

# 寻常痤疮患者痤疮丙酸杆菌耐药性及其分子机制

郭娴菲<sup>1</sup>, 尹兴平<sup>2</sup>, 黄海峰<sup>1</sup>, 赵琪<sup>3</sup>, 毕鸣晔<sup>1</sup>

(1. 南京医科大学附属无锡人民医院皮肤科, 江苏 无锡 214023; 2. 苏州高新区人民医院皮肤科, 江苏 苏州 215129; 3. 南京医科大学附属无锡人民医院检验科, 江苏 无锡 214023)

**[摘要]** 目的:了解寻常痤疮患者中痤疮丙酸杆菌耐药情况,并探讨其可能的分子生物学机制。方法:选择 18 例寻常痤疮患者炎症性皮损,厌氧条件下分离、培养和鉴定获得 12 个痤疮丙酸杆菌临床株。采用纸片法对红霉素、克林霉素、甲硝唑和四环素 4 种常用抗生素进行体外药敏试验。根据药敏试验结果,选择对红霉素耐药菌株并提取细菌 DNA,对 23S rRNA 基因扩增和测序,分析其核苷酸序列变化。结果:所有菌株均对四环素高度敏感而对克林霉素和甲硝唑均耐药,11 个临床株对红霉素耐药,仅一株中度敏感。对 12 株 23S rRNA 序列经 PCR 测序后发现共 7 株发生第 1392 位 A→G、第 1393 位 A→G、第 1518 位 A→G、第 1533 位 T→C、第 1569 位 A→G、第 1814 位 G→A、第 1839 位 G→A、第 1946 位 T→C、第 1974 位 A→G、第 2034 位 T→C、第 2058 位 A→T、第 2273 位 A→G 和第 2513 位 T→C 碱基变化,其余 5 株的核苷酸序列没有变化。结论:结合以前关于 PA 耐药基因的分子检测结果,除了已经报道的第 2058 位 A→T 变化外,本研究发现多个 23S rRNA 新突变位点以及同一菌株发生多位点突变,而部分菌株的核苷酸序列没有变化,这些新突变位点以及同一菌株多位点突变与痤疮丙酸杆菌对红霉素耐药性的关联性有待进一步证实,并可能存在其他机制。

**[关键词]** 寻常痤疮; 痤疮丙酸杆菌; 耐药性; 23S rRNA

**[中图分类号]** R758.733

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1000-4963(2020)12-0717-06

doi:10.16761/j.cnki.1000-4963.2020.12.004

## Drug resistance and molecular mechanism of propionibacterium acne in patients with acne vulgaris

GUO Xian-fei, YIN Xing-ping, HUANG Hai-feng, ZHAO Qi, BI Ming-ye

(Department of Dermatology, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 214023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate propionibacterium acne resistance in patients with acne vulgaris and explore its possible molecular mechanism. **Methods:** Twelve clinical strains of propionibacterium acne were isolated and identified from eighteen patients with acne vulgaris. The antibiotic sensitivity of erythromycin, clindamycin, metronidazole and tetracycline was tested by disk method in vitro. Bacteria DNA was extracted from erythromycin-resistant strains. The 23SrRNA gene was amplified and sequenced. The nucleotide sequences were analyzed. **Results:** All clinical strains were highly sensitive to tetracycline and resistant to clindamycin and metronidazole. Eleven clinical strains were erythromycin-resistant, and only one strain was mildly sensitive to erythromycin. The 23SrRNA of 12 clinical strains were sequenced. Seven strains were found to have nucleotide changes with 1392A→G, 1393A→G, 1518A→G, 1533T→C, 1569A→G, 1814G→A, 1839G→A, 1946T→C, 1974A→G, 2034T→C, 2058A→T, 2273A→G and 2513T→C alternations while no nucleotides alternations were found in the other 5 strains. **Conclusion:** Apart from the reported 2058A/T change, multiple 23SrRNA new mutation sites and several mutations in the same strain were found, while no nucleotide changes were found in some strains. The relationship between erythromycin-resistance and these new mutation sites or multi-site mutation in the same strain needs to be confirmed. Furthermore, this study suggests that there may be other molecular mechanisms in erythromycin-resistance of propionibacterium acne in patients with acne vulgaris.

