

## · 基础研究 ·

## 耐药突变选择窗与细菌耐药的动物体内研究

崔俊昌 刘又宁 王睿 童卫杭 陈良安

**【摘要】** 目的 探讨耐药突变选择窗(MSW)与体内细菌耐药发生的相关性。方法 建立兔组织笼金黄色葡萄球菌感染模型,给予不同剂量的左氧氟沙星灌胃治疗。抽取组织笼内组织液进行药物浓度测定,同时监测组织笼内细菌药物敏感性变化。结果 当左氧氟沙星浓度位于MSW内时,导致金黄色葡萄球菌耐药突变体的选择富集,引起耐药。当药物浓度低于抑制菌群中99%细胞生长的最低药浓度或高于防耐药变异浓度时,无耐药出现。当左氧氟沙星浓度在MSW内的下部时,最容易选择出耐药突变体,且耐药出现最快。结论 MSW在体内存在,保持抗菌药物浓度在MSW以上可以限制耐药突变体的选择富集。

**【关键词】** 耐药突变选择窗;左氧氟沙星;金黄色葡萄球菌;抗药性

## Correlation of mutant selection window with selection of drug resistant mutants in rabbits

CUI Junchang, LIU Youning, WANG Rui, et al

Department of Respiratory Diseases, Department of Clinical Pharmacology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

**【Abstract】** Objective To study the correlation of mutant selection window(MSW) with selection of drug-resistant mutants *in vivo*. Methods Tissue cage infection model with *Staphylococcus aureus* was established in rabbits, and the infected animals were treated orally with various doses of levofloxacin. Changes in levofloxacin concentration and levofloxacin susceptibility of bacteria were monitored at the site of infection. Results The selection of mutants and drug-resistance occurred when levofloxacin concentration at the site of infection fluctuated within MSW. The drug resistance did not occur when the levofloxacin concentration was lower than MIC<sub>99</sub> or higher than mutant prevention concentration. The mutant selection occurred more easily and earlier when levofloxacin concentrations were in the lower portion of MSW than in the upper portion, as indicated by MIC. Conclusion The MSW exists *in vivo*. Maintenance of drug concentrations above the MSW can suppress the outgrowth of resistant mutants.

**【Key words】** mutant selection window; levofloxacin; *Staphylococcus aureus*; drugresistance

耐药突变选择窗(mutant selection window, MSW)理论是近年来提出的一个遏制抗菌药物耐药的新策略,窗的上限为防耐药变异浓度(mutant prevention concentration, MPC),下限则是能够对敏感菌产生选择压力的最低抗菌药物浓度,可以用最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,

MIC)或抑制菌群中99%细胞生长的最低药浓度(MIC for 99% the cells in the population, MIC<sub>99</sub>)来估算<sup>[1,2]</sup>。由于MSW是通过体外实验得到的一个容易引起耐药突变体选择的抗菌浓度范围,本研究通过兔组织笼感染模型,进一步明确MSW在体内是否存在以及MSW与耐药突变体选择的关系。

### 1 材料与方法

1.1 抗菌药物 注射用盐酸左氧氟沙星,200mg/瓶,批号:040910-1,由珠海丽珠集团丽宝生物化学制药有限公司提供。

1.2 细菌 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923,购自中

收稿日期:2007-06-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370615,30672505)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院呼吸科(崔俊昌、刘又宁、陈良安),临床药理研究室(王睿、童卫杭)

作者简介:崔俊昌,男,1970年2月生,河北省曲阳县人,医学博士,副主任医师。

通讯作者:陈良安,010-66939361, E-mail: chenla301@263.net

国药品生物制品检定所。

1.3 试剂及仪器 甲醇、高氯酸、磷酸二氢钾和三乙胺(分析纯)购自北京化学试剂公司。乙腈(色谱纯)购自 Fisher 公司,左氧氟沙星标准品(批号:200202,含量:97.2%)购自中国生物制品检定所,加替沙星(批号:20020801,含量:78.6%)由浙江京新药业有限公司提供。M-H 肉汤和胰酶大豆琼脂(Difco),高效液相色谱仪 Agilent 1100(Agilent)。

