文章编号:1000-5404(2010)15-1645-04

论著

原子力显微镜观察耐药铜绿假单胞菌株药物作用前后的细菌表面特征变化

李忠新,张春雷,周小梅,蓝志明,李瑜珍,张书楠,陈 萍,吕 琪,黄志伟 (518001 广东 深圳,深圳市中医院检验科)

【摘要】 目的 从临床分离 1 株耐 β-内酰胺类铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PA)菌株,观察其体外耐 β-内酰胺类抗菌药物后发生的细菌表面特征变化。方法 从伤口分泌物中分离铜绿假单胞菌并采用 K-B 法进行药物敏感性实验,筛选出 1 株耐 β-内酰胺类抗菌药物的菌株;通过革兰染色和原子力显微镜(atomic force microscope,AFM)观察 K-B 实验前后细菌形态和表面特征的变化。结果 筛选出了 1 株耐 β-内酰胺类抗菌药物的菌株,通过革兰染色和原子力显微镜观察到 K-B 实验后细菌菌体均变长,能达到 K-B 实验前的 10 倍,宽度略微瘦小,即长 5.0 ~ 25.0 μm,宽 0.3 ~ 0.8 μm,表现出 L 型的细菌形态;革兰阴性的染色特性未发生改变;在 500 nm × 500 nm 的扫面面积下 AFM 观察到 K-B 实验后铜绿假单胞菌的表面孔洞增多,显示出粗糙的特征,通过地貌图(K-B 实验前深度不大于 10 nm,K-B 实验后深度大于 30 nm)和粗糙度参数分析,结果进一步证实该现象。结论 AFM 能观察到 K-B 实验后铜绿假单胞菌的表面变得更加粗糙的特征,而革兰染色不能观察到这一改变;AFM 扫描观察技术可用于细菌表面微观变化观察。

【关键词】 铜绿假单胞菌;β-内酰胺;原子力显微镜
【中图法分类号】 R378.991;R446.5 【文献标志码】 A

Surface characteristics of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain under atomic force microscope before and after treatment with drugs

Li Zhongxin, Zhang Chunlei, Zhou Xiaomei, Lan Zhiming, Li Yuzhen, Zhang Shunan, Chen Ping, Lu Qi, Huang Zhiwei
(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong Province, 518001, China)

【Abstract】 Objective To observe the surface characteristics of *in vitro* β-lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* after treated with β-lactam resistant antibiotics. Methods A *Pseudomonas aeruginosa* strain was isolated from wound secretions with the K-B method to test its susceptibility to β-lactam resistant antibiotics. Morphology of the stain and its surface characteristics were observed with Gram staining under atomic force microscope (AFM). Results A β-lactam antibiotics resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain was isolated. The strain after Gram staining was 10-fold longer (5.0 to 25.0 μm) and slightly less wider (0.3 to 0.8 μm) under atomic force microscope after K-B experiments. The strain was L-shaped. No change was found in the strain after Gram-negative staining. Atomic force microscopy showed more holes on surface of the strain under a scanning area of 500 nm × 500 nm, which were further confirmed on the topographic maps (the depth was less than 10 nm before K-B test and greater than 30 nm after K-B test). Conclusion Atomic force microscopy can show the rough surface characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* after K-B experiment, but cannot show them after Gram staining, indicating that AFM scanning can be used to observe microchanges on the surface of the strain.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; β-lactam; atomic force microscope

Corresponding author: Zhang Chunlei, E-mail: chenyaojunfree@163.com

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PA)由于不断产生耐药株,其耐药性也不断变化,且广泛存在于环境中,故已成为医院内常见的条件致病菌。铜绿假单胞菌产生耐 β-内酰胺类抗菌药物的主要机制是产 β-内酰胺酶,包括头孢菌素酶、超广谱 β-内酰胺酶、金属 β-内酰胺酶[1]。在损伤细胞壁的生物因素和理化条件下,细菌细胞壁合成受阻从而转化成一种细胞壁缺失或缺陷的细菌,称为细菌的 L 型[2]。L 型细菌可

