

亚抑菌浓度莫匹罗星对烧伤创面分离铜绿假单胞菌生物膜的影响

孙凤军^{1*}, 陈盛², 枉前³, 冯伟¹, 夏培元^{1#} (1. 第三军医大学西南医院药剂科, 重庆 400038; 2. 第三军医大学西南医院儿科, 重庆 400038; 3. 第三军医大学新桥医院药剂科, 重庆 400037)

中图分类号 R969.1; R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)14-1939-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.14.21

摘要 目的: 研究烧伤患者伤口分离铜绿假单胞菌的耐药性, 并探讨亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生物膜的作用。方法: 采用琼脂平板倍比稀释法检测 30 株临床分离铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度 (MIC), 菌落计数法分析亚抑菌浓度 (1/4 MIC) 莫匹罗星对铜绿假单胞菌黏附性的影响, 96 孔板结晶紫染色法检测亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响。结果: 我院临床烧伤患者分离的铜绿假单胞菌对莫匹罗星、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、左氧氟沙星、庆大霉素、奈替米星具有较高的耐药性, 而对头孢他啶和氨曲南的敏感性较高。亚抑菌浓度莫匹罗星对临床分离铜绿假单胞菌的黏附性和生物膜形成均有抑制作用。结论: 莫匹罗星可抑制铜绿假单胞菌生物膜形成, 但其抑制程度具有菌株差异性。

关键词 莫匹罗星; 铜绿假单胞菌; 生物膜; 亚抑菌浓度

Effect of Sub-minimal Inhibitory Concentration Mupirocin on Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wounds

SUN Feng-jun¹, CHEN Sheng², WANG Qian³, FENG Wei¹, XIA Pei-yuan¹ (1. Dept. of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Dept. of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Dept. of Pharmacy, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients' burn wounds and analyze the effect of sub-minimal inhibitory concentration (sub-MIC) mupirocin on biofilm of *P.aeruginosa*. METHODS: The MIC of 30 batches *P.aeruginosa* clinical isolates was determined by the agar double dilution method. The effect of sub-MIC mupirocin on the adhesion of *P.aeruginosa* was analyzed by using flat colony counting method, and the effect of sub-MIC mupirocin on biofilm formation of *P.aeruginosa* was assayed by using the 96-well crystal violet staining method. RESULTS: *P.aeruginosa* strains isolated from burn patients had high resistance to mupirocin, piperacillin, imipenem, meropenem, levofloxacin, gentamicin and netilmicin. However, they were more sensitive to ceftazidime and aztreonam. The sub-MIC mupirocin could inhibit the adhesion and biofilm formation of *P.aeruginosa*. CONCLUSIONS: Mupirocin could inhibit the biofilm formation of *P. aeruginosa*, but its inhibition had differences among the strains.

KEYWORDS Mupirocin; *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilm; Sub-minimal inhibitory concentration

烧伤创面由于破坏了皮肤的防御系统, 并为细菌提供了生长所需的养分和适宜的温度, 使细菌易于在创面上大量繁殖, 导致伤口感染, 延缓患者的康复。莫匹罗星作为一种新型的外用抗菌药物, 可预防控制细菌的感染, 减轻创面的炎症反应, 促进创面愈合^[1]。铜绿假单胞菌是引起烧伤感染的主要细菌, 也是常见的生物膜感染病原菌^[2-3]。形成生物膜的铜绿假单胞菌高度耐药并能逃避免疫系统攻击, 难于治疗^[4-5]。莫匹罗星虽然是烧伤患者最常见的局部用药之一, 但目前尚缺乏其对铜绿假单胞菌的耐药及生物膜作用的相关研究。本研究拟以烧伤患者临床分离的铜绿假单胞菌为研究对象, 分析其耐药情况及对莫匹罗星的敏感性, 并进一步研究亚抑菌浓

度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生物膜的作用。

1 材料

1.1 仪器

VITEK-2 全自动细菌分析仪 (法国生物梅里埃公司); 酶标仪 (美国 MD 公司); 多点接种仪 (日本佐久间公司)。

1.2 菌株来源

30 株临床分离铜绿假单胞菌 (PA1-PA30) 均分离自第三军医大学西南医院 (以下简称“我院”) 2013 年住院烧伤患者的伤口临床送检标本。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 由我院药剂科实验室保存。

