

抗生素使用剂量对葡萄球菌生长繁殖的影响*

桂芳, 邹珍, 汤朗媚, 林章强, 石玉慧, 张媛, 龚为 (湖南怀化医学高等专科学校检验系 418000)

【摘要】 目的 通过观察不同浓度抗生素作用下葡萄球菌生长繁殖的规律, 探讨耐药菌形成的机制, 并指导临床用药。**方法** 将金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌接种至含不同浓度呋喃妥因、头孢呋辛的培养基内, 在培养的不同时间检测细菌的生长情况, 绘制细菌的生长曲线。**结果** 低于最低抑菌浓度(MIC)的敏感抗生素对葡萄球菌早期有抑菌作用, 但培养 24 h 后, 细菌数量有增高趋势; 耐药抗生素在 18~24 h 内对两种葡萄球菌都具有不同程度抑制作用, 浓度越高抑菌作用越强, 但在培养后期细菌的生长速度明显增快。**结论** 应根据药敏试验合理选择抗生素, 并做到足量全程用药, 以避免耐药性变异。

【关键词】 抗生素; 耐药性; 金黄色葡萄球菌; 表皮葡萄球菌

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 08. 028 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)08-0971-02

金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌是引起多种化脓性感染的常见病原菌, 并且易发生耐药性变异, 特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 往往对多种抗生素同时耐药, 给临床治疗带来很大困难。为了解抗生素的使用剂量对葡萄球菌抑菌作用的影响, 进一步探讨耐药菌的形成原因和机制, 指导临床用药, 本文分别以不同浓度的敏感抗生素和耐药抗生素作用于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌, 观察细菌的生长情况, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗生素 呋喃妥因(粉剂)、头孢呋辛(粉剂), 生产厂家: 山东罗欣药业股份有限公司。

1.1.2 菌株 实验菌株: 1 株金黄色葡萄球菌和 1 株表皮葡萄球菌均来自怀化市第一人民医院临床分离菌株, 质控菌株: 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为本校微生物实验室保存菌种。

1.1.3 培养基 MH 营养肉汤和 MH 营养琼脂培养基购自卫生部杭州天和生物制品研究所, 按说明配制。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 采用纸片扩散法(K-B 法)分别检测不同菌株来源金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌对抗生素的敏感性, 并用稀释法检测其最低抑菌浓度(MIC)。

1.2.2 抗菌药物的稀释 根据最低抑菌浓度检测结果, 用无菌蒸馏水稀释头孢呋辛、呋喃妥因, 取稀释液分别加入营养肉汤培养基内, 使头孢呋辛的终浓度分别为 2 000、1 000、500、250、125、62.5 U/mL, 呋喃妥因的最终浓度分别为 100、50、25、12.5、6.75、3.375 U/mL。

1.2.3 细菌接种 将金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌分别接种于 MH 固体培养基中分离培养, 各挑取 1 个直径约 1 mm 的典型菌落溶于 1 mL 的无菌生理盐水, 经稀释后分别接种 0.05 mL 于上述不同浓度的抗生素培养基, 并接种一只不含抗生素的 MH 肉汤作为对照, 置 37℃ 温箱培养 18~24 h。

1.2.4 细菌计数 分别在培养的 0、12、18、24、36、48 h 的培养物中各取出 5 μL 培养物分别接种于营养琼脂平板上, 置 37℃ 温箱内培养 18~24 h 后计菌落数(CFU)。

2 结果

2.1 药敏试验结果 临床分离的金黄色葡萄球菌对头孢呋辛

耐药, MIC 为 2 000 U/mL, 表皮葡萄球菌对头孢呋辛耐药, MIC 为 2 000 U/mL, 对呋喃妥因敏感, MIC 为 100 U/mL。

2.2 3 株葡萄球菌在无抗生素 MH 培养基中的生长情况 在 MH 培养基内, 金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌临床分离菌株和金黄色葡萄球菌质控菌株在 12~18 h 内生长迅速, 符合对数期特点, 24 h 后繁殖速度减慢, 进入稳定期和衰亡期。临床分离菌株在对数期的繁殖速度比质控菌株快(图 1)。

