

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20245121

· 论 著 ·

## $\beta$ -内酰胺酶抑制剂联合不同 $\beta$ -内酰胺类抗生素对耐多药结核分枝杆菌临床菌株体外活性研究

石 洁, 郑丹薇, 徐吉英, 马晓光, 苏茹月, 朱岩昆, 王少华, 常文静, 孙定勇

(河南省疾病预防控制中心结核病防治所结核病参比实验室, 河南 郑州 450016)

**[摘要]** 目的 体外评估 5 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素和不同  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂组合对耐多药结核分枝杆菌(MDR-TB)活性的影响,以期发现针对耐多药结核病最有效的  $\beta$ -内酰胺类抗生素和  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂组合。方法 选取 2021 年河南省耐药监测项目收集的 MDR-TB 菌株,使用最小抑菌浓度(MIC)法测定 5 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素或联合  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂对临床 MDR-TB 的 MIC 值,并采用聚合酶链式反应(PCR)和 DNA 测序法分析菌株的 *blaC* 突变情况。结果 共纳入 105 株 MDR-TB, MIC 检测结果显示,多尼培南对 MDR-TB 抗菌活性最高,其 MIC<sub>50</sub> 值为 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂联合后,大部分  $\beta$ -内酰胺类抗生素的 MIC 值明显下降。共有 13.33%(14 株)的菌株存在 *blaC* 基因的突变,主要为 3 种核苷酸替代突变,分别为 AGT333AGG、AAC638ACC、ATC786ATT。BlaC 蛋白 Ser111Arg 和 Asn213Thr 与同义单核苷酸突变相比,增强了克拉维酸/舒巴坦与美罗培南对 MDR-TB 的协同作用。结论 多尼培南和舒巴坦组合对 MDR-TB 具有最强的抗菌活性。而 BlaC 蛋白 Ser111Arg 和 Asn213Thr 的替代突变使 MDR-TB 对美罗培南的敏感性在克拉维酸/舒巴坦协同时增强。

**[关键词]** 结核分枝杆菌;  $\beta$ -内酰胺类;  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂; 耐多药结核分枝杆菌

**[中图分类号]** R969.3

## *In vitro* activity of $\beta$ -lactamase inhibitors combined with different $\beta$ -lactam antibiotics against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains

SHI Jie, ZHENG Dan-wei, XU Ji-ying, MA Xiao-guang, SU Ru-yue, ZHU Yan-kun, WANG Shao-hua, CHANG Wen-jing, SUN Ding-yong (Tuberculosis Reference Laboratory, Tuberculosis Prevention and Control Institute, Henan Province Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the *in vitro* effect of combinations of 5  $\beta$ -lactam antibiotics with different  $\beta$ -lactamase inhibitors on the activity of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB), and identify the most effective combination of  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase inhibitors against MDR-TB. **Methods** MDR-TB strains collected in Henan Province Antimicrobial Resistance Surveillance Project in 2021 were selected. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of 5  $\beta$ -lactam antibiotics or combinations with different  $\beta$ -lactamase inhibitors on clinically isolated MDR-TB strains were measured by MIC detection method, and the *blaC* mutation of the strains was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. **Results** A total of 105 strains of MDR-TB were included in the analysis. MIC detection results showed that doripenem had the highest antibacterial activity against MDR-TB, with a MIC<sub>50</sub> of 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . MIC values of most  $\beta$ -lactam antibiotics decreased significantly after combined with  $\beta$ -lactamase inhibitors. A total of 13.33% ( $n = 14$ ) strains had mutations in *blaC* gene, mainly 3 nu-

[收稿日期] 2023-12-06

[基金项目] 河南省自然科学基金项目(232300420290);河南省科技攻关项目(222102310726)

[作者简介] 石洁(1983-),女(回族),上海市人,副主任技师,主要从事结核病相关研究。

[通信作者] 孙定勇 E-mail: sundy2222@126.com

cleotide substitution mutations, namely AGT333AGG, AAC638ACC and ATC786ATT. BlaC proteins Ser111Arg and Asn213Thr enhanced the synergistic effect of clavulanic acid/sulbactam and meropenem on MDR-TB compared with synonymous single-nucleotide mutation. **Conclusion** The combination of doripenem and sulbactam has the strongest antibacterial activity against MDR-TB. Substitution mutations of BlaC protein Ser111Arg and Asn213Thr enhances the sensitivity of MDR-TB to meropenem through the synergy with clavulanic acid/sulbactam.

