

## 铜绿假单胞菌 L 型对第三代和第四代头孢菌素的药物敏感性研究

陈登宇,徐志本,郑庆委,高淑娴

**[摘要]** **目的:**探讨铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA) L 型对第三代和第四代头孢菌素敏感及耐药状况。**方法:**将 PA 诱导成稳定的 L 型,利用 K-B 纸片琼脂扩散法检测 PA 原菌及其 L 型对第三代和第四代头孢菌素的敏感程度,分析 PA-L 型的耐药状况。**结果:**PA-L 型对第三代和第四代头孢菌素的抑菌圈直径均较原菌缩小( $P < 0.05$ ),但仍维持在敏感程度。**结论:**PA-L 型对第三代和第四代头孢菌素仍具有敏感性。

**[关键词]** 铜绿假单胞菌;L 型;耐药性;头孢菌素

**[中图分类号]** R 378.991 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.10.032

## Study on drug sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* L-forms to the third and forth generation cephalosporins

CHEN Deng-yu, XU Zhi-ben, ZHENG Qing-wei, GAO Shu-xian

(Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:**To study the drug sensitivity of L-forms of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) to the third and forth generation cephalosporins. **Methods:**PA was induced into a stable L-form. The drug sensitivity of PA L-forms to the third and forth generation cephalosporins was analyzed by K-B drug sensitivity test. The change trend of drug sensitivity and resistance of PA L-forms was analyzed. **Results:**The inhibition zone of PA L-forms was smaller than that of their parent bacteria, and there had the significant difference( $P < 0.05$ ). But the drug sensitivity of L-forms of PA to the third and forth generation cephalosporins was still sensitive. **Conclusions:**The drug sensitivity of PA L-forms to the third and forth generation cephalosporins is still sensitive.

**[Key words]** *Pseudomonas aeruginosa*; L-form; drug resistance; cephalosporin

由于患者免疫力下降、侵入性医疗操作及细菌固有耐药性等因素,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)已成为医院感染的主要致病菌,具有内毒素、外毒素及胞外酶等多种致病因素,致病力强,使用抗生素后易转变为细胞壁缺陷型细菌即细菌 L 型<sup>[1]</sup>。L 型菌仍具有致病能力,导致感染慢性化迁延不愈,对作用于细胞壁的抗菌药物敏感性下降。本实验通过研究 PA-L 型对头孢菌素的耐药性,判断 PA-L 型对第三代和第四代头孢菌素敏感性情况,以期为指导临床合理使用抗菌药物控制 PA 感染提供参考依据。

### 1 材料与方法

1.1 菌株 PA 标准菌株:CMCC10104 株,购于中

国药品生物制品检定所。

1.2 试剂和仪器 革兰染液(南京建成生物工程研究所);药敏纸片,包括第三代头孢菌素头孢噻肟(CTX)、头孢曲松(CRO)、头孢哌酮(CFP)和头孢他啶(CAZ)及第四代头孢菌素头孢吡肟(FEP)(英国 OXOID 公司)。水解酪蛋白(MH)琼脂用于琼脂纸片扩散法测定细菌对抗生素敏感性,100 mL MH 琼脂培养基配制:琼脂 1.7 g,牛肉浸出粉 30 g,可溶性淀粉 0.15 g,酪蛋白水解物 1.75 g, pH 7.4, 121 °C 高压灭菌 15 min,倒制平板备用。L 型用 MH 琼脂平板,琼脂 1%,另加 2% 氯化钠,制成高渗软琼脂平板。正置数码显微镜(日本 Nikon)。

1.3 PA-L 型的诱导 用哌拉西林药物纸片将 PA 诱导成稳定 L 型<sup>[1]</sup>。并通过革兰染色观察 PA 原菌及 L 型的镜下形态。

1.4 菌液制备 PA 按常规细菌培养获得对数生长期的原菌,用无菌 0.9% 氯化钠注射液制成  $10^8$  CFU/mL 菌液即 0.5 麦氏浓度;PA-L 型传代培养获得新鲜培养物,用无菌 3% 氯化钠高渗溶液制成  $10^8$  CFU/mL 菌液即 0.5 麦氏浓度,计数采用麦氏比浊法。

[收稿日期] 2015-01-22

[基金项目] 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(KJ2009B220Z, KJ2016A461);蚌埠医学院科研项目(BY0809)

[作者单位] 蚌埠医学院病原生物学教研室,安徽省感染与免疫重点实验室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 陈登宇(1978-),男,博士,副教授。

1.5 药物敏感性试验 按全国临床检验操作规程进行体外药物敏感性试验,先制备检测菌液,经 37℃ 培养 6 h 后,比浊至 0.5 麦氏单位,平板接种菌液后贴片培养,琼脂扩散法进行药物敏感性试验。将 0.5 麦氏单位浓度菌液均匀涂布药敏平板,无菌操作将 5 种头孢菌素药敏纸片均匀贴于平板中心及四周,常规细菌培养后,测量抑菌圈直径,参照全国抗菌药物敏感性试验标准判定药物敏感性。

