

· 技术与方法 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.26.021

# Poloxamer 407 凝胶上细菌药物敏感性分析<sup>\*</sup>

宋 鸿, 李林或, 韩云竹

(遵义医学院微生物学教研室, 贵州遵义 563003)

**摘要:** 目的 评价 Poloxamer 407(P407)温敏性即型凝胶上细菌药物敏感性。方法 采用改良 Kirby-Bauer(K-B)纸片法检测 9 种细菌在 P407 和 Mueller-Hinton(MH)琼脂培养基上的药物敏感性, 同时比较不同抗菌药物在 P407 和 MH 琼脂培养基上的扩散速率; 采用 SDS-聚丙酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分析两种培养基上铜绿假单胞菌外膜蛋白的表达情况。结果 P407 培养基上的抑菌圈直径普遍较 MH 琼脂培养基上的小; 抗菌药物在这两种培养基上的扩散速率差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 铜绿假单胞菌生物膜外膜蛋白的表达与其在 P407 培养基上生长的表达相似, 而与 MH 琼脂培养基上的表达不同。结论 P407 作为一种培养基赋形剂, 可用于临床细菌生物膜药物敏感筛选试验中。

**关键词:** Poloxamer 407; 细菌生物膜; 微生物敏感性试验

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)26-3468-03

## Analysis on antimicrobial susceptibility of bacteria on Poloxamer 407 gel<sup>\*</sup>

Song Hong, Li Linyu, Han Yunzhu

(Teaching and Research Section of Microbiology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the antimicrobial susceptibility of bacteria cultured on a Poloxamer 407(P407) thermosensitive in-situ gel. **Methods** The modified Kirby Bauer(K-B) disc diffusion method was adopted to determine the drug susceptibility of 9 kinds of bacterium isolated on the P407 and the Mueller Hinton(MH) agar culture medium, at the same time the diffusion rates of different antibacterial drugs on the P407 and the MH agar culture medium were compared; the sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) was adopted to analyze the outer membrane proteins(OMPs) expression of *Pseudomonas aeruginosa* on these two kinds of culture medium. **Results** In the antimicrobial susceptibility tests, the inhibition zones on the P407 gel were found to be generally smaller than those on the MH agar. The difference in the diffusion rates of the antibacterial drugs on these two kinds of culture medium had no statistically significant difference( $P>0.05$ ); the OMPs expression of *Pseudomonas aeruginosa* was similar to its growth expression on the P407 culture medium, but different from its expression on the MH agar. **Conclusion** P407 as an excipient of bacteria culture medium can be used in the screening test of the biofilm antimicrobial susceptibility.

**Key words:** Poloxamer 407; bacterial biofilm; microbial sensitivity tests

在自然界中生物膜是细菌生存最为普遍的一种方式。据美国疾病预防控制中心(CDC)的统计, 65% 的人类细菌性感染都与生物膜形成有关。有资料报道, 细菌一旦形成生物膜后, 其对抗菌药物的耐受性比浮游菌提高了数百乃至上千倍<sup>[1]</sup>。然而, 目前指导临床合理使用抗菌药物的传统试验常常测定的对象是浮游菌, 却忽略了在机体内细菌可以由浮游菌向生物膜转变的生存方式。因此, 只依据传统药敏结果来指导临床使用抗菌药物, 往往很难达到满意的疗效<sup>[2]</sup>。为此需要建立一种更为理想的药物敏感试验方法。本研究建立一种 Poloxamer 407(P407)温敏性即型凝胶培养体系, 探讨在不同培养基赋形剂下细菌药物敏感试验结果的差异性, 旨在为临床合理选择抗菌药物提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 细菌来源** 试验菌株为: 铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、摩氏根氏菌、化脓性链球菌、脑膜败血性黄杆菌。由本院检验科提供。每种细菌有 6 株。质控菌株为金黄色葡萄球菌

ATCC25923、大肠埃希菌 ATCC25922。

**1.2 主要试剂及仪器** P407 购自上海力明生物工程有限公司, Mueller-Hinton(MH)琼脂及肉汤培养基购自杭州天和微生物试剂公司, 药敏纸片购自英国 Oxoid 公司, 膜蛋白提取试剂盒购自上海生物工程有限公司, 电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司, 培养箱购自上海跃进医疗器械厂。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 P407 培养基制备** 将 MH 肉汤与 P407 粉末混合后充分搅拌, 置 4 ℃冰箱过夜, 待完全溶解后调整 pH 至 7.2~7.4, 高压灭菌, 重放于 4 ℃冰箱过夜, 次日将培养基倒入培养皿, 在使用之前将其放于 35 ℃培养箱过夜。P407 终浓度为 30% (wt/vol, 质体积比)。

