# 特地唑胺对耐甲氧西林表皮葡萄球菌植入物相关性骨髓炎的治疗效果研究[Δ]

娄方练[*],郑周海[#],付福建(重庆市南川区人民医院骨科,重庆 408400)

中图分类号 R978.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)04-0420-04
DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.04.009

**摘 要** 目的:通过构建耐甲氧西林表皮葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE)植入物相关性骨髓炎大鼠模型,观察特地唑胺对MRSE相关性骨髓炎的治疗效果。方法:将预先定植MRSE生物膜的不锈钢丝植入大鼠的胫骨近端,感染1周后将94只大鼠随机分为6组,分别为对照组($n$=18)、特地唑胺治疗组($n$=16)、特地唑胺-利福平联合治疗组($n$=15)、利福平治疗组($n$=15)、万古霉素-利福平联合治疗组($n$=15)以及万古霉素治疗组($n$=15)。在建模感染后1周后以及治疗完成后,分别对每组中的5只大鼠进行骨和钢丝的细菌定量培养以及骨组织的苏木精-伊红染色。结果:感染1周后,胫骨培养的葡萄球菌中位数为4.89 lg CFU/g[四分位数间距为(3.83~5.33)lg CFU/g],并且每组大鼠的植入钢丝均检出葡萄球菌。药物治疗3周后,骨培养的葡萄球菌的中位数为3.70 lg CFU/g。除单用万古霉素治疗组(2.78 lg CFU/g)外,所有治疗组大鼠骨内葡萄球菌数量均显著低于未治疗组,利福平治疗组、特地唑胺-利福平联合治疗组以及万古霉素-利福平联合治疗组均未检测到葡萄球菌。结论:MRSE植入物相关性骨髓炎大鼠模型对利福平、特地唑胺及万古霉素敏感。特地唑胺联合利福平在MRSE外源性骨髓炎大鼠模型中具有较好的治疗作用。

**关键词** 特地唑胺;骨髓炎;耐甲氧西林表皮葡萄球菌

## Therapeutic Effects of Terazolamide on Methicillin-Resistant Staphylococcus Epidermidis Implant Associated Osteomyelitis[Δ]

LOU Fanglian, ZHENG Zhouhai, FU Fujian (Dept. of Orthopedic, Chongqing Nanchuan District People's Hospital, Chongqing 408400, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To observe the therapeutic effects of terdizolamide on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) implant associated osteomyelitis by establishing a rat model of MRSE associated osteomyelitis. METHODS: The stainless-steel wire prefixed with MRSE biofilm was implanted into the proximal tibia of rats. One week after infection, 94 rats were randomly divided into the control group ($n$=18), terdizolamide treatment group ($n$=16), terdizolamide combined with rifampicin treatment group ($n$=15), rifampicin treatment group ($n$=15), vancomycin combined with rifampicin treatment group (n=15) and vancomycin treatment group ($n$=15). One week after modeling infection and after completion of treatment, quantitative bacterial culture of bone and steel wire and HE staining of bone tissues of 5 rats in each group were performed respectively. RESULTS: One week after infection, the median number of *Staphylococcus* cultured on tibia was 4.89 lg CFU/g [interquartile range (from 3.83 to 5.33) lg CFU/g], and *Staphylococcus* were detected in the implanted steel wires of each group of rats. After three weeks of drug treatment, the median of *Staphylococcus* cultured on bone was 3.70 lg CFU/g. Except for vancomycin treatment group (2.78 lg CFU/g), the number of *Staphylococcus* on bone in all treatment groups were significantly lower than those in the untreated group. No *Staphylococcus* was detected in the rifampicin treatment group, terdizolamide combined with rifampicin treatment group and vancomycin combined with rifampicin treatment group. CONCLUSIONS: The rat model of MRSE implant associated osteomyelitis is sensitive to rifampicin, terazolamide and vancomycin. Tedizolamide combined with rifampicin has better therapeutic effects in the MRSE exogenous osteomyelitis rat model.