**[Key words]** acne vulgaris; propionibacterium acne; drug resistance; 23S rRNA

[J Clin Dermatol, 2020, 49(12):717-722]

寻常痤疮是一种常见,好发于青少年的慢性毛囊皮脂腺炎症性疾病,其中痤疮丙酸杆菌过度繁殖是加重痤疮炎症反应的重要因素<sup>[1]</sup>。近年来,随着痤疮治疗中抗菌药物的广泛应用,耐药性痤疮丙酸杆菌(*P.acnes*, PA)的发生率呈逐年上升趋势<sup>[2-4]</sup>,导致临床疗效不佳。目前

国内对于寻常痤疮患者 PA 的耐药特征,特别是其分子机制报道极少。本文通过对寻常痤疮患者耐药性 PA 菌株 23S rRNA 基因测序研究其产生耐药性的分子机制。现将结果报告如下。

### 1 病例与方法

1.1 一般资料 伦理委员会同意后,选择就诊的寻常痤疮患者。入选标准:年龄 18~35 岁,性别不限;符合

收稿日期:2020-02-05;修回日期:2020-03-16

通讯作者:毕鸣晔,E-mail:bmy\_888@126.com

寻常痤疮的诊断标准(Pilsbury 分类 2~3 级);排除标准:近 3 个月口服或外用过维 A 酸类药物和抗菌药物;近 1 个月内口服或外用糖皮质激素药物和免疫抑制剂;近 1 个月内面部接受过寻常痤疮光电治疗或化学焕肤术如果酸或水杨酸治疗等;孕妇或哺乳妇。签署知情同意后,记录患者一般情况和病情分级。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PA 临床株的分离和培养

对寻常痤疮患者面部炎症性皮损(主要是炎性丘疹和脓疱)经碘酊消毒和生理盐水冲洗后,用手术尖刀刺破皮损,挤出内容物立即接种到哥伦比亚血琼脂培养基,并送至微生物实验室。气袋法 37 °C 同时做厌氧培养和需氧培养。72 h 后用无菌接种环挑取厌氧培养的单菌落进行纯化培养,培养 72 h。

### 1.2.2 PA 临床株鉴定

取单独菌落分别进行菌落形态学、显微镜检和鉴定。①菌落形态学:培养平皿中可见较小、白色或灰白色、光滑、不透明、不溶血的菌落;②显微镜检:选取形态规则的针尖至粟粒大、米色或淡黄色的半球形小菌落,涂片、革兰氏染色后油镜下观察;③生化鉴定:触酶试验,接种环挑取细菌涂布于洁净玻片与上,加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 1 滴后观察。若立即出现大量气泡为阳性;吡啶实验,无菌操作下接种少量菌落到蛋白胨水培养液试管中,置 37 °C 恒温箱中厌氧培养 48 h。在培养液中加入乙醚 1~2 mL,充分振荡并静置片刻使乙醚层浮于培养液的上层,沿管壁缓慢加入 5~10 滴吡啶试剂,乙醚层呈现玫瑰红色为阳性;④ VITEK-MS Plus 质谱法鉴定:参照凌勇活等<sup>[9]</sup>的方法,以 PA 标准菌株 GIM1.243 进行平行对照试验。参数设置:线性操作模式,正离子,基质抑制偏转模式,脉冲离子提取时间 350 ns,相对分子质量为 2000~20 000。校准点位:质谱校准菌株为 PA 标准菌株 GIM1.243(广东微生物研究所,GIM1.243),VITEK MS-CHCA 基质液( $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸)为阴性校对。检测所获取的细菌全细胞蛋白质谱与内质控标准菌株进行比对,即为最终鉴定结果。

### 1.2.3 体外药敏试验

采用纸片法(杭州微生物试剂有限公司)。挑取培养 24 h 菌落,用生理盐水制成菌悬液,震荡混匀后用浊度计调整浓度为 0.5 个麦氏浊度;无菌棉拭子蘸取菌液,在含脑心浸液固体培养基的平皿表面均匀涂布接种 3 次,室温下干燥 3~5 min。用无菌镊子将药敏试纸(红霉素、甲硝唑、四环素和克林霉素)纸片紧贴于平板表面,35 °C 孵育 24 h 后,测量抑菌圈直径。判定标准:抑菌圈直径 >20 mm,高敏;10~20 mm,中敏;<10 mm,耐药。