1.4 实验动物 雌性新西兰白兔 28 只,体重 2.5~3.0kg,由解放军总医院实验动物中心提供(许可证号:SCXK 京 2002-2005)。

1.5 左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC、MIC<sub>99</sub>、MPC 采用琼脂平板稀释法,具体见笔者以前的报道<sup>[4]</sup>。

1.6 兔组织笼感染模型的建立<sup>[4]</sup> 雌性新西兰白兔,背部去毛,速眠新 0.1ml/kg 肌注麻醉后,皮肤碘伏消毒。在背部正中切开皮肤,在皮下植入 1 个无菌的多孔、中空的高尔夫练习球,然后缝合。术后应用青霉素 100 000U/kg、2 次/d 肌注 3d,预防感染。4~6 周后高尔夫练习球内充满清亮的组织液,实验前 1d,用无菌注射器抽取球内液体 0.5ml,取 100μl 接种于 M-H 琼脂平板上,37℃ 过夜培养,经检验无菌后,用于建立感染模型。实验当日,用无菌注射器往高尔夫练习球内注入 1.5×10<sup>10</sup>cfu 对数生长期金黄色葡萄球菌 ATCC25923。细菌感染后 2d 抽取球内组织液 0.5ml 进行细菌菌落计数,细菌浓度在 10<sup>8</sup>cfu/ml 以上者用于实验。

1.7 抗菌药物治疗 28 只实验动物分为 7 组,每组 2~5 只兔子。分别给予 5、10、20、25、30、40mg/kg 左氧氟沙星灌胃治疗,1 次/d,连续给药 5d。对照组应用生理盐水灌胃。

1.8 药物浓度测定 治疗期间每日给药前及给药后 2、4、6、8、10h 及治疗结束后 24、48、72h 取组织液 0.5ml,12 000r/min 离心 10min,上清液 -20℃ 保存。采用高效液相色谱法测定组织液内左氧氟沙星浓度<sup>[5]</sup>。

1.9 组织笼内恢复生长细菌的耐药性变化 治疗前,治疗期间及治疗结束后 24h 及 72h 对组织笼内恢复生长的细菌进行 MIC 测定。从组织笼内抽取组织液 0.3ml,标本用 M-H 肉汤进行 10 倍系列稀释,37℃ 增菌,按 NCCLS(CLSI)推荐的标准进行 MIC 测定。

1.10 统计学处理 率的比较采用 Fisher 精确检

验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC、MIC<sub>99</sub>、MPC 及 MSW 左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的 MIC、MIC<sub>99</sub> 及 MPC 分别为 0.125、0.1 和 0.8mg/L,体外 MSW 为 0.1~0.8 mg/L。

2.2 MSW 与体内发生耐药的关系 按药物浓度是否位于 MSW 内分为 MSW 内组(包括跨 MSW)和 MSW 外组(包括对照、药物浓度低于 MIC<sub>99</sub> 和高于 MPC 的动物),见表 1。只有药物浓度位于 MSW 内组出现了耐药,而 MSW 外组无一例出现耐药。经 Fisher 精确检验,两组耐药发生率差异具有显著统计学意义(P=0.001)。说明耐药突变体的选择富集只发生于药物浓度位于 MSW 内时。

表 1 MSW 与体内发生耐药的关系

药物浓度	动物数	出现耐药动物数	耐药发生率(%)
MSW 内	18	12	66.7
MSW 外	10	0	0

2.3 药物浓度位于 MSW 的不同位置与耐药发生的关系 根据药物浓度与 MSW 的关系进一步分为对照组、低于 MIC<sub>99</sub> 组、跨 MSW 的下部组(T>MIC<sub>99</sub><20%)、MSW 下部组(C<sub>max</sub><0.5 mg/L)、MSW 上部组、跨 MSW 的上部组(T>MPC<20%)和高于 MPC 组(表 2)。当药物浓度低于 MIC<sub>99</sub>、高于 MPC 和跨 MSW 的上部(T>MPC>20%)时,无耐药出现,而当药物浓度位于 MSW 内的下部时,所有动物(7/7)出现了耐药,和对照组相比差异有显著统计学意义。