**1.3.2 药敏试验** 采用改良 K-B 纸片法测定 9 种细菌对氨苄西林舒巴坦(Ampicillinsulbactam, SAM), 亚胺培南(imipenem, IPM), 头孢曲松(ceftriaxone, CRO), 庆大霉素(gentamycin, CN), 环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)5 种药物的敏感性。

**1.3.3 抗菌药物扩散速率** 将药物纸片置于 P407 和 MH 琼

\* 基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目[黔科合 G 字 LKZ(2011)37 号]。作者简介: 宋鸿(1975—), 博士, 副教授, 主从事病原微生物学的研究。

表 1 细菌药物敏感试验结果( $\bar{x} \pm s$ , mm)

菌株	培养基	抗菌药物(抑菌圈直径)				
		SAM(20 μg)	IPM(10 μg)	CRO(30 μg)	CN(10 μg)	CIP(5 μg)
铜绿假单胞菌	MH 琼脂	6.40±2.61	20.75±5.71	18.80±5.93	15.83±3.76	24.58±3.95
	P407	7.00±1.90	11.58±1.96	11.67±5.50	11.00±4.56	16.33±5.50
金黄色葡萄球菌	MH 琼脂	25.88±4.75	22.60±5.54	22.60±4.77	18.92±4.25	—
	P407	7.00±1.79	11.58±1.96	11.67±5.50	11.00±4.56	—
表皮葡萄球菌	MH 琼脂	11.83±3.31	11.42±1.43	10.00±1.41	10.67±1.33	—
	P407	5.67±1.03	5.00±0.63	5.17±0.98	5.50±2.59	—
化脓性链球菌	MH 琼脂	—	22.83±3.33	22.17±4.01	5.00±1.73	23.50±2.18
	P407	—	11.83±2.84	2.67±0.58	3.33±0.58	7.83±1.76
大肠埃希菌	MH 琼脂	14.08±4.83	20.42±4.96	21.67±4.93	12.75±4.37	15.83±5.45
	P407	7.33±2.16	12.67±4.17	9.00±3.63	6.33±1.86	7.17±3.19
鲍曼不动杆菌	MH 琼脂	14.00±4.50	14.88±4.59	15.80±5.63	11.00±5.43	12.84±5.64
	P407	6.17±1.17	11.17±1.72	9.42±3.95	8.92±2.54	7.67±2.40
肺炎克雷伯菌	MH 琼脂	25.63±5.41	21.58±4.72	23.90±4.34	16.75±1.08	23.42±1.96
	P407	11.33±2.31	10.10±3.40	7.45±2.64	8.80±1.82	15.75±3.01
摩氏摩根菌	MH 琼脂	8.67±2.08	12.00±4.09	16.33±5.03	13.33±3.06	12.67±2.08
	P407	4.67±1.15	5.50±2.78	6.67±1.15	5.00±1.73	5.67±0.58
脑膜败血黄杆菌	MH 琼脂	5.67±0.29	14.33±0.58	6.50±0.50	6.50±1.80	22.17±1.61
	P407	3.33±0.58	4.17±0.29	4.00±3.33	3.00±0.87	6.83±1.44

—:未检测。

脂培养基平皿中心,再将 3 个圆形的无菌滤纸片分别置于接近药物纸片不同的位置上,24 h 后将滤纸片取出置于 MH 琼脂培养基内,测定大肠埃希菌的药物敏感性。通过比较抑菌圈的大小,了解抗菌药物在两种培养基上的扩散速率。

**1.3.4 铜绿假单胞菌外膜蛋白的检测** 采用置片法制备铜绿假单胞菌生物膜模型:将高温灭菌后盖玻片放入 MH 液体培养基中,加入悬菌液,37 ℃ 培养 72 h,隔天换液。从盖玻片、P407 及琼脂培养基上收集细菌,按试剂盒说明书提取细菌外膜蛋白。SDS-PAGE 电泳分析结果。

