

多西环素联合左氧氟沙星对耐药肺炎克雷伯菌的 体内外抗菌活性研究

吴凡¹,王保贵²,胡文³,陈春林²

(1 江西省药品检查员中心,南昌 33000; 2 宜春学院化学与生物工程学院,宜春 336000;
3 宜春市人民医院,宜春 336000)

[摘要] **目的:** 探究多西环素联合左氧氟沙星对耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的体内外抗菌活性。**方法:** 于宜春市人民医院收集临床分离的 8 株 CRKP,体外采用微量肉汤稀释法测定多西环素和左氧氟沙星对 8 株 CRKP 的最小抑菌浓度(minimal inhibition concentration, MIC),棋盘稀释法判断两药联用的抑菌效果,时间-杀菌曲线法进一步评价两药联合的杀菌作用。结晶紫染色半定量生物膜法测定两药联用对生物膜形成的抑制作用和消除作用。体内利用鼻腔滴注 CRKP 菌液建立小鼠肺部急性感染模型,记录小鼠精神状态及肺部组织荷菌量、血清炎症因子 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素(IL)-6 的水平和病理形态学改变等指标评估,分析多西环素联合左氧氟沙星对 CRKP 的体内抗菌活性。**结果:** 多西环素对 8 株 CRKP 的 MIC 为 4 ~ 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,左氧氟沙星对 8 株 CRKP 的 MIC 为 16 ~ 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。棋盘法显示多西环素联合左氧氟沙星对 8 株 CRKP 具有 80% 的协同或相加作用;时间-杀菌曲线显示,多西环素联合左氧氟沙星对 CRKP2 和 CRKP7 作用 24 h 后使细菌数较初始细菌数降低 $\geq 2 \lg \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,呈现抑菌或杀菌作用;结晶紫染色法结果表明,多西环素与左氧氟沙星联用对 CRKP 生物膜具有抑制和破坏作用;动物实验表明,与模型组相比,联合组小鼠精神状态良好,肺部组织荷菌量及 CRP,IL-6 水平显著降低($P < 0.001$);HE 染色结果表明,给药组较模型组肺泡结构清晰,炎性细胞减少,充血面积降低,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。**结论:** 体外实验表明,多西环素联用左氧氟沙星对 CRKP 具有协同抗菌或杀菌作用,体内实验表明多西环素联用左氧氟沙星可降低炎症指标,有效治疗肺组织细菌感染,有较好的体内抗菌作用。

[关键词] 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;多西环素;左氧氟沙星;联合药敏;生物膜;动物实验

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)23-2425-09

In vitro and *in vivo* antibacterial activity of doxycycline combined with levofloxacin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

WU Fan¹, WANG Bao-gui², HU Wen³, CHEN Chun-lin²

(1 *Jiangxi Drug Inspection Center, Nanchang 330000, China*; 2 *School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China*; 3 *Yichun People's Hospital, Yichun 336000, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the *in vivo* and *in vitro* antibacterial activity of doxycycline combined with levofloxacin on carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP). **Methods:** Eight clinically isolated CRKP strains were collected in Yichun People's Hospital, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of 8 CRKPs was determined using microbroth dilution method *in vitro*. The antibacterial effect of the two drugs was

[作者简介] 吴凡,男,副研究员,主要从事药效学研究。联系电话:(0791)88336200,E-mail: 574172480@qq.com。

[通讯作者] 陈春林,男,副教授,主要从事抗菌药物合理用药的临床药学研究。联系电话:(0795)3201098,E-mail: chen Chunlinyxy@163.com。

judged by checkerboard dilution method. The time-sterilization curve was further applied to evaluate the combined bactericidal effect of the two drugs. Crystal violet staining semi-quantitative biofilm method was used to determine the inhibitory effect and elimination effect of the combination of two drugs on biofilm formation. *In vivo*, a model of acute lung infection of mice was established by nasal instillation of CRKP bacteria, and the mental state of mice was recorded. The bacterial load of lung tissues, the levels of serum inflammatory factor C-reactive protein (CRP), IL-6 and pathological morphological changes were evaluated and analyzed. **Results:** The MIC of doxycycline to 8 CRKP strains was $4 \sim 256 \text{ ug} \cdot \text{mL}^{-1}$, levofloxacin to 8 strains of CRKP MIC of $16 \sim 256 \text{ ug} \cdot \text{mL}^{-1}$. The checkerboard method showed that doxycycline combined with levofloxacin had an 80% synergistic or additive effect on 8 CRKP strains. The time-sterilization curve showed that after the treatment of doxycycline combined with levofloxacin on CRKP2 and CRKP7 for 24 hours, the number of bacteria decreased by $\geq 2 \text{ lg CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ compared with the initial bacterial number, showing bacteriostatic or bactericidal effects. The results of crystal violet staining showed that the combination of doxycycline and levofloxacin had inhibitory and destructive effects on CRKP biofilms. Animal experiments showed that compared with the model group, the combined group mice had a good mental state, and the loading levels of lung tissue, C-reactive protein (CRP) and IL-6 significantly reduced ($P < 0.001$). The results of HE staining showed that the alveolar structure was clear, the inflammatory cells reduced, and the hyperemia area reduced in the drug administration group compared with the model group, and the differences were statistically significant ($P < 0.001$). **Conclusion:** *In vitro* experiments show that doxycycline combined with levofloxacin has a synergistic antibacterial or bactericidal effect on CRKP, and *in vivo* experiments show that doxycycline combined with levofloxacin can reduce inflammatory indexes, effectively treat bacterial infections in lung tissue, exerting good antibacterial effect *in vivo*.

