维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)03－0247－03

龟分枝杆菌药物敏感性与耐药性探讨

杨致邦[1],陈清凤[2],李华平[1],陈　全[1]

(1.重庆医科大学基础医学院微生物学教研室　重庆　400016;　2.重庆职工医学院微生物寄生虫学教研室　重庆　400050)

【摘　要】目的:探讨龟分枝杆菌对抗生素的敏感性和耐药机理。方法:从我市工厂医院院内感染标本中分离龟分枝杆菌 12 株。用琼脂扩散法测定抗生素的敏感性,用滤纸片法进行联合药敏试验,并提取、鉴定质粒,用氟哌酸消除质粒。结果:42 种抗生素中,3 株龟分枝杆菌龟亚种对大多数氟喹诺酮类、氨基糖甙类的抗生素敏感。对抗结核药利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇敏感。9 株脓肿亚种对大多数氨基糖甙类的抗生素敏感,对氟喹诺酮类的环丙沙星敏感,对多数抗结核药耐药。在药物间均为无关作用。从 6 株脓肿亚种中提取出一个 9.1kb 质粒,消除质粒后耐药性不变。结论:龟分枝杆菌是一种对多种抗生素耐药的细菌,药物敏感性差异较大。其耐药性与质粒传递无关。

【关键词】龟分枝杆菌;抗生素;质粒

【中国图书分类法分类号】R969.4　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000－11－29

Research of susceptibility and resistance to antibiotics in mycobacterium chelonei

YANG Zhi－bang, et al

(Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To investigate the susceptibility to antibiotics and the mechanism of the resistance in Mycobacterium chelonei. ***Methods***: To determine the susceptibility of antibiotics by the method of agar dilution and to test the combination drug susceptibility by the method of the filter paper. 12 strains of Mycobacterium chelonei were isolated from cases of the hospital infection in the factory clinics in Chongqing and the plasmids were extracted and eliminated by norfloxacin in these bacteria. ***Results***: In 42 antibiotics, 3 of M. chelonei subspecies were susceptible to most of antibiotics, such as aminoglycosides, fluoroquinolones and rifampin, pyrafat, ethambutol in the antituberculosis agents and 9 of M. Chelonei subspecies abscesses were susceptible to most of antibiotics of aminoglycosides, ciprofloxacin in fluoroquinolones but resistant to antituberculosis agents in the test. The noncorrelation between any 2 antibiotics was observed. A 9.1 Kb plasmids profile was observed in 6 bacteria, but as it was eliminated, the resistance to antibiotics was not changed. ***Conclusion***: The bacteria are multiply resistant and have great differences in their susceptibility. The resistance to antibiotics was not translated by plasmid.

【Key words】 Mycobacterium chelonei; Antibiotic; Plasmid

致病性非结核分枝杆菌主要有偶发分枝杆菌(Mycobacterium fortuitum, M. fortuitum)和龟分枝杆菌(Mycobacterium Chelonei, M. Chelonei)。M. fortuitum 主要引起肺部的感染,也可感染伤口。M. chelonei 分为龟亚种(subsp chelonei)和脓肿亚种(subsp abscesses)。常寄生于人和动物的呼吸道、消化道,并广泛分布于土壤、城市的废水及水源等自然环境中[1]。该菌很少侵犯肺部,却常引起皮肤和软组织的感染。多见于手术后的伤口,注射时污染引起的局部感染、淋巴管炎和脓肿。1969 年 Inman 等首次报道了 12 例注射组织胺而引起的注射脓肿[2]。以后,此菌引起感染甚至暴发流行的报道增多[3~5],并逐渐成为医院内感染的重要病原菌。由于对大多数抗生素,尤以抗结核药物不敏感[6],且无恒定的敏感药物,给治疗带来极大困难,常需经相当长时间才能治愈。为更好地防治该菌引起的感染,本文对从我市院内感染分离的龟分枝杆菌进行

作者介绍:杨致邦(1948－　),男,副教授。主要研究方向:机会致病菌感染病原学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

抗生素敏感性测定和质粒分析，以探讨其对抗生素的敏感性和耐药机理。

1 材料与方法

1.1 菌种 1996 年至 1999 年从我市工矿医院院内感染标本分离龟分枝杆菌 12 株，其中龟亚种 3 株，脓肿亚种 9 株。均经形态、抗酸染色性，生长温度、生长速度、暗产色，光产色试验，麦康凯培养基、5% NaCl 培养基生长试验，铁吸收试验、硝酸盐分解、枸橼酸利用等生化反应鉴定[7]。参考菌株龟分枝杆菌龟亚种和脓肿亚种购自中国药物生物制品检定所(菌种号 93325、93326)。

