

• 论 著 •

产生物膜的肺炎克雷伯菌的体外药敏试验探讨

石宗盛, 薛世聪

(广东省清远市中医院检验中心 511500)

摘要:目的 探讨产生物膜的肺炎克雷伯菌体外药敏试验的不同,为临床治疗提供准确的药敏参考。方法 对临床分离筛选的 16 株产生物膜的肺炎克雷伯菌用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验,记录 24、48、72 h 这几个时间段的结果。然后将菌株传种数代至其不产生物膜,再行上述操作。最后对两次的药敏结果进行对比分析。结果 产生物膜的肺炎克雷伯菌 24 h 抑菌圈的毫米数与 48、72 h 结果比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 产生物膜的肺炎克雷伯菌用 K-B 纸片扩散法进行体外药敏试验时,结果宜在 48 h 后报告,这对于该菌的预防具有一定参考价值。

关键词:细菌生物膜; 肺炎克雷伯菌; K-B 纸片扩散法; 药敏试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.023 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2017)04-0490-03

Study on in vitro drug susceptibility test of biomembrane-producing Klebsiella pneumoniae

SHI Zongsheng, XUE Shicong

(Clinical Laboratory Center, Qingyuan Municipal Hospital of traditional Chinese Medicine, Qingyuan, Guangdong 511500, China)

Abstract: Objective To study the difference of in vitro drug susceptibility test of biomembrane-producing Klebsiella pneumoniae to provide accurate drug reference for clinical treatment. Methods The drug susceptibility test was carried out in clinically isolated and screened 16 strains of biomembrane-producing Klebsiella pneumoniae by K-B paper diffusion method, and the results at 24, 48, 72 h were recorded. Then the strains were reproduced for several generations until not producing biofilm. Then the above operations were taken again. Finally, the results of twice drug susceptibility tests were performed the contrastive analysis. Results The mm number of inhibition zone of biomembrane-producing Klebsiella pneumoniae at 24 h had statistical difference compared with that at 48, 72 h ($P<0.05$). Conclusion When the in vitro drug susceptibility test of biomembrane-producing Klebsiella pneumoniae is conducted by K-B paper diffusion method, it is suitable to report the results after 48 h, this has a certain reference value for preventing this bacterium.

Key words: bacterial biofilm; Klebsiella pneumoniae; K-B disk diffusion method; drug sensitivity test

生物膜也称为生物被膜,是细菌黏附于生物材料或机体腔道表面,分泌多糖蛋白复合物并将其自身包绕其中,形成大量细菌聚合体的膜状物^[1]。随着对细菌致病机制的进一步了解,发现生物膜细菌对抗菌药物和宿主免疫防御机制的抵抗性很强,从而导致严重的临床问题,尤其是慢性和难治的感染性疾病,因此,需重视对产生物膜现象的研究。肺炎克雷伯菌是临床中常见的易形成生物膜的条件致病菌。肺炎克雷伯菌产生物膜是肺部等组织感染后,抗菌药物治疗失败的常见原因,因此本实验为探讨产生物膜的肺炎克雷伯菌体外药敏试验的方法,为临床治疗提供准确的药敏结果。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 2016 年 1—11 月临床分离保存的 156 株来自下呼吸道的肺炎克雷伯菌,质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 均购自原卫生部临检中心。

1.2 产生物膜菌株筛选 使用试管培养法对保存的肺炎克雷伯菌进行筛选:挑取待检菌株接种于培养液,37℃振荡培养过夜;转接 20 μL 过夜培养物加入装有 2 mL 培养液的玻璃试管中;在 37℃恒温振荡器上以 150 r/min 培养 12~16 h;将试管中的培养液倒净后,加入 2.5 mL 的 1% 结晶紫溶液,室温孵育

5 min;将试管中的结晶紫染色液倒净后,流水冲洗试管 3~5 min;把试管倒置在滤纸上除去残余的水,在 37℃烘箱中烘干,设置空白对照,观察、记录^[2-3]。最终筛选出 16 株产生物膜的肺炎克雷伯菌。