**KEYWORDS** Terazolamide; Osteomyelitis; Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*

>50%的慢性和恶性感染由革兰阳性葡萄球菌引起,其中以金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌最为常见[1]。在美国和欧洲,引起假体关节感染的凝固酶阴性葡萄球菌中,>80%的菌株对甲氧西林耐药;慢性细菌的感染过程中常涉及生物膜的形成[2-3],并且生物膜内微环境的改变会影响药物的抗菌作用,因此,临床上由耐甲氧西林表皮葡萄球菌(methicillin-

Δ 基金项目:重庆市卫生和计划委员会(No. 2018ZBXM011)
* 主治医师。研究方向:脊柱、创伤、骨感染。E-mail:15266939@qq.com
# 通信作者:副主任医师。研究方向:脊柱、创伤。E-mail:524265121@qq.com

resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE)引起的植入物相关感染治疗困难,抗菌药物疗效局限,通常需要移除所有的假体或充分清创才能得以痊愈[4-5]。针对 MRSE 相关性植入物导致的骨髓炎需要安全有效的抗菌方案。

目前,万古霉素是 MRSE 感染的首选治疗药物,但由于针对 MRSE 的万古霉素最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC)相对较高,一些研究结果认为对于 MRSE,万古霉素具有潜在毒性和有限的杀菌作用[6-7]。利福平在生物膜相关感染中的治疗效果明显,但针对耐药菌的治疗仍具有风险,因此不作为单一药物进行使用。特地唑胺是噁唑烷酮类抗菌药物,经美国食品药品监督管理局批准用于急性细菌性皮肤及皮肤结构感染的治疗,并且其对耐甲氧西林葡萄球菌具有更强的作用[8-9]。但目前尚无针对特地唑胺治疗 MRSE 植入物相关性骨髓炎的具体研究,因此,本研究利用 MRSE 菌株建立了骨髓炎大鼠模型,将特地唑胺单药、特地唑胺联合利福平、利福平单药、万古霉素单药以及万古霉素联合利福平的治疗效果进行比较,现报告如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

RM2235 型手动轮转式切片(Leica 公司);BX41 型光学显微镜(Olympus 公司);DS-Ril 型生物数码显微镜(Nikon 公司)。

### 1.2 MRSE 菌株及实验动物

MRSE 菌株:研究所涉及到的 MRSE 菌株最初是从恢复期的假体周围感染患者获取。实验动物:雄性大鼠 94 只,体重 250~350 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号为 SCXK(沪)2012-0002。本研究相关内容获得了医院动物伦理委员会的批准。

### 1.3 药品与试剂

注射用盐酸万古霉素(批准文号为国药准字 H20084268,规格为 0.5 g)购自重庆莱美药业股份有限公司;注射用磷酸特地唑胺(CAS 号:856867-55-5)购自美国 Merck 公司;利福平注射液[批准文号为国药准字 H20050725,规格为 5 ml∶0.3 g(以利福平计)]购自沈阳双鼎制药有限公司。0.9%氯化钠溶液购自广州珠江制药厂。

## 2 方法

### 2.1 动物模型的建立

采用体重 250~350 g 的雄性大鼠 94 只建立实验性植入物相关性骨髓炎模型。首先,腹腔注射氯胺酮(60 mg/kg)和甲苯噻嗪(6 mg/kg)进行全身麻醉之后,剃光大鼠左腿毛发,手术暴露左腿胫骨近端 1/3,髓腔内钻取 1.5 mm 直径孔。在 0.9%氯化钠溶液中加入硬化剂、花生四烯酸钠盐并注入髓腔。将 $10^8$ CFU/ml MRSE 悬液 100 μl 注射至骨髓中。预先准备直径 5 mm、长度 1 mm 的不锈钢丝,浸泡于 MRSE 和色氨酸酶大豆肉汤混合的悬浮液 1 ml 中,37 ℃环境下孵育 2 h,使其形成生物膜,并将带有生物膜的金属丝植入骨髓腔内。以石膏覆盖孔口,用缝合线缝合筋膜和皮肤,并在伤口上喷洒杀菌剂。皮下注射缓释丁丙诺啡(0.05 mg/kg)止痛。为验证模型是否成功,于感染 1 周后取 5 只大鼠进行定量骨和钢丝的细菌培养。

