行菌落计数,依据参考文献[10]计算MIC₉₉.

1.2.2 MPC_{pr}和MPC的测定 抗菌药物浓度以MIC为基线,倍比递增,制备含有不同浓度药物琼脂平板,每个浓度4个琼脂平板.具体测定方法为^[6,11]:首先使用肉汤法选择性富集扩增菌液,使其菌液浓度达到 10^{10} CFU/mL以上,再用新鲜MH肉汤将菌液浓度调整为 3×10^{10} CFU/mL后,取100 μL,该菌液均匀涂抹于含有抗菌药物的MH琼脂平板上,使每个药物浓度的细菌接种总量为 1.2×10^{10} CFU.置于37℃恒温培养箱中培养72 h,每隔24 h做1次菌落计数,观察细菌生长情况.以培养72 h后仍无菌落生长的最低药物浓度设为暂定防突变浓度(Provisional mutant prevention concentration, MPC_{pr}).再以MPC_{pr}为基线,线性递减(20%)抗菌药物浓度,制备不同浓度的含药琼脂平板,重复以上操作,再培养72 h后仍不出现菌落生长的最低药物浓度即为MPC.

1.3 数据处理

根据测定37株金黄色葡萄球菌的MIC和MPC结果,计算出37株金黄色葡萄球菌菌群的MIC₅₀(抑制50%细菌生长的最低抑菌浓度)、MIC₉₀(抑制90%细菌生长的最低抑菌浓度)和MPC₉₀(抑制90%细菌生长的防突变浓度).

MSW是指MIC与MPC之间的范围. $SI = MPC/MIC_{99}$ 或 MPC_{90}/MIC_{90} ,用于评价不同抗菌药物的选择耐药突变能力,SI越大,意味着抑制选择耐药突变能力越弱,SI越小,则反之.依据试验测得的MPC和

MIC 的数据,计算金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MPC/MIC₉₉和 37 株临床分离菌株的 MPC₉₀/MIC₉₀.

2 结果

2.1 头孢喹肟对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MIC、MIC₉₉和 MPC

采用琼脂稀释法测定,头孢喹肟对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MIC、MIC₉₉分别是 0.5 和 0.4 μg/mL, MPC_{pr}、MPC 分别是 2.0 和 1.6 μg/mL, MSW、SI(MPC/MIC₉₉)分别是 0.4~1.6 μg/mL 和 4.

2.2 头孢喹肟对金黄色葡萄球菌临床分离株的 MIC₅₀、MIC₉₀和 MPC₉₀

采用琼脂平板法测定头孢喹肟对 37 株临床分离的金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MPC(表 1). 由表 1 数据可见,MIC 与 MPC 存在不一致性,即头孢喹肟对几株金黄色葡萄球菌的 MIC 相同,但其 MPC 并不一定相同. 根据试验测定所有金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MPC,计算头孢喹肟对 37 株临床分离的金黄色葡萄球菌的 MIC₅₀、MIC₉₀和 MPC₉₀分别是 0.50、1.00 和 5.12 μg/mL,MSW 和 SI(MPC₉₀/MIC₉₀)分别为 1.00~5.12 μg/mL 和 5.12.

表 1 头孢喹肟对 37 株金黄色葡萄球菌分离株的 MIC 和 MPC
Tab.1 The MIC and MPC of cefquinome against 37 isolates of *Staphylococcus aureus*

n/株	MIC/(μg·mL ⁻¹)	n/株	MPC/(μg·mL ⁻¹)
1	0.25	1	0.800
27	0.50	1	1.280
		9	2.048
		11	2.560
		3	3.200
		1	4.096
		2	5.120
9	1.00	1	3.200
		3	4.096
		2	5.120
		2	6.400
		1	8.190

3 讨论

传统药效学理论认为,当抗菌药物浓度低于 MIC 时,易于筛选出耐药突变菌株,从而导致细菌耐药性产生^[5, 12-13],而 Drlica^[5]和 Zhao 等^[6]提出的 MSW 理论认为只有抗菌药物的浓度落在 MIC 与

MPC 之间的范围时,才能使细菌耐药突变菌株的选择性富集扩增并产生耐药. Firsov 等^[14]采用体外模型研究了 4 种氟喹诺酮类药物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的防耐药突变浓度,验证了 MSW 理论. 所以,在兽医临床用药时,我们不仅要考虑抗菌药物的药代动力学参数与 MIC 之间的关系,还要考虑药代动力学参数与 MPC 之间的关系. 本试验研究头孢喹肟对金黄色葡萄球菌的 MPC,为临床制定合理的给药方案提供了新的思路和参考依据,尽量减少头孢喹肟的血药浓度落在 MSW 内的时间,以避免耐药突变株富集扩增.

邢茂等^[15]报道罗红霉素对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MIC₉₉、MPC、SI 分别是 0.24、25.5 μg/mL 及 106;阿奇霉素对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MIC₉₉、MPC、SI 分别为 0.18、20.5 μg/mL 及 114. 李朝霞等^[16]报道左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MIC、MPC、SI 分别为 0.125、1.00 μg/mL 和 8. 而本试验测得头孢喹肟对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 MIC₉₉(0.4 μg/mL)高于罗红霉素、阿奇霉素及左氧氟沙星,但其选择指数较小,仅为 4. 说明罗红霉素、阿奇霉素和左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的抗菌活性强,但是头孢喹肟对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 具有较强的抑制细菌耐药突变株产生的能力,不易产生耐药突变株.