1.3 转种后生物膜消失菌株的确认 将上述筛选出来的 16 株菌株进行转种,每转种一代后进行上述试管培养法试验判断其生物膜是否消失,如果没消失继续转种,直至 16 株菌株的生物膜都消失。

1.4 仪器与试剂 BD 公司的 PHOENIX100 分析仪及仪器相配套的革兰阴性、阳性细菌鉴定/药敏板。血平板及 MH 平板均为安图公司产品。亚胺培南(IPM)、头孢他啶(CAZ)、左氧氟沙星(LEV)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、头孢吡肟(FEP)、庆大霉素(CN10)、莫西林/克拉维酸钾(AMC)、头孢曲松(CRO)、头孢唑林(CZO)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)10 种药敏纸片均为英国 OXOID 公司产品。

1.5 方法 将分离出的 16 株产生物膜的肺炎克雷伯菌进行体外 K-B 法药敏试验,记录 24、48、72 h 不同时间段的药敏结果。然后将 16 株菌进行转种数代使其生物膜消失,再进行上述试验,最后对上述两次结果做对比分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行处理,计

量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺炎克雷伯菌转种前后体外药敏试验结果比较 16 株产生物膜的肺炎克雷伯菌转种前体外 K-B 法药敏试验 24 h 抑菌圈直径与转种前 48、72 h 及转种后 24、48、72 h 抑菌圈直径

比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 抗菌药物敏感、中介、耐药结果 16 株转种前后产生物膜的肺炎克雷伯菌体外 K-B 法药敏试验 24 h 的敏感(S)、中介(I)、耐药(R)结果与 48、72 h 结果出现不同程度变化, 见表 2。

表 1 肺炎克雷伯菌转种前后不同时间段抑菌圈的直径比较($\bar{x} \pm s$, mm)

抗菌药物	转种前			转种后		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
IPM	30.13±4.23	26.11±3.21	25.91±3.31	26.45±3.28	26.08±3.41	25.95±3.37
CAZ	31.12±5.03	25.26±5.65	25.04±5.21	26.32±5.11	25.84±5.33	25.15±5.28
LEV	26.15±5.31	21.24±4.65	20.77±4.56	21.54±4.76	21.11±4.65	20.83±4.71
TZP	27.63±6.31	22.33±5.34	21.87±5.18	23.31±5.64	22.41±5.47	21.95±5.27
FEP	30.88±6.22	24.87±5.66	24.16±5.23	25.53±5.54	24.91±5.34	24.32±5.37
CN10	25.89±5.21	20.56±4.78	19.87±4.66	20.66±4.76	20.23±4.62	19.78±4.53
AMC	28.54±4.46	22.45±4.21	22.14±4.37	23.33±4.54	22.89±4.45	22.23±4.22
CRO	25.78±5.43	19.87±4.81	19.22±4.11	20.84±4.78	20.32±4.59	19.33±4.53
CZO	23.67±6.33	18.56±4.32	18.13±4.11	18.78±4.65	18.23±4.53	18.05±4.25
SAM	24.64±5.87	19.54±4.43	19.16±4.35	20.36±4.76	19.76±4.65	19.23±4.53

表 2 抗菌药物敏感、中介、耐药结果比较(n)

项目	IPM			CAZ			LEV			TZP			FEP			
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
转种前	24 h	16	0	0	16	0	0	16	0	0	16	0	0	16	0	0
	48 h	15	1	0	14	1	1	15	1	0	14	2	0	15	1	0
	72 h	15	1	0	14	1	1	15	1	0	14	2	0	15	1	0
转种后	24 h	15	1	0	14	1	1	15	1	0	14	2	0	15	1	0
	48 h	15	1	0	14	1	1	15	1	0	14	2	0	15	1	0
	72 h	15	1	0	14	1	1	15	1	0	14	2	0	15	1	0