2.4 组织液内药物浓度在 MSW 内的位置与耐药出现时间及耐药性的关系 见表 3。当药物浓度位于 MSW 的下部(0.1~0.2 mg/L)时,多数动物在治疗后 72h 出现 MIC 增高, MIC 增加 2~4 倍;药物浓度位于 MSW 的中部(0.15~0.3 mg/L)时,治疗后 96~120h 出现 MIC 增高, MIC 增加 4 倍;而当药物浓度位于 MSW 的上部(0.3~0.8 mg/L)时, MIC 增高多出现在治疗后 120h,且 MIC 有 4~8 倍的改变。可见药物浓度在 MSW 的下部时比在中上部时更容易导致耐药的发生,但当药物浓度保持在 MSW 的上部时,所选择出的菌株有更高的耐药性。

表2 药物浓度位于MSW的不同位置与耐药发生的关系

药物浓度范围	动物数	出现耐药动物数	耐药发生率(%)	P值*
低于MIC <sub>99</sub> 组	3	0	0	—
跨MSW的下部组 (T>MIC <sub>99</sub> <20%)	3	1	33.3	0.5
MSW下部组	7	7	100	0.008
MSW上部组	5	4	80	0.071
跨MSW的上部组 (T>MPC<20%)	3	0	0	—
高于MPC组	4	0	0	—
对照组	3	0	0	—

注:\* 和对照组相比

表3 组织液内药物浓度与耐药出现时间及耐药性的关系

动物编号	药物在MSW内的 浓度范围(mg/L)	出现耐药的 时间(h)	治疗结束后2d恢复生长 细菌的MIC(mg/L)
L1	0.1~0.133	96	0.25
L2	0.1~0.176	72	0.5
L3	0.1~0.192	72	0.5
L4	0.1~0.193	72	0.25
L5	0.1~0.170	72	0.25
L6	0.1~0.194	72	0.25
M1	0.1~0.254	96	0.5
M2	0.1~0.296	120	0.5
U1	0.1~0.791	72	1
U2	0.1~0.671	120	0.5
U3	0.1~0.672	120	1
U4	0.1~0.796	120	1

### 3 讨论

MSW是通过体外琼脂平板实验得到的一个引起耐药突变体选择的抗菌药物浓度范围。由于体内药物浓度是处于一个动态变化的过程,通过琼脂平板的静态药物浓度测定的MSW在体内感染部位是否存在,以及体外MSW与体内耐药突变体选择的相关性目前尚不清楚。Croisier和Etienne等<sup>[6-8]</sup>观察了血中而不是肺组织中药物浓度及MSW与肺组织内细菌耐药的相关性,在实验的设计上存在一定的缺陷。笔者通过兔组织笼感染模型,观察了组织笼内组织液中左氧氟沙星浓度与金黄色葡萄球菌耐药的关系。

从结果看,当左氧氟沙星药物浓度低于MIC<sub>99</sub>及高于MPC时,也就是说药物浓度位于MSW外时,无一例动物出现耐药。保持药物浓度在MPC以上,可以达到限制耐药突变体选择富集的目的。而出现耐药的动物,其药物浓度均大部分时间位于MSW内(MSW下部组和上部组)。表明MSW在动物体内感染部位存在,并与体外测定的结果一致。当

药物浓度位于MSW内的下部时,耐药发生率最高。这一结果也提示目前我们所提倡的保持药物浓度高于MIC的治疗策略存在致命的弊端,如果药物的C<sub>max</sub>不能高于MPC,药物浓度将在治疗的大部分时间位于MSW内,将非常容易选择出耐药突变体,从而导致耐药的发生,尤其是当感染部位细菌量很大时。

当药物浓度位于MSW内的下部时,比药物浓度位于中、上部时早24~48h出现耐药,这一差别可能是由于药物浓度在MSW的下部时有更多的耐药突变体存在和更容易增殖,而当药物浓度保持在MSW的中、上部时有一些耐药突变体被杀死或生长被抑制。当药物浓度位于MSW的下部时更容易出现耐药突变体的选择,虽然其耐药性低于药物浓度在中、上部时选择出的耐药突变体,但当药物浓度波动时,这些耐药突变体可能再次被选择,从而导致高水平的耐药。虽然这只是左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌的动物体内研究结果,是否适用于其他药物及病原体尚需进一步的研究。但这一结果也提示我们,如果临床医生在患者能够耐受的情况下选用推荐的最高抗菌药物剂量,可能会减少耐药的发生。

