

· 论 著 ·

亚最低杀菌浓度阿莫西林对体外诱导金黄色葡萄球菌标准菌株的耐药研究

陈荣剑¹, 祝仲珍², 王占科³, 杨莉萍², 袁小兰⁴, 胡新华², 宁丽萍³, 兰小鹏⁵

[摘要] **目的** 观察亚最低杀菌浓度(Sub-minimum bactericidal concentration, Sub-MBC)阿莫西林对金黄色葡萄球菌标准菌株的耐药性影响。**方法** 以金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 29213)为研究对象,阿莫西林为抗菌药物,以微量稀释法定量检测不同诱导天数 MBC 值,采用 1/2MBC 浓度对金黄色葡萄球菌进行 30 d 多步体外诱导实验,观察金黄色葡萄球菌标准菌株 MBC 变化,以全自动微生物药敏鉴定仪对最终诱导后菌株进行阿莫西林耐药性分析。**结果** 金黄色葡萄球菌标准菌株 MBC 值阿莫西林体外诱导 7 d 即显著升高,诱导 30 d 升高至原始菌株 MBC 的 32 倍;经全自动药敏分析仪鉴定诱导出的耐药菌株对阿莫西林耐药。**结论** 亚最低杀菌浓度阿莫西林可体外诱导金黄色葡萄球菌标准菌株出现耐药,且耐药性随亚最低杀菌浓度诱导时间增加而升高,提示合理选择抗菌药物使用剂量可作为预防细菌耐药重要措施。

[关键词] 亚最低杀菌浓度;阿莫西林;体外诱导;细菌耐药;金黄色葡萄球菌

[中图分类号] R969.3 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.05.003

Study on the antibiotic resistance of staphylococcus aureus induced by sub-MBC of amoxicillin in vitro
CHEN Rong-jian¹, ZHU Zhong-zhen², WANG Zhan-ke³, YANG Li-ping², YUAN Xiao-lan⁴, HU Xin-hua², NING Li-ping³, LAN Xiao-peng⁵. 1. Department of General Surgery, 2. Department of Nosocomiology, 3. Department of Clinic Laboratory, 94 Hospital of PLA, Nanchang, Jiangxi 330002, China; 4. Department of Nursing, Lung Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 5. Department of Clinic Laboratory, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou, Fujian 350025, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of inducing by amoxicillin with the dose of sub-MBC (minimum bactericidal concentration) on the antibiotic resistance of Standard strains of staphylococcus aureus. **Methods** The standard strain ATCC 29213 of staphylococcus aureus were induced by amoxicillin with the dose of 1/2MBC for 30 days. The quantitative data of MBC were detected by microdilution method in vitro everyday, and the antibiotic resistance to amoxicillin of staphylococcus aureus induced by this method were identified using automatic microorganisms drug sensitivity analyzer. **Results** The quantitative data of MBC of the standard strain of staphylococcus aureus induced by amoxicillin for 7 days significantly increased, and the MBC increased 32 times after induced for 30 day than that of the original strain. The drug-resistant strain induced by our methods showed resistant of amoxicillin which was identified by the automatic microorganisms drug sensitivity analyzer. **Conclusion** Amoxicillin can induce the standard strains of staphylococcus aureus resistance to antibiotic with the dose of sub-MBC for long time in vitro, and the degree of the antibiotic resistance increased by the time of inducement with sub-MBC, suggesting that it is important to to select a rational dosage of antimicrobial to prevent antibiotic resistance in clinics.

[Key words] sub-MBC; amoxicillin; induce in vitro; bacteria antibiotic; staphylococcus aureus

临床抗菌药物的不合理使用促进和诱导了细菌耐药的发生,研究导致细菌耐药原因和机理已引起国内外高度重视^[1-3]。抗菌药物使用不合理,包括抗菌药物使用种类不合理和抗菌药物使用剂量不合理。有文献报道,低剂量抗菌药物可体外诱导临床

患者感染菌株发生细菌耐药现象^[4],但低剂量抗菌药物浓度体外诱导标准菌株耐药性的研究报道,国内外不多。金黄色葡萄球菌是临床住院感染患者的常见致病菌,也是医院内感染的常见菌,金黄色葡萄球菌标准菌株对青霉素敏感,但临床患者感染的金黄色葡萄球菌菌株普遍存在耐药现象^[5-6]。为此,本文以金黄色葡萄球菌标准菌株为研究对象,通过阿莫西林亚最低杀菌浓度(Sub-minimum bactericidal concentration, Sub-MBC)体外多步诱导培养,观察金黄色葡萄球菌标准菌株 MBC 值变化,旨在证明亚最低杀菌浓度抗菌药物可诱导细菌耐药的发生,为