### 1.2.4 耐药性 PA 的基因突变检测

#### 1.2.4.1 PA 基因组 DNA 提取

参照细菌 DNA 提取试剂盒(北京天根生物)说明书。主要步骤:①菌体收集和

裂解:取细菌培养液 3 mL,离心弃上清;沉淀物中加入 200  $\mu$ L 缓冲液 GA,充分震荡至菌体完全悬浮。加入 20  $\mu$ L Proteinase K 溶液,混匀后再加入 220  $\mu$ L 缓冲液 GB,振荡后 70 °C 静置 10 min,溶液变清亮后短暂离心去除水珠;②沉淀加 220  $\mu$ L 无水乙醇,充分振荡混匀 15 s 后出现絮状沉淀,离心后将上一步所得溶液和絮状沉淀加入吸附柱 CB3,离心并弃废液;③洗涤:将吸附柱 CB3 放入收集管中,加入 500  $\mu$ L 缓冲液 GD 洗涤,离心后弃废液;将吸附柱 CB3 收集管中,加入 600  $\mu$ L 漂洗液 PW 进行洗涤,离心后弃废液,重复该步骤 3 次。吸附柱 CB3 置室温数分钟,以彻底去除吸附材料中残余的漂洗液;④洗脱:将吸附柱 CB3 转入干净的离心管中,向吸附膜滴加 50~200  $\mu$ L 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2~5 min 后离心,将溶液收集到离心管中。

#### 1.2.4.2 23S rRNA 基因扩增

##### 1.2.4.2.1 引物序列

采用 Primer3 在线设计程序,设计 PCR 引物(江苏金唯质生物科技有限公司合成),并且在 NCBI 上进行引物特异性检查(表 1)。

表 1 23S rRNA 基因的引物序列及扩增产物大小

引物	序列(5'→3')	产物长度(bp)
23S rRNA-F	AGTCGGGTCCTAAGCGGAG	
23S rRNA-R	TTCCCCTTAGATGCTTTCAG	1539

##### 1.2.4.2.2 PCR 反应体系及扩增

反应体系:2×Mix 15  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ L,上下游引物各 0.8  $\mu$ L,DNA 模板 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 11.2  $\mu$ L,总体积 30  $\mu$ L。充分混匀后短暂离心,并置入 PCR 扩增仪(Bio-rad 公司)。扩增反应参数:95 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,32 个循环,72 °C 终延伸 5 min。结束后将扩增产物取出,置于冰上待用。

##### 1.2.4.2.3 PCR 产物电泳

①制备 2% 琼脂糖凝胶和 PCR 产物加样:称取 2 g 琼脂糖粉加入 100 mL 1× 三羟甲基氨基甲烷乙酸盐乙二胺四乙酸(TAE)电泳缓冲液后反复加热至全部溶解。待温度至 50~60 °C 时加入 10  $\mu$ L 溴乙锭染料,混合后将溶液倒入已插梳子的制胶槽。胶凝固后拔出梳子,将凝胶转移至加有 1× TAE 电泳缓冲液的电泳槽,PCR 产物和 DNA 上样缓冲液后混匀后加样,同时加入 DNA Marker;②电泳和拍照观察:电泳条件:电压 100 V,时间 30~50 min。电泳结束后将凝胶置于凝胶成像系统中,可见 DNA 明亮条带,设置适合的曝光度,拍照保存。

##### 1.2.4.2.4 测序分析

PCR 产物纯化后送上海生工公

司,构建 pMD-19T 载体后测序。采用核酸的 blastn 程序,在 NCBI 上对测序结果进行比对分析。

## 2 结果

### 2.1 PA 临床株的分离和鉴定

与 PA 标准株平行试验,根据形态学、生化试验和 API 鉴定系统 20A 鉴定板鉴定,从 18 例患者的皮损标本中分离出 PA 12 个临床株(表 2,菌落形态见图 1)。形态学:革兰氏染色后油镜下呈阳性、分节状、排列杂乱的棒状杆菌(图 2)。生化鉴定:触酶试验出现大量气泡为阳性反应;吲哚实验乙醚层呈玫瑰红色,为阳性反应(图 3)。