续表 2 抗菌药物敏感、中介、耐药结果比较(n)

项目	CN10			AMC			CRO			CZO			SAM			
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
转种前	24 h	15	1	0	14	1	1	13	2	1	12	3	1	13	2	0
	48 h	13	2	1	12	2	1	11	3	2	10	4	2	12	1	2
	72 h	13	2	1	12	2	1	11	3	2	10	4	2	12	1	2
转种后	24 h	13	2	1	12	2	1	11	3	2	10	4	2	12	1	2
	48 h	13	2	1	12	2	1	11	3	2	10	4	2	12	1	2
	72 h	13	1	2	12	2	1	11	2	3	10	4	2	12	1	2

3 讨 论

生物膜的多细胞结构的形成是一个动态过程, 包括细菌起始黏附、生物膜发展和成熟等阶段, 生物膜细菌在各阶段具有不同的生理生化特性。细菌首先通过表面的黏附蛋白与物体或宿主结合, 然后分泌大量细胞外多糖使多个细菌黏合形成微菌落, 最后微菌落内部出现复杂的结构和特殊的信号转导系统

标志生物膜形成。细菌菌毛、荚膜及糖转运系统可能参与肺炎克雷伯菌生物膜的形成。菌毛在细菌表面, 其中Ⅲ型菌毛在肺炎克雷伯菌生物膜形成早期的附着及细菌间相互粘连中起重要作用^[4-5]。荚膜多糖可能是细菌胞间间质的主要成分, 糖转运系统可能参与基质多糖的转运。此过程中可有多种调控因子参与, 但具体机制还不明确^[6]。生物膜是细菌的特殊存在形式, 为细菌适应环境而使用的一种对策, 是抵抗机体防御和限

制抗菌药物接触细菌的屏障。由于能够形成生物膜,使肺炎克雷伯菌的感染出现急性发作期与静止期交替、容易复发、难以根治等一系列特点^[7-8]。因此为临床治疗提供准确的药敏结果给临床提供及时的用药参考具有非常重要的意义。生物膜内细菌生长环境极度拥挤及有毒的代谢物堆积,使许多细菌得不到充足的营养,再加上分泌的黏性多糖等物质阻滞其生长,因而生物膜内细菌生长速度大大减慢。K-B 法药敏试验要求 24 h 内报告结果,对于产生物膜细菌来说可能会有部分药敏纸片周围的细菌还未生长,错误地认为此种抗菌药物对细菌抑制作用非常强,而报告此抗菌药物敏感。在试验中 10 种抗菌药物的抑菌圈直径都有改变且 24 h 结果与 48、72 h 结果比较差异有统计学意义($P<0.05$)。为了解此菌黏液消失后,K-B 药敏法实验结果有无此种现象,将分离到的 16 株产生物膜的肺炎克雷伯菌反复传种数代,至生物膜消失,细菌生长速度恢复正常,再做 K-B 法药敏试验,其 24、48、72 h 的抑菌环直径比较差异无统计学意义($P>0.05$)。并与未转种前的产生物膜的肺炎克雷伯菌 48、72 h 结果相一致。这或许是患者体外 K-B 药敏法 24 h 报告的抗菌药物敏感,而体内细菌清除效果不好的原因之一,因而对于产生物膜的肺炎克雷伯菌体外 K-B 药敏法的结果宜 48 h 后报告,对于该菌的预防具有一定参考价值。

肺炎克雷伯菌产生物膜与其对碳青霉烯类药物、 β -内酰胺类药物的耐药密切相关,作用机制有抗菌药物被阻止进入生物膜;生物膜内的抗菌药物作用位点改变或者失效;生物膜中的低营养条件导致静止状态的细菌增多并长期存在,这使得仅杀伤分裂状态细菌的抗菌药物难以发挥作用等一系列机制^[9-11]。因此对产生物膜的肺炎克雷伯菌使用单一 β -内酰胺类、碳青霉烯类药物治疗将大大提高耐药风险。有研究表明大环内酯类药物与碳青霉烯类药物联合有较好的抑菌效果^[12],这可能与大环内酯类药物的作用机制有关,它能抑制细菌的蛋白质合成从而抑制生物膜的形成,使得碳青霉烯类、 β -内酰胺类等敏感药物可以接触到菌体并达到一定的药物浓度从而起到杀菌的作用。因而在日常的临床工作中需加强对肺炎克雷伯菌产生物膜现象的重视,在临床标本直接涂片镜检中或者纯培养后发现肺炎克雷伯菌产生物膜的现象,应在报告单上标识此菌产生