【通信作者】 张春雷,E-mail:chenyaojunfree@163.com

以逃避β-内酰胺类抗生素杀伤，这是细菌的一种重要生存状态[3]。故本研究采用原子力显微镜（atomic force microscope，AFM）观察耐β-内酰胺类抗菌药物的铜绿假单胞菌在K-B实验前后细菌表面特征的变化。

1 材料与方法

1.1 药敏纸片

β-内酰胺类药敏纸片氨苄西林（AMP）、阿莫西林/克拉维酸（AMC）、头孢噻吩（CFT）、头孢噻肟（CTX）、庆大霉素（GEN）、萘啶酸（NAL）、环丙沙星（CIP）、四环素（TBT）、利福平（RFA）、复方新诺明（SMZ）等均购自中国药品生物制品检定所。

1.2 试剂

琼脂由英国ATB ID32GN M-HOXOID出品；牛肉膏、蛋白胨由英国OXOID公司出品；氯化钠为国产市售分析纯。

1.3 仪器

原子力显微镜（日本精工公司，型号SPI3800N-SPA400，应用AFM的气相）；100 μm扫描仪（Scanner参数为：X：115 μm，Y：115 μm，Z：9.97 μm），表示应用的Scanner在X、Y轴方向上的扫描移动范围最大值为115 μm，在Z轴方向上移动范围最大值为9.97 μm，应用AFM测定使用三角悬臂（triangle cantilever）200 nm；测定中使用相应的探针支架；多功能显微镜（BL-410，日本奥林巴斯公司出品）；全自动细菌鉴定仪（VITEK-32，法国梅里埃）；紫外可见分光光度计（Du800，贝克曼公司出品）；恒温培养箱（HH. B11，上海跃进医疗器械厂）。

1.4 标本来源、细菌的分离与鉴定

来自本院患者送检的伤口分泌物12份，在普通营养琼脂上分离铜绿假单胞菌并采用全自动细菌鉴定仪进行鉴定。

1.5 药敏实验

琼脂扩散敏感实验（K-B）参考文献[4]的方法进行。

1.6 耐β-内酰胺类铜绿假单胞菌的筛选

分别用β-内酰胺类药敏纸片AMP、AMC、CFT、CTX、GEN、NAL、CIP、TBT、RFA、SMZ对铜绿假单胞菌进行K-B实验，10种药敏纸片均不出现抑菌环的细菌为耐β-内酰胺类铜绿假单胞菌。

1.7 细菌K-B实验前后革兰染色

挑取K-B实验前后10种药敏纸片，将筛选出的耐β-内酰胺类铜绿假单胞菌进行涂片，干燥、火焰固定，并用革兰染料进行初染、媒染、脱色、复染常规的4个步骤，染色完毕干燥，多功能显微镜镜检其染色特性和细菌形态的改变。

1.8 细菌K-B实验前后AFM观察

挑取K-B实验前后10种药敏纸片，将筛选出的耐β-内酰胺类铜绿假单胞菌用生理盐水涂片于AFM专用的载玻片上，干燥，甲醇固定，生理盐水洗涤10 min，蒸馏水洗涤5 min，干燥，按照AFM操作程序进行观察。采用SPI3800N-SPA400的粒子解析软件，得到平均粒子直径、平均粒子面积、粒子面积的标准偏差、正规化粒子数、粒子总面积、粒子面积率、平均偏差粗糙度（Ra）、均方根粗糙度（P-V）和轮廓最大最高粗糙度（L）。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 11.0统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 铜绿假单胞菌的分离和鉴定结果