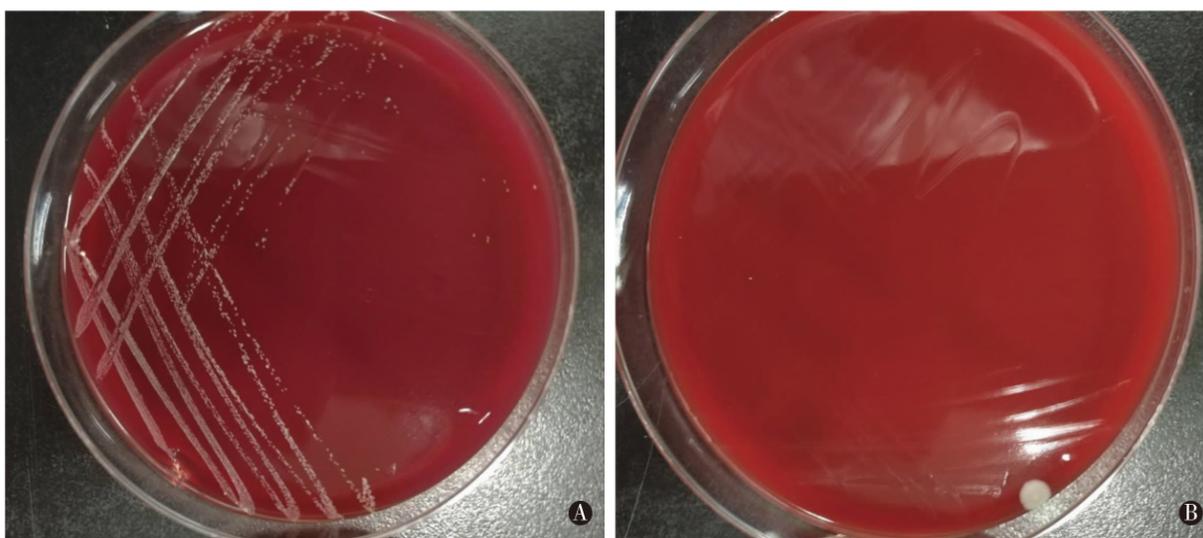
### 2.2 4 种抗菌药物体外抗菌活性检测

12 个 PA 临床株均对四环素高度敏感,抑菌圈直径 >20 mm,而对甲硝唑和克林霉素均耐药;其中,1 株对红霉素中度敏感,抑菌圈直径为 10~20 mm 之间,其余 11 个菌株对红霉素耐药(图 4,表 3,表 4)。

### 2.3 23S rRNA 基因的扩增及测序

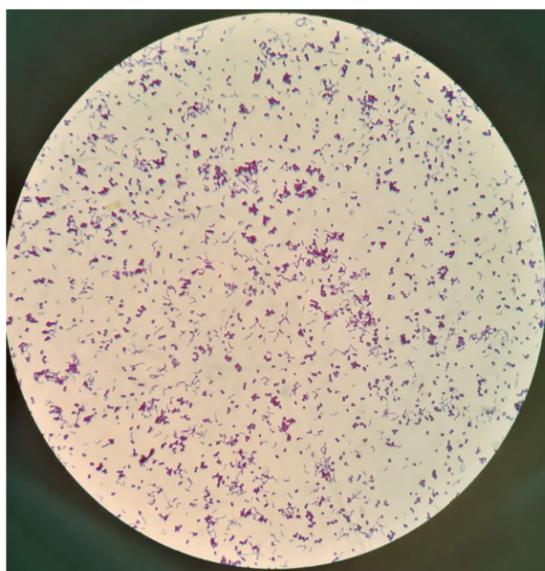
2.3.1 PCR 产物扩增后电泳 以 12 个 PA 临床株 DNA 为模板,PCR 扩增后电泳,可见目的条带清晰明亮(图 5)。

