

耐庆大霉素铜绿假单胞菌体外传代 耐药水平变化

戴丽冰 马福广 彭燕豪 梁佩红 刘锡麟

【摘要】 目的 检测耐药铜绿假单胞菌体外传代过程中耐药水平是否发生改变。 **方法** 将 26 株耐庆大霉素 (GM) 铜绿假单胞菌 (PA) 株按最低抑菌浓度 MIC 值分为高等水平 (20 株) 及中等水平 (6 株) 耐药组, 进行体外传代 (30 代) 培养, 并分别对每株 PA 子 1、10、20、30 代进行 MIC 及最低杀菌浓度 (MBC) 检测。 **结果** 通过对高水平耐 GM 组和中水平耐 GM 组各子代间 MIC 及 MBC 的均值进行多重比较, 每组子代间的总体差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。 **结论** 耐 GM 铜绿假单胞菌各子代间耐药水平无发生变化。当临床发现耐药水平不同的铜绿假单胞菌, 可高度怀疑是来自不同的 PA 菌株。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 传代; 耐药水平

The change in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to gentamicin during in vitro subculturing

DAI Libing, MA Fuguang, PENG Yanhao, et al. Department of Burns and Plastic Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital (The Fourth Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University), Guangzhou Research Institute of Traumatic Surgery, Guangzhou, 510220 Guang Dong Province, P. R. China

【Abstract】 Objective To observe the change in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) to gentamicin (GM) during in vitro subculturing. **Methods** Twenty-six strains of PA with resistance to GM isolated from burn patients were subcultured in vitro for 30 generations. The strains were also divided into high level (20 strains) and medium level (6 strains) of resistant groups according to their MIC (minimum inhibition concentration) values. The MIC and MBC (minimal bactericidal concentration) levels were examined in every strains of the 1st, 10th, 20th, and 30th filial generations of PA strain. **Results** There was no significant general difference of MIC and MBC values among the filial generations in each group ($P < 0.05$) when multiple comparisons of MIC and MBC mean values were made among every filial generations in high and medium levels of GM resistant groups. **Conclusion** There was no evident difference in GM resistance among all the filial generations of PA. The result indicated that, the PA with different levels of GM resistance clinically found might come from different PA strains.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; Subculture; Resistance; Gentamicin

铜绿假单胞菌 (*pseudomonas aeruginosa*, PA) 是烧伤病区主要的医院感染菌。临床分离的 PA 普遍发生多重耐药, 但从烧伤病区环境中分离的 PA 较少发生耐药。为了解此现象是否与耐药 PA 的耐药性在自然环境中发生递减或丢失有关, 对 26 株从烧伤感染患者分离的耐庆大霉素 (GM) 铜绿假单胞菌株进行体外传代 (30 代) 培养, 研究耐庆大霉素铜绿假单胞菌在传代过程中耐药水平的变化。

材 料 与 方 法

1. 菌种: (1) 质控菌: 铜绿假单胞菌 ATCC27853, 北京生物制品检定所提供。(2) 试验菌: 26 株耐庆大霉素铜绿假单胞菌 (中等水平耐药 6 株, 高水平耐药 20 株), 均为广州市红十字会医院烧伤感染患者分离菌株, 经 AUTOSAN-4 细菌鉴定

仪进行细菌鉴定及药物敏感试验。

2. 试剂及抗生素: 营养琼脂, 批号: 990201, 上海市医学化验所试剂厂产品。硫酸庆大霉素 (gentamicin, GM), 批号: 990813, 剂型: 80 mg/2 ml, 广州番禺市桥药品厂产品。

3. 方法: (1) 耐 GM 铜绿假单胞菌单克隆菌株子代传代培养: 在营养琼脂平皿上分离耐 GM 铜绿假单胞菌单克隆菌株接种到琼脂斜面作子 1 代培养, 35.5 ~ 36℃ 孵育 24 h。从子 1 代斜面挑取菌落转种至另一斜面作子 2 代培养, 同上方法每株菌 24 h 传 1 代共传 30 代, 分别对每株菌子 1、10、20、30 代进行 MIC 及 MBC 检测。(2) 耐 GM 铜绿假单胞菌 MIC 检测采用试管肉汤稀释法 (常量稀释法)^[1]: 以铜绿假单胞菌 ATCC 27853 MIC 0.5 ~ 2 μg/ml 为质控标准, 26 株试验菌按 MIC 值分高水平及中等水平耐药, 其中高水平耐 GM 有 20 株, 庆大霉素 MIC 范围在 5 000 ~ 40 000 μg/ml, 6 株中等水平耐庆大