### 2.2 分组

确定感染后,94 只动物开始接受不同的药物治疗。动物随机分为 6 组:对照组(18 例)、特地唑胺治疗组(16 例)、特地唑胺-利福平联合治疗组(15 例)、利福平治疗组(15 例)、万古霉素治疗组(15 例)以及万古霉素-利福平联合治疗组(15 例)。选择合适的剂量模拟上述人体 MIC 浓度。不同药物的给药剂量和方法如下:特地唑胺 30 mg/kg,1 日 1 次;利福平 25 mg/kg,1 日 2 次;万古霉素 50 mg/kg,1 日 2 次;上述药物均为腹腔注射,连续治疗 14 d。

治疗结束后 24 h 处死大鼠。无菌条件下取出左侧胫骨,如果需要培养,则冷冻于-80 ℃环境中。每组取 1 只大鼠胫骨进行组织病理学评价。在植入钢丝的 5 mm 范围内切割和粉碎骨头、称重,并对不锈钢丝进行无菌处理。将粉碎的骨头和钢丝分别悬浮于胰蛋白胨大豆肉汤 2 ml 中,涡旋 30 s,40 kHz 下超声 5 min。进行定量骨和钢丝细菌培养。如果在定量培养过程中没有细菌生长,则在剩余的 2 ml 肉汤中加入无菌胰蛋白胨大豆肉汤 8 ml,37 ℃下孵育 48 h,进行定性培养。对于有生长迹象的肉汤,进行传代,以确定存在 MRSE。

### 2.3 抗菌药物的 MIC 测定

对于治疗后从骨或钢丝上恢复的 MRSE,使用定量培养板上的 3 个菌落测定特地唑胺、利福平或万古霉素的 MIC。采用琼脂稀释法测定生物膜测定最低生物膜抑菌浓度(MBIC)和最低生物膜杀菌浓度(MBBC),具体方法如下:将不同浓度剂量的抗菌药物稀释后加入融化并冷却至约 50 ℃的琼脂中,制成不同药物浓度梯度的平板并接种获取的 MRSE 菌种,孵育后观察细菌生长情况,测定 MBIC 和 MBBC。

### 2.4 组织病理学检查

每组随机抽取 1 只大鼠取下的胫骨,在 10%甲醛中固定 2 d,在 5%硝酸溶液中脱钙。胫骨纵切成两半,石蜡包埋,顶部有髓腔表面,纵切,然后进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin,HE)染色。观察成骨细胞数量,骨重建形成和骨破坏情况,以及炎症细胞浸润程度。

### 2.5 统计学方法

使用 SAS 9.4 软件进行数据分析,以骨(g)或钢丝($cm^2$)表面葡萄球菌数目(以 lg CFU 表示)的中位数和四分位数间距(IQR)进行统计学描述;使用 Kruskal-Wallis 检验比较各组细菌数量差异,进一步采用威尔科克森秩和检验进行对照组与 5 个治疗组的组间比较;$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各药的 MIC、MBIC 以及 MBBC

各药针对 MRSE 的 MIC:万古霉素为 2 μg/ml,利福平≤0.015 μg/ml,特地唑胺为 0.5 μg/ml。各药针对 MRSE 的 MBIC:万古霉素为 2 μg/ml,利福平为 0.001 μg/ml,特地唑胺为 2 μg/ml。各药针对 MRSE 的 MBBC:万古霉素为 128 μg/ml,利福平为 2 μg/ml,特地唑胺为 32 μg/ml。