1.3 药品

莫匹罗星标准品购自美国 Sigma 公司 (纯度 > 99%); 哌拉西林、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、氨曲南、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素、阿米卡星和奈替米星均购自中国食品药品

* 主管药师。研究方向: 细菌耐药及致病机制。电话: 023-68765991。E-mail: fengji_sun@163.com

通信作者: 主任药师, 教授, 博士生导师。研究方向: 细菌耐药及感染防治。电话: 023-68754438。E-mail: peiyuan_xia@aliyun.com

检定研究院。

1.4 试剂

MH培养基(北京陆桥生物技术有限公司);LB培养基、LB肉汤(美国BD公司);胰蛋白胨、酵母提取物(英国Oxoid公司);氯化钠(上海升博生物制品公司)。

2 方法

2.1 最低抑菌浓度(MIC)测定

采用琼脂平板倍比稀释法检测MIC。-70℃保存铜绿假单胞菌划线接种于MH琼脂平板,37℃恒温活化培养18h,挑单菌落用生理盐水将菌液稀释校正至0.5麦氏单位(约108 CFU/ml),以多点接种仪将1~2μl菌液接种至含不同浓度药物的MH琼脂平板,每个接种点的含菌量约105 CFU/ml。37℃孵育18h后判断结果,以能完全抑制细菌生长的最低药物浓度为MIC,结果按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2012年标准判读。

2.2 亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生长的影响

取铜绿假单胞菌过夜培养物以1:100比例接种于LB培养基中,37℃以转速为200 r/min、离心半径为9.5 cm振荡培养18h。取菌液1:1 000接种于新鲜的LB培养基。每个菌株均分为空白对照组和莫匹罗星组。空白对照组不加药物,莫匹罗星组药物的终浓度为1/4 MIC。然后以每孔1 ml加入24孔培养板中,每个样本3个复孔,用全波段酶标仪在光密度(OD)600 nm处测定其生长曲线。每2 h测定一次读数,测定周期为24 h。

2.3 亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌黏附性的影响

采用菌落计数法。将培养过夜的铜绿假单胞菌稀释至0.5麦氏单位,再用LB肉汤稀释100倍。然后在CLSM培养皿中加入1 ml菌液和1 ml莫匹罗星,使莫匹罗星终浓度为1/4 MIC。空白对照组加入2 ml菌液。37℃培养4 h后,用无菌的磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,去除浮游菌。然后将PBS加入CLSM培养皿中超声10 min,以使黏附的细胞脱落。最后将细胞悬浮液稀释至合适浓度,涂布于LB培养基上,37℃培养24 h后计数。每个样本设置3个平行组,试验重复3次。

2.4 亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响

参考文献[6]采用96孔板结晶紫染色法。LB平板转铜绿假单胞菌过夜活化,挑单菌落于10 ml LB肉汤中摇菌约18 h,以比浊法稀释至0.5麦氏单位,再用LB肉汤稀释100倍。试验分为空白对照组(不加药)和莫匹罗星组(终浓度为1/4 MIC),每组设置3个复孔,37℃孵育24 h。以每孔PBS 200 μl轻柔冲洗2次,将96孔板倒置于通风阴凉处进行风干固定。固定24 h后,以每孔1%结晶紫溶液200 μl染色10 min,移除结晶紫溶液,并以流水冲洗96孔板至空白对照孔无明显颜色,再次倒置于通风阴凉处进行风干。风干后每孔加入30%冰醋酸溶液100 μl充分溶解染色液,酶标仪590 nm处测定OD。

2.5 统计学方法

细菌生物膜形成的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异性采用SPSS 10.0软件进行t检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 抗菌药物MIC测定

铜绿假单胞菌对莫匹罗星、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、左氧氟沙星、庆大霉素、奈替米星具有较高的耐药性,而对头孢他啶和氨曲南的敏感性较高。铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药性见表1。

表1 铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药性

Tab 1 Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to the common antimicrobial agents