**1.4 统计学处理** 所有数据采用 SPSS12.0 统计软件处理。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 t 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 药敏试验结果** 除铜绿假单胞菌 SAM 纸药片在 P407 培养基上抑菌圈大于 MH 琼脂培养基外,其余在 P407 培养基上的纸药片抑菌圈均比 MH 琼脂培养基上的小,见表 1。

**2.2 抗菌药物纸片扩散速率** 大肠埃希菌药物敏感试验结果显示在两种培养基上抑菌圈大小差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),这说明 5 种抗菌药物在 P407 和 MH 琼脂培养基上扩散速率无差异,见图 1。

**2.3 铜绿假单胞菌外膜蛋白检测** 经 SDS-PAGE 电泳染色后,可见铜绿假单胞菌形成生物膜后外膜蛋白的表达与其在 P407 培养基上生长的表达相似,而与 MH 琼脂培养基上生长的细菌不同,在  $(71 \sim 72) \times 10^3$ 、 $112 \times 10^3$  处未见明显相似的蛋白条带,见图 2。

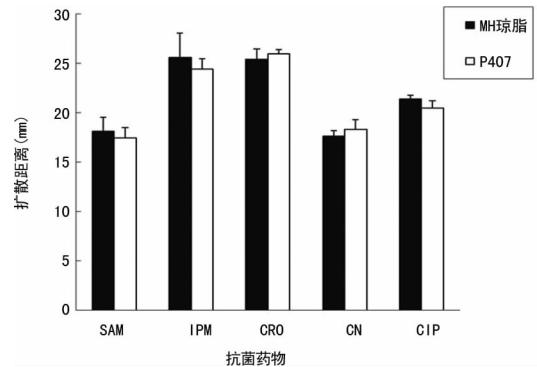
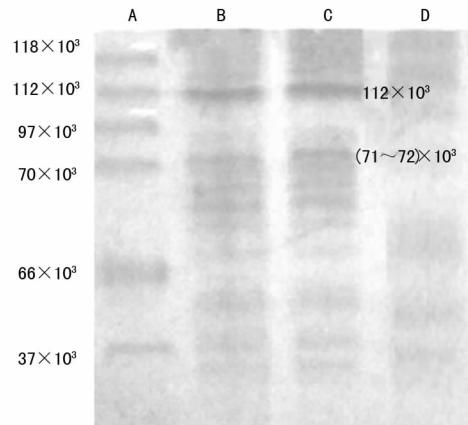


图 1 不同抗菌药物在培养基上扩散速率



A: Marker; B: P407; C: 生物膜; D: MH 琼脂。

图 2 铜绿假单胞菌外膜蛋白的表达

### 3 讨 论

细菌经破损的上皮进入体内,可能会被宿主先天免疫防御系统清除,或者会黏附于宿主细胞外基质蛋白上形成生物膜。细菌形成生物膜后,对环境因子的抵抗力增强,这是由于生物膜内的细菌被细胞外多聚物(extracellular polymeric substances, EPS)所包裹,这些EPS所形成的物理屏障能够阻挡抗菌药物的渗入及机体免疫系统的杀伤作用<sup>[3]</sup>;其次位于生物膜深层的细菌由于养分的缺乏,分裂不活跃,生长缓慢,有的甚至处于休眠状态<sup>[4]</sup>。临幊上对于这类感染性疾病的治疗,依据的药敏试验所选用抗菌药物往往只能杀死浮游菌,使症状暂时控制,而实际上生物膜内的细菌却很难被杀灭<sup>[5]</sup>。这些没有被杀灭的细菌又会离开菌群向远处播散,启动下一个生物膜的形成,造成临幊慢性感染反复发作。