### 3.2 实验性骨髓炎大鼠模型的构建及药物治疗效果评估

建模 1 周后检测大鼠骨组织中 MRES 的细菌数量，中位细菌数量为 4.89 lg CFU/g[IQR 为(3.83~5.33)lg CFU/g]，并且所有钢丝表面均检测到 MRSE。经药物治疗后再次对骨组织进行细菌的定量培养，结果见图 1(A)。对照组的 MRSE 细菌数量为 3.70 lg CFU/g [IQR 为(0.5~4.29)lg CFU/g]，特地唑胺组为 0.50 lg CFU/g[IQR 为(0.1~2.68)lg CFU/g]，万古霉素组为 2.78 lg CFU/g [IQR 为(0.50~3.64)lg CFU/g]。利福平治疗组、特地唑胺-利福平联合治疗组及万古霉素-利福平联合治疗组的骨组织中均未检出 MRSE。除万古霉素治疗组外，其他治疗组的菌落计数与对照组比较，差异均有统计学意义($P\leqslant 0.005$)。特地唑胺治疗组与万古霉素治疗组比较，残留细菌数量的差异无统计学意义($P=0.11$)。但特地唑胺治疗组与利福平治疗组($P=0.000\ 8$)、万古霉素治疗组与利福平治疗组($P=0.000\ 3$)的细菌数量比较，差异均有统计学意义。

同时，对钢丝上的 MRSE 进行定量培养，结果见图 1(B)。利福平治疗组($P=0.02$)、特地唑胺治疗组($P=0.43$)、特地唑胺-利福平联合治疗组($P=0.003$)及万古霉素-利福平联合治疗组($P=0.003$)的 MRSE 菌落数与对照组相比，差异均有统计学意义；但万古霉素治疗组 MRSE 菌落数与对照组相比，差异无统计学意义($P=0.27$)。

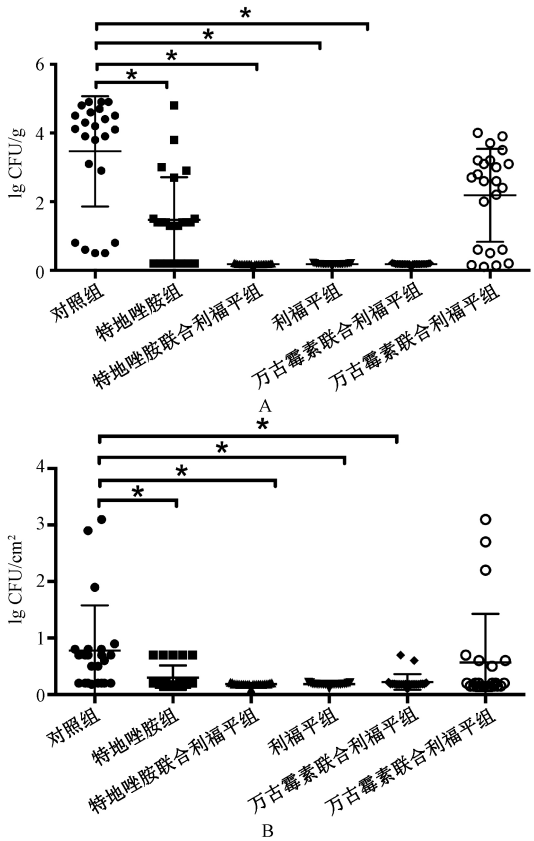
### 3.3 骨组织的病理学分析

对骨组织进行 HE 染色，由图 2 可知，在 MRSE 细菌的刺激下，对照组中的成骨细胞活性显著增加，骨重建明显[图 2(A)箭头所示]，但大鼠的骨组织标本中均无急性炎症细胞浸润的迹象；在万古霉素治疗组大鼠的骨骼横截面上的髓腔内可见一条钢丝穿透切迹[图 2(B)箭头所示]。

## 4 讨论

本研究采用假体周围感染患者来源的 MRSE 菌株构建骨髓炎大鼠模型，进行特地唑胺、利福平以及万古霉素的药物干预，发现除单用万古霉素效果不佳外，特地唑胺联合利福平、万古霉素联合利福平均对 MRSE 感染的骨髓炎动物模型具有较好的治疗效果。