**[Key words]** *Mycobacterium tuberculosis*;  $\beta$ -lactam;  $\beta$ -lactamase inhibitor; multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

近年来,耐多药结核分枝杆菌(MDR-TB,即至少对利福平和异烟肼产生耐药)的出现成为结核病防治的主要障碍,增加了耐多药患者治疗失败的风险<sup>[1]</sup>。2023年世界卫生组织发布的《全球结核病报告》显示,2022年全球约有1 060万例结核病患者,其中有130万例死于结核病;2022年利福平耐药或耐多药患者数约41万例,其中造成16万例死亡<sup>[1-3]</sup>。MDR-TB对两种最重要的抗结核药物产生了耐药性,增加了耐多药结核病患者治疗失败的风险<sup>[4]</sup>。

$\beta$ -内酰胺类抗生素对革兰阳性菌和革兰阴性菌均有良好的杀菌活性<sup>[5]</sup>,但结核分枝杆菌由于存在由染色体基因 *blaC* 所编码的高活性  $\beta$ -内酰胺酶(BlaC),对这类药物中大部分具有天然耐受性<sup>[6]</sup>。BlaC属于Ambler分子结构分类中A类 $\beta$ -内酰胺酶,其对临床中大部分 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂,包括克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦敏感<sup>[7]</sup>。因此,将 $\beta$ -内酰胺类抗生素和 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂联合使用可克服结核分枝杆菌对其耐药性。阿莫西林和克拉维酸被世界卫生组织认定为第五组抗结核药物<sup>[8]</sup>,但其在耐多药及广泛耐药结核病患者中的临床治疗数据有限。

目前国内关于 $\beta$ -内酰胺类抗生素联合 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂对结核分枝杆菌尤其是MDR-TB作用的研究较少。有研究<sup>[9]</sup>使用结核分枝杆菌临床分离菌株评估克拉维酸和阿维巴坦、舒巴坦对 $\beta$ -内酰胺类抗生素的协同作用,但对这些药物在耐多药菌株中的效果尚未有研究进行评估。本研究团队在之前的研究<sup>[10]</sup>中比较了克拉维酸和2种新型的 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂阿维巴坦及他唑巴坦的协同作用,但对目前临床中常用的 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂(克拉维酸、他唑巴坦和舒巴坦)未做评价。因此,在本研究中选择不同类型的5种 $\beta$ -内酰胺类抗生素和3种临床常用的 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂,采用肉汤稀释方法评估 $\beta$ -内酰胺类抗生素与 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂对MDR-TB在体外的杀菌活性,为耐多药结核患者的临床治疗提供更多实验室证据。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源及药物敏感试验 选取2021年河南省耐药监测项目收集的MDR-TB菌株。本研究经河南省疾病预防控制中心医学伦理委员会审核通过。使用比例法对酸性罗氏培养基上培养阳性的菌株进行异烟肼、利福平、乙胺丁醇、链霉素、卡那霉素、阿米卡星、卷曲霉素及氧氟沙星药敏试验<sup>[11]</sup>。同时使用含有对硝基苯甲酸(PNB)和2-噻吩羧酸肼(TCH)的罗氏培养基对菌株进行分枝杆菌种属鉴定。