K-B纸片法是最早由 Bauer 等人创立的,在 1975 年通过了美国临幊检验委员会标准,该方法简单易行,重复性好,试验成本较低,不需要任何特殊设备,对抗菌药物的选择有很大的灵活性,并且临幊医生容易理解,因此被推广应用至今<sup>[6]</sup>。然而,该方法有时测定的结果与临幊实践不符,如甲氧苯青霉素耐药的金黄色葡萄球菌用纸片法测定对头孢菌素的敏感性,有时可表现为敏感或中度敏感,但临幊实践证明这类菌对现有的头孢菌素均耐药。最近国外有研究发现,在 P407 培养基上细菌能形成生物膜,用 P407 替代琼脂作为培养基赋形剂用于临幊药敏试验,能反映细菌形成生物膜后的情况<sup>[7-8]</sup>。Gilbert 等<sup>[7]</sup>在研究中发现铜绿假单胞菌形成生物膜后其外膜蛋白的表达与其在 Poloxamer 凝胶培养基上表达相似,而当铜绿假单胞菌生长在琼脂培养基及肉汤培养基中这些外膜蛋白则不表达。这些蛋白在浮游菌中不表达,说明了在 Poloxamer 和琼脂培养基上生长的细菌表型不同,在 Poloxamer 上生长的细菌与形成生物膜的细菌表型是相似的。在本次试验中作者对 P407 和琼脂培养基上的铜绿假单胞菌外膜蛋白进行了分析比较,研究发现 P407 培养基与生物膜模型上细菌外膜蛋白表达相似,在  $(71 \sim 72) \times 10^3$ 、 $112 \times 10^3$  处都有明显相似的蛋白条带,而在琼脂培养基上的细菌却没有相似的蛋白条带,这与文献报道是相符的<sup>[9]</sup>。这提示 P407 培养基上铜绿假单胞菌外膜蛋白的表达具有该菌由浮游菌转变为生物膜后的特征。

临幊实验室测试细菌药物敏感性的标准方法是测定抗菌药物的最低抑菌浓度,此方法仅仅适用于浮游菌,对有生物膜形成的细菌则效果不理想<sup>[2,10]</sup>。有研究表明,有生物膜形成的细菌对一些抗菌药物是不敏感的,而在浮游状态的同类细菌却敏感。本研究发现, P407 药物敏感培养体系中抑菌圈的直径普遍小于琼脂培养基上的直径,而抗菌药物在两种培养基中的扩散速率基本一致,无显著差异性。这些表明细菌在不同培养基介质中生长,对抗菌药物的敏感性发生了表型变异。在两种培养基上药敏试验结果的差异性,使得对传统的 K-B 纸片扩散法的结果产生质疑? 错误的药敏试验结果指导临幊抗菌药物的使用,无论是剂量还是种类的不合理使用都可以提高生物膜内细菌耐药率的发生<sup>[11]</sup>。随着细菌耐药率的增长,临幊需

要一种更为合理的药敏试验来指导抗菌药物的使用。

P407 是一种温敏性即型凝胶,具有良好的生物相容性及安全性,在药物制剂中得到了广泛应用<sup>[12]</sup>。临幊药敏筛选试验时应考虑到生物膜形成,特别是反复感染或难治性感染。P407 可作为一种检测生物膜药物敏感性的培养基赋形剂。

### 参考文献:

- [1] Ciofu O, Mandsberg LF, Wang H, et al. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(2): 215-225.
- [2] 刁菁, 杨秀生, 李天保, 等. 病原微生物药敏检测方法的研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(8): 1-5.
- [3] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms [J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(4): 322-332.
- [4] Borriello G, Werner E, Roe F, et al. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2659-2664.
- [5] 枢前, 孙凤军, 夏培元. 亚抑菌浓度抗生素对细菌生物膜形成的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(4): 200-204.
- [6] Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology [J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 48 Suppl 1: S1-4.
- [7] Gilbert P, Jones MV, Allison DG, et al. The use of poloxamer hydrogels for the assessment of biofilm susceptibility towards biocide treatments [J]. J Appl Microbiol, 1998, 85(6): 985-990.
- [8] Yamada H, Koike N, Ehara T, et al. Measuring antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* using Poloxamer 407 gel [J]. J Infect Chemother, 2011, 17(2): 195-199.
- [9] Clutterbuck AL, Cochrane CA, Dolman J, et al. Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2007, 6(6): 2-13.
- [10] 杨维青, 刘晓峰, 黄震. 铜绿假单胞菌临床菌株生物被膜的定量分析[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(3): 181-183.
- [11] Drifford K, Miller K, Bostock JM, et al. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(5): 1053-1056.
- [12] 杜广增, 赵浩如. Poloxamer 407 温敏性即型凝胶的制备和应用进展[J]. 药学进展, 2008, 32(4): 163-167.

(收稿日期:2014-04-20 修回日期:2014-06-28)