虽然在感染性心内膜炎以及小鼠导管相关生物膜感染模型中，特地唑胺对 MRSA 的治疗作用已经得到了验证[10-11]，但特地唑胺针对 MRSE 在骨髓炎中的作用尚未得到研究结果证明。本研究成功建立了一种实验性植入物相关性骨髓炎大鼠模型，并将其用于评价特地唑胺对 MRSE 的治疗作用。既往有研究报道认为，可以通过将细菌直接注入髓腔 4 周后产生骨髓感染，建立骨髓炎模型[12-14]。但是，单纯注射 MRSE 并不能产生足够的感染力，机体能够通过自身的免疫反应在 3 周内清除病原，因此，骨髓炎建模的成功率不稳定。本研究对既往 MSRA 骨髓炎模型进行了改进，包括筛选来自临床患者的常见菌株，借助钢丝形成 MRSE 的生物膜并转移至骨髓腔内，使模型更符合临床常见的植入物源性骨髓炎的发病机制。同时，将感染时间和治疗间隔分别缩短至 1 周和 2 周，避免了因疾病自限性造成的假阳性。此外，本研究观察到 MRSE 的数量随着时间的推移而减少(1 周时为 4.89 lg CFU/g，3 周时为 3.7 lg CFU/g)；发现感染 3 周后骨组织病理切片没有急性炎

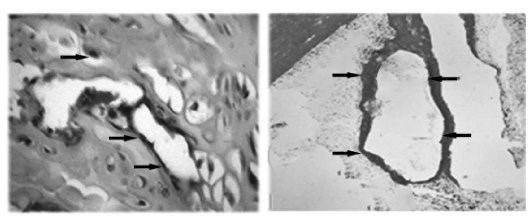



A. MRSE 细菌的骨组织定量培养结果(以每克骨组织的细菌菌落数 lg CFU 表示)；B. MRSE 细菌的钢丝定量培养结果(以每 $cm^2$ 表面积中的细菌菌落数 lg CFU 表示)；* $P<0.005$；水平线表示中位数

A. quantitative culture results on bone tissue of MRSE bacteria (expressed as lg CFU of bacterial colonies per gram of bone tissue; B. quantitative culture results on steel wire of MRSE bacteria (expressed as lg CFU of bacterial colonies per $cm^2$ of surface area); * $P<0.005$; the horizontal line indicates the median

**图 1 骨组织及钢丝表面细菌的定量培养结果**

**Fig 1 Quantitative culture results on bone tissue and steel wire surface of bacteria**




A. 对照组(HE 染色，×400 倍)；B. 万古霉素治疗组(×20 倍)

A. control group(HE staining, ×400 times); B. vancomycin treatment group(×20 times)

**图 2 骨组织病理学图像**

**Fig 2 Histopathological analysis of bone tissue**

症的迹象，但会出现骨重塑和成骨活性的增加。这与既往的研究结果一致，金属植入物的大鼠股骨骨折模型的研究结果发现，术中轻度表皮葡萄球菌污染不会出现明显的感染症状，但是会抑制骨愈合[15-16]。

本研究观察到万古霉素单药治疗并不能减少细菌数量，而特地唑胺单药治疗可以明显抑制细菌数量，MRSE 在骨内、钢丝上的中位数均低于万古霉素单药治疗组。特地唑胺-利福平联合治疗组的 MRSE 数量较无治疗组明显减少，且特地唑胺-利福平联合治疗与万古霉素-利福平联合治疗效果相当。虽然临床上针对 MRSE 的治疗通常会选择万古霉素，但葡萄球菌可能存在一定的耐药性[17]，因此一直存在争议。最近，相关研究报道，在小鼠皮下导管相关生物膜感染模型中，特地唑胺降低 MRSA 密度的效果优于利奈唑胺和万古霉素[18]。特地唑胺对葡萄球菌的体外药效是万古霉素的 2~8 倍[19]，其对葡萄球菌的抑菌作用和抗生素后效应优于利奈唑胺。特地唑胺孵育 6~24 h 内可明显阻止细菌再生，而根据体内生物荧光成像检测证实特地唑胺与停药后复发无关[20]。目前的研究结果表明，特地唑胺联合利福平治疗可能是 MRSE 植入物相关性骨髓炎的一种具有临床应用前景的治疗方案。

本研究也具有一定的局限性。首先，使用了单一的菌株。其次，由于感染持续时间短，该模型可能不能反映慢性骨髓炎的治疗效果。综上所述，本研究建立了一种新的大鼠 MRSE 骨髓炎模型，该模型可用于研究抗菌治疗方案的效果，并且本研究成功证实特地唑胺与利福平联合治疗对 MRSE 外源性骨髓炎具备较好的治疗效果。

## 参考文献


[1] 陈祥，廖一名，高兴华，等. 老年关节假体周围慢性感染病原菌特点调查[J]. 中华老年多器官疾病杂志，2019，18(3)：195-199.