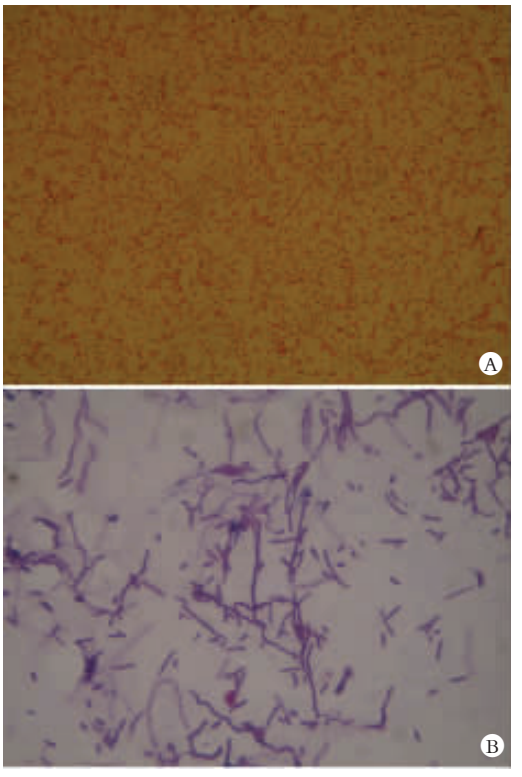
采用普通营养琼脂培养基对12份伤口分泌物进行平板培养，培养后菌落大小不一，直径2～3 mm，扁平，边缘不整齐，且呈相互融合状态，部分菌落产绿色色素。然后挑选20株产绿色色素的细菌继续平板培养，全自动细菌鉴定仪鉴定该20株细菌均为铜绿假单胞菌。

2.2 耐β-内酰胺类抗菌药物铜绿假单胞菌的筛选

对20株分离的铜绿假单胞菌进行10种β-内酰胺类抗菌药物的药敏实验，结果发现有1个菌株对10种β-内酰胺类抗菌药物均表现为不出现抑菌环或抑菌环小，我们把这株细菌定为耐β-内酰胺类抗菌药物铜绿假单胞菌。

2.3 耐β-内酰胺类抗菌药物铜绿假单胞菌K-B实验前后革兰染色结果

染色完毕干燥，多功能显微镜镜检发现K-B实验前细菌长1.5～3.0 μm，宽0.5～0.8 μm，单在，成对或偶尔成短链，革兰阴性（图1A）；K-B实验后，在所用的10种抗生素作用下细菌菌体均变长，能达到K-B实验前的10倍，宽度略微瘦小，即长5.0～25.0 μm，宽0.3～0.8 μm，革兰阴性未见改变（图1B）。10种抗生素作用下细菌的变化比较一致。



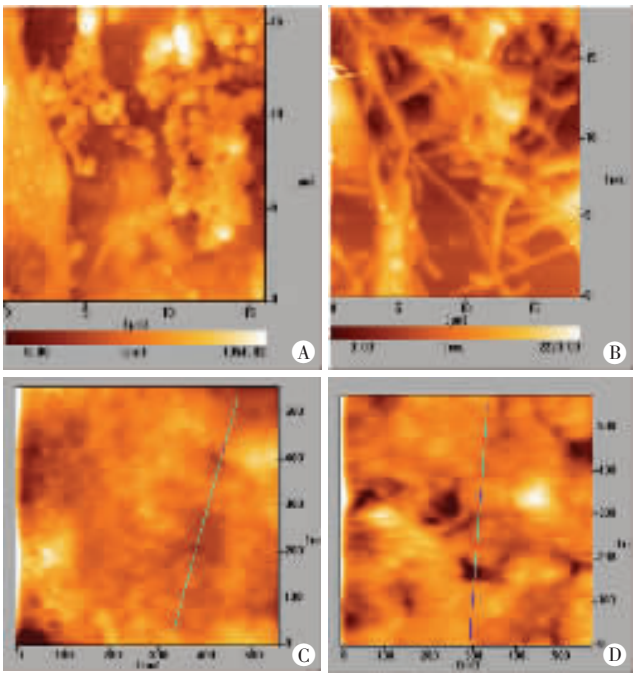
A：K-B实验前；B：AMP K-B实验后

图1 K-B实验前后铜绿假单胞菌革兰染色结果（多功能显微镜×1 000）

2.4 耐 β-内酰胺类抗菌药物铜绿假单胞菌 K-B 实验后的 AFM 观察结果

在大面积范围内观察到细菌的形态变化特征与革兰染色相似，即拓扑图像显示 K-B 实验前铜绿假单胞菌呈椭圆形，表面较光滑（图 2A），K-B 实验后，10 种抗生素作用下细菌的变化比较一致，细菌菌体均变长，宽度略微瘦小（图 2B）。