基金项目: 江西省卫生厅资助课题(20092108)
作者单位: 330002 江西南昌,解放军 94 医院,1. 普外科,2. 感染管理科,3. 检验科;4. 330006 江西南昌,江西省肺科医院护理部;5. 350025 福建福州,南京军区福州总医院检验科
通讯作者: 祝仲珍, E-mail: zhuzhongzhen1972@sina.com

临床合理使用抗菌药物剂量提供实验依据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株 金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC 29213,由江西省临床检验中心提供。

1.1.2 抗菌药物 阿莫西林,规格为 0.5 g/支,批号为 20140120,购自中国药品生物制品检定所。

1.2 主要试剂和设备 M-H 肉汤细菌培养液(批号为 20140318)及 M-H 琼脂固体培养平板(直径 9 cm,批号为 20131124B)购自郑州安图绿科生物工程有限公司;系列麦氏标准比浊管,购自梅里埃诊断产品(上海)有限公司;LRHS-100 型 37 ℃ 恒温培养箱,购自上海跃进医疗器械有限公;BSC1500RIB2X 型生物安全柜,购自济南博科生物技术有限公司。WALK AWAY 40SI 型全自动药敏鉴定分析仪及药敏板条,购自上海西门子医疗器械有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准菌株液制备 在生物安全柜中,金黄色葡萄球菌标准菌株解冻后,无菌操作条件下,将标准菌株接种在 M-H 琼脂固体培养平板复活,然后接种于不含抗菌药物的 M-H 肉汤培养液中,37 ℃ 培养 24 h 后,用麦氏标准管调整菌液浓度为 1×10^5 CFU/mL 备用。

1.3.2 微量稀释法测定 MBC 用抗菌药物微量稀释法测定金黄色葡萄球菌标准菌株 MBC。参考文献[7],首先用 M-H 细菌培养液对阿莫西林进行倍比稀释,分别加入 12 × 8 孔聚苯乙烯无菌微孔培养板中,然后再分别加入金黄色葡萄球菌标准原始菌株或诱导菌株,使抗菌药物终浓度分别为 1024、512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 和 0.5 μg/mL,金黄色葡萄球菌标准原始菌株或诱导后菌株终浓度为 1×10^5 CFU/mL。同时,设空白对照孔和生长对照孔,空白对照孔加 M-H 细菌培养液,但不加细菌液;生长对照孔加细菌液和 M-H 细菌培养液,但不加抗菌药物。微孔细菌培养板 37 ℃ 培养 24 h 后,肉眼观察微孔内细菌生长情况,取清晰透明底部无沉淀微孔细菌培养液,三线法接种在 M-H 琼脂固体培养基,24 h 培养后观察有无细菌生长。M-H 琼脂固体培养基上无细菌生长的最小抗菌药物浓度为 MBC。为减少 MBC 测定实验误差以及确保 Sub-MBC 药物浓度诱导,避免误使用 MBC 药物浓度导致细菌全部杀死造成诱导终止和失败,本实验同一菌株平行测定 5 次,MBC 值均发生变化,才被认定诱导后菌株

MBC 变化值。

1.3.3 Sub-MBC 抗菌药物多步诱导耐药菌株 首先用微量稀释法测定抗菌药物最低杀菌浓度,测定金黄色葡萄球菌标准原始菌株 MBC 值,记为 MBC0。取 10 μL 金黄色葡萄球菌标准原始菌株(MBC0)加入 5.0 mL M-H 液态培养基中,调整阿莫西林终浓度为 1/2 MBC0(亚最低杀菌浓度),37 ℃ 诱导培养 24 h,测定诱导后菌株 MBC 值,如果 MBC 值没有变化,保持抗菌药物浓度不变,继续诱导培养细菌,每天均测定 MBC 值,并观察有无变化。如果经多次诱导培养后菌株 MBC 值发生变化,记作 MBC1,改变抗菌药物终浓度为 1/2 MBC1,继续诱导培养,继续每天测定 MBC 值。如果多次诱导培养后,菌株 MBC 值又发生变化,再记作 MBC2,改变抗菌药物终浓度为 1/2 MBC2,再继续诱导培养。以此类推,连续诱导 30 d,每天测定并记录 MBC 变化值及其诱导变化时间(图 1)。

