

分类号: R758.703

UDC: \_\_\_\_\_

重 庆 医 科 大 学

硕 士 学 位 论 文

论文题目 重庆地区痤疮丙酸杆菌对四种抗生素耐药性的调查

作者姓名 刘丽华

指导教师姓名 (职称、单位名称) 李 惠 教授

重庆医科大学附属第一医院皮肤科(400016)

周维康 主任医师

重庆市急救医疗中心 (400014)

申请学位级别 硕士 学科、专业名称 皮肤病与性病学

论文答辩年月 2007 年 05 月

2007 年 05 月

分类号:  R758.703

UDC: \_\_\_\_\_

重 庆 医 科 大 学

硕 士 学 位 论 文

论文题目  重庆地区痤疮丙酸杆菌对四种抗生素耐药性的调查

作者姓名  刘丽华

指导教师姓名(职称、单位名称)  李 惠 教授

重庆医科大学附属第一医院皮肤科(400016)

周维康 主任医师

重庆市急救医疗中心 (400014)

申请学位级别  硕士  学科、专业名称  皮肤病与性病学

论文答辩年月  2007 年 05 月

2007 年 05 月

# 重庆医科大学

## 研究生学位论文独创性声明

本人申明所呈交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得重庆医科大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与我同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

学位论文作者签名： 刘丽华 日期： 2007-4-20

## 学位论文版权使用授权书

本人完全了解重庆医科大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在攻读学位期间论文工作的知识产权单位属重庆医科大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署名单位为重庆医科大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外），可以采用影印、缩印或其他手段保存论文。

论文作者签名： 刘丽华  
指导教师签名： 张 阔  
日 期： 2007-4-20

# 目 录

符号说明.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	4
论文正文：重庆地区痤疮丙酸杆菌对四种抗生素耐药性的调查.....	7
前 言.....	7
材料与方法.....	9
结 果.....	17
讨 论.....	21
结 论.....	27
参考文献.....	28
论文附图.....	31
文献综述：痤疮的抗生素治疗及耐药现状.....	34
致 谢.....	40
研究生在读期间发表文章情况.....	41

## 符号说明

英文缩写	英文全称	中文全称
CFU	Clone Formation Unit	集落形成单位
g	gram	克
h	hour	小时
Kpa	kilopascal	千帕
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	最低抑菌浓度
min	minute	分钟
mg	milligram	毫克
ml	millilite	毫升
MLSB	Macrolide—Lincosamide—Streptoramin B	大环内酯-林可霉素-链阳霉素 B 耐药
NCCLS	National Committee of Clinical Laboratory Standard	美国国家临床实验室标准委员会
NHS	National Health Service	国家卫生局（英国）
P.acnes	Propionibacterium acnes	痤疮丙酸杆菌
PBS	Phosphate-buffered-saline	磷酸缓冲液
μl	microlitre	微升

# 重庆地区痤疮丙酸杆菌对四种抗生素耐药性的调查

## 摘 要

**目的** 痤疮丙酸杆菌（*P.acnes*）是痤疮的重要致病菌，在当前各种新型广谱抗生素选择压力下不断呈现新的流行趋势和耐药特征。通过测定红霉素、克林霉素、四环素、甲硝唑对 *P.acnes* 的最低抑菌浓度，了解 *P. acnes* 对四种抗生素的耐药现状及耐药性变化的动态，旨在为临床治疗提供用药参考。

**方法** 本研究主要从以下方面进行了一些探索。第一：收集 60 例痤疮患者的痤疮内容物作为标本，进行分离培养，将获得的菌株进行菌落形态、镜下形态、触酶试验、硝酸盐试验和吲哚试验的鉴定后，再予 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定卡鉴定；第二：用卡方检验比较不同性别及年龄组中 *P.acnes* 的培养阳性率是否有显著差异；第三：用琼脂稀释法检测 *P.acnes* 对红霉素、克林霉素、四环素、甲硝唑的敏感水平。