进一步将扫描面积缩小，即将图 2A、B 进一步放大倍数，直至扫描面积为 500 nm×500 nm 时得到图 2C、D。K-B 实验前细菌表面平整（图 2C），K-B 实验后细菌的表面有许多凹凸不平的孔洞（图 2D）。

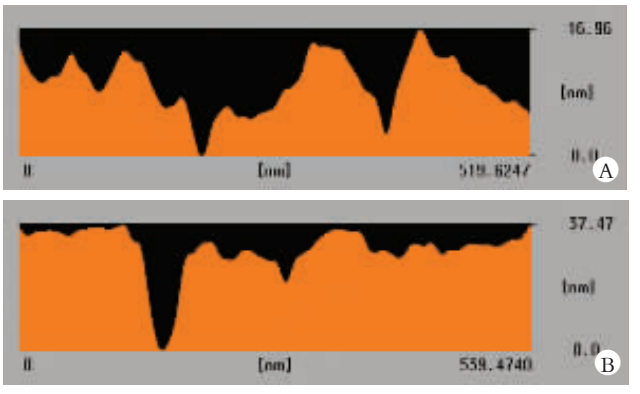


A：K-B 实验前（扫描面积 15 μm×15 μm），彩色条从 0.00～1 054.82 nm，代表了图中相应颜色的高度；B：AMP K-B 实验后（扫描面积 15 μm×15 μm），彩色条从 0.00～2 220.00 nm，代表了图中相应颜色的高度；C：K-B 实验前（扫描面积 500 nm×500 nm）；D：AMP K-B 实验后（扫描面积 500 nm×500 nm）

图 2 K-B 实验前后不同扫描面积的铜绿假单胞菌 AFM 观察

采用 SPI3800N-SPA400 的粒子解析软件在图 2C、D 中随机划 1 条线分析相应的地貌特征，得到图 3。图中横坐标表示所画直线的长度，纵坐标表示在此直线上的地貌凹凸不平的程度。纵坐标值越大表示凹凸不平的程度越严重，K-B 实验前为 16.96 nm（图 3A），K-B 实验后为 37.47 nm（图 3B）；另外地貌图中的山峰代表突起的高度，峡谷代表凹陷的深度，K-B 实验前深度不大于 10 nm（图 3A），K-B 实验后深度大于 30 nm（图 3B）。在 500 nm×500 nm 的扫描面积中可见 K-B 实验后表现出表面特征的凹凸不平较 K-B 实验前增加。

采用 SPI3800N-SPA400 的粒子解析软件对图 2C、D 进行分析，结果表明 K-B 实验后细菌平均粒子直径、平均粒子面积、粒子面积的标准偏差、正规化粒子数、粒子总面积、粒子面积率与实验前比较差异有统计学意义（$P<0.05$，表 1），K-B 实验后表面粗糙度显著增加（$P<0.05$，表 2）。表 2 中的轮廓算术平均偏差粗糙度（Ra）、均方根粗糙度（P-V）和轮廓最大高度粗糙度（L）为不同计算方式得到的表面粗超度的 3 个参数，数值越大代表粗糙度越高。每种抗生素作用后的数值均有显著性的提高，表明 K-B 实验后表面的粗糙度增加。



A：K-B 实验前；B：AMP K-B 实验后

图 3 K-B 实验前后铜绿假单胞菌在 AFM 扫描面积为 500 nm×500 nm 时的地貌图观察

表 1 K-B 实验前后细菌在 AFM 扫描面积为 500 nm×500 nm 时的粒子解析参数比较（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