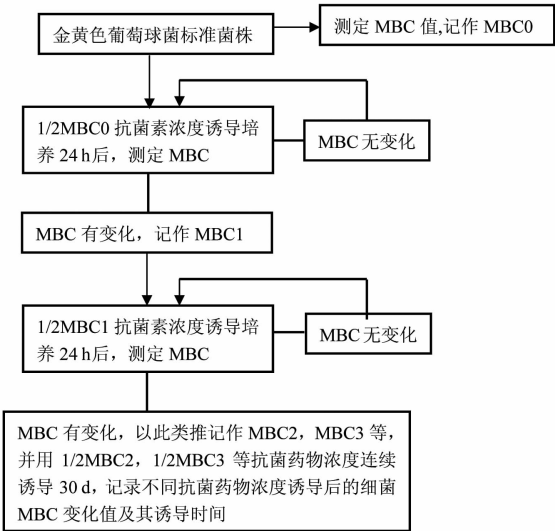


图 1 亚最低杀菌浓度抗菌药物多步诱导耐药菌株

1.3.4 诱导后耐药菌株的鉴定 本组实验诱导出的耐药菌株(MBC 升高 10 倍以上),经不含任何抗菌药物 M-H 液态增菌培养基,稳定传代 3 次,用麦氏标准管调整菌液浓度为 1×10^5 CFU/mL(0.5 个麦氏单位),经 WALK AWAY 40SI 型全自动西门子药敏鉴定分析仪,自动判断对阿莫西林的耐药性,重复测定 10 次,并与诱导前标准菌株耐药性进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件。计量数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数数据用百分率(%)表示;金黄色葡萄球菌标准原始菌株和不同诱导时间后菌株 MBC 值进行单因素方差分析,对标准原始菌株和诱导成功后菌株的阿莫西林耐药

百分率进行 χ^2 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Sub-MBC 阿莫西林不同诱导时间对金黄色葡萄球菌 MBC 值影响 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 标准菌株阿莫西林 MBC 值为 4.0 $\mu\text{g/mL}$, 通过 1/2 MBC 阿莫西林浓度诱导, 并根据菌株 MBC 值升高不断调整提高诱导浓度, 结果发现, 诱导后 7、14、20、25 和 30 d 菌株 MBC 分别升高到诱导前的 2、4、8、16 和 32 倍。诱导后 25 d 和 30 d 金黄色葡萄球菌阿莫西林 MBC 值分别升高到 64 $\mu\text{g/mL}$ 和 128 $\mu\text{g/mL}$ (表 1 和图 2)。

表 1 亚最低杀菌浓度阿莫西林不同诱导时间 对金黄色葡萄球菌 MBC 值影响					
组别	诱导天数	诱导剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>n</i>	MBC 值 ($\mu\text{g/mL}$)	升高倍数
MBC0	诱导前	0.0	5	4.0 \pm 0.0	0
MBC1	7 d	2.0	5	8.0 \pm 0.0*	2
MBC2	14 d	4.0	5	16.0 \pm 0.0*	4
MBC3	20 d	8.0	5	32.0 \pm 0.0*	8
MBC4	25 d	16.0	5	64.0 \pm 0.0*	16
MBC5	30 d	32.0	5	128.0 \pm 0.0*	32

注: 与 MBC0 组比较, * $P < 0.01$

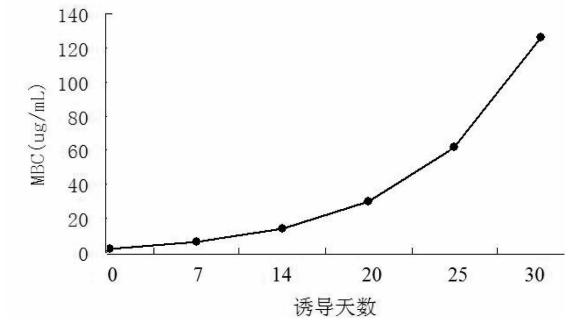


图 2 亚最低杀菌浓度阿莫西林不同诱导时间
对金黄色葡萄球菌 MBC 值影响

2.2 诱导出的耐药菌株对阿莫西林耐药性鉴定 本组实验诱导出的金黄色葡萄球菌耐药菌株, 经全自动细菌药敏鉴定分析仪进行药敏鉴定, 结果发现对阿莫西林耐药率为 100%, 而原始菌并不耐药, 标准菌株体外耐药诱导成功。