1.2  $\beta$ -内酰胺类抗生素及 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂 共选用5种 $\beta$ -内酰胺类抗生素和3种 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂进行最小抑菌浓度(MIC)的测定。5种 $\beta$ -内酰胺类抗生素分别为阿莫西林、亚胺培南、美罗培南、多尼培南、比阿培南;3种 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂为克拉维酸、他唑巴坦和舒巴坦,均订购于美国APEXbio公司。使用微孔板 alamarBlue 显色法测定 $\beta$ -内酰胺类抗生素的MIC值<sup>[12]</sup>。首先在96孔板加样孔中加入100  $\mu$ L含有不同浓度的 $\beta$ -内酰胺类抗生素和 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的7H9液体培养基。其中 $\beta$ -内酰胺类抗生素按列倍比稀释,最后一列的加样孔不加入 $\beta$ -内酰胺类抗生素。从培养4周的罗氏培养基上刮取菌落至含0.5%吐温-20的生理盐水中,将菌悬液浊度调整至1麦氏单位。然后将1麦氏单位的菌悬液使用含有10% OADC的Middlebrook 7H9液体培养基稀释20倍,取100  $\mu$ L加入含有不同药物组合的96孔板检测孔中。最终 $\beta$ -内酰胺类抗生素的浓度为0.5~512  $\mu$ g/mL。将96孔板用parafilm密封后,放至37℃培养10 d后,每孔加入20  $\mu$ L alamarBlue和50  $\mu$ L 5%的吐温-80,继续孵育24 h,根据加样孔颜色变化判读结果。如果加样孔颜色由蓝色变为粉色则指示有细菌生长,如果加样孔颜色不改变则指示该孔中的药物抑制结核分枝杆菌生长。将每行中未发生颜色变化检测孔的最小药物浓度记录为MIC值。每个样本做2次平行

试验以观察结果一致性。

MIC 下降比值是指加入 β-内酰胺酶抑制剂的 MIC/单独 β-内酰胺类抗生素的 MIC<sup>[7]</sup>。MIC 下降比值 ≤ 0.25 定义为具有协同作用,且进一步比较不同抑制剂对内酰胺类抗生素的影响<sup>[7]</sup>。

1.3 菌株基因组的提取及基因测序 使用煮沸法进行结核分枝杆菌基因组 DNA 的提取。刮取一环新鲜培养的菌落至含有 200 μL TE 缓存液的 1.5 mL 离心管中,100 °C 加热灭活并 13 200 r/min 离心 10 min 后,取上清液用于后续 PCR 扩增。

对 *blaC* 基因进行 PCR 扩增<sup>[9]</sup>,扩增引物序列分别为 *blaC*-3'-ATGCGCAACAGAGGATTCGGTC、*blaC*-5'-CTATGCAAGCACACCGGCAACG。PCR 产物送至上海生工有限公司进行测序。使用 DNAMAN 软件将测序结果与标准菌株 H37Rv 参考序列进行比对。

## 2 结果

### 2.1 不同 β-内酰胺酶抑制剂最佳抑菌浓度的确定

共纳入 105 株 MDR-TB,药敏结果见表 1。为确定不同 β-内酰胺酶抑制剂最佳抑菌浓度,首先纳入 7 株 MDR-TB 评估不同 β-内酰胺类抗生素的 MIC,以及这些抗生素在加入 4 种不同浓度 β-内酰胺酶抑制剂(分别为 2.5、5、10 μg/mL)后 MIC 的改善情况。随着 β-内酰胺酶抑制剂浓度的上升,MDR-TB 菌株对比阿培南和多尼培南的 MIC 值明显下降。但 β-内酰胺酶抑制剂浓度为 5、10 μg/mL 时两组间 β-内酰胺类抗生素的 MIC 值差别不大,因此,在后续的试验组别中使用 5 μg/mL 的 β-内酰胺酶抑制