1.6 统计学方法 采用 *t* 检验。

## 2 结果

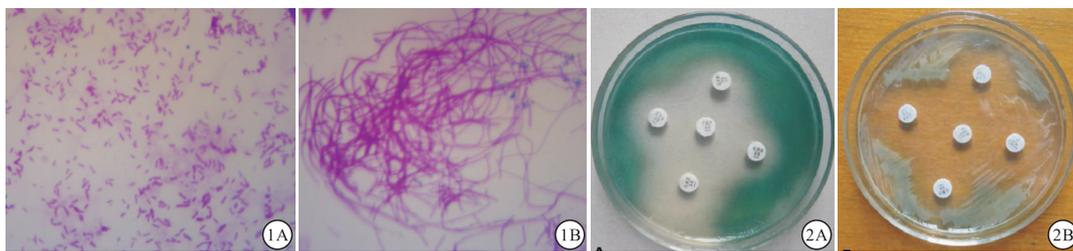
2.1 革兰染色结果 PA 原菌为革兰阴性中等大小杆菌,PA-L 型为革兰阴性长丝状杆菌,缠绕成团(见图 1)。

2.2 药敏试验结果 L 型平板药敏纸片四周有细

小 PA-L 型菌落出现,依据细菌药物敏感性标准判断,PA 标准菌株 L 型对 CTX、CRO、CFP 和 CAZ 的药物敏感性维持在敏感程度,对 FEP 药物敏感性也维持在敏感程度,抑菌圈较原菌缩小( $P < 0.05$ )(见表 1,图 2)。

表 1 PA 原菌及 L 型对头孢菌素药敏试验结果抑菌圈比较( $\bar{x} \pm s$ ;mm)

分组	<i>n</i>	PA	PA-L 型	<i>t</i>	<i>P</i>
CTX	5	23.86 ± 0.77	22.84 ± 0.29	2.77	<0.05
CRO	5	23.56 ± 0.39	22.94 ± 0.40	2.48	<0.05
CFP	5	27.15 ± 0.19	26.57 ± 0.35	3.26	<0.05
CAZ	5	33.11 ± 0.14	32.88 ± 0.09	3.09	<0.05
FEP	5	35.64 ± 0.13	35.13 ± 0.43	2.54	<0.05



1A: PA原菌革兰阴性中等大小杆菌;1B: PA-L型革兰阴性长丝状杆菌;2A: PA药敏试验培养物;2B: PA-L型药敏试验培养物

图1 革兰染色观察PA镜下形态(革兰染色) 图2 PA及L型药敏试验培养物

## 3 讨论

PA 俗称绿脓杆菌,毒力因子多、耐药性严重,现已成为医院感染的主要致病菌之一,多见于肺部感染、伤口感染、败血症<sup>[2]</sup>。PA-L 型在抗生素治疗后的患者体内经常出现,导致感染慢性化,常被作为病原菌检出,因此关于 PA-L 型药物敏感性研究对于 PA 感染的防治具有极其重要的价值。

细菌 L 型是细胞壁缺陷型细菌,在体内、外多种因素作用下细菌细胞壁肽聚糖形成受抑,但仍可生长繁殖并具有致病性。头孢菌素作用于细菌细胞壁抑制转肽酶活性、影响肽聚糖层的合成,发挥杀菌作用,单独应用可诱导细菌变异为 L 型导致感染迁延。CRO 是第三代头孢菌素类抗生素,用于敏感致病菌所致的下呼吸道感染、皮肤软组织感染、败血症等,同类药品还有 CAZ、CTX、CFP 及第四代头孢菌素 FEP。本研究发现,PA 变异为 L 型后对第三代和第四代头孢菌素抑菌圈均较 PA 原菌缩小( $P < 0.05$ ),但参考全国抗菌药物敏感性试验标准具体判定 PA 及 L 型对某种抗生素的敏感性,发现 PA-L

型对第三代头孢菌素如 CTX、CRO、CFP、CAZ 和第四代头孢菌素如 FEP 仍维持在敏感程度。但临床用药可能要延长头孢菌素的疗程,才能取得彻底清除的效果。

PA 具有多重耐药的特性,能天然抵抗多种抗菌药物,其耐药的机制主要有外膜通透性下降,产生内酰胺酶、青霉素结合蛋白的改变,外排泵激活及产生生物膜等。近年来,随着临床应用抗菌药物的等级增加,广谱耐药的 PA 也越来越多,其耐药性的产生除受质粒影响外,还决定于染色体基因类型并与菌株基因突变及环境选择密切相关<sup>[3-4]</sup>。有资料<sup>[5]</sup>显示 PA-L 型仍具有致病性,L 型较原菌细胞壁缺损对作用于细胞壁的头孢菌素可产生一定耐药性,单独使用头孢菌素可诱生 L 型菌的产生,但若联合应用于核蛋白体或核糖核酸的抗菌药物,可以避免 L 型产生所导致的病情迁延。因此合理地联合应用抗菌药物,可能是全面杀灭 PA 及降低 PA-L 型产生的有效方法。

### [ 参 考 文 献 ]

[1] 陈登宇,陈艺林,徐萍萍. 哌拉西林诱导铜绿假单胞菌 L 型形成的实验研究[J]. 蚌埠医学院学报,2010,35(2):115.