许宏涛等^[17]报道头孢克洛、头孢丙烯及头孢呋辛对金黄色葡萄球菌临床菌株的 MIC₉₀分别为 2.00、1.00 及 0.25 μg/mL,MPC₉₀分别为 32.0、19.2 及 2.4 μg/mL,MPC₉₀/MIC₉₀分别为 16.0、19.2、9.6. 而本试验测得头孢喹肟对 37 株金黄色葡萄球菌临床菌株的 MIC₉₀、MPC₉₀和 SI(MPC₉₀/MIC₉₀)均小于头孢克洛. 虽然头孢喹肟对 37 株金黄色葡萄球菌临床菌株的 MIC₉₀和 MPC₉₀高于头孢呋辛,但是其 SI 却小于头孢呋辛. 这表示头孢喹肟对金黄色葡萄球菌的抗菌活性可能不如头孢呋辛,但其抑制耐药突变菌株选择富集扩增的能力可能强于头孢克洛、头孢丙烯及头孢呋辛,相对这 3 种药可能不易于筛选出耐药突变株.

杨大伟等^[18]报道猪肌肉注射头孢喹肟(1 mg/kg),在猪体内头孢喹肟的消除半衰期(*t*_{1/2β})为 2.76 h,峰质量浓度(*C*_{max})为 1.8 μg/mL,达峰时间(*t*_{max})为 0.32 h. 而各种动物通过皮下或肌肉注射,一般临床给药剂量建议为 1 mg/kg,其达峰时间为 0.5~2 h,峰质量浓度为 2.5~3.8 μg/mL,消除半衰期为 1~2 h^[19-20]. 此时头孢喹肟的血药浓度虽然能远高于

MIC₉₀,能起到良好的抗菌效果,但是峰质量浓度都小于 MPC₉₀,几乎全部血药质量浓度都落在 MSW 内,易于诱导耐药菌株的产生,所以,兽医临床用药时应该适当加大头孢喹肟的给药剂量,使血药浓度尽可能高于 MPC. 但是,头孢喹肟是时间依赖性抗生素,已有文献报道,时间依赖性抗菌药物以临床推荐剂量给药,药物浓度达到 MIC 值的 4~5 倍时,其杀菌作用即处于饱和状态,即使药物浓度继续增高,其杀菌活性及速率并没有出现明显变化^[21]. 如果盲目加大头孢喹肟的给药剂量并不能显著提高治疗效果,反而会造成不良反应和增加费用. 同时考虑到头孢喹肟的消除半衰期较短,所以,当头孢喹肟抗菌药物治疗金黄色葡萄球菌感染病时,关键是缩短给药间隔,使血药浓度高于防突变浓度的时间尽可能延长,从而提高其治疗效果和限制耐药突变株的选择性富集.

参考文献:

- [1] SIBBALD M J, ZIEBANDT A K, ENGELMANN S, et al. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(3): 755-788.
- [2] LIMBERT M, ISERT D, KLESEL N, et al. Antibacterial activities *in vitro* and *in vivo* and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35(1): 14-19.
- [3] SØRENSEN L K, SNOR L K. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 882(1/2): 145-151.
- [4] 刘美端, 赵地顺, 刘宝树, 等. 头孢喹肟研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(4): 216-221.
- [5] DRLICA K. The mutant selection window and antimicrobial resistance [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52(1): 11-17.
- [6] ZHAO Xilin, DRLICA K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: Measurement and potential use of the mutant selection window [J]. *J Infect Dis*, 2002, 185(4): 561-565.
- [7] LIANG Beibei, NAN Bai, YUN Cai, et al. Mutant prevention concentration-based pharmacokinetic /pharmacodynamic indices as dosing targets for suppressing the enrichment of levofloxacin-resistant subpopulations of *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5): 2409-2412.
- [8] DONG Yizhi, ZHAO Xilin, DOMAGALA J, et al. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(7): 1756-1758.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S20 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth informational supplement [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010: 1-20.
- [10] 崔俊昌, 刘又宁, 王睿, 等. 4 种氟喹诺酮类药物对金黄色葡萄球菌的防耐药变异浓度 [J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(22): 1863-1866.
- [11] BLONDEAU J M, ZHAO Xilin, HANSEN G, et al. Mutant prevention concentration of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(2): 433-438.
- [12] SCHENTAG J J, GILLILAND K K, PALADIN J A. What have we learn from pharmacokinetic and pharmacodynamic theories? [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 32(suppl): s39-s46.
- [13] HO P L, TSE W S, TSANG K W T, et al. Risk factors for acquisition of levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: A case-control study [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 32(5): 701-707.
- [14] FIRSOV A A, VOSTROV S N, LUBENKO I Y, et al. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(5): 1604-1613.
- [15] 邢茂, 刘同华, 王琴. 罗红霉素和阿奇霉素对金黄色葡萄球菌的防耐药突变浓度的研究 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(8): 757-760.
- [16] 李朝霞, 刘又宁, 王睿, 等. 左氧氟沙星联合万古霉素缩小金黄色葡萄球菌耐药突变选择窗的初步研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(8): 911-914.
- [17] 许宏涛, 陶凤蓉, 张芃, 等. 头孢菌素对金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌防耐药突变浓度研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(12): 1475-1477.
- [18] 杨大伟, 陈杖榴, 丁焕中, 等. 头孢喹肟在猪体内的药动学及生物利用度 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(9): 1182-1185.
- [19] 王付民, 陈杖榴. 头孢喹肟的研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2004, 25(4): 50-53.
- [20] 杨大伟, 陈杖榴, 丁焕中, 等. 头孢喹肟对大肠杆菌防突变浓度的测定 [J]. *中国兽医学报*, 2008, 38(2): 165-168.
- [21] 卫京平. 抗生素药效学和药代动力学研究进展 [J]. *天津药学*, 2001, 13(1): 8-10.

【责任编辑 柴 焰】