剂,见表 2。

表 1 105 株 MDR-TB 常规药敏试验结果

Table 1 Routine drug susceptibility testing results of 105 MDR-TB strains

抗菌药物	耐药株数	耐药率 (%)
INH + RFP	17	16.19
INH + RFP + EMB	7	6.67
INH + RFP + SM	15	14.29
INH + RFP + EMB + SM	18	17.14
INH + RFP + SM + PAS	2	1.90
INH + RFP + SM + CPM	5	4.76
INH + RFP + EMB + SM + KM	5	4.76
INH + RFP + OFX + LFX	6	5.71
INH + RFP + OFX	1	0.95
INH + RFP + EMB + OFX + LFX	4	3.81
INH + RFP + EMB + SM + OFX + LFX	5	4.76
INH + RFP + EMB + SM + OFX + LFX + KM	11	10.48
INH + RFP + EMB + SM + OFX + LFX + CPM	9	8.57

注:INH 为异烟肼,RFP 为利福平,EMB 为乙胺丁醇,SM 为链霉素,PAS 为对氨基水杨酸,CPM 为卷曲霉素,KM 为卡那霉素,OFX 为氧氟沙星,LFX 为左氧氟沙星。

2.2 联合使用克拉维酸时耐多药菌株对 β-内酰胺类抗生素的敏感性 5 种 β-内酰胺类抗生素中,多尼培南和比阿培南对 MDR-TB 的抗菌活性最佳,且多尼培南优于比阿培南;而亚胺培南和阿莫西林的抗菌活性最差。克拉维酸与多尼培南和比阿培南显示出较好的协同作用,而对亚胺培南和阿莫西林 MIC 值的影响较小,尤其是阿莫西林。见表 2。

表 2 β-内酰胺类抗生素单独及与克拉维酸联合对 MDR-TB 的药敏试验结果

Table 2 Drug susceptibility testing results of β-lactam antibiotics alone and in combination with clavulanic acid against MDR-TB

抗生素	MIC <sub>50</sub> (μg/mL)		MIC <sub>90</sub> (μg/mL)		不同 MIC 下降比值对应的菌株数 (n = 105)					
	单独	联合	单独	联合	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031
阿莫西林	256	128	512	256	47	35	23	0	0	0
比阿培南	32	16	64	32	12	21	47	17	5	3
美罗培南	32	16	128	64	29	34	29	8	5	0
亚胺培南	128	64	512	128	31	38	28	8	0	0
多尼培南	16	8	64	16	15	28	30	15	14	3

2.3 联合他唑巴坦时耐多药菌株对  $\beta$ -内酰胺类抗生素的敏感性 在 3 种  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂中,他唑巴坦对  $\beta$ -内酰胺类抗生素的协同作用相对较差,和  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合后 MIC<sub>50</sub> 值高于其他抑制

剂。与克拉维酸结果相似,加入他唑巴坦后 MDR-TB 菌株对比阿培南和多尼培南 MIC 值的变化较为明显,对阿莫西林和亚胺培南的 MIC 值影响较小,尤其是亚胺培南。见表 3。

表 3  $\beta$ -内酰胺类抗生素单独及与他唑巴坦联合对 MDR-TB 的药敏试验结果

Table 3 Drug susceptibility testing results of  $\beta$ -lactam antibiotics alone and in combination with tazobactam against MDR-TB

抗生素	MIC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)		MIC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)		不同 MIC 下降比值对应的菌株数 (n = 105)					
	单独	联合	单独	联合	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031
阿莫西林	256	64	512	256	44	34	24	3	0	0
比阿培南	32	16	64	32	15	25	43	16	4	2
美罗培南	32	16	128	128	42	32	25	6	0	0
亚胺培南	128	128	512	512	65	30	10	0	0	0
多尼培南	16	8	64	32	18	28	42	12	4	1

2.4 联合使用舒巴坦时耐多药菌株对  $\beta$ -内酰胺类抗生素的敏感性 在 3 种  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂中,舒巴坦对  $\beta$ -内酰胺类抗生素的协同作用最好。在 5 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素中,舒巴坦对阿莫西林、比阿培