[Key words] carbapenem resistant to *Klebsiella pneumoniae*; doxycycline; levofloxacin; combined drug sensitivities; biofilms; animal experiments

肺炎克雷伯菌属于肠杆菌科细菌,是目前仅次于大肠埃希菌的最重要的医院感染条件致病菌,常可引起呼吸系统感染、肝脓肿、败血症及脑膜炎等全身多部位感染。碳青霉烯类抗菌药物是目前治疗肺炎克雷伯菌的首选药物。据 2020 年全国细菌耐药网检测显示,肺炎克雷伯菌在革兰阴性菌检出率中位列第 2 位,且其对碳青霉烯类药物的耐药率高达 23.2%^[1-2],可供选择的药物越来越少,治疗难度逐渐增大。目前临床对耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的治疗主要依赖替加环素、多黏菌素等^[3],近年来随着多耐药菌,甚至泛耐药菌的出现,耐药肺炎克雷伯菌的治疗给临床治疗带来了极大的挑战。

多西环素(doxycycline, DOX)属于半合成四环素类,具有广谱、半衰期长、不良反应小等特点^[4]。其机制为特异性与细菌核糖体 30S 亚基在 A 位置结合,改变细胞膜通透性,发挥抑菌作用^[5]。时间杀菌曲线表明,2MIC 多西环素在 2 ~ 8 h 内使产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)肺炎克雷伯菌菌落数降低

$\geq 2 \text{ lg CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,呈现抑菌活性,随着浓度增加,4MIC 呈现杀菌作用^[6]。有临床病例报道^[7],多西环素成功治愈了 1 例大肠杆菌和泛耐药肺炎克雷伯菌泌尿路感染的患者,可见多西环素有较好的抗菌潜力。

左氧氟沙星(levofloxacin, LEV)属于喹诺酮类抗生素,具有广谱、抗菌作用强等特点,能够有效抑制细菌 DNA 螺旋酶活性,使细菌 DNA 合成及复制受阻,导致细菌死亡^[8]。研究表明,LEV 对下呼吸道感染治疗的总有效率可达 90% 以上^[9],且 LEV 在和其他药物联用时有较好的抗菌效果^[10]。

近年来,由于抗生素的不合理运用,CRKP 对临床上常用药物耐药性不断上升,这种现状使 CRKP 的临床抗感染治疗复杂化。多数研究表明药物联用对 CRKP 出现抑菌或杀菌效果^[11],且临床上联合用药对于治疗 CRKP 感染的效果及预后也明显优于单药^[12]。故本实验结合临床用药经验,通过联合药敏实验、时间杀菌曲线和细菌生物膜实验、小鼠急性肺炎感染等实验,研究多西环素联用 LEV 体内外抗菌

效果,探索用药方案的合理性,以期为临床治疗 CRKP 提供新的用药选择。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株 宜春市人民医院 2020 年分离的 8 株非重复的 CRKP,来自神经外科术后和 ICU 感染患者标本,分别取自肺部感染患者痰液和脑脊液。8 株非重复的肺炎克雷伯菌对亚胺培南、美罗培南的最小抑菌浓度(MIC) $\geq 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,符合中国疾病预防控制中心对于碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌最新定义标准,即全为 CRKP^[13]。

1.2 培养基和抗菌药物 抗菌药物多西环素(批号:F2115338,纯度:98%)、LEV(批号:D2129050,纯度:95%)均购自阿拉丁公司;M-H 琼脂、M-H 肉汤培养基均由杭州微生物试剂有限公司提供。

1.3 仪器 WGZ-2XJ 细菌浊度仪(上海昕瑞仪器仪表有限公司);TECAN Infinite 200 PRO 全波段酶标仪(北京世贸远东科学仪器有限公司)。

1.4 动物 ICR 小鼠(SPF 级),均为雄性,体重 18~22 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,许可证号:SCXK(湘)2022-0011。标准条件下饲养:温度 $(23 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 50%~65%。

2 方法

2.1 微量稀释法药敏实验 采用微量肉汤稀释法测定多西环素、LEV 对 8 株 CRKP 的 MIC,参照美国临床和实验室标准化协会 2017 年 M100s-27th 推荐的规范和折点实施实验和判读结果^[14]。

2.2 联合药敏实验 棋盘法测定多西环素联合 LEV 的联合药敏,每个抗生素的药物浓度测试范围为 $0.25 \sim 512 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每孔中分别加入 2 种抗菌药物各 50 μL ,再加入新鲜制备的菌液浓度为 $2 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液 100 μL ,孔中菌液浊度最终为 $1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,37 $^\circ\text{C}$ 培养 18 h 后,读取单药和两药联用的 MIC 值。