1.2 药物敏感性试验 采用琼脂扩散法。联合药敏试验采用滤纸片法，略有改良。先用琼脂扩散法测定各种抗生素的抑菌环，然后以两抗生素抑菌环半径之和为间距(无抑菌环者为 0)，放置纸片。35℃ 培养 3 天后观察，以抑菌环交界处弧形扩宽为相加作用，弧形变平为拮抗作用，无变化为无关作用[7]。所用心脑血琼脂平板为本室自制，药物滤纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.3 β 内酰胺酶试验 采用纸条酸度测定法。取青霉素 10mg 加入 0.9ml1% 溴甲酚紫液中，滴在滤纸上成直径为 1cm 之圆斑。用接种环取数个新培养的菌落涂抹于圆斑上，35℃ 观察 5min。以圆圈变黄者为产生 β 内酰胺酶。同时以产 β 内酰胺酶的金黄色葡萄球菌作阳性对照[7]。

1.4 质粒分析 质粒提取鉴定参照 Wallace 的碱裂解法。将 35℃ 培养 3 天的菌落洗下，加入含 0.05M Tris、0.01M EDTA、0.05M NaCl、20% 蔗糖和 1% 溶菌酶的混合液中，置 37℃ 孵育 2h。然后加入含 3% SDS、0.5M Tris Hcl 液，55℃ 水浴 2h。再加入 3M KCl 溶液中，混合 5min，加入酚和氯仿，抽提 5min。离心取上清液，无水乙醇沉淀 DNA。将提取的 DNA 与 DNA - HindⅢ 分子量标准同时进行琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，紫外核酸检测仪观察并摄像[8]。

1.5 质粒消除试验 用氟哌酸消除质粒。先测定氟哌酸对该菌的 MIC 浓度 (500μg/ml)。然后将氟哌酸加入心脑血琼脂平板中，使其达到次 MIC 浓度 (250μg/ml)。划线接种细菌，35℃ 培养 3 天，洗下菌苔。按前述方法提取鉴定质粒，再次测定对各种抗生素的敏感性[9]。

2 结 果

12 株临床分离龟分枝杆菌对 42 种抗生素的敏感性见表 1。联合药敏试验结果，在敏感药之间及与不敏感药间均为无关作用，未发现协同作用和相加作用者。12 株菌均产生 β 内酰胺酶。

从 6 株脓肿亚种中提取鉴定出一个 9.1 kb 质粒，6 株龟分枝杆菌脓肿亚种的质粒电泳图谱见图 1，参考菌株和其余菌株未发现质粒。用氟哌酸可消除此质粒，但消除后，6 株菌的药物敏感性不变。

表 1 12 株临床分离龟分枝杆菌对 42 种抗生素的敏感性

抗生素	龟亚种(3 株)			脓肿亚种(9 株)		
	耐药	中敏	敏感	耐药	中敏	敏感
青霉素 G	3			9		
苯唑青霉素	3			9		
氨苄青霉素	3			9		
羧苄青霉素	3			9		
阿洛西林	3			9		
哌拉西林	3			9		
头孢呋新	3			9		
头孢氨苄	3			9		
头孢噻肟钠	3			9		
头孢他定	3			9		
头孢曲松	3			9		
头孢哌酮	3			9		
环丙沙星			3			9
诺氟沙星			3	9		
氧氟沙星			3	9		
卡那霉素		3				9
阿米卡星			3			9
庆大霉素			3		3	6
链霉素	3			3	6	
新霉素			3	6	3	
万古霉素	3				9	
妥布霉素		1	2		6	3
红霉素	2	1				
林可霉素	3			3	6	
克林霉素	3			9		
四环素		1	2	6	3	
强力霉素	3			9		
氯霉素	3			9		
多粘菌素 B	3			9		
大观霉素	3			9		
奥普托欣	3			9		
萘啶酸	3			9		
呋喃妥因	3			9		
杆菌肽	3			9		
甲硝唑	3			9		
替硝唑	3			9		
复方新诺明	3			9		
对氨水杨酸	3			9		
利福平			3	9		
异烟肼	3			9		
吡嗪酰胺		1	2	9		
乙胺丁醇			3	5	4	