不同药敏纸片实验	平均粒子直径（$\times10^2$，nm）	平均粒子面积（$\times10^5$，nm^2）	粒子面积的标准偏差（$\times10^4$，nm^2）	正规化粒子数（μm）	粒子总面积（$\times10^7$，nm^2）	粒子面积率（%）
K-B 实验前	2.993±0.315	1.032±0.128	0.923±0.101	2.450±0.308	0.157±0.031	32.3±2.8
AMP K-B 实验后	5.371±0.805[a]	5.680±0.310[a]	3.024±0.328[a]	1.332±0.134[a]	9.342±1.007[a]	122.6±14.4[a]
AMC K-B 实验后	5.401±0.798[a]	5.450±0.415[a]	3.144±0.223[a]	1.299±0.122[a]	9.299±0.356[a]	123.0±21.3[a]
CFT K-B 实验后	5.370±0.345[a]	5.700±0.512[a]	2.992±0.456[a]	1.340±0.254[a]	9.350±0.435[a]	119.9±35.6[a]
CTX K-B 实验后	5.383±0.216[a]	5.390±0.445[a]	2.924±0.355[a]	1.320±0.343[a]	9.340±0.879[a]	120.6±30.9[a]
GEN K-B 实验后	5.325±0.305[a]	5.621±0.767[a]	3.012±0.654[a]	1.335±0.265[a]	9.349±0.754[a]	122.0±26.7[a]
NAL K-B 实验后	5.390±0.615[a]	5.633±0.586[a]	3.004±0.458[a]	1.294±0.198[a]	9.332±0.698[a]	121.6±40.1[a]
CIP K-B 实验后	5.342±0.987[a]	5.654±0.690[a]	2.988±0.338[a]	1.329±0.098[a]	9.341±0.765[a]	122.8±32.3[a]
TBT K-B 实验后	5.311±0.654[a]	5.722±0.450[a]	3.101±0.562[a]	1.331±0.419[a]	9.349±0.680	123.6±28.7[a]
RFA K-B 实验后	5.358±0.323[a]	5.441±0.412[a]	2.990±0.189[a]	1.307±0.128[a]	9.360±0.790[a]	122.2±29.8[a]
SMZ K-B 实验后	5.367±0.554[a]	5.809±0.315[a]	3.085±0.433[a]	1.298±0.310[a]	9.343±0.450[a]	122.4±35.6[a]

a：$P<0.05$，与 K-B 实验前比较

表2 K-B实验前后细菌在AFM扫描面积为500 nm×500 nm时的粗糙度比较($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

不同药敏纸片实验	Ra(nm)	P-V(nm)	L(nm)
K-B实验前	2.98±0.15	16.75±2.80	10.23±3.68
AMP K-B实验后	4.55±0.36[a]	35.83±3.15	19.23±2.66[a]
AMC K-B实验后	4.54±0.80[a]	35.79±1.80[a]	19.01±8.08[a]
CFT K-B实验后	4.35±0.79[a]	35.86±1.68[a]	19.20±7.06[a]
CTX K-B实验后	4.54±0.52[a]	35.90±5.12[a]	19.12±3.54[a]
GEN K-B实验后	4.55±0.90[a]	35.80±4.80[a]	19.32±1.99[a]
NAL K-B实验后	4.54±0.75[a]	35.74±3.77[a]	19.22±5.78[a]
CIP K-B实验后	4.50±0.38[a]	35.73±5.09[a]	18.99±1.98[a]
TBT K-B实验后	4.40±0.55[a]	35.81±2.23[a]	18.92±4.05[a]
RFA K-B实验后	4.60±0.87[a]	35.69±2.76[a]	19.02±3.66[a]
SMZ K-B实验后	4.61±0.98[a]	35.93±4.07[a]	19.45±6.08[a]

a $P<0.05$,与K-B实验前比较

3 讨论

长期使用β-内酰胺类抗生素能诱导产生L型细菌,如AMP、AMC、CFT、CTX、GEN、NAL、CIP、TBT、RFA、SMZ,主要是由于β-内酰胺类抗生素可抑制细胞壁的主要成份肽聚糖的合成。铜绿假单胞菌为革兰阴性菌,革兰阴性菌的肽聚糖层极薄,故其易被诱导为L型细菌。正常细菌细胞壁比较坚硬,主要原因是肽聚糖的结构,肽聚糖是由多糖链与多肽链相互交联构成,形成网络,包围在细菌周围。β-内酰胺类抗生素诱导铜绿假单胞菌后,导致其部分细胞壁损失,暴露出柔软的细胞膜,且细胞膜具有可变性和可塑性[5],故L型铜绿假单胞菌的菌体变长,略微瘦小。这一变化也增强了L型铜绿假单胞菌的滤过性,可能增强其感染能力和致病性。