# 血培养阳性标本细菌分布及耐药性分析

李 甲,姚晓玲,郑 岚

**[摘要]** **目的:**了解血培养阳性标本中分离的病原菌分布及耐药情况,为临床合理使用抗生素提供治疗依据。**方法:**回顾分析2014年7月至2015年6月临床送检血培养标本中分离的病原菌及药敏试验结果,采用BACT/ALERT 3D型全自动血培养仪进行培养,ATB微生物分析系统进行细菌鉴定和药敏试验。**结果:**从临床送检的血培养标本中共分离出病原菌76株,其中革兰阳性菌41株,革兰阴性菌31株,真菌4株,分别占53.95%、40.79%和5.26%。前5位病原菌为凝固酶阴性葡萄球菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌。大肠埃希菌和克雷伯菌属对碳氢酶烯类药物敏感率为100%,未发现耐万古霉素革兰阳性球菌。**结论:**及时监测血培养病原菌变化及耐药趋势,对指导临床用药至关重要。

**[关键词]** 血培养;病原菌;耐药性

**[中图分类号]** R 466.5

**[文献标志码]** A

**DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.10.033

## Analysis of the distribution and drug resistance of pathogens in positive blood culture specimens

LI Jia, YAO Xiao-ling, ZHENG Lan

(Department of Infection Management, The Central Hospital of Bengbu, Bengbu Anhui 233000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the distribution and drug resistance of pathogens isolated from blood culture to provide the basis in clinical rational use of antibiotics. **Methods:** The data of the pathogens isolated from blood culture and results of drug sensitive test were retrospectively analyzed from July 2011 to June 2012. The blood was cultured using the BACT/ALERT 3D automatic blood culture instrument. The bacteria identification and drug sensitive test were implemented using ATB expression identification system. **Results:** Seventy-six strains of pathogenic bacteria were isolated from clinical blood culture samples, which included 41 strains of gram-positive bacteria (53.95%), 31 strains of gram-negative bacteria (40.79%) and 4 strains of fungi (5.26%). The top five pathogens were the *Coagulase-negative staphylococci*, *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa* by turn. The sensitive rate of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* to carbapenem drug was 100%, the gram-positive Cocci of vancomycin-resistant was not found. **Conclusions:** The timely monitoring of the pathogenic bacteria change in blood culture and trend of drug resistance are important in guiding the clinical drug use.

**[Key words]** blood culture; pathogen; drug resistance

血培养是诊断血流感染的重要实验室方法之一。近年来随着广谱抗生素、免疫抑制剂的广泛应用,临床各种侵入性操作和器官移植的增多,血流感染的概率不断上升,血培养作为血液细菌感染诊断及危重患者病情监测的重要手段,对明确菌血症、败血症的临床诊断,指导医生准确合理应用抗生素治疗,具有重要指导意义。本研究对我院血培养阳性标本分离出的76株细菌分布及耐药情况进行回顾

性分析,现作报道。

### 1 材料与方法

**1.1 菌种来源** 选择2014年7月至2015年6月我院临床送检血培养阳性标本中分离的76株病原菌。

**1.2 仪器与试剂** 法国梅里埃公司的BACT/ALERT 3D型全自动血培养仪及其配套的血培养瓶、ATB微生物分析系统。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、粪肠球菌 ATCC29212 购自卫生部

[收稿日期] 2016-02-01

[作者单位] 安徽省蚌埠市中心医院 感染管理科,233000

[作者简介] 李 甲(1984-),男,公共卫生医师。

[2] 张祎博,孙景勇,倪语星,等. 2005-2014年CHINET铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(2):141.

[3] WEILE J, SCHMID RD, BACHMANN TT, et al. DNA microarray for genotyping multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 59(3):325.

[4] 诸林俏,黄晨,周璇. 铜绿假单胞菌医院感染调查及耐药分析

[J]. 中国微生态学杂志,2011,23(4):353.

[5] 陈登宇,夏佩莹,刘勇,等. 铜绿假单胞菌及L型诱导巨噬细胞凋亡的实验研究[J]. 中国微生态学杂志,2010,22(6):498.

(本文编辑 马启)