物膜,以提示临床医生需联合用药,使患者得到及时有效的治疗。

参考文献

[1] 李蓉,葛新. 抗生素对肺炎克雷伯菌生物膜的杀灭作用研究[J]. 预防医学论坛,2008,14(2):141-142.

[2] 李京宝,韩峰,于文功. 细菌生物膜研究技术[J]. 微生物学报,2007,47(3):558-561.

[3] 杨朵,张正. 两种检测肺炎克雷伯菌生物膜方法的比较[J]. 中国实验诊断学,2008,12(10):1297-1298.

[4] 沈定树,施致远. 克雷伯菌致病因子的研究进展[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册,2005,26(1):57-59.

[5] 杨朵,张正. 肺炎克雷伯菌生物膜及黏附因子 mrkD 的测定[J]. 现代检验医学杂志,2008,23(3):24-26.

[6] 雷旭,谭华炳. 肺炎克雷伯菌 cAMP 受体蛋白基因缺失株的构建及其在生物膜形成中的作用[J]. 中华实验和临床感染病杂志,2014,8(2):153-157.

[7] 魏丹丹,刘洋,万腊根,等. 高毒力肺炎克雷伯菌新型变种感染病例分析及耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(6):392-396.

[8] 葛新,董小青,王玉祥. 肺炎克雷伯菌生物膜对消毒剂抵抗性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(2):231-232.

[9] 乔晓戔,芦起. 肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类药物的机制[J]. 临床儿科杂志,2015,33(10):907-911.

[10] 尹辉,陈群. 肺炎克雷伯菌耐 β -内酰胺类抗生 素的研究进展[J]. 国外医学:流行病学传染病学分册,2003,30(1):39-42.

[11] 许春. 肺炎克雷伯杆菌对 β -内酰胺类抗生 素的耐药机制[J]. 中国热带医学,2006,6(9):1673-1675.

[12] 穆小萍,唐玲玲,纪存委,等. 阿奇霉素联合亚胺培南对肺炎克雷伯菌生物膜的抑制作用[J]. 中国抗生素杂志,2015,40(8):617-620.

(收稿日期:2016-09-16 修回日期:2016-11-07)

(上接第 489 页)

[8] Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation[J]. N Engl J Med,2005,352(12):1179-1189.

[9] Fifi JT, Brockington C, Narang J, et al. Clopidogrel resistance is associated with thromboembolic complications in patients undergoing neurovascular stenting [J]. Ame J Neur,2013,34(4):716-720.

[10] Fu Z, Dong W, Shen M, et al. Relationship between hyporesponsiveness to clopidogrel measured by thrombelastography and in stent restenosis in patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. Clin Biochem,2014,

47(16/17):197-202.

[11] 张海涛,苟文,秦华迪,等. CYP2C19 基因多态性对氯吡格雷抵抗患者预后的影响[J]. 检验医学与临床,2014,11(13):1761-1763.

[12] 邢元,李为民. 氯吡格雷抵抗中基因多态性研究进展[J]. 国际心血管病杂志,2014,41(2):91-94.

[13] Hu Y, Tan H, Chen YJ, et al. Relationship of CYP2C19 gene polymorphisms, clopidogrel resistance and prognosis in patients with coronary heart disease after PCI[J]. Mol Car,2015,15(2):1250-1255.

(收稿日期:2016-10-29 修回日期:2016-12-20)