2.3.2 PCR 产物测序结果对比 12 个耐药株 PCR 产物经测序,并与野生型(标准菌株)进行比对,发现 7 株 23S rRNA 基因发生多位点的点突变,突变方式有



A:厌氧培养 72 h 后培养平皿中可见较小、灰白色、光滑、不透明、不溶血的菌落; B:需氧培养 72 h 后培养平皿中无菌落生长

图 1 痤疮丙酸杆菌培养 72 h 后菌落形态



革兰氏染色呈阳性,分节状、排列杂乱的棒状杆菌  
图 2 培养的痤疮丙酸杆菌显微镜下图像( $\times 1500$ )



乙醚层呈玫瑰红色  
图 3 痤疮丙酸杆菌吲哚实验

表 2 痤疮丙酸杆菌厌氧培养、触酶实验及吲哚实验结果

编号	厌氧培养		触酶实验	吲哚实验	符合
	无氧培养	有氧培养			
1*	+	-	+	+	√
2*	+	-	+	+	√
3*	+	-	+	+	√
4*	+	-	+	+	√
5*	+	-	+	+	√
6	-	-	-	-	-
7	+	-	+	-	-
8*	+	-	+	+	√
9*	+	-	+	+	√
10*	+	-	+	+	√
11*	+	-	+	+	√
12*	+	-	+	+	√
13	+	-	+	-	-
14	-	-	-	-	-
15*	+	-	+	+	√
16	+	-	+	-	-
17*	+	-	+	+	√
18	-	-	-	-	-

备注: \* 标记样品用于后续实验

A1392G、A1393G、A1518G、T1533C、A1569G、G1814A、G1839A、T1946C、A1974G、T2034C、A2058T、A2273G和T2513C, 5 个耐药株未检测到 23S rRNA 基因突变 (表 5)。

2.3.3 PA 耐药株突变位点分析 详见表 6, 不同耐药株 23S rRNA 基因的突变位点存在差异, 其中 2、4、11 和 17 号有 2 个或 2 个以上的不同突变位点。

### 3 讨论

寻常痤疮是一种发生于面部及胸背部毛囊皮脂腺单位的慢性炎症性疾病。目前认为, 本病是遗传因素作用下, 雄激素诱导的皮脂过度分泌、毛囊皮脂腺导管角化异常、痤疮丙酸杆菌增殖及炎症和免疫反应等相关<sup>[6]</sup>。其中, 毛囊皮脂腺中 PA 过度繁殖是诱发和维持痤疮炎症反应的重要原因<sup>[7]</sup>。寻常痤疮的治疗一方面在于纠正毛囊角化异常、减少皮脂分泌及减轻炎症反应, 另一方面, 抑制寄生于毛囊皮脂腺单元中嗜脂性微生物特别是 PA 过度繁殖, 全身或局部抗菌药物治疗, 有助于干扰细菌生长和代谢, 抑制或杀灭局部感染性细菌, 减轻局部炎症反应, 改善中重度痤疮皮损, 避免瘢痕形成<sup>[8]</sup>。

痤疮的抗菌药物治疗始于 20 世纪 50 年代早期, 目前临床上常用的口服抗菌药物主要有四环素类、大环内酯类及硝基咪唑类等, 外用抗菌药物有夫西地酸、克林霉素和氯霉素等。除抗菌作用外, 一些抗菌药物还有抗炎、免疫调节作用, 这些药物对中重度痤疮的治疗有很好的疗效。由于本病病程长、反复发作、抗菌药物使用不规则及患者依从性差等原因, 部分患者在使用抗菌