药品名称	耐药率,%(株)	敏感率,%(株)
莫匹罗星	86.7(26)	13.3(4)
哌拉西林	60.0(18)	40.0(12)
头孢他啶	26.7(8)	73.3(22)
亚胺培南	53.3(16)	46.7(14)
美罗培南	50.0(15)	50.0(15)
氨曲南	30.0(9)	70.0(21)
环丙沙星	43.3(13)	56.7(17)
左氧氟沙星	53.3(16)	46.7(14)
庆大霉素	53.3(16)	46.7(14)
阿米卡星	33.3(10)	66.7(20)
奈替米星	53.3(16)	46.7(14)

3.2 亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生长的影响

在0~24 h的13个观察时间点,1/4 MIC莫匹罗星对30株铜绿假单胞菌生长均无影响。

3.3 亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌黏附性的影响

与空白对照组相比,莫匹罗星组铜绿假单胞菌黏附细胞数降低一半以上的有10株,降低比例为30%~50%的有12株,降低比例为10%~30%的有5株,而降低比例<10%的有3株。亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌黏附细胞数的影响见表2。

表2 亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌黏附细胞数的影响

Tab 2 Effect of sub-MIC mupirocin on the adhesion cells of *Paeruginosa*

降低比例	菌株
>50%	PA6、PA12、PA15、PA16、PA17、PA21、PA24、PA25、PA28、PA30
30%~≤50%	PA1、PA3、PA4、PA7、PA9、PA11、PA13、PA19、PA20、PA23、PA26、PA29
10%~≤30%	PA2、PA8、PA10、PA18、PA27
<10%	PA5、PA14、PA22

3.4 亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响

1/4 MIC莫匹罗星对铜绿假单胞菌生物膜形成具有抑制作用。除了铜绿假单胞菌PA5、PA14、PA22差异无统计学意义($P > 0.05$)外,莫匹罗星对其他27株菌的生物膜均有显著的抑制效果($P < 0.05$)。亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响见图1。

4 讨论

铜绿假单胞菌是烧伤感染的重要病原菌,其分离率居革兰阴性菌首位^[2-3]。本研究发现我院烧伤患者临床分离的铜绿假单胞菌对大部分试验所选用药物具有较高的耐药性,高于国内文献的报道^[2,7],其原因可能是我院烧伤科为全国最大的烧伤治疗中心,收治的危重患者较多,转院患者多。然而,铜

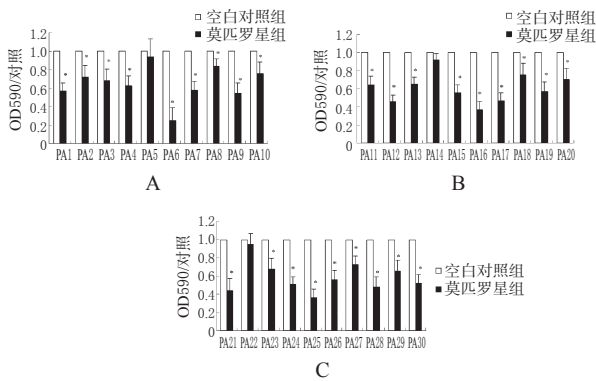


图1 亚抑菌浓度莫匹罗星对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响
A. PA1~PA10菌株; B. PA11~PA20菌株; C. PA21~PA30菌株
注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

Fig 1 Effect of sub-MIC mupirocin on biofilm formation of *P.aeruginosa*

A. PA1-PA10; B. PA11-PA20; C. PA21-PA30
Note: vs. control group, * $P < 0.05$

绿假单胞菌对头孢他啶和氨曲南具有较高的敏感性,可能与我院抗菌药物的使用习惯有关。由于烧伤患者失去了皮肤屏障,加之酸碱电解质的紊乱易导致并发感染,因此烧伤严重患者多经过抗感染治疗。我院临床烧伤患者伤口分离铜绿假单胞菌的高耐药率提示针对烧伤科的铜绿假单胞菌感染要根据药敏结果选择抗菌药物。