部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FIC)作为联合药敏实验结果的判断依据。 $\text{FIC} = \text{MIC}_{\text{甲药联合}} / \text{MIC}_{\text{甲药单药}} + \text{MIC}_{\text{乙药联合}} / \text{MIC}_{\text{乙药单药}}$ 。FIC ≤ 0.5 为协同作用, $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ 为相加作用, $1 < \text{FIC} \leq 2$ 为无关作用, FIC > 2 为拮抗作用^[15]。

2.3 时间杀菌曲线 使用时间杀伤实验绘制协同杀菌曲线。杀伤效果通过标准时间杀伤实验进行量

化,使用棋盘实验数据显示的有效药物组合的最低抑菌浓度。操作如下:将含有 $2 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液与单一或联合抗菌药物混合,然后在恒温环境中 35 $^\circ\text{C}$ 下连续振荡培养过夜。同时,不含抗生素的相同培养液经历相同的程序并作为对照。在 0, 3, 6, 9, 12 和 24 h 的时间点连续稀释培养的肉汤样品,并分别涂在 M-H 琼脂平板上。在 35 $^\circ\text{C}$ 下静置过夜后,对细菌菌落进行计数并绘制杀菌曲线^[16]。杀菌作用的判定标准:细菌存活数从初始接种数量下降 $\geq 3 \text{ lg CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,则认为杀菌率达 99.9%,药物在该浓度下对受试菌有杀菌作用;下降 $> 2 \text{ lg CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为协同作用^[17]。

2.4 细菌生物膜的形成 采用结晶紫染色法检测生物膜形成能力^[18],将菌株接种于 MH 平板上 37 $^\circ\text{C}$ 下培养 24 h,配制 $2 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液加入 96 孔板中,每孔 100 μL 菌悬液和 100 μL 无菌 M-H 肉汤,设 3 个复孔,以 200 μL 无菌 M-H 肉汤作为阴性对照,孵育 24 h,吸出培养基后用 200 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 遍,空气中干燥 20 min,每孔加入 200 μL 0.1% 结晶紫染色 20 min,吸出结晶紫,重复 PBS 清洗 3 遍,空气干燥 20 min,加入 95% 乙醇溶解,酶标仪测定 570 nm 下吸光度 A,以阴性对照的平均 OD 值 + 3 \times 标准差值(ODc 值)为临界值。大于该 ODc 值则判定为可形成生物膜。

2.5 生物被膜抑制实验^[19-20] 取 96 孔组织培养板,合理选取 3 孔作为一组,分别为多西环素组、LEV 组、联用组,每孔各加入 100 μL 稀释好的菌液和 100 μL 药液。同时设置了只含有培养基和菌液的对照组。37 $^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 24 h 后取出,吸出孔中的液体,用无菌 PBS 清洗 3 次,以便清洗附着的细菌。加 99% 甲醇固定 15 min,自然干燥后加入 200 μL 浓度为 0.1% 的结晶紫染液,染色 15 min,用 PBS 彻底清洗,洗去剩余的结晶紫染液,室温晾干 20 min 后加入的 95% 的乙醇溶解,放置 15 min,溶解附着的生物膜。酶标仪测定 590 nm 波长处的生物膜 OD 值。

2.6 生物被膜清除实验 按照“2.4”项下方法进行细菌生物膜的培养,96 孔培养板中加入 200 μL 菌液,在 37 $^\circ\text{C}$ 条件下恒温箱中培养 72 h,使其形成稳态成熟期生物膜。按“2.5”项下方法操作,分组给予相应药物,37 $^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 24 h 后取出,酶标仪测定 590 nm 波长处的生物膜的 OD 值,计算清除率。

2.7 小鼠肺部 CRKP 感染模型的建立^[21] 将 50 只小鼠随机分为模型组(model)、对照组(control)、多西环素组、LEV 组、多西环素和 LEV 联用组,对照组 10 只,其余每组 8 只。小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),保持小鼠以头仰立位姿势,鼻腔滴入 CRKP 菌悬液 $30 \mu\text{L}$ ($10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$),对照组小鼠同法滴入相同体积的生理盐水。接种后,小鼠继续保持头仰立位 20 s,以确保 CRKP 菌悬液或生理盐水因重力作用均匀进入两肺。小鼠苏醒后置于笼中自由取食。建模成功的标准为:CRKP 接种后,小鼠均表现出不同程度的呼吸加快、活动降低、竖毛或被毛凌乱、眼周分泌物增多等症状。

2.8 给药治疗 感染 24 h 后,按照 LEV $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、多西环素 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量(药物剂量的选择依赖正常成年人所需剂量换算所得),每天灌胃给药 1 次,空白组、模型组每天给予同体积的生理盐水,疗程 5 d。