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

龟分枝杆菌对抗生素的敏感性，差异较大。Welch 用琼脂扩散法测定了 7 株临床分离的龟分枝杆菌对 7 种抗生素的敏感性，表明该菌多数对四环素、氯霉素、卡那霉素、庆大霉素，妥布霉素敏感，对氧苄青霉素和多粘菌素 B 耐药[10]。Swenson 测定了 15 株龟分枝杆菌对 13 种抗生素的敏感性，表明该菌对阿米卡星，磺胺甲基异恶唑、妥布霉素和红霉素敏感，对卡那霉素、万古霉素、庆大霉素不敏感[11]。国内毕志强等[6]测定了标准菌株对 12 种抗结核药的敏感性，表明龟亚种对利福平、乙胺丁醇、对氨水杨酸、卡那霉素、氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星敏感。而脓肿亚种对所有抗结核药均耐药[6]。我们的结果表明。龟亚种对大多数氟喹诺酮类、氨基糖甙类抗生素敏感，对抗结核药中的利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇敏感。脓肿亚种对大多数氨基糖甙类抗生素敏感，对氟喹诺酮类药中的环丙沙星敏感，对抗结核药大多不敏感。实验结果中对抗结核药的敏感性与文献[6]的报道相似，对其它抗生素的敏感性与前述报道均不相同。

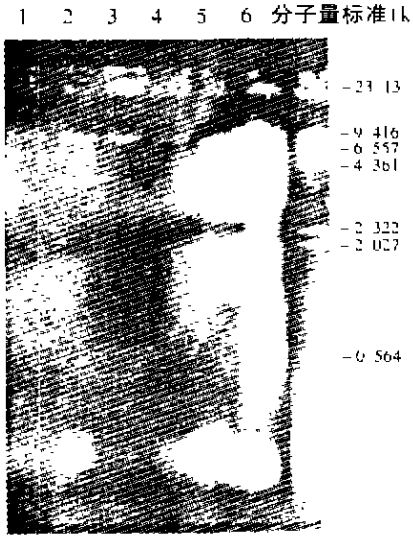


图 1 6 株龟分枝杆菌脓肿亚种的质粒电泳图谱

Richard J 等报道在龟分枝杆菌中分离出 8.15Mdal、8.20Mdal、60Mdal、60.17Mdal 4 种大小不同的质粒，但对某种抗生素耐药的菌株出现相同质粒的频率极低，其质粒的有无和大小与耐药性无关[8]。本文从龟脓肿菌中分离出一个 9.1kb 质粒，目前尚未见报道。经氟哌酸消除试验证实也与耐药性无关。联合药敏试验表明，虽然多种抗生素联合应用不能起到相加作用，但也不会降低其抗菌活性。

以上结果表明，龟分枝杆菌，尤以脓肿亚种，是一种对多种抗生素耐药，而且耐药性差异较大的细菌。对该菌的感染，以药物敏感试验结果指导临床用药具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, et al. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples[J]. Environ Microbiol, 1999; Jun; 65(6): 2492－2496.

[2] Inman PM, Beck AD, Brown AC, et al. Outbreak of injection abscesses due to M abscesses[J]. Arch Derm, 1969; 100: 141.

[3] Wallace RJ, Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo－outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria[J]. Annu Rev Microbiol, 1998; 52: 453－490.

[4] WilsonS; CascioB; NeitzschmanHR. Radiology case of the month. Nail puncture wound to the foot. Mycobacterium chelonei osteomyelitis[J]. JLaStateMedSoc. 1999; May; 151(5): 251－252.

[5] 李良成，扈庆华，刘 军，等. 一起龟分枝杆菌脓肿亚种引起的院内术后暴发感染的病原学调查[J]. 中国防痨杂志，1998; 20(4): 1998.

[6] 毕志强，那希宽，付育红，等 分枝杆菌药物敏感性报告[J]. 中国防痨杂志，1997; 19: 366.

[7] 李影林，场苏焯，张颖悟，等. 临床微生物学检验[M]. 吉林科学技术出版社，1991; 604－607.

[8] Wallace RJ, Hull SI Bobey DG et al. Mutational resistance as the mechanism of aquired drug resistance to aminoglycosides and antibacterial agents in Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonei [J]. Am Rev Respir dis, 1985; 132: 409－416.

[9] 李立津，王 哲，胡文芝. 氟哌酸和黄连素对志贺氏菌耐药性质粒消除研究[J]. 中华传染病杂志，1994; 12(1): 4－7.

[10] Welch DF, Kelly MT Antimicrobial susceptibility test of Mycobacterium fortuitum complex [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1979; 15(6): 754－757.

[11] Swenson JM, Thornsberry C, Silcox VA, et al. Rapidly growing Mycobacteria: Testing of Susceptibility to 34 andtimicrobial agents by broth microdilution [J]. Antimicrob agents Dis, 1973; 107: 1－8.