莫匹罗星是临床上常用的烧伤局部抗菌药物,其对革兰阳性菌具有较好的抗菌活性,并且对金黄色葡萄球菌生物膜具有抑制作用^[8],而对铜绿假单胞菌的MIC较高^[9]。根据文献和临床上莫匹罗星在局部用药时的用药浓度,笔者选择1/4 MIC为亚抑菌浓度,对于MIC>1 024 $\mu\text{g/ml}$ 的菌株,选择512 $\mu\text{g/ml}$ 为试验浓度^[6]。研究发现,1/4 MIC莫匹罗星对细菌的生长几乎无抑制作用,但是可以抑制铜绿假单胞菌的黏附和生物膜的形成。莫匹罗星对30株临床分离的铜绿假单胞菌生物膜的作用显示,除3株差异无统计学意义外,其他均有明显抑制,说明莫匹罗星对生物膜的抑制具有菌株差异性,但未发现其对生物膜有诱导作用。由于形成生物膜的铜绿假单胞菌具有高度的耐药性,该结果提示莫匹罗星虽然对铜绿假单胞菌具有较高的MIC,但可能和其他抗菌药物联合应用对铜绿假单胞菌具有协同作用。现已发现多个铜绿假单胞菌生物膜抑制的靶点^[10],莫匹罗星抑制生物膜形成的机制尚需进一步的研究,其

具体的抗感染效果也需动物实验进行验证。

参考文献

- [1] 李孝建,刘锡麟.莫匹罗星对大面积烧伤后残余创面感染的疗效[J].中华医院感染学杂志,2000,10(2):121.
- [2] 黄子初.烧伤创面细菌培养及药敏分析[J].临床和实验医学杂志,2006,3(5):254.
- [3] Sun FJ, Zhang XB, Fang Y, et al. Spectrum and drug resistance of pathogens from patients with burns [J]. *Burns*, 2012,38(8):1 124.
- [4] Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilms: mechanisms of immune evasion [J]. *Adv Appl Microbiol*, 2014,86:1.
- [5] Gupta K, Marques CN, Petrova OE, et al. Antimicrobial tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two-component hybrid sags[J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(21):4 975.
- [6] Wang Q, Sun FJ, Liu Y, et al. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaADBC-positive and -negative clinical isolates of Staphylococcus epidermidis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010,54(6):2 707.
- [7] 陈娟,姜俊.2010—2012年烧伤科住院患者感染细菌耐药监测分析[J].国际检验医学杂志,2014,35(1):111.
- [8] Hurler J, Sorensen KK, Fallarero A, et al. Liposomes-in-hydrogel delivery system with mupirocin: in vitro antibi-film studies and in vivo evaluation in mice burn model [J]. *Biomed Res Int*, 2013,2 013:498 485.
- [9] Sutherland R, Boon RJ, Griffin KE, et al. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985,27(4):495.
- [10] Sharma G, Rao S, Bansal A, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilm: potential therapeutic targets[J]. *Biologicals*, 2014,42(1): 1.

(收稿日期:2014-08-13 修回日期:2015-01-15)

(编辑:李 劲)

国家卫生计生委副主任刘谦赴中国医学科学院医学生物学研究所调研疫苗研发工作

本刊讯 2015年4月13日,国家卫生计生委副主任刘谦赴中国医学科学院医学生物学研究所对Sabin株脊髓灰质炎灭活疫苗(sIPV)及肠道病毒71型(EV71)灭活疫苗的研发和生产等情况进行专题调研。刘谦一行实地考察了两个疫苗的GMP生产车间,详细了解了疫苗研发和产业化进展情况。

刘谦充分肯定了医科院医学生物学研究所取得的工作成绩,要求研究所认真落实创新驱动发展战略,不断提高科技创

新能力。一是全力加快上述疫苗产业化和临床应用进程,注重与相关部门的沟通协调,发挥科研成果更大的社会效益。二是继续加强创新研发,形成较为完善的疫苗产品链,为疾病防控提供强有力的技术支撑。三是认真谋划发展战略,不断增强自身发展实力,力争成为国家级疫苗研发平台。四是结合事业单位分类改革要求与市场机制,根据不同任务特点探索多元发展、合作互赢的发展机制和运行模式。