2.9 肺组织菌落计数 治疗 5 d 后,用 10% 水合氯醛($0.04 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉小鼠,无菌开胸取肺组织,用无菌生理盐水冲洗干净,右肺组织吸干表面水分后称重,置于 1 mL 生理盐水中匀浆,进行 10 倍梯度稀释($1:10^1 \sim 1:10^5$),分别取 100 μL 涂抹于无药 MH 琼脂平板上,用 L 形玻璃棒均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h,进行细菌计数。

2.10 血清 CPR 和炎症因子 IL-6 指标检测 水合氯醛麻醉小鼠,眼球取血暂存 EP 管中,3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10 min,采用酶联免疫法检测血清 CRP 和 IL-6 水平,步骤严格按照试剂说明书要求操作。

2.11 肺组织 HE 染色 切取部分小鼠肺组织,经 4% 多聚甲醛中固定,然后常规脱水、包埋、切片、HE 染色,光镜下观察肺组织病理状态变化。

2.12 统计学分析 所有的实验数据结果都用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)显示,使用 GraphPad prism 8.0.2 软件完成作图和多组间使用单因素方差数据分析(one-way ANOVA)。

结 果

1 多西环素与 LEV 对 CRKP 的联合药敏结果

MIC 结果显示,8 株 CRKP 菌株对多西环素的敏感率仅为 12.5%,对 LEV 的耐药率为 100%,见表 1。棋盘法药敏结果显示,多西环素与 LEV 联用时,对 2 株显示无关或拮抗作用。与 LEV 联用时,对另 1 株显示协同作用,对其他 5 株为相加作用(见表 1)。两药联用时多西环素的 MIC 值从 $4 \sim 256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下降到 $1 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,LEV 的 MIC 值从 $16 \sim 256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下降到 $1 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 多西环素联用 LEV 对 8 株临床分离的 CRKP 的联合药敏

序号	菌株编号	多西环素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		LEV/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		FIC	作用
		单用	联用	单用	联用		
1	210902105	8	4	64	16	0.75	相加作用
2	210511021	8	4	64	8	0.625	相加作用
3	210424013	16	16	256	1	>1	无关作用
4	210524015	8	4	64	8	0.625	相加作用
5	210507013	8	4	32	8	0.75	相加作用
6	210429107	>256	4	16	4	0.266	协同作用
7	210518013	4	1	32	16	0.75	相加作用
8	210812017	>256	>256	256	256	>2	拮抗作用

2 多西环素与 LEV 联合时间杀菌曲线

基于棋盘法联合药敏实验结果,选取 CRKP2, CRKP7 进行体外时间杀菌曲线实验,观察多西环素与 LEV 联用对于 CRKP 的杀菌作用。依据 FIC 值和药物在体内可达到的血药浓度,合理选取药物浓

度。结果显示,多西环素与 LEV 的药物组合对受试菌株具有联合抗菌作用。多西环素与 LEV 联用对 CRKP2 在($t+24$)时达到抑菌效果,曲线呈下行趋势。多西环素和 LEV 联用对 CRKP7 在($t+24$)时达到杀菌效果,曲线也呈下行趋势(见图 1)。

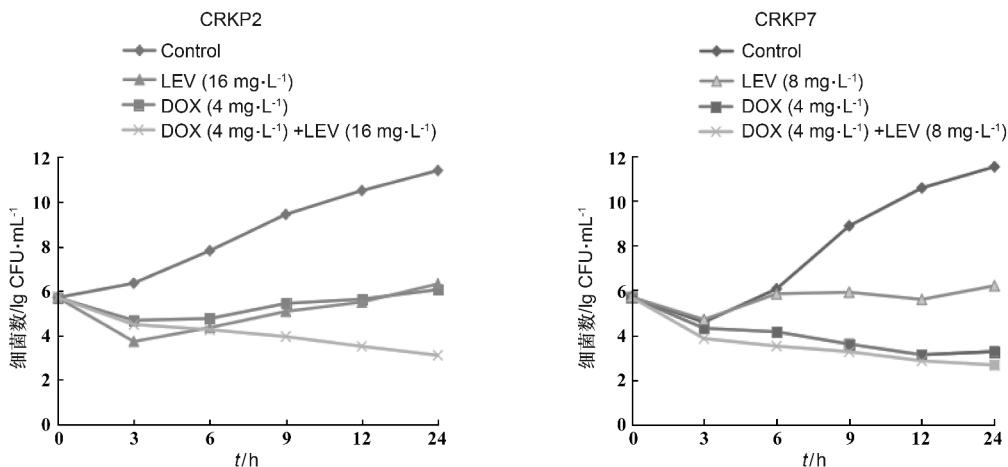
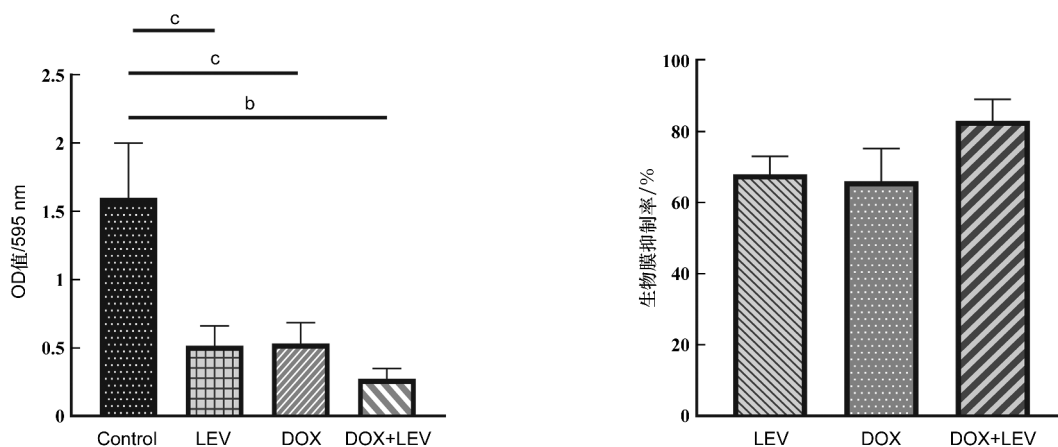