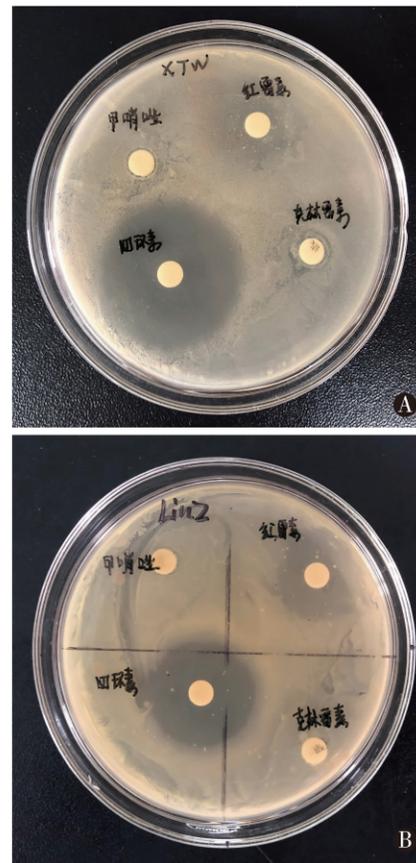


图 4 痤疮丙酸杆菌药敏试验结果  
A: 四环素; 抑菌圈直径>20 mm; 甲硝唑、红霉素和克林霉素; 抑菌圈直径<20 mm; B: 四环素; 抑菌圈直径>20 mm; 甲硝唑和克林霉素; 抑菌圈直径<20 mm; 红霉素; 抑菌圈直径为 10~20 mm 之间

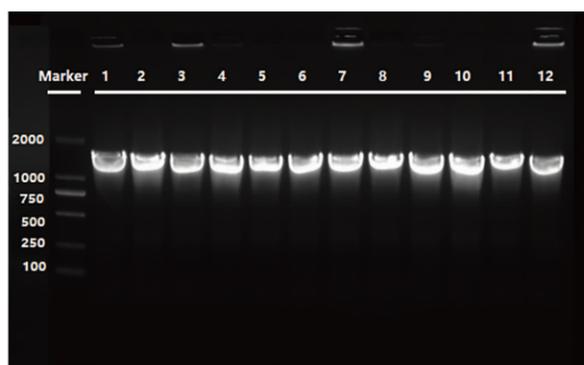
表 3 痤疮丙酸杆菌药敏实验结果

编号	甲硝唑	克林霉素	四环素	红霉素
1	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
2	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
3	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
4	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
5	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
8	<10 mm	<10 mm	>20 mm	10~20 mm
9	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
10	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
11	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
12	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
15	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm
17	<10 mm	<10 mm	>20 mm	<10 mm

表 4 痤疮丙酸杆菌对不同抗菌药物耐药情况

抗菌药物	红霉素	甲硝唑	四环素	克林霉素
菌株总数	12	12	12	12
耐药菌株数	11	12	0	12

药物治疗后出现疗效下降。进一步研究发现, 疗效下降除了与给药途径及给药时机等因素有关外, 与 PA 对抗菌药物产生耐药性有关。大量研究表明痤疮丙酸杆菌对



PA临床株的 PCR 产物

图 5 痤疮丙酸杆菌 PCR 产物电泳图

表 5 痤疮丙酸杆菌 PCR 产物测序结果比对

编号	序列	突变位点
	GACGGAAAGACCCCGGA	None(wild type)
17	GACGTAAGACCCCGGA	A2058T
	GAGTGTGTGAACCGATCAT	None(wild type)
1	GAGTGTGTGAGCCGATCAT	A1393G
11	GAGTGTGTGACCGATCAT	A1392G
	GCATGATGGGGAGCCCATG	None(wild type)
17,4	GCATGATGGGGAGCCACG	T1533C
11	GCGTGATGGGGAGCCCATG	A1518G
	TGTCGAGAAAAGCTTC	None(wild type)
17	TGTCGAGAAAAGCTTC	A1569G
	GTCGTAAGACGATGTATA	None(wild type)
4	GTCGTAAGACAATGTATA	G1814A
	TCCTGCCCGTCTGGA	None(wild type)
4	TCCTGCCCACTGCTGGA	G1839A
	ATTCCCTTGTCGGGTAAGT	None(wild type)
2	ATTCCCTTGCCGGGTAAGT	T1946C
	ACGAATGGAGTAACGATTT	None(wild type)
3	ACGAATGGGTAACGATTT	A1974G
	AGTAAAGATGCTCGTTAC	None(wild type)
2	AGTAAAGACGCTCGTTAC	T2034C
	TAAAGGGTAACGGAGGCC	None(wild type)
4	TAAAGGGTAGCGGAGGCC	A2273G
	TCGGCTCGTCGATCCT	None(wild type)
5	TCGGCTCGCCGATCCT	T2513C

表 6 痤疮丙酸杆菌不同耐药株突变方式

编号	突变位点
1	A1393G
2	T1946C, T2034C
3	A1974G
4	T1533C, G1814A, G1839A, A2273G
5	T2513C
11	A1392G, A1518G
17	T1533C, A1569G, A2058T