表 1 26 株 PA 分组子代 MIC 均值(μg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The average MIC values in the filial generations from 26 strains of PA (μg/ml, $\bar{x} \pm s$)

分 组	例数(株)	体外传代序数(代)			
		1	10	20	30
高水平组	20	14655 ± 1.69	18664 ± 1.73	19320 ± 1.61	16827 ± 1.73
中水平组	6	25 ± 1.43	20 ± 1.55	25 ± 1.43	25 ± 1.43

注: 各组子代间 MIC 均值多重比较, $P > 0.05$

表 2 26 株 PA 分组子代 MBC 均值(μg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The average MBC values in the filial generations from 26 strains of PA (μg/ml, $\bar{x} \pm s$)

分 组	例数(株)	体外传代序数(代)			
		1	10	20	30
高水平组	20	54702 ± 1.61	60674 ± 1.60	67298 ± 1.47	60674 ± 1.51
中水平组	6	320 ± 2.14	254 ± 2.32	320 ± 2.14	320 ± 1.86

注: 各组子代间 MBC 均值多重比较, $P > 0.05$

霉素, MIC 范围均在 20 ~ 40 μg/ml。中等水平耐 GM 测试菌原液浓度为 1 280 μg/ml, 高水平耐 GM 测试菌原液浓度为 40 000 μg/ml, 依次倍比稀释至 13 管。接种菌量用 0.5 麦氏管^[2]比浊, 最终接种菌量约 1.5 × 10⁸ CFU/ml。35.5 ~ 36℃ 孵育 24 h 阅读 MIC 结果。以容量接种环自肉眼观察无细菌生长的试管移种一环于营养琼脂平皿 35.5 ~ 36℃ 24 h 培养, 以能杀死细菌的最低浓度为该测试菌的 MBC。

4. 统计学方法: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用最小显著差法(LSD)法^[3,4]进行单因素分析。

结 果

高水平耐 GM 组和中等水平耐 GM 组 MIC 及 MBC(子 1 代与子 10 代, 20 代, 30 代; 子 10 代与子 20 代, 30 代; 子 20 代与子 30 代) 均值间的多重比较, 每组子代间总体差异无显著变化($P > 0.05$)。认为高水平组和中等水平组各子代间 MIC 及 MBC 的差异无显著性意义, 即耐 GM 铜绿假单胞菌各子代间耐药性无发生改变(表 1, 2)。

讨 论

细菌耐药性形成目前已知主要与耐药性质粒的传递、基因突变及生理性适应三个因素有关。本实验结果表明, 耐 GM 铜绿假单胞菌在体外培养环境中即使多次传代, 基因突变(耐药性改变)的发生频率较低, 因此笔者认为, 临床烧伤创面与病区环境中分离的 PA 的不同的耐药性有研究探讨意义。PA 是条件致病菌, 广泛分布在自然界, 如正常人的皮肤、

胃肠道等, 烧伤时人体防御机制破坏, 免疫功能受损, 可导致烧伤创面内源性感染。因抗生素大量应用, 具有耐药质粒的 PA 菌株被筛选出来并在创面定植造成严重感染。这可能是临床烧伤创面分离的 PA 普遍发生多重耐药主要原因之一。

耐药 PA 在反复多次传代过程中耐药性是否会发生改变的有关研究, 少见报道。本研究根据文献[5]选用 GM 对耐药 PA 子 1 ~ 30 代进行 MIC 及 MBC 检测, 结果表明, 在没有外来因素诱导下, 高水平及中等水平耐 GM 铜绿假单胞菌在有限的传代过程中, GM 耐药水平不发生改变。当临床发现耐药水平不同的铜绿假单胞菌, 可高度怀疑是来自不同的 PA 菌株。

志谢: 本文承蒙李芳博士修改, 特此志谢。

参 考 文 献

- 俞树荣, 主编. 微生物学检验. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 456 - 462.
- 叶应妩, 王毓三, 主编. 全国临床检验操作规程. 南京: 东南大学出版社, 1997. 553 - 557.
- 杨树勤, 主编. 卫生统计学. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 235 - 240.
- 刘润幸, 主编. spss 8.0 for window 统计软件使用指南. 广州: 广东人民出版社, 1999. 67 - 75.
- 张秀珍, 主编. 当代细菌检验与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 345 - 346.
- 宋建新, 高美英. 外膜透性及 - 内酰胺酶在绿脓杆菌耐药机制中的作用. 同济医科大学学报, 1998, 12: 287 - 289.

(收稿日期: 2000 - 04 - 27)

(编辑: 张 宁)