图1 多西环素与 LEV 联用对于 CRKP 的时间杀菌曲线

3 多西环素联合 LEV 对 CRKP7 生物膜的抑制作用

基于杀菌曲线的结果和细菌成膜能力比较,多西环素联用 LEV 实验选取 CRKP7 为实验菌株,实验分为 4 组(多西环素组、LEV 组、联合组、对照组)进行生物膜的抑制作用实验,观察生物膜生长情况,

测定生物膜抑制率。与对照组相比,多西环素组、LEV 组和联合组均能明显抑制 CRKP7 生物膜的形成($P < 0.01$)。其中多西环素组的抑制率为 64%、LEV 组的抑制率为 68%、联合组的抑制率为 83%,联合组与多西环素组和 LEV 组相比较,抑制率具有增强的趋势,但无统计学意义,见图 2。



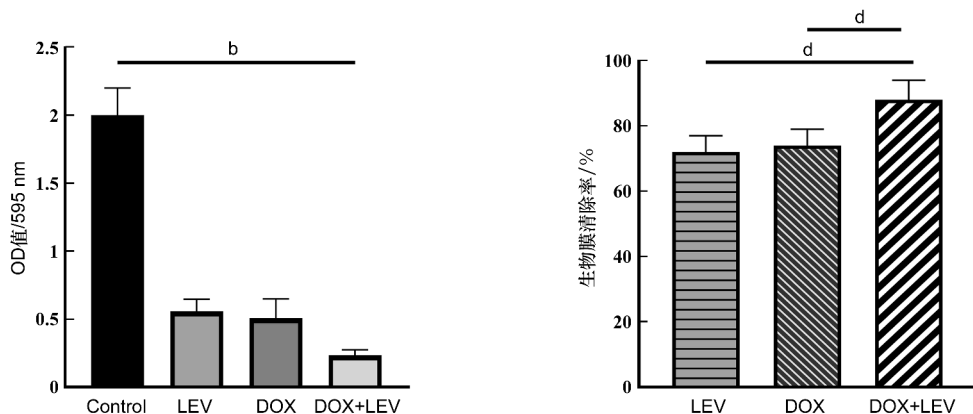
DOX + LEV 组与 Control 组相比,b; $P < 0.001$;DOX 组与 Control 组相比,c; $P < 0.01$;LEV 组与 Control 组相比,c; $P < 0.01$

图2 多西环素联合 LEV 对 CRKP7 生物膜的抑制作用

4 多西环素联合 LEV 对 CRKP7 成熟生物膜的清除作用

实验分组同抑制实验进行生物膜的清除作用实验,观察各组生物膜生长情况,测定药物对生物膜的清除率。与对照组相比,多西环素组、LEV 组和联

合组均能明显清除 CRKP7 的已形成生物膜($P < 0.001$)。多西环素组的清除率为 74%、LEV 组的清除率为 72%、联合组的清除率为 88%,联合组与多西环素组和 LEV 组相比较清除率分别提高了 14% 和 16% ($P < 0.05$),具有显著统计学意义,见图 3。



DOX + LEV 组与 Control 组相比, $b: P < 0.001$; DOX 组与 Control 组相比, $d: P < 0.05$; LEV 组与 Control 组相比, $d: P < 0.05$