通过AFM观察发现细胞表面的拓扑特征出现差异,K-B实验后细菌表面变得更加凹凸不平,表面粗糙度增加。出现粗糙度增加的主要原因是细胞壁的破坏,这可能与细胞壁主要成分肽聚糖的合成受到阻碍有关。粗糙度增加的其他原因:①可能与主动外排系统通道增加相关。当主动外排系统通道增加后,主动外排的效率就大大提高,从而引起细胞表面结构变化,使得表面更加粗糙。铜绿假单胞菌的主动外排系统包括MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM、MexJKO-prM[6]。β-内酰胺类抗生素经外膜孔蛋白进入膜间隙,结合在内膜外侧,可被MexB捕获,借助MexA辅助蛋白的桥联作用,经OprM排出细胞[7]。②β-内酰胺类抗生素作用下,细胞膜上MexB和MexA形成的复合体可能增多,可能导致细胞表面凹凸不平。

铜绿假单胞菌在向L型转变时,被发现早期细菌分裂时隔壁形成发生障碍,以至数十个军体连接形成长丝体,从而变异为稳定的L型。此时,肽聚糖层将大部分丢失甚至完全丧失[3]。细菌L型耐药问题日益严重,对抗生素的敏感性与原菌往往不同,抑制细胞壁合成的抗菌药物对其效果往往不明显。铜绿假单胞菌本身耐药机制复杂,包括抗菌药物灭活酶的产生、细菌细胞膜通透性的改变和主动外排作用等[8-11]。进而,其变异体L型的铜绿假单胞菌将增加医院内感染的发病率,而医院大多采用联合用药的方式来改善抗菌药物的耐药情况[12,13]。故合理应用抗生素应作为医院质量控制的标准[14],使得滥用抗生素现象得到控制。

参考文献:

[1] 肖若媚. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(13):14-17.

[2] 黄谷良. 细菌L型与疾病[M]. 北京:学苑出版社, 1996:4.

[3] 陈登宇, 夏佩莹, 孟庆荣. 铜绿假单胞菌L型的诱导及其产绿脓菌素能力的研究[J]. 实用医药杂志, 2008, 25(1):77-79.

[4] 王玎, 黄长武, 陈维贤, 等. 产超广谱β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌的耐药谱和基因分型[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3):273-274.

[5] 朱智玲, 杨平, 可秋平. 15年前后细菌L型临床耐药性的变迁[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(2):185-186, 188.

[6] Giakkoupi P, Petrikkos G, Tzouvelekis L S, *et al*. Spread of integron-associated VIM-type metallo-beta-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible Pseudomonas aeruginosa strains in Greek hospitals[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2):822-825.

[7] Mao W, Warren M S, Lee A, *et al*. MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in Pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7):2001-2007.

[8] 周明明, 彭定辉, 周铁丽, 等. 主动外排在铜绿假单胞菌耐药中的作用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(14):1786-1789.

[9] 施凯舜, 潘发愤. 铜绿假单胞菌耐药研究进展[J]. 浙江医学, 2008, 30(2):199-202.

[10] 阮卫, 杨祚升. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(6):536-538.

[11] Green S L, Maddox J C, Huttenbach E D. Linezolis and reversible myelosuppression[J]. JAMA, 2001, 285(10):1291.

[12] 刘丽文, 韩克军, 陈正荣. 联合用药对多药耐药铜绿假单胞菌的体外活性[J]. 中华医药感染学杂志, 2009, 19(10):1262-1264.

[13] Obritsch M D, Fish D N. Nosocomial infections due to multi-drug-resistant Psedomonas aeruginosa:epiodemiology and treatment options[J]. Pharmacotherapy, 2005, 25(10):1353-1364.

[14] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中华医学会中华儿科杂志编辑委员会. 急性呼吸道感染抗生素合理使用指南(试行)(下部分)[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(6):379-383.

(收稿 2010-01-20 修回 2010-02-28)

(编辑 张 维)