3 讨 论

临床患者感染的细菌发生耐药问题, 已引起临床高度重视^[8]。研究细菌耐药机理, 探讨细菌耐药发生原因, 为防治细菌发生耐药具有重要意义。标

准菌株是指遗传信息和生物学性状明确的商品化的菌株, 常用于做细菌耐药性试验的质控菌株^[9]。文献报道, 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 质控菌株阿莫西林的肉汤稀释法最低抑菌浓度 (MIC) 值为 0.12 ~ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ^[10]。本实验采用微量倍比稀释法检测的金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 标准质控菌株 MBC 值为 4.0 $\mu\text{g/mL}$, 最低抑菌浓度 (minimum Inhibitory concentration, MIC) 值为 2.0 $\mu\text{g/mL}$, 提示对阿莫西林药物敏感, 其 MIC 值略高于文献报道的数值, 可能和本实验的条件和文献存在差异有关。

本研究发现, 采用 1/2MBC 值的阿莫西林亚药物浓度诱导金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 标准菌株 7 d, MBC 值开始明显升高 1 倍, 然后再提高阿莫西林诱导浓度, 再诱导 7 d, MBC 又升高 1 倍。随着诱导菌 MBC 值不断升高, 我们不断提高阿莫西林诱导药物浓度, 分别在第 20 天、第 25 天和第 30 天 MBC 值发生显著变化, 诱导第 30 天 MBC 值升高了 32 倍, 发生变化诱导间隔由开始的 7 d 缩短为 5 d, 提示随着亚最低杀菌浓度抗菌药物的使用延长, 诱导耐药菌产生的速度明显加快。金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 标准菌株经过 5 次 MBC 升高, 历经 30 d 最终变成耐药菌株, 并得到全自动药敏鉴定分析仪实验结果的证实, 提示使用亚最低杀菌浓度阿莫西林可以体外诱导金黄色葡萄球菌出现耐药现象, 为临床正确使用大于 MBC 值抗菌药物剂量, 预防细菌耐药发生, 提供实验证据。

在抗菌药物临床应用中, 抗菌药物突变选择窗 (mutation selection window, WSW) 可作为指导临床选择抗菌药物治疗剂量的重要依据^[11], WSW 一般大于 MIC 且小于耐药变异预防浓度 (mutation prevention concentration, MPC), 但 MPC 是临床患者的调查结果, 和实验室检测的细菌体外 MBC 在数值上并不完全相同。值得注意的是, 临床上细菌出现耐药现象, 并不是突然发生的, 细菌从敏感到耐药, 有一个渐变的过程, 表现为 MBC 或 MIC 值逐步发生变化, 而 WSW 在理论上也是在变化中, 因此本研究每天都要对诱导菌进行 MBC 值检测并不断调整诱导浓度。

Sub-MBC 阿莫西林抗菌药物浓度对体外诱导金黄色葡萄球菌敏感菌株发生耐药, 可能因同一菌株在繁殖过程中存在药物耐药性差异; 其次, 亚最低杀菌浓度杀死绝大多数药物敏感细菌后, 留下对药物耐药的极少部分“逃逸细菌”株; 而“逃逸细菌”株药物耐药出现遗传学改变可被稳定传代。阿莫西林 (下转第 495 页)

患者采用其他治疗方法无效的急性闭角型青光眼患者采用了 TDCP 方法进行治疗后,随访 10 个月发现,其眼压均控制在 17 mmHg 以下,但是也有研究表明^[11],TDCP 应用于复杂性青光眼的治疗需要重复操作才能够达到理想的降眼压效果,尽管在末次随访中有 50% 的患者需要采用降压药物来控制眼压^[12],而小梁切除术的再手术率及末次随访所采用的降眼压药物均明显少于 TDCP 组,所以短期来说 TDCP 手术降压效果不如小梁切除术,需药物辅助治疗,但是长期比较无明显差异。

综上所述,相比于小梁切除术,TDCP 手术治疗青光眼患者操作更为简便,手术时间短,短期的降低眼压效果不如小梁切除术,但是长期对于眼压及视力的影响无明显差异,在短期内需要采用降眼压药物的数量及手术再次治疗的患者比例较高,所以对两种手术方案的选择需要综合考虑这些因素。

【参考文献】

- [1] 李媛媛,陈建卓,王 润,等.以近视首诊的青少年开角型青光眼 78 例临床分析[J].东南国防医药,2014,16(3):302-303.
- [2] 胡晓佳,刘丽华.内窥镜引导下玻璃体切割术治疗复杂性眼外伤患者的手术配合[J].中国实用护理杂志,2013,29(33):17-19.
- [3] 倪 焰,赵培泉,栾 洁,等.改进的 23G 硅油取出法治疗复杂

性视网膜脱离硅油填充眼的临床观察[J].中华实验眼科杂志,2013,31(5):487-488.