**结果** 本研究 60 份标本中，分离培养出 33 株 *P.acnes*，均经过菌落形态、镜下形态、触酶试验、硝酸盐试验和吲哚试验和 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定卡鉴定明确。其中菌落形态、镜下形态、触酶试验、硝酸盐试验和吲哚试验得到结果与 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定卡鉴定相一致。本实验中 *P.acnes* 分离阳性率为 55%，其分离阳性率与性别及年龄无关。将这 33 株 *P.acnes* 用琼脂稀释法检测其对四种抗生素的敏感水平。测定结果显示 33 株 *P.acnes* 中对红霉素耐药的有 19 株，对甲硝唑耐药的有 13 株，对四环素耐药的有 5 株，对克林霉素耐药的有 3 株，其耐药率分别为 57.6%、

39.4%、15.2%、9.1%。

**结论** 重庆地区的 *P.acnes* 存在着耐药情况，尤其对红霉素的耐药率较高。*P. acnes* 耐药性的产生与抗生素的不合理应用有关，临床皮肤科应掌握病原菌流行趋势和耐药特征，这对于控制耐药菌株的流行和蔓延，指导临床合理使用抗生素有着十分重要的意义。

**关键词：** 痤疮丙酸杆菌， 琼脂稀释法， 抗生素耐药性

# **PRESENT CONDITION OF P.ACNES DRUG RESISTANCE TO ANTIBIOTICS**

## **ABSTRACT**

**Objective** Propionibacterium acnes (p.acnes) is an important pathogenic bacterium, and its new popular trend and new characteristic of drug fast shows up continuously under the present pressure of new broad-spectrum antibiotics. We try to know the present condition and the changeable state of drug resistance of P.acnes to antibiotics through examining the minimal inhibitory concentration of P.acnes to erythromycin, arilin, clindamycin and tetracycline in order to provide the best antibacterials for clinic medication therapeutics.

**Methods** This study was mainly from the following aspects of exploration:

First, we collected 60 cases of acne patients with acne content as a specimen which were isolated and cultured, the strains will be done with colony morphology, appearance in microscopic, catalase test, nitrate test, indole test identified, VITEK automatic re-microbial analysis system, anaerobes ANI identification card identification.

Secondly, chi-square test was used to compare the effect of sex and age on the p.acnes positive rate.



Thirdly, agar dilution method was used to test the sensitive level of *P.acnes* to erythromycin, clindamycin, tetracycline and metronidazole.

**Results** The 33 *P.acnes* were isolated and cultured from the 60 samples, which were passed through under colony morphology, appearance in microscopic, catalase test, nitrate test, indole test, VITEK automatic pilot and microbial analysis system, ANI anaerobes identification card identification, They were clearly identified. The results of the VITEK automated microbial analysis system and ANI anaerobes identification card identification are corresponding with the results of colony morphology, appearance in microscopic, catalase test, nitrate test and indole test. In this experiment, the cultural rate is 55%. The sex and the age have no effect on the cultural rate. We examine this 33 strains' sensitive level to the 4 antibiotics by agar dilution method. The result shows that 19 strains have drug resistance to erythromycin, and 13 strains to arilin, 5 strains to tetracycline, 3 strains to clindamycin. And the drug resistance rate respectively is 57.6%, 39.4%, 15.2% and 9.1%.

**Conclusion** Drug resistance of *P.acnes* is exist in Chongqing area, especially erythromycin resistance rate is higher. *P.acnes* resistance is correlated with antibiotic unreasonable application. We should acquire pathogens prevalent trends and characteristics of resistance in clinical Dermatology. which has great significance to control the spread of resistant