南、美罗培南和多尼培南的协同作用较好,尤其是对多尼培南最佳。与其他 2 种抑制剂相似,舒巴坦对亚胺培南的协同作用最差。见表 4。

表 4  $\beta$ -内酰胺类抗生素单独及与舒巴坦联合对 MDR-TB 的药敏试验结果

Table 4 Drug susceptibility testing results of  $\beta$ -lactam antibiotics alone and in combination with sulbactam against MDR-TB

抗生素	MIC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)		MIC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)		不同 MIC 下降比值对应的菌株数 (n = 105)					
	单独	联合	单独	联合	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031
阿莫西林	256	32	512	128	34	40	20	7	4	0
比阿培南	32	8	64	16	8	16	31	33	15	2
美罗培南	32	8	128	32	19	23	33	18	12	0
亚胺培南	128	64	512	512	43	42	20	0	0	0
多尼培南	16	4	64	16	11	15	26	26	20	7

2.5  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂对 5 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素协同作用比较 对阿莫西林而言,联合舒巴坦后有 31 株 (29.52%) MDR-TB 菌株发生协同作用,高于联合克拉维酸 (23 株, 21.90%) 和他唑巴坦 (27 株, 25.71%)。对于美罗培南,发生协同作用顺序为舒巴坦 > 克拉维酸 > 他唑巴坦。与阿莫西林和美罗培南相似,比阿培南 (77.14%) 和多尼培南 (75.23%) 与舒巴坦组合与其他两组药物组合相比显示出更明显的协同作用;并且对于多尼培南,27 株菌的 MIC 值下降 94% 以上。对亚胺培南而言,尽管仅有 36 株 (34.28%) 菌株在加入克拉维酸后发生了协同作用,与他唑巴坦 (9.52%) 和舒巴坦 (19.05%) 相比,

克拉维酸被认为是与亚胺培南联合对 MDR-TB 最有效的  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂。见表 5。

2.6 协同效应与 *blaC* 基因突变的相关性研究 共有 13.33% (14 株) 的 MDR-TB 菌株存在 *blaC* 基因突变,主要为 3 种核苷酸替代突变, AGT333AGG、AAC638ACC 和 ATC786ATT。其中发生最多的是 ATC786ATT 位点的同义突变,有 6 株菌发生该位点的突变,并且该位点的突变为同义突变,未引起氨基酸的改变。此外,有 5 株菌发生 AAC638ACC 突变导致 213 位 Asn 突变为 Thr,有 3 株菌发生 AGT333AGG 突变导致 111 位 Ser 突变为 Arg。由于 105 株 MDR-TB 中存在 *blaC* 的同义突变,以 ATC786ATT 同义

**表 5** 不同的  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂与  $\beta$ -内酰胺类抗生素对 105 株 MDR-TB 联合药敏协同作用情况(株)**Table 5** Synergistic effects of combinations of different  $\beta$ -lactamase inhibitors with  $\beta$ -lactam antibiotics against 105 strains of MDR-TB (No. of isolates)

抗生素	克拉维酸	他唑巴坦	舒巴坦
阿莫西林	23	27	31
比阿培南	72	65	81
美罗培南	42	31	63
亚胺培南	36	10	20
多尼培南	62	59	79

**表 6** MDR-TB *blaC* 基因突变株  $\beta$ -内酰胺类抗生素/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂联合药敏 MIC 下降比值**Table 6** MDR-TB *blaC* gene mutation strains and decreased MIC ratios of  $\beta$ -lactam antibiotics/ $\beta$ -lactamase inhibitors combination

核苷酸突变	氨基酸突变	菌株数	$\beta$ -内酰胺酶抑制剂		
			克拉维酸/阿莫西林	克拉维酸/美罗培南	舒巴坦/美罗培南
T333G	Ser111Arg	3	0.25~0.5	0.125~0.25	0.063~0.125
A638C	Asn213Thr	5	0.5~1	0.063~0.125	0.125~0.25
C786T	Ile262Ile	6	1	0.5~1	0.25~1