- [4] 李晓华,何世坤.眼科表观遗传学研究进展[J].中华眼科杂志,2013,49(6):568-573.
- [5] 张运江,俞方良.内窥镜下睫状体光凝联合白内障超声乳化手术临床研究进展[J].国际眼科纵览,2013,37(5):329-334.
- [6] 高付林,胡莲娜.白内障超声乳化人工晶体植入术治疗急性闭角型青光眼效果观察[J].中华临床医师杂志(电子版),2012,6(7):180-181.
- [7] 王瑞琴.巩膜间层引流池样小梁切除术治疗难治性青光眼术前及术后护理[J].医学美容(中旬刊),2015,13(1):439-439.
- [8] 王 岩,李若溪,王昕华,等.玻璃体视网膜治疗复杂性眼外伤的临床疗效[J].国际眼科杂志,2013,13(1):62-63.
- [9] 刘 励,林 胤,陈本安,等.闭角型青光眼合并白内障高眼压下单行超声乳化人工晶体植入术疗效分析[J].东南国防医药,2012,14(4):314-316.
- [10] Katz LJ, Steinmann WC, Kabir A. Selective laser trabeculoplasty versus medical therapy as initial treatment of glaucoma: a prospective, randomized trial[J]. J Glaucoma, 2012, 21(7):460-468.
- [11] Hong BK, Winer JC, Martone JF. Repeat selective laser trabeculoplasty[J]. J Glaucoma, 2009, 22(11):180-183.
- [12] Samples JR, Singh K, Lin SC. Laser trabeculoplasty for open-angle glaucoma: a report by the American Academy of Ophthalmology[J]. Ophthalmology, 2011, 118(11):2296-2302.

(收稿日期:2015-05-29;修回日期:2015-08-18)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)

(上接第 460 页)

是青霉素类抗菌药物,其化学分子中的内酰胺基可快速与金黄色葡萄球菌体内某种转肽酶结合,导致金黄色葡萄球菌转肽酶失活,细菌无法合成细胞壁而受到破坏。已有文献报道,亚抑菌浓度抗菌药物可通过体外诱导细菌生物膜形成,并通过 SOS 基因损伤修复机制导致细菌耐药的发生^[12-13]。本研究提示,临床长时间以低于 MBC 值剂量使用抗菌药物可诱导耐药菌株即“逃逸细菌”的产生,临床用药不仅要合理使用抗菌药物种类,更要重视和合理使用抗菌药物的使用剂量。

【参考文献】

- [1] 石晓卉,刘 琪,于湘友,等.外科重症监护室临床细菌分布及耐药性监测[J].东南国防医药,2014,16(4):349-352.
- [2] 肖舒心,徐晓刚.最具威胁性的超级耐药菌[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(6):473-473.
- [3] Penwell WF, Shapiro AB, Giacobbe RA, et al. Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in acinetobacter baumannii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(3):1680-1689.
- [4] 赵 磊,荆鹏伟.氟喹诺酮类药物体外诱导大肠埃希菌耐药性观察[J].郑州大学学报:医学版,2011,46(1):103-106.

- [5] 黄学忠,林佩佩,陈晓飞,等.1385 株临床流行菌株调查及耐药分析[J].东南国防医药,2011,13(3):219-222.
- [6] 王凤玲,代荣琴,刘玉枝,等.2006~2011 年金黄色葡萄球菌耐药情况分析[J].国际检验医学杂志,2014,35(8):975-976.
- [7] 周家军,梁蓓蓓,王 睿,等.利奈唑胺与万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌体外抗菌活性[J].中国临床药理学杂志,2010,26(8):593-596.
- [8] 王效雷,罗 婕,丁兆霞,等.119 例尿管相关性尿路感染的病原体分布及耐药性分析[J].东南国防医药,2015,17(1):46-48.
- [9] 庞载元,吴贤丽,敖茂程,等.14 种市售抗菌药对金黄色葡萄球菌标准菌株的体外抑菌作用[J].中国执业药师,2014,(11):20-22.
- [10] 尚 红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].北京:人民卫生出版社,2015:586-587.
- [11] Ni W, Song X, Cui J, et al. Testing the mutant selection window hypothesis with escherichia coli exposed to levofloxacin in a rabbit tissue cage infection model[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(3):385-389.
- [12] Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance[J]. Drug Discov Today Technol, 2014, 11:49-56.
- [13] 黄梨莎.亚抑菌浓度抗菌药物对金黄色葡萄球菌耐药性及 SOS 基因表达的影响[D].山东大学,2011.

(收稿日期:2015-07-09;修回日期:2015-08-10)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)