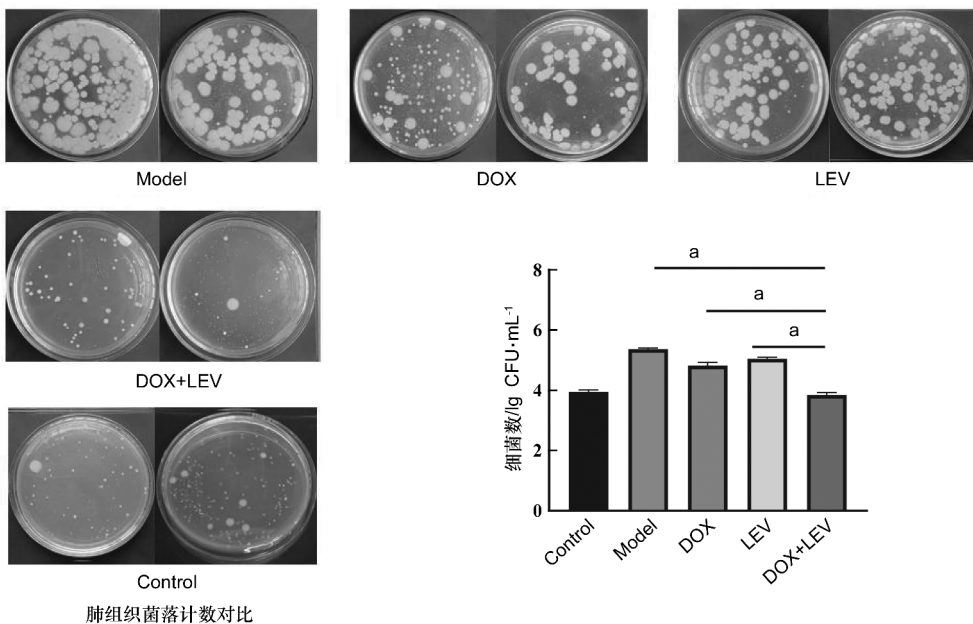
图3 多西环素联合 LEV 对 CRKP7 生物膜的清除作用

5 各组小鼠基本体征变化

与正常组小鼠相比,小鼠肺部 CRKP 感染模型组小鼠毛发杂乱无光泽、行动迟缓、进食量及饮水量减少、体质量减轻。给药组上述症状明显减轻,毛发逐渐柔顺光泽、行动敏捷、体质量上升。

基于肺组织菌落计数结果,小鼠肺部 CRKP 感染模型组菌落数明显高于正常组,感染严重。联合组小鼠肺组织菌落数明显低于模型组和单药组,趋近于正常组。联合组与各组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.001$),见图 4。

6 各组小鼠肺组织菌落计数



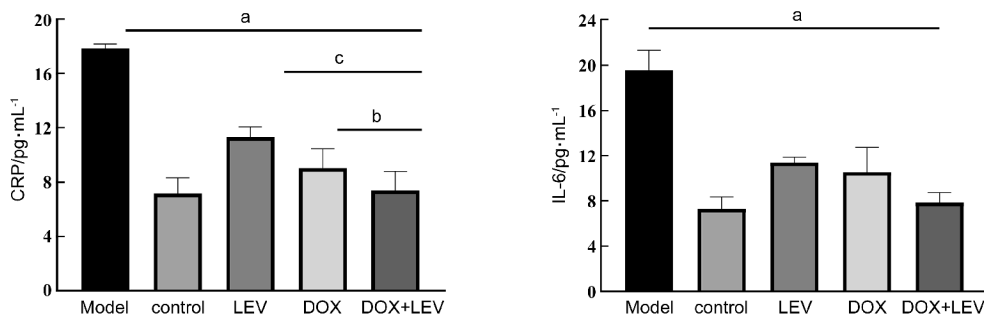
DOX + LEV 组与 Control 组相比, $a: P < 0.0001$; DOX 组与 DOX + LEV 组相比, $a: P < 0.0001$; LEV 组与 DOX + LEV 组相比时, $a: P < 0.0001$

图4 多西环素联用 LEV 对小鼠肺部 CRKP 感染肺组织菌落数对比和差异性统计

7 血清 CRP 和炎症因子 IL-6 的指标变化

由实验结果可见,与正常组相比,小鼠肺部 CRKP 感染模型组血清中 CRP 和 IL-6 的数值明显

升高,与模型组相比,联合组血清中 CRP 和 IL-6 的水平显著下降,差异具有统计学意义,见图 5。



DOX + LEV 组与 Model 组 IL-6 相比, a: $P < 0.0001$; DOX + LEV 组与 Model 组 CRP 相比, b: $P < 0.001$; LEV 组与 DOX + LEV 组 CRP 相比, c: $P < 0.01$

图 5 多西环素联用 LEV 对小鼠肺部 CRKP 感染血清炎症因子影响

8 各组小鼠肺组织 HE 染色情况

通过 HE 染色可知,正常组肺脏组织表面被膜结构清晰,肺脏实质为肺内支气管各级分支及其终末的大量肺泡,各级支气管结构无明显异常,肺泡壁由单层上皮组成,结构清晰;间质包括肺内结缔组织及血管等均无明显异常,未见明显的病理改变。与

正常组相比,小鼠肺部 CRKP 感染模型组中等面积肺泡壁重度增厚,肺泡萎缩,部分肺泡结构消失,周围肺泡腔代偿性增大,肺泡间隔增宽,大量炎性细胞浸润,血管周围大量出血,可见较多红细胞。与模型组相比,给药组炎症细胞数减少,联合组下降显著,且肺泡充血范围减少,血管结构较清晰,见图 6 和图 7。