strains and to guide clinical use of antibiotics

**Keywords :** propionibacterium acnes, agar dilution method,  
antimicrobial resistance,

# 重庆地区痤疮丙酸杆菌对四种抗生素耐药性的调查

## 前 言

痤疮是皮肤科的常见病、多发病之一，是一种毛囊及皮脂腺的慢性炎症。痤疮的发病因素很多，包括内分泌因素、毛囊及皮脂腺的导管角化异常、微生物的感染、免疫因素等<sup>[1]</sup>。其中，痤疮丙酸杆菌（*P. acnes*）等微生物的感染，是其重要的一个发病因素。痤疮丙酸杆菌是一种细胞内寄生菌，属于皮肤的正常菌群，为革兰氏阳性无芽孢多形性杆菌。直或微弯，呈棒状，大小为  $0.5\sim 0.8\times 1\sim 5\mu\text{m}$ ，染色不均，有浓染部分。排列呈 X、Y、V 及栅状。无荚膜，无鞭毛。专性厌氧，最适温度  $30\sim 37^{\circ}\text{C}$ 。菌落小，圆形，灰白色，不透明。触酶试验阳性，硝酸盐试验阳性，吲哚试验可为阳性。

*P. acnes* 一般寄居在皮肤的毛囊及皮脂腺中。随着青少年的发育成熟，毛囊口出现角栓，皮脂腺分泌功能也明显增加，因皮脂含有较多脂肪酸等成分，适合 *P. acnes* 的生长繁殖，从而成为痤疮主要的病因之一。通过研究发现，*P. acnes* 诱导炎症的机制可能是：通过激活补体系统产生 C5a 或低级肽引起白细胞趋化，吞噬破坏 *P. acnes* 产生脂酶，分解甘油三酯产生较多的游离脂肪酸，游离脂肪酸刺激毛囊及毛囊周围发生非特殊性炎症反应<sup>[2]</sup>。*P. acnes* 通过免疫和非免疫性途径引起皮损局部炎症的机制有<sup>[3]</sup>：①细胞壁成分肽聚糖通过毛囊上皮扩散至周围组织，刺激巨噬细胞产生白介素-8(IL-8)和  $\alpha$ -肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )并上调粘附分子的表达；②多种中性粒细胞和淋巴细胞趋化因子，以及 IL-8 和 TNF- $\alpha$  诱导中性粒细胞和淋巴细胞聚集到毛囊皮脂腺上皮；③*P. acnes* 与特异性抗体结合，通过经典途径激活补体系统，产生对中性粒细胞有强大趋化作用的补体片段 C5a；④有抗 *P. acnes* 抗体参与时，诱导中性粒细胞释放多种水解酶，破坏毛囊壁，损伤真皮组织；⑤*P. acnes* 分泌多种蛋白酶和脂酶，破坏了毛囊壁的完整性；⑥细胞壁成分肽聚糖多糖刺激皮脂腺周围组织产生肉芽肿反应；⑦粉刺中亚油酸缺乏导致中性粒细胞产生大量的反应性氧中间产物如  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 OH $^-$  等，破坏了毛囊壁的完整性，损伤周围组织。

四十多年前，开始使用抗生素治疗痤疮，使 *P. acnes* 感染的控制一度取得满意的疗效。但是近年来由于对这些抗菌药物的过多应用及不合理使用，导致对这些药物产生不同耐药性的 *P. acnes* 日益增多。在过去的十年中，*P. acnes* 对抗生素的敏感性在逐渐降低，有关于 *P. acnes* 临床耐药性的报道也逐渐增多<sup>[4]</sup>。世界上很多国家对本国或本地区 *P. acnes* 的流行情况进行了监测，我国在这方面的研究比较少。70 年代末，在美国检测并报道了第一例 *P. acnes* 的耐药菌株。从那以后，欧洲、澳大利亚、日本等也先后报道了 *P. acnes* 出现耐药菌株。1998 年，经 Leeds 的皮肤研究中心报道，*P. acnes* 的耐药率对于红霉素达 53.4%，对于克林霉素达 46%，对于土霉素达 23.3%<sup>[5]</sup>。一项研究表明 *P. acnes* 对红霉素的耐药是导致其疗效降低的原因。最近，经 NHS 的研究，证实用四环素和米诺环素治疗对四环素耐药的 *P. acnes*，疗效明显降低<sup>[6]</sup>。