抗生素的耐药已成为不可忽视的现象<sup>[9]</sup>。耐药是细菌在自身生存过程中的一种特殊表现形式，根据发生机制分为固有耐药和获得性耐药。获得性耐药是由于细菌

与抗生素接触后通过改变自身代谢途径，使其不被抗生素杀灭，主要由质粒介导，其机制主要包括：①产生灭活酶；②抗菌药物作用靶位改变；③改变细菌外膜通透性；④影响主动流出系统；⑤细菌生物被膜的形成等<sup>[10]</sup>。目前认为，当长期应用抗生素时，占多数的敏感菌株不断被杀灭，耐药菌株就大量繁殖，代替敏感菌株，而使细菌对该种药物的耐药率不断升高。

23S rRNA 是细菌核糖体 50 S 大亚基的组成部分，长度约 3 kb。23S rRNA 有 ~ 区共 6 个结构域，与核糖体蛋白形成立体构象，蛋白质深入大亚基内部与 23S rRNA 相互作用，起到稳定核糖体的作用。23S rRNA 结构域 V 区中心环碱基则构成转肽酶中心活性部分，肽合成后由肽输出通道输出核糖体。大环内酯类抗生素通过结合于 50 S 大亚基的转肽酶活性中心与肽链输出道之间狭窄的部分，阻止肽链延伸，进而阻碍蛋白质的合成，同时，可抑制 50 S 大亚基的组装而使功能性核糖体减少，蛋白质合成减少，从而抑制细菌生长<sup>[11]</sup>。

从 1979 年美国最先报道痤疮丙酸杆菌临床耐药株以来<sup>[12]</sup>，国内外多项研究陆续报道了其耐药情况。耐药性 PA 多见于抗菌药物疗程长、病情复发和用药依从性差和疗效差的患者，还与用药途径有关<sup>[8]</sup>。痤疮患者中 PA 耐药的分子机制尚未完全阐明，可能与染色体突变或耐药基因转移有关。研究发现引起大环内酯类抗生素耐药的主要机制为靶位改变（包括基因突变或者甲基化）、抗菌药物主动外排以及药物灭活<sup>[13]</sup>。红霉素、克林霉素耐药与 23S rRNA 的 2058A-G、2059A-G 突变有关，而四环素耐药则与 16S rRNA 的 1058G-C 突变有关。目前尚未发现关于 PA 对甲硝唑耐药分子学研究的报道<sup>[14]</sup>。Ross 等<sup>[15]</sup>根据耐药特征，将耐药 PA 分为 4 个表型：型表现为对所有类抗生素固有耐药；型表现为对所有大环内酯类抗生素固有低度耐药和诱导性高度耐药；型仅对红霉素耐药，对 16 环大环内酯类抗生素敏感；型对所有的 14 环、15 环和 16 环大环内酯类高度耐药，对克林霉素敏感。后来证明、和型耐药分别由相当于 *E.coli* 23S rRNA 的 2058(A→G)、2057(G→A)、2059(A→G) 的基因点突引起<sup>[16]</sup>。

本文对临床收集 18 个临床标本培养，经培养、鉴定 12 个 PA 菌株。进一步的药敏试验发现，12 个菌株均对四环素高度敏感，而对甲硝唑仅有 1 株中度敏感，这与以往寻常痤疮患者中 PA 耐药性的检测结果类似<sup>[17]</sup>。尽管目前尚不明确 PA 对甲硝唑耐药的分子机制，临床上对寻常痤疮炎症性损害的治疗也有效，推测可能与甲硝唑通过抑制毛囊皮脂腺中其他厌氧菌生长，改变局部微环境从而间接抑制局部 PA 过度增殖。11 个 PA 临床株表现为对红霉素、所有 12 株表现为对克林霉素耐药，与马英等<sup>[18]</sup>、Fan 等<sup>[19]</sup>的报道一