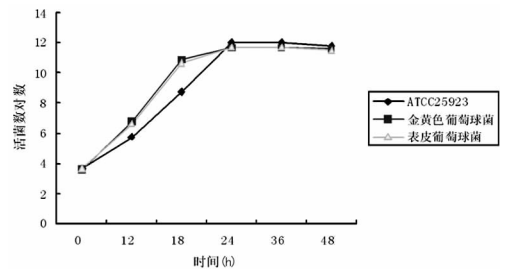


图 1 三株葡萄球菌生长曲线

2.3 呋喃妥因对表皮葡萄球菌生长繁殖的影响 呋喃妥因在培养基内对表皮葡萄球菌的生长抑制作用显著, 与无抗生素培养基相比, 在受到不同浓度呋喃妥因作用后细菌数量均呈下降趋势, 其中以 MIC(100 U/mL) 和 50 U/mL 二种药物浓度对细菌的生长抑制作用最明显; 随着药物浓度降低, 虽然早期有抑菌作用, 但在培养 24 h 后, 细菌繁殖数量呈增高趋势, 例如在 3.19 U/mL 药物浓度培养基中, 细菌数量由 24 h 时的 8.0×10^6 CFU/mL 增高至 48 h 时的 3.0×10^8 CFU/mL(图 2)。

2.4 头孢呋辛对表皮葡萄球菌生长繁殖的影响 头孢呋辛在培养基内对表皮葡萄球菌早期具有一定抑制作用, 其中以 2 000 U/mL 药物浓度对细菌的抑制作用最明显。与无抗生素培养基相比, 不同浓度头孢呋辛作用后 18~24 h 内细菌数量均有所下降, 但在 24 h 后细菌繁殖速度增快, 细菌数量逐渐增多, 其中在 62.5 U/mL 药物浓度培养基中, 细菌数量由 24 h 时的 9.6×10^9 CFU/mL 增高至 48 h 时的 1.8×10^{11} CFU/mL, 与无抗生素培养基细菌数量相近(图 3)。

2.5 头孢呋辛对金黄色葡萄球菌生长繁殖的影响 与无抗生

* 基金项目: 怀化医专大学生研究性学习和创新性实验计划项目。

素培养基相比,头孢呋辛在培养基内对金黄色葡萄球菌的生长早期具有一定抑制作用,其中高浓度头孢呋辛(2 000 U/mL 和 1 000 U/mL)在 18 h 内对细菌的抑制作用较为显著,但之后细菌数量逐渐增高;在其余药物浓度(500、250、125、62.5 U/mL)作用下,24 h 内细菌数量有所下降,但此后细菌繁殖速度也逐渐增快,至 48 h 时与无抗生素培养基内的细菌数量接近。

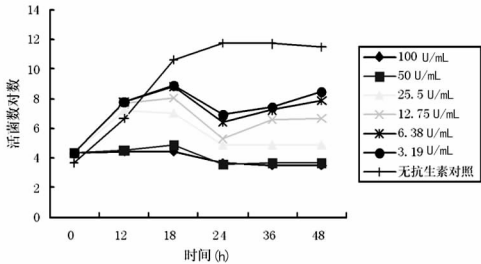


图 2 不同浓度呋喃妥因对表皮葡萄球菌生长繁殖的影响

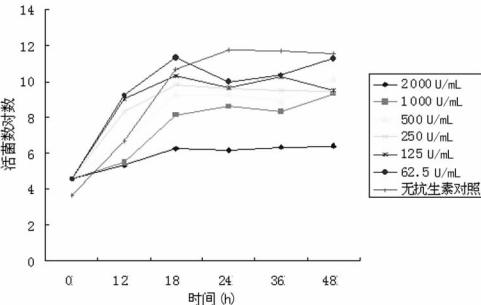


图 3 不同浓度头孢呋辛对表皮葡萄球菌生长繁殖的影响

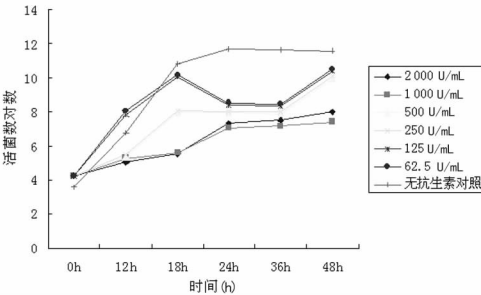


图 4 不同浓度头孢呋辛对金黄色葡萄球菌生长繁殖的影响

3 讨 论

金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌是引起多种化脓性感染的常见病原菌之一,近年来,这两种葡萄球菌的分离率均呈明显上升趋势。有资料表明,引起医院感染的病原菌中,革兰阳性菌最常见的是葡萄球菌,且多为耐药菌株^[1-5]。特别是随着抗生素的广泛应用,耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)和多重耐药的表皮葡萄球菌在全球蔓延,因此,抗生素的使用规范日益受到临床重视。