本研究从痤疮患者皮损中分离培养菌株，经三级鉴定明确为 *P. acnes*。用琼脂稀释法对其进行药敏试验，以了解 *P. acnes* 在重庆地区的耐药现状，提供给临床医生及时可靠的药敏资料，供临床用药参考，避免抗生素的滥用，从而减少耐药菌株的产生具有重要意义。

# 1 材料与amp;方法

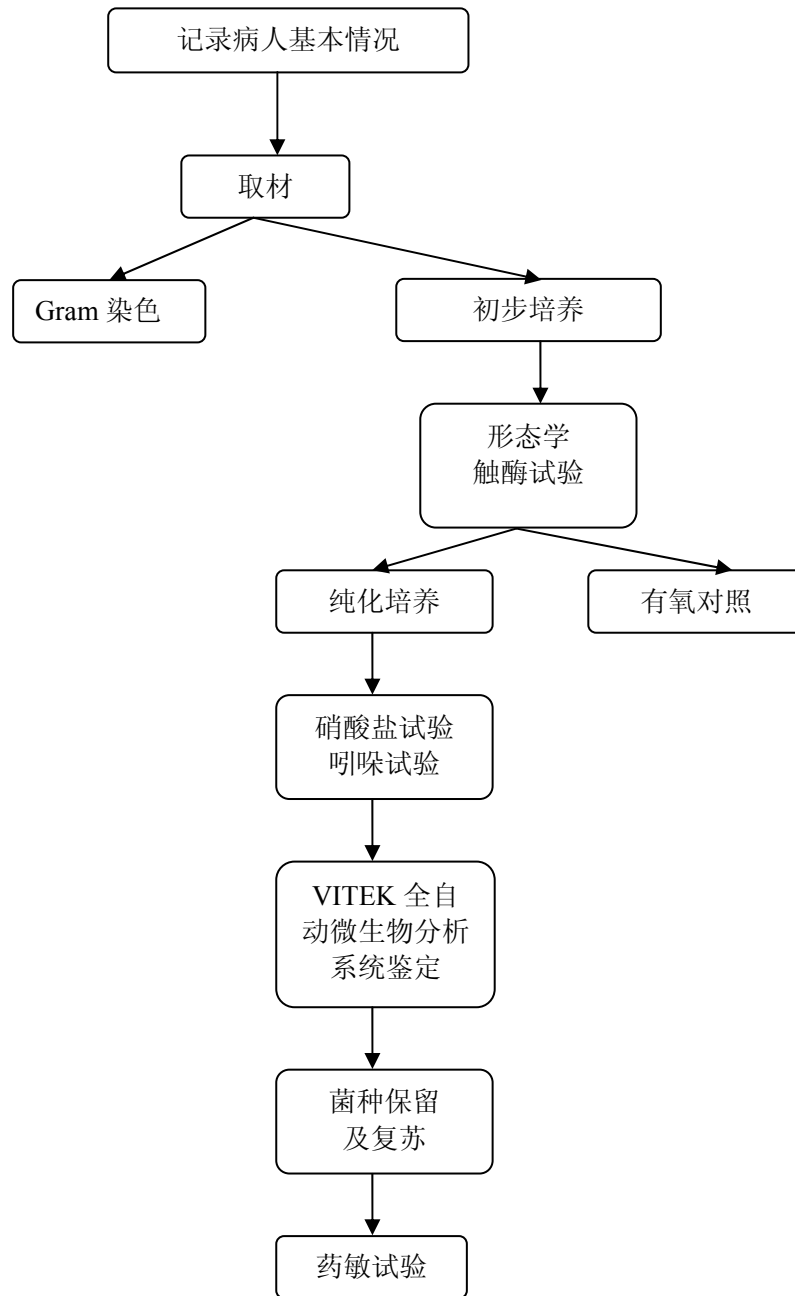


图 1: 实验流程图

Fig1 : the flow diagram of experiment

## 1.1 材料

### 1.1.1 培养基的主要成分

- |         |            |             |
|---------|------------|-------------|
| 1. 胰蛋白胨 | Tryptone   | 英国 OXOID 公司 |
| 2. 多胨   | Polypepton | 日本制药会社      |