### 3 讨论

研究<sup>[12-15]</sup>表明, $\beta$ -内酰胺酶抑制剂可增强  $\beta$ -内酰胺类抗生素对结核分枝杆菌的抗菌活性。本研究对比青霉素类药物阿莫西林和 4 种不同碳青霉烯类抗生素对 MDR-TB 的抗菌活性,结果表明不同  $\beta$ -内酰胺类抗生素 +  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂组合抗菌效果存在明显差异。与阿莫西林相比,碳青霉烯类抗生素单独或联合  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂对耐多药菌株活性更强。与 Horita 等<sup>[16]</sup>研究表明结核分枝杆菌临床分离株对碳青霉烯类抗生素 +  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂组合更敏感的结果一致。与青霉素类相比,碳青霉烯类抗生素对  $\beta$ -内酰胺酶水解作用具有更强的耐受性,因此与  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂联合后能更好地提高其杀菌活性。

此外,不同碳青霉烯类抗生素的杀菌活性也存在一定差异。本研究使用的 4 种碳青霉烯类抗生素中,多尼培南和比阿培南对 MDR-TB 的抗菌活性较好,其次是美罗培南,亚胺培南的抗菌活性最差,与之前的研究<sup>[17]</sup>结果一致。碳青霉烯类抗生素对耐多药菌株杀菌活性的差异可能与 Ambler A 类  $\beta$ -内酰胺酶 *BlaC* 的作用机制相关。多尼培南或美罗培南比亚胺培南对 *BlaC* 水解作用更加耐受,造成结核分枝

杆菌对美罗培南敏感性相对较强<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>表明,在培养基中加入美罗培南能较好地抑制细胞壁合成,从而增强细菌包膜渗透性。因此,美罗培南的加入可提高结核分枝杆菌对碳青霉烯类抗生素和其他抗菌药物的敏感性。研究显示,美罗培南和阿莫西林与克拉维酸之间存在协同作用<sup>[20]</sup>。

联合使用  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂解决了细菌对  $\beta$ -内酰胺酶的耐药性问题。研究<sup>[21]</sup>表明, $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的抗菌活性显示出物种差异性,与其在体内的类型和三维结构有关。研究<sup>[9]</sup>使用结核分枝杆菌临床分离菌株评估克拉维酸和阿维巴坦、舒巴坦对  $\beta$ -内酰胺类抗生素协同作用,泰比培南与克拉维酸联合显示出最强的抗菌活性。本研究发现舒巴坦与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合后,较克拉维酸和他唑巴坦联合  $\beta$ -内酰胺类抗生素对 MDR-TB 显示出更好的抗菌效果。Horita 等<sup>[16]</sup>研究表明,舒巴坦与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合后较克拉维酸联合  $\beta$ -内酰胺类抗生素具有更高的抗菌活性。分析原因,一方面由于本研究使用肉汤稀释法测定 MIC 值,需要 7 d 才能判读结果,而克拉维酸的半衰期为 1.4 d,明显低于舒巴坦 7 d 的半衰期<sup>[22]</sup>。因此,由于克拉维酸的相对不稳定性导致在药物作用过程活性药物损失,从而限制了对结核分枝杆菌的抗菌协同作用。另一方面,体内试验表明  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂通过提高细胞膜的

渗透性,增强了  $\beta$ -内酰胺类抗生素的抗菌活性<sup>[23]</sup>。由于克拉维酸与舒巴坦相比疏水性差,可能使其更难穿透结核分枝杆菌外表面较厚的脂质层,降低其抑菌能力。