[2] 吐尔洪江·瓦哈甫，沈灏，张先龙. 表皮葡萄球菌引起假体周围感染的生物膜形成机制[J]. 国际骨科学杂志，2016，37(2)：93-97.

[3] Hischebeth GT, Randau TM, Ploeger MM, et al. Staphylococcus aureus versus Staphylococcus epidermidis in periprosthetic joint infection-Outcome analysis of methicillin-resistant versus methicillin-susceptible strains[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2019, 93(2): 125-130.

[4] 赵丽，何磊，商淑梅. 人工全膝关节置换术切口感染常见病原菌及其耐药性[J]. 医学动物防制，2012，28(11)：1265-1266，1268.

[5] Swetha TK, Pooranachithra M, Subramenium GA, et al. Umbelliferone Impedes Biofilm Formation and Virulence of Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis via Impairment of Initial Attachment and Intercellular Adhesion[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 357.

[6] 王艳，张会英，吴俊，等. 骨科感染患者革兰阳性球菌的耐药监测研究[J]. 检验医学与临床，2016，13(1)：16-17，20.

[7] 高壁如，王梦梦，杨湘越. 血培养分离表皮葡萄球菌的分布及耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志，2019，34(2)：76-78.

[8] 谭娇梅，乔红群，丁亚军，等. 注射用磷酸特地唑胺体内抗菌作用研究[J]. 中国抗生素杂志，2017，42(5)：425-428.

[9] Albac S, Labrousse D, Hayez D, et al. Activity of Different Antistaphylococcal Therapies, Alone or Combined, in a Rat Model of Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis Osteitis without Implant[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(2): e01865-19.

[10] 吴清权，张勇，黄修献，等. 利奈唑胺与万古霉素治疗老年感染性心内膜炎病人的效果观察及安全性分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2019，17(14)：2166-2169.

[11] 白羽. MRSA 感染性心内膜炎动物模型建立及其应用[D]. 北京：北京协和医学院，2016.

[12] 刘金月，章猛奇，卿明松，等. 金黄色葡萄球菌性骨髓炎动物模型构建的研究与进展[J]. 中国组织工程研究，2020，24(14)：2256-2262.

[13] 李鼎鹏，谢兴文，汪付田，等. 基于文献回顾分析动物骨髓炎模型制备方法的特点研究[J]. 中药药理与临床，2019，35(5)：159-163.

[14] 肖吉. 大鼠胫骨急性骨髓炎模型的建立[D]. 南京：南京医科大学，2018.

[15] Lovati AB, Romanò CL, Bottagisio M, et al. Modeling Staphylococcus epidermidis-Induced Non-Unions: Subclinical and Clinical Evidence in Rats[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e147447.

[16] Schmidt-Malan SM, Greenwood Quaintance KE, Karau MJ, et al. In vitro activity of tedizolid against staphylococci isolated from prosthetic joint infections[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016, 85(1): 77-79.

[17] 魏利，李桂秋. 万古霉素在金黄色葡萄球菌中的耐药性研究进展[J]. 医学综述，2019，25(1)：119-123，128.

[18] Park KH, Greenwood-Quaintance KE, Schuetz AN, et al. Activity of Tedizolid in Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis Experimental Foreign Body-Associated Osteomyelitis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(2): e01644-16.

[19] Locke JB, Zurenko GE, Shaw KJ, et al. Tedizolid for the management of human infections: in vitro characteristics[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58 Suppl 1: S35-S42.

[20] Bayer AS, Abdelhady W, Li L, et al. Comparative Efficacies of Tedizolid Phosphate, Linezolid, and Vancomycin in a Murine Model of Subcutaneous Catheter-Related Biofilm Infection Due to Methicillin-Susceptible and-Resistant Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(8): 5092-5096.


（收稿日期：2020-08-25）

欢迎关注《中国医院用药评价与分析》微信公众号！通过在线投稿系统投稿的作者可进入微信公众号查询稿件状态。