3. 牛肉膏	Beef Extract	上海长生生化制药厂
4. 酵母膏	Yeast extract	北京海淀区微生物培养基制品厂
5. 维生素 K1	Vitamin K1	无锡市第七制药有限公司
6. 琼脂	Agar powder	香港 Farco 化学公司
7. 葡萄糖	Amylaceum	重庆北碚化学试剂厂

### 1.1.2 主要仪器

1. 电子分析天平 (上海天平仪器厂)
2. 超净工作台 (上海沪新净化设备厂)
3. 普通光学显微镜 (日本 OLYMPUS)
4. 厌氧罐 (北京市检验仪器厂)
5. 电热恒温培育箱 (日本三洋公司)
6. XC-05 型旋片式真空泵 (西南医疗器械厂)
7. 自动调温高温高压灭菌锅 (日本三洋电器公司)
8. 氮气罐 (重庆泰和气体实业有限公司)
9. 混合气罐 (重庆泰和气体实业有限公司)
10. VITEK 全自动微生物分析系统 (法国梅里埃公司)
11. 多点接种仪 MIT-P 型 (日本株式会社佐久间制所)

### 1.1.3 试剂、药物和质控菌株

1. 培养基：在实验室自行配制 6cm 改良 CDC 血琼脂平板、9cm 布氏肉汤药敏平板、用于保存菌种的庖肉基、用于生化鉴定的培养基。

2. 药物：红霉素，四环素，克林霉素，甲硝唑（由重庆医科大学附属第一医院传染病学寄生虫病研究所提供，其纯度见后表）。

3. 标准菌株：痤疮丙酸杆菌 NCTC737(由西安西京医院皮肤科馈赠)，迟缓优杆菌 (*E.lentum*) ATCC 43055 (由重庆医科大学临床微生物教研室提供)。

4. 其他：革兰染色液、3%过氧化氢、欧氏试剂（对二甲基氨基苯甲酸 1g，无水乙醇 95ml，浓盐酸 20ml）、硝酸盐试剂（甲液：磺胺酸 0.5g、冰醋酸 30ml、水 120ml 乙液：α-萘酚 1g、纯乙醇 200ml）、ANI 厌氧菌鉴定卡。

## 1.2 主要实验步骤与方法

### 1.2.1 试验准备

1. 玻璃制品的准备：将烧杯、锥形瓶、量筒、吸管、试管、漏斗、平皿泡酸后，烘干，根据需要置于铝盒中高压消毒，37℃烤箱烤干备用。

2. 其他器材的准备：精密 pH 试纸、麦氏比浊管（由梅里埃公司制造）、天平、高压蒸汽锅、滤纸、酒精灯、接种环、无菌针头、痤疮针、玻片。厌氧罐用酒精擦净后，用紫灯照射 30min。

### 1.2.2 培养基的制备

1. 调配成分：将各培养基处方按比例逐样准确称重，倒入大烧杯中，加定量蒸馏水，使其充分混合；

2. 溶解：将调配好的混合物在沸水浴中完全溶解；

3. 校正：用 NaOH 将 PH 调整致 7.2-7.4；

4. 滤过澄清：在溶化后趁热以双层纱布过滤；；

5. 灭菌：分装于容量为 500ml 的锥形瓶中，铝箔封口后，用高压灭菌，条件为 68.95Kpa，10-15min 左右；

6. 分装：将 CDC 培养基灭菌后，冷却至 50℃左右，加入 10%兔血，混匀后以无菌操作倾注于 6cm 的灭菌平皿内，厚度 3-4mm，待琼脂凝固后将平皿翻转。硝酸盐及蛋白胨培养基均分装于小试管中。布氏琼脂培养基在灭菌后，冷却至 50℃左右，以无菌操作倾注于 9cm 的灭菌平皿内，同时按比例加入相应量的抗生素，制备成药敏培养基。