(下转第346页)

阻滞这种作用。缬沙坦可通过对 AT<sub>1</sub>R 的拮抗抑制 RAS 的过度激活及抑制 NO 和自由基介导的组织损伤而改善脓毒症心肌损伤。加用缬沙坦可以明显减轻脓毒症时心肌损伤的程度,可能机制包括:抑制 AT<sub>1</sub>R 功能,同时激活 AT<sub>2</sub>R;降低脓毒症时过度升高的 NO 和 MDA 水平,当然,后二者也可能是对 RAS 调节后的继发结果,故 ARB 类药物作为脓毒症时心肌保护时的应用,具有一定的临床前景,相关机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*, 2003, 9: 517-524.

[2] Guest TM, Ramanathan JH, Tuteur PG, et al. Myocardial injury in critically ill patients. *JAMA*, 1995, 273: 1945.

[3] Turner A, Tsamitros M, Bellomo R, et al. Myocardial cell injury in septic shock. *Crit Care Med*, 1999, 27: 2035-2036.

[4] Wichterman KA, Bauce AE, Chaudry IH, et al. Sepsis and septic shock: a review of laboratory model and a proposal. *Surg Res*, 1980, 29: 1892.

[5] 林毅红, 梁仲培, 刘金保. 盲肠结扎穿刺致大鼠败血症的改良模型. *广州医药*, 1998, 29: 39-40.

[6] 许强, 吴海云, 王士雯. 血浆心钠素及脑钠素检测对预

测老年重度脓毒症及并发功能异常及预后的价值. *中国综合临床*, 2005, 21: 385-388.

[7] Charpentier J, Luyt CE, Fulla Y, et al. Brain natriuretic peptide; a marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Crit Care Med*, 2004, 32: 660-665.

[8] Brueckmann M, Huhle G, Lang S, et al. Prognostic value of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with severe sepsis. *Circulation*, 2005, 112: 527-534.

[9] Brueckmann M, Bertsch T. Increased plasma levels of NT-proANP and NT-proBNP as markers of cardiac dysfunction in septic patients. *Clin Lab*, 2005, 51: 373-379.

[10] Titheredge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1411: 437-455.

[11] Kabour A, Henegar JR, Janicki JS. Angiotensin II (A II)-induced myocyte necrosis: role of the A II receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994, 23: 547-553.

[12] Meredith PA. Optimal dosing characteristics of the angiotensin II receptor antagonist telmisartan. *Am J Cardiol*, 1999, 84(2A): 7K-12K.

[13] Frolkis I, Gurevitch J, Yuhus Y, et al. Interaction between paracrine tumor necrosis factor-alpha and paracrine angiotensin II during myocardial ischemias. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37: 316.

(上接第 341 页)

参考文献

[1] Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolones studies. *Clin Infect Dis*, 2001, 33(Suppl): S147-S156.

[2] Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52: 11-17.

[3] 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. *中华医学杂志*, 2004, 84: 1863-1866.

[4] 崔俊昌, 刘又宁, 王睿, 等. 左氧氟沙星对兔组织金黄色葡萄球菌感染的疗效研究. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12: 291-294.

[5] 童卫杭, 柴栋, 崔俊昌, 等. 兔感染性模型组织液中左氧氟沙星浓度的 HPLC 测定. *中国抗生素杂志*, 2005,

30: 759-761.

[6] Croisier D, Etienne M, Bergoin E, et al. Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental *pneumococcal pneumonia* in a rabbit model of human therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 1699-1707.

[7] Croisier D, Etienne M, Piroth L, et al. In vivo pharmacodynamic efficacy of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an experimental model of pneumonia: impact of the low levels of fluoroquinolone resistance on the enrichment of resistant mutants. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54: 640-647.

[8] Etienne M, Croisier D, Charles PE, et al. Effect of low-level resistance on subsequent enrichment of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in rabbits. *J Infect Dis*, 2004, 190: 1472-1475.