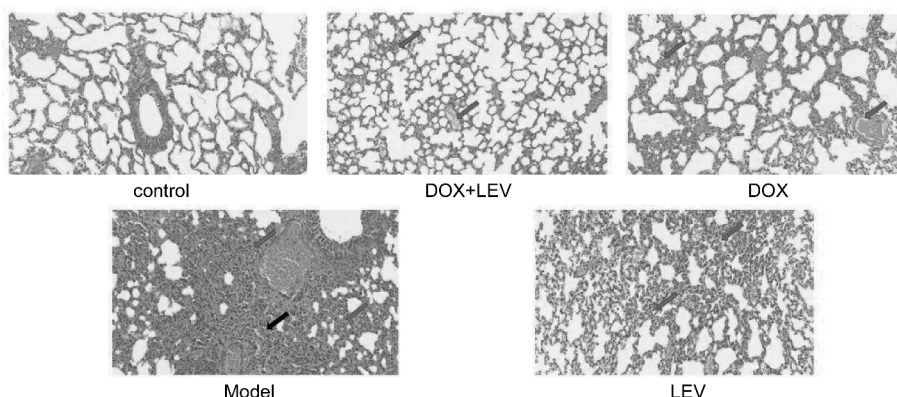
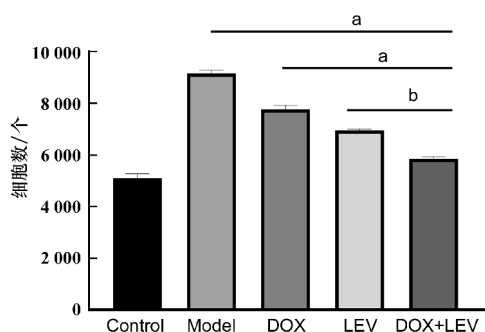


图 6 多西环素联用 LEV 对小鼠肺部 CRKP 感染肺组织形态影响



DOX + LEV 组与 Model 组相比, a: $P < 0.0001$; DOX 组与 DOX + LEV 组相比, a: $P < 0.0001$; LEV 组与 DOX + LEV 组相比, b: $P < 0.001$

图 7 多西环素联用 LEV 对小鼠肺部 CRKP 感染肺组织炎症细胞数的影响

讨 论

肺炎克雷伯菌是一种重要的机会性致病菌,在机体免疫力低下患者中感染尤为重要。随着抗生素使用的日益频繁,多重耐药和泛耐药肺炎克雷伯菌的出现和流行对人体健康造成了极大的危害。碳青霉烯类药物 CRKP 的检出呈现逐年增加的趋势。研究发现,抗生素联用对于 CRKP 的疗效远大于单药治疗^[22],较为常见的有碳青霉烯类与多黏菌素类、替加环素、磷霉素、利福平等联合应用^[23-24]。

多西环素作为第 2 代四环素类药物,可通过阻止细菌蛋白质的合成达到抗菌效果,还可以破坏细胞膜的通透性,抑制细菌生长或杀灭细菌^[25]。相较

于其他抗生素,CRKP对多西环素一直保持较高的敏感性。在本研究中MIC结果显示,8株CRKP菌株对多西环素的敏感率仅为12.5%,表明随着多西环素临床使用的增加,CRKP对多西环素的敏感性也逐渐下降。LEV是一种喹诺酮类抗生素,对病原菌的DNA解旋酶具有较强的抑制作用,可以干扰RNA-蛋白质的结合,从而阻断DNA的合成与复制。LEV对CRKP耐药率较高,本实验中结果显示,其对临床分离的8株CRKP耐药率为100%。LEV和头孢他啶联合应用对产KPC的肠杆菌科菌株有较好的协同抗感染效果^[26]。因此我们选用多西环素与LEV联用,进一步观察对CRKP的作用。

本研究中,多西环素联用LEV对6株CRKP表现出最有效的协同作用,两药联用时MIC值较单药下降,药物浓度均在临床可达到的血药浓度正常范围内。时间杀菌曲线实验表明,多西环素(4 mg·L⁻¹) + LEV(16 mg·L⁻¹)、多西环素(4 mg·L⁻¹) + LEV(8 mg·L⁻¹)分别对CRKP2/CRKP7在24 h内呈现出抑菌或杀菌效果。上述结果进一步揭示临床上多西环素联用LEV对治疗CRKP感染可能会有协同杀菌作用。两药均属于浓度依赖性抗生素,在耐受安全的情况下,更高剂量的药物浓度可能有更好的疗效。

有研究发现,肺炎克雷伯菌的耐药性与生物膜紧密相关^[27]。肺炎克雷伯菌在生物膜状态下的耐药程度是浮游菌状态的10~1 000倍^[28]。因此,我们对多西环素联用LEV是否作用于CRKP生物膜做了进一步研究。结果表明,多西环素联合利福平可有效抑制早期生物膜的形成,抑制率高达83%,对成熟生物膜的清除率也可达88%,能有效降低细菌生物膜耐药性,增强抗菌效果。体内实验中,CRKP感染模型组小鼠精神状态差、毛发杂乱无光泽、行动迟缓;肺部菌荷量较正常组显著偏高,炎性细胞浸润,肺内充血,炎性因子明显偏高,肺组织结构模糊,出现明显病变。而联合用药组小鼠精神状态逐渐好转,体质量上升;肺部菌荷量接近正常组,炎性因子显著降低,肺组织病变不明显。