本研究进一步分析 *blaC* 基因突变与  $\beta$ -内酰胺类抗生素/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂协同作用的关系。105 株 MDR-TB 中分别有 14 株 *blaC* 基因发生碱基突变,包含 2 种错义突变,有 6 株菌在 262 位 Ile 发生了同义突变。以同义突变作对照,BlaC 蛋白 Ser111Arg 突变明显增强克拉维酸对美罗培南和阿莫西林对 MDR-TB 菌株协同作用,同时也增强了舒巴坦对美罗培南的协同作用。BlaC 蛋白 Asn213Thr 突变只增强克拉维酸或舒巴坦存在时菌株对美罗培南的敏感性。对野生型 BlaC 蛋白进行结构分析,显示 213 位天冬酰胺和 111 位丝氨酸均位于 BlaC 与  $\beta$ -内酰胺类抗生素/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂结合基序附近,该基序包含结核分枝杆菌 BlaC 蛋白的 R220、A244、S130 和 T237 氨基酸<sup>[24]</sup>。但是并没有直接生化证据表明 111 位丝氨酸和 213 位天冬酰胺作为羧酸结合区域的一部分参与底物结合,仍需要进一步进行分子结构分析为结核分枝杆菌 BlaC 蛋白结合位点提供新的见解。

本研究也存在一定的局限性,研究主要在体外观察几种常见的  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂对 MDR-TB 菌株中  $\beta$ -内酰胺类抗生素的协同作用,并未进行体内试验和临床试验。而动物试验和临床试验可以更全面地揭示药物相互作用的实际效果。因此,未来需要进行更多的体内试验和临床试验来验证本研究结果。此外, $\beta$ -内酰胺类抗生素的抗结核疗效可能不如目前 A 类(氟喹诺酮类、贝达喹啉、利奈唑胺)、B 类(氯法齐明、环丝氨酸)药物方案,而且大部分为注射剂型药物,可能对患者依从性带来一定影响,也影响该类药物的临床应用。

总之,本研究表明多尼培南和舒巴坦对 MDR-TB 具有最佳的抗菌活性,而亚胺培南联合使用  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂时对 MDR-TB 作用有限。此外 BlaC 蛋白在 111 位 Ser 至 Arg 的突变将影响菌株对美罗培南的敏感性。下一步研究迫切需要评估多尼培南/舒巴坦在临床实践中对耐多药结核病的潜在应用。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参 考 文 献]

- [1] Orenstein EW, Basu S, Shah NS, et al. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and Meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(3): 153-161.
- [2] Migliori GB, Centis R, D'Ambrosio L, et al. Totally drug-resistant and extremely drug-resistant tuberculosis: the same disease?[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(9): 1379-1380.
- [3] Zhao YL, Xu SF, Wang LX, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. N Engl J Med, 2012, 366(23): 2161-2170.
- [4] Bagcchi S. WHO's global tuberculosis report 2022[J]. Lancet Microbe, 2023, 4(1): e20.
- [5] Davies Forsman L, Giske CG, Bruchfeld J, et al. Meropenem-clavulanic acid has high *in vitro* activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(6): 3630-3632.
- [6] Gonzalo X, Bielecka MK, Tezera L, et al. Anti-tuberculosis activity of three carbapenems, clofazimine and nitazoxanide using a novel *ex vivo* phenotypic drug susceptibility model of human tuberculosis[J]. Antibiotics (Basel), 2022, 11(10): 1274.
- [7] Zhang D, Wang YF, Lu J, et al. *In vitro* activity of  $\beta$ -lactams in combination with  $\beta$ -lactamase inhibitors against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 60(1): 393-399.
- [8] Dooley KE, Obuku EA, Durakovic N, et al. World Health Organization group 5 drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis: unclear efficacy or untapped potential?[J]. J Infect Dis, 2013, 207(9): 1352-1358.
- [9] Li F, Wan L, Xiao TY, et al. *In vitro* activity of  $\beta$ -lactams in combination with  $\beta$ -lactamase inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 3579832.
- [10] 石洁, 郑丹薇, 马晓光, 等.  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂阿维巴坦和瑞来巴坦联合不同  $\beta$ -内酰胺类药物对耐多药结核分枝杆菌体外活性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2023, 46(8): 797-805.
- [11] Shi J, Zheng DW, Ma XG, et al. *In vitro* activity of  $\beta$ -lactamase inhibitors avibanctam and relebactam in combination with  $\beta$ -lactams against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and mutations of resistance genes[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2023, 46(8): 797-805.
- [12] Shi J, Zheng DW, Zhu YK, et al. Role of MIRU-VNTR and spoligotyping in assessing the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Henan Province, China[J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1): 447.