本研究发现,临床分离的金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌在对数期繁殖能力均比标准质控菌株强,说明体内环境更能促进病原菌的生长,以至于在培养早期仍保持其旺盛的繁殖能力。在受到不同浓度抗生素作用后,敏感抗生素(呋喃妥因)在 MIC 浓度下对表皮葡萄球菌的抑制作用显著,甚至在低于 MIC 浓度作用下,细菌的生长也受到一定抑制。但随着抗生素浓度的逐步降低,培养 24 h 后细菌数量呈增高趋势,提示在

低浓度抗生素的诱导和选择下,部分细菌可能已发生耐药性变异,由于耐药菌大量繁殖导致细菌数量的增加。两种葡萄球菌虽然对头孢呋辛均耐药,但在体外培养的早期,头孢呋辛对两种葡萄球菌都具有一定抑制作用,并且抑制能力与药物浓度呈正比关系;但培养 24 h 后,细菌的繁殖速度均开始增快,可见,葡萄球菌对耐药抗生素有一个早期适应阶段。因此,临床经验用药或不规范使用抗生素在用药早期可能会收到一定治疗效果,但在后期,随着耐药菌的大量繁殖会导致治疗失败,造成疾病的慢性化或反复发作,并有利于耐药菌的播散。

临床分离的金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌往往是多重耐药菌株,其耐药机制主要包括:(1)由质粒编码的 β -内酰胺酶使药物水解而耐药;(2)由 *mecA* 基因编码的青霉素结合蛋白 PBP2a 导致耐药;(3)多种主动外排系统降低细胞内抗菌药物浓度而引起耐药;(4)形成生物膜、产生钝化酶等^[6-9]。本研究中,对呋喃妥因敏感的表皮葡萄球菌在持续低浓度药物接触和诱导下,有利于开启细菌的耐药基因(如抗菌药物水解酶基因),从而导致耐药菌的形成。另一方面,对头孢呋辛耐药的金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌,在药物作用的早期对细菌生长繁殖都具有一定抑制作用,可能与质粒在细菌之间的传递过程有关,也可能是相关耐药基因的转录和表达过程尚未完成。

故此,临床应加强对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的检测,并根据药敏试验结果合理用药,规范使用抗生素,对敏感抗生素要做到足量全程用药,这对于避免耐药菌的形成和播散具有非常重要的意义。

参考文献

[1] 李耀军,王莉.金黄色葡萄球菌医院感染的分布和耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(15):3368-3369.
[2] 文细毛,任南,吴安华,等.全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J].中华医院感染学杂志,2011,21(2):350-355.
[3] 张卫良,黄琨明.凝固酶阴性葡萄球菌医院感染及耐药性分析[J].检验医学与临床,2012,9(8):949-951.
[4] 张丽君.2011 年医院临床常见病原菌分布及耐药性分析[J].检验医学与临床,2012,9(10):1193-1194.
[5] 李明安,谢新园,司丽媛.住院患者耐甲氧西林葡萄球菌感染分布及流行性研究[J].检验医学与临床,2010,7(24):2753-2754.
[6] 郭利平,王晓彦.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究进展[J].中国感染控制杂志,2012,11(1):78-80.
[7] 卢天舒,关靖宇,安春丽.凝固酶阴性葡萄球菌临床流行及其耐药性研究现状[J].临床军医杂志,2010,38(3):451-453.
[8] 阳苹,夏云.葡萄球菌感染的临床分布及耐药性分析[J].重庆医学,2012,41(30):3167-3168.
[9] 朱道,王丽英,朱海平.凝固酶阴性葡萄球菌的鉴定及分类[J].国际检验医学杂志,2012,33(14):1685-1686.