由本实验可见,多西环素联合LEV对CRKP有较好的体内外抗菌活性,这可能为临床治疗CRKP感染、保护现有抗菌药物临床应用价值及延缓和减少耐药菌株的产生提供用药指导。

[参 考 文 献]

[1] 员静,单斌,孟雪斐,等. 2018-2020年多中心耐碳青霉烯

- 类肠杆菌目细菌的流行病学特征及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(11): 1038-1043.
- [2] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2021年CHINET中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2022, 22(5): 377-387.
- [3] ZHANG R, DONG N, HUANG YL, et al. Evolution of tigecycline- and colistin-resistant CRKP (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*) *in vivo* and its persistence in the GI tract[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 127-139.
- [4] 方宝霞,陈富超,李开俊. 多西环素的不良反应与临床应用[J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(20): 4084-4085.
- [5] GROSSMAN TH. Tetracycline antibiotics and resistance [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(4): a025387.
- [6] SETIAWAN A, WIDODO ADW, ENDRASWARI PD. Comparison of ciprofloxacin, cotrimoxazole, and doxycycline on *Klebsiella pneumoniae*: time-kill curve analysis [J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2022, 84: 104841.
- [7] WHITE CR, JODLOWSKI TZ, ATKINS DT, et al. Successful doxycycline therapy in a patient with *Escherichia coli* and multi-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection [J]. *J Pharm Pract*, 2017, 30(4): 464-467.
- [8] 杜美霖,张艳霞. 下呼吸道感染采用不同抗生素方案治疗的药理学分析[J]. 黑龙江医药科学, 2023, 46(3): 125-126.
- [9] 刘庆元. 下呼吸道感染疾病采用不同抗生素方案治疗的药理学效果对比分析[J]. 世界复合医学, 2019, 5(7): 64-66.
- [10] ANDERSON KF, LONSWAY DR, RASHEED JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8): 2723-2725.
- [11] 曹玲,肖斌,陈丽丹,等. 碳青霉烯类药物联合用药治疗广泛耐药肺炎克雷伯菌的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(12): 1195-1200.
- [12] WANG X, WANG Q, CAO B, et al. Retrospective observational study from a Chinese network of the impact of combination therapy versus monotherapy on mortality from carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(1): e01511-e01518.
- [13] 胡付品,朱德妹. 医疗机构碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌感染防控指南简介[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 331-335.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. 2017, M100-S27.
- [15] ZHANG WX, GUO Y, YANG Y, et al. Study of *in vitro* synergistic bactericidal activity of dual β -lactam antibiotics against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Microb Drug Resist*, 2020, 26(3): 204-210.
- [16] SOPIRALA MM, MANGINO JE, GEBREYES WA, et al. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(11): 4678-4683.
- [17] SKARIYACHAN S, MUDDEBIHALKAR AG, BADRINATH V, et al. Natural epiestriol-16 act as potential lead molecule against prospective molecular targets of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*-Insight from *in silico* modelling and *in vitro* investigations [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 82: 104314.
- [18] XU ZB, LIANG YR, LIN SQ, et al. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification [J]. *Curr Microbiol*, 2016, 73(4): 474-482.
- [19] CHANDA W, JOSEPH TP, PADHIAR AA, et al. Combined effect of linolenic acid and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and quorum sensing [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 4328-4338.
- [20] 孟千琳,彭勤,凌保东. 抗菌药物联合中药单体对泛耐药鲍曼不动杆菌生物被膜的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2022,

- 47(7): 697 - 702.
- [21] 李晓冰, 何晓静, 徐辉, 等. 左氧氟沙星在肺炎克雷伯菌肺部感染小鼠体内的药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(7): 575 - 578.
- [22] CERCEO E, DEITELZWEIG SB, SHERMAN BM, *et al.* Multi-drug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options[J]. *Microb Drug Resist*, 2016, 22(5): 412 - 431.
- [23] 王明贵, X. Guan, L. He, 等. 广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制: 中国专家共识[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(1): 82 - 92.
- [24] 阙万才, 程昱, 赵志常, 等. 头孢他啶/阿维巴坦耐药肺炎克雷伯菌的体外抗菌药物治疗方案研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1502 - 1508.
- [25] 肖瑶. 夫西地酸联合多西环素对金黄色葡萄球菌的抗菌作用及防耐药突变选择窗的影响[D]. 江西: 宜春学院, 2019.
- [26] ANDERSON KF, LONSWAY DR, RASHEED JK, *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8): 2723 - 2725.
- [27] SINGH AK, YADAV S, CHAUHAN BS, *et al.* Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their *in vitro* biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 669.
- [28] MOHAMED SH, MOHAMED MSM, KHALIL MS, *et al.* Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Appl Microbiol*, 2018, 125(1): 84 - 95.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2023 - 09 - 18