- [12] Li GL, Xu ZQ, Jiang Y, et al. Synergistic activities of clofazimine with moxifloxacin or capreomycin against *Mycobacterium tuberculosis* in China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2019, 54(5): 642–646.
- [13] Gupta R, Al-Kharji NMSA, Alqurafi MA, et al. Atypically modified carbapenem antibiotics display improved antimycobacterial activity in the absence of  $\beta$ -lactamase inhibitors[J]. ACS Infect Dis, 2021, 7(8): 2425–2436.
- [14] Fisher JF, Mobashery S.  $\beta$ -lactam resistance mechanisms: Gram-positive bacteria and *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016, 6(5): a025221.
- [15] Solapure S, Dinesh N, Shandil R, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of  $\beta$ -lactams against replicating and slowly growing/nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(6): 2506–2510.
- [16] Horita Y, Maeda S, Kazumi Y, et al. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to an oral carbapenem alone or in combination with  $\beta$ -lactamase inhibitors[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(11): 7010–7014.
- [17] Wang XH, Zhang XK, Zong ZY, et al. Biapenem versus meropenem in the treatment of bacterial infections: a multicenter, randomized, controlled clinical trial[J]. Indian J Med Res, 2013, 138(6): 995–1002.
- [18] Tremblay LW, Fan F, Blanchard JS. Biochemical and structural characterization of *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase with the carbapenems ertapenem and doripenem[J]. Biochemistry, 2010, 49(17): 3766–3773.
- [19] Gokulan K, Khare S, Cerniglia CE, et al. Structure and inhibitor specificity of L, D-Transpeptidase (LdtMt2) from *Mycobacterium tuberculosis* and antibiotic resistance: calcium binding promotes dimer formation[J]. AAPS J, 2018, 20(2): 44.
- [20] Gonzalo X, Drobniewski F. Is there a place for  $\beta$ -lactams in the treatment of multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis? Synergy between meropenem and amoxicillin/clavulanate[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(2): 366–369.
- [21] Kudinha T, Kong FR. Possible step-up in prevalence for *Escherichia coli* ST 131 from fecal to clinical isolates: inferred virulence potential comparative studies within phylogenetic group B2[J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 78.
- [22] Montaner M, Lopez-Argüello S, Oliver A, et al. PBP target profiling by  $\beta$ -lactam and  $\beta$ -lactamase inhibitors in intact *Pseudomonas aeruginosa*: effects of the intrinsic and acquired resistance determinants on the periplasmic drug availability [J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(1): e0303822.
- [23] Kazakova O, Racoviceanu R, Petrova A, et al. New investigations with lupane type A-ring azepane triterpenoids for antimycobacterial drug candidate design[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12542.
- [24] DeLoney CR, Schiller NL. Competition of various beta-lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(11): 2702–2709.

(本文编辑:曾翠、陈玉华)

**本文引用格式:**石洁,郑丹薇,徐吉英,等.  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂联合不同  $\beta$ -内酰胺类抗生素对耐多药结核分枝杆菌临床菌株体外活性研究[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(9): 1091–1097. DOI: 10.12138/j. issn. 1671–9638. 20245121.

**Cite this article as:** SHI Jie, ZHENG Dan-wei, XU Ji-ying, et al. *In vitro* activity of  $\beta$ -lactamase inhibitors combined with different  $\beta$ -lactam antibiotics against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains [J]. Chin J Infect Control, 2024, 23(9): 1091–1097. DOI: 10.12138/j. issn. 1671–9638. 20245121.