7. 质量检验：无菌检验：将配置好的培养基置 35℃孵育 24h，无菌生长为合格。

8. 保存：制备好的琼脂培养基注明名称、制作日期，置于保鲜袋内存放于 4℃保存备用。

9. 以上培养基均在使用前 1-2 天制备。使用前均需要在厌氧环境中预还原 12-24 小时。

10. 庖肉基的制备：取 15×15mm 的试管，每管装 0.5g 牛肉渣，加入 CDC 液体培养基 10ml 左右，肉渣与液体的的高度比约 1：2。上盖 1cm 厚的融化凡士林，121℃高压灭菌 15min 后置于 4℃备用。

### 1.2.3 研究对象

按照 Pillsbury 分类标准<sup>[7]</sup>, 根据主要皮疹的类型、数目、发生部位对痤疮的严重程度进行评估和分级, 将痤疮分为 I 到 IV 度。选择 2006 年 4 月至 9 月重庆医科大学附属第一医院皮肤科门诊 II-IV 度痤疮患者 60 例(均符合痤疮有关诊断标准),

年龄: 13-33 岁,  $\leq 18$  岁的 36 人,  $> 18$  岁的 24 人。

性别: 男 39 例, 女 21 例。其中治疗组中男性 10 例。

### 1.2.4 脂酸标本采集和分离培养

1. 培养基的准备: 取装有 CDC 培养基的 6cm 培养皿在氮气中预还原 48 小时后备用。

2. 记录基本情况: 年龄、性别、痤疮皮损分级情况、抗生素的使用情况。

3. 在培养皿底部编号。

4. 取材和接种: 在痤疮患者皮损处严格消毒, 用无菌针头刺破皮肤, 消毒后的痤疮针挤压出痤疮内容物, 接种环经高温火焰烧灼, 冷却后取痤疮内容物, 尽量取较稀的分泌物, 脂栓硬结不取。采取分区划线分离法接种于 CDC 培养基, 立即放入厌氧罐中, 放入催化剂钯粒, 点燃蜡烛置于厌氧罐中。

5. 培养: 真空泵将罐中空气抽去 90% 左右, 随即冲入氮气, 如此反复充抽 3 次, 最后一次注入混合气(含 10% $H_2$ 、10% $CO_2$  和 80% $N_2$ ), 置于 35℃ 培育箱中培育 48 小时。

6. 在接种的同时将痤疮内容物涂片, 革兰氏染色后镜检。

7. 厌氧培养阳性者做耐氧试验, 厌氧生长而需氧不生长者为厌氧菌。

### 1.2.5 细菌鉴定

1. 菌落形态: 菌落较细小, 圆形, 灰白色, 不透明, 用接种环易挑起。

2. 镜下形态: 为革兰氏阳性杆菌, 直或微弯, 呈棒状, 染色不均, 有浓染部分。排列呈 X、Y、V 及栅状, 无荚膜, 无鞭毛。

3. 触酶试验:



原理：具有触酶（过氧化氢酶）的细菌，能催化过氧化氢，放出新生态氧，继而形成分子氧，出现气泡。

方法：用接种环挑取培养基上的菌落，置于洁净玻片上，然后滴加 3%过氧化氢一大滴。

结果判断：于半分钟内有大量气泡产生者为阳性。不产气泡者为阴性。

#### 4.硝酸盐试验：

原理：某些细菌能还原培养基中的硝酸盐，生成亚硝酸盐、氨和氮等。如培养基中有亚硝酸盐存在，与醋酸作用生成亚硝酸，亚硝酸与对氨基苯磺酸作用，成为重氮苯磺酸，后者与  $\alpha$ -萘胺结合为红色的 N- $\alpha$ -萘胺偶氮苯磺酸。