致。其中,仅有 1 株在相当于 *E.coli* 23S rRNA2058 位点出现由 A→G 突变,表现为对红霉素和克林霉素耐药,与文献报道一致,未发现 23S rRNA 基因 2057 和 2059 位点突变。另外,对其他红霉素耐药菌株 23S rRNA 基因检测发现新突变位点,分别是 A1392G、A1393G、A1518G、T1533C、A1569G、G1814A、G1839A、T1946C、A1974G、T2034C、A2058T、A2273G 和 T2513C,而且同一耐药菌株出现多个不同突变位点,这些新发现基因突变位点、同一菌株多位点突变是否共同参与了 PA 对红霉素和克林霉素耐药表型及其可能的分子学机制尚待进一步研究。5 例耐药株未检测到 23S rRNA 基因突变,是否存在 23S rRNA 基因突变以外其他的耐药机制也有待确定。

本研究收集了 18 例寻常痤疮患者,仅从炎症性皮损标本中成功分离出 12 个 PA 临床株,分离率 66.7%,研究样本量偏少。另外,未对 PA 23S rRNA 基因的不同区段分别进行扩增、核苷酸序列分析比对研究,需要进一步扩大样本量来证实本研究新发现的突变位点以及 23S rRNA 基因突变外其他的 PA 对红霉素、克林霉素耐药的可能分子机制。

(致谢:衷心感谢尹兴平主任在本研究实验阶段及论文撰写过程给予的悉心指导和帮助!)

#### 参考文献

- [1] Sorel Fitz-Gibbon, Shuta Tomida, Bor-han Chiu, et al. *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(9): 2152-2160.
- [2] Mendoza N, Hernandez PO, Tying SK, et al. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from acne patients in Colombia[J]. Int J Dermatol, 2013, 52(6): 688-692.
- [3] Schafer F, Fich F, Lam M, et al. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne[J]. Int J Dermatol, 2013, 52(4): 418-425.
- [4] Luk NM, Hui M, Lee HC, et al. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* among acne patients in a regional skin centre in Hong Kong[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013, 27(1): 31-36.
- [5] 凌勇活, 孙菲, 李明, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对痤疮患者痤疮丙酸杆菌的鉴定[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2017, 31(1): 98-99, 103.
- [6] Layton AM. Optimal management of acne to prevent scarring and psychological sequelae[J]. Am J Clin Dermatol, 2001, 2(3): 135-141.
- [7] Burkhart CG, Burkhart CN. Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug[J]. J Am Acad Dermatol, 2007, 57(4): 722-724.
- [8] 尹兴平, 夏隆庆. 痤疮患者痤疮丙酸杆菌耐药性的研究进展[J]. 国外医学(皮肤性病学分册), 2004, 30(3): 152-154.
- [9] Dreno B, Thiboutot D, Gollnick H, et al. Antibiotic stewardship in dermatology: limiting antibiotic use in acne. Eur J Dermatol, 2014, 24(3): 330-334.
- [10] Abeck D, Mempel M. *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications[J]. Br J Dermatol, 1998, 139(Suppl53): 13-16.
- [11] 吴移谋, 叶元康. 支原体学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 101.
- [12] Crawford WW, Crawford IP, Stoughton RB, et al. Laboratory induction and clinical occurrence of combined clindamycin and erythromycin resistance in *Corynebacterium acnes*[J]. J Invest Dermatol, 1979, 72(4): 187-190.
- [13] 韩旭, 辛德莉. 肺炎支原体对大环内酯类抗生素的耐药机制[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(16): 1101-1103.
- [14] 唐慧菁. 东莞地区痤疮患者痤疮丙酸杆菌耐药基因分析[D]. 暨南大学, 2018.
- [15] Ross JI, Eady EA, Cove JH, et al. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(5): 1162-1165.
- [16] Ross JI, Snelling AM, Eady EA, et al. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia[J]. Br J Dermatol, 2001, 144(2): 339-346.
- [17] 张丽媛, 王奇飒, 朱纹懿, 等. 我国痤疮患者皮损中痤疮丙酸杆菌对抗生素耐药性的 Meta 分析 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2019, 35(9): 515-519.
- [18] 马英, 刘晔, 王倩倩, 等. 夫西地酸对痤疮丙酸杆菌的体外抗菌活性研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2014, 47(11): 823-825.
- [19] Fan Y, Hao F, Wang W, et al. Multicenter cross-sectional observational study of antibiotic resistance and the genotypes of *Propionibacterium acnes* isolated from Chinese patients with acne vulgaris[J]. J Dermatol, 2016, 43(4): 406-413.