方法：将 *P.acnes* 接种硝酸盐培养基，在厌氧环境，35℃培养 48 小时，加入硝酸盐还原试剂（甲、乙液等量混合 0.1ml 观察培养结果）。

结果判断：红色为阳性，阴性不变色。

#### 5. 吲哚试验：

原理：有些细菌具有有色氨酸酶，能分解蛋白胨中的有色氨酸产生吲哚，与吲哚试剂形成红色化合物。

方法：将 *P.acnes* 接种于蛋白胨水培养基，置于厌氧环境中，35℃培养 24 小时。延管壁在培养物中加入吲哚试剂数滴。

结果判读：加入吲哚试剂后静置半分钟，使成两层，在培养物液面之上的层呈玫瑰红色的为吲哚试验阳性，不变色者为阴性。

6. 最后用 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定卡鉴定。VITEK 全自动微生物分析系统实全自动细菌鉴定和药敏分析系统。其菌种鉴定原理为：根据不同细菌理化性质不同，采用光电技术、电脑技术和数码鉴定相结合的原理。每张试卡内有 30 种干燥的生化反应及酶底物。系统将以各孔的反应值作为判断依据，组成数码于数据库中标准生物模型相比较，经矩阵分析得出鉴定结果。

7. 鉴定明确的 *P. acnes* 再经单一菌落转种纯培养后，转入疱肉基中，置于 4℃中保存。

## 1.2.6 稀释法药敏试验

1. 琼脂稀释法的原理：稀释法是体外定量测定抗菌药物抑制带测菌生长活性的方法，抗菌药物可在液体或固体培养基中稀释。将不同剂量的抗菌药物加入融化并冷至 50℃左右的定量琼脂中，制成含不同递减浓度药物的平板。接种待测菌，按需求 35℃孵育相应时间后。稀释法所测得的某抗菌药物抑制测试菌生长最低浓度为测试菌的 MIC。

### 2. 方法：

① 将冻存于疱肉基中的 *P. acnes* 置于 35℃复苏 24 小时后，用分区划线法接种于 CDC 血平板上，置于厌氧环境中，35℃孵育 48 小时后，挑取形态特征完全一致的至少 5 个典型菌落，转种于 CDC 肉汤培养基中，准备接种于含抗生素的培养基。

② 含抗生素培养基的制备：根据美国国家临床实验室标准委员会（NCCLS）推荐的各抗生素对痤疮丙酸杆菌的敏感、中敏、耐药的 MIC 界值设计抗生素的浓度。按照如下公式称取抗生素放入试管：

$$\text{重量 (mg)} = \frac{\text{重量 (mg)} \times \text{所需浓度 (}\mu\text{g/ml)}}{\text{标准品纯度 (\%)}}$$

表 1-1:配置抗菌剂的溶剂和稀释剂

Tab 1-1: solvent and diluent of antibiotics

抗生素	溶剂	稀释剂
红霉素 (Erythromycin)	95%乙醇	蒸馏水
克林霉素 (Clindamycin)	蒸馏水	蒸馏水
四环素 (tetracycline)	甲醇	PBS (PH6.5)
甲硝唑 (Arilin)	二甲基亚砷	蒸馏水

表 1-2 :抗菌药倍比稀释表:

Tab 1-2 : Antibiotics according to proportion dilution

抗生素	稀释范围( $\mu\text{g/mL}$ )	标准品纯度
红霉素 (Erythromycin)	0.125-256	88.4%
四环素 (tetracycline)	0.125-256	96.6%
克林霉素 (Clindamycin)	0.125-256	85.5%
甲硝唑 (Arilin)	0.125-256	91.5%

表 1-3:琼脂稀释法药敏试验中抗菌药稀释液的制备方案

Tab1-3: Antibiotics diluent preparation plan in agar dilution

抗微生物药稀释液						琼脂中稀释的 抗生素最终浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
步骤	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	来源	体 积 (mL)	+ 蒸馏水 (mL)	= 中间浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	
1	5120	贮存液	1	1	2560	256
2	2560	1 号液	1	1	1280	128
3	1280	2 号液	1	1	640	64
4	640	3 号液	1	1	320	32
5	320	4 号液	1	1	160	16
6	160	5 号液	1	1	80	8
7	80	6 号液	1	1	40	4
8	40	7 号液	1	1	20	2
9	20	8 号液	1	1	10	1
10	10	9 号液	1	1	5	0.5
11	5	10 号液	1	1	2.5	0.25
12	2.5	11 号液	1	1	1.25	0.125
13	1.25	10 号液	1	1	0.625	0.0625

根据各种抗生素的不同理化特性选用不同的溶液进行溶解,例如,红霉素用95%乙醇溶解,克林霉素用甲醇溶解等<sup>[8]</sup>,然后进行倍比稀释,具体见表 1-3。

将抗生素稀释液倒入培养皿,加入经高压灭菌并 50℃水浴平衡后的布氏琼培养基,同时快速晃动培养皿使抗生素和培养基充分混匀,厚度 3-4mm 左右,无菌间内自然晾干备接种。

③ 接种:

(1) 将接种棒及接种超净平台预先在紫灯下照射 6-8 小时,于接种前关闭紫灯,

将接种棒在 75%的酒精中浸泡 5min 后，酒精灯的火焰灼烧 1-2min，置于无菌处备用。

(2) 将点种仪上特殊的玻璃试管泡酸后，于 260℃烘干，置于铝盒中高压消毒，37℃烤箱烤干备用。

(3) 取已分纯、并在厌氧环境下，35℃中孵育 24 小时的细菌培养物，对照麦氏比浊管，用生理盐水稀释成  $1.5 \times 10^8$ CFU/ML 浓度的菌液。

(4) 将菌液注入玻璃试管(12×35mm)，液面不超过其 2/3 处，依次装入玻璃试管架。

(5) 将灭菌处理后的接种棒架用螺丝固定在挂臂上。短暂的开启、关闭电源开关，调整凸轮位置确认全部接种棒都能插入玻璃试管后，打开电源开关。

(6) 将接种皿安放在滑轨上的接种平台上，在接种棒取样后达到最高位置点时，滑动接种皿平台到接种位置进行接种。当接种棒再次达到最高位置点时，将接种平台返回原位并取下接种皿。

(7) 每种抗生素培养基均从低浓度开始，按上述方法依次接种细菌。

(8) 在接种开始和最后各接种一个生长对照培养基，培养基内为 10ml 布氏肉汤培养基，不含任何抗生素，用来了解接种过程中是否有污染，并可与第一个生长对照培养基比较接种菌液量是否减少。

(9) 每株接种物中取一些样品接种 CDC 培养基，可提供新鲜细菌，便于必要时重复实验。

(10) 做第二批菌株时，需换用已消毒的无菌试管，并将接种棒浸泡于 75%的酒精中 5min 左右，再用火焰灼烧。

④ 孵育：将接种好的培养基，在最短的时间内水平移动到厌氧罐中，并放入钯粒其间注意切勿将培养皿中刚接种好的菌液晃动，导致菌液混杂，实验结果不可靠。将厌氧罐放在 35℃恒温箱中培养 48 小时。

### 3. 药敏结果：

① 结果判断：把培养皿放在黑色不反光的表面上读数。完全抑制菌落生长的

最低药物浓度为该药对检测菌的 MIC，单一菌落生长可忽略不计。如果有细菌在较低浓度无菌生长而在较高浓度有菌生长，应检查接种物的纯度、抗生素浓度的标记顺序是否错误等，必要时重复。如果找到需氧菌可能污染或孔间交叉污染，则必需重新测试。

② 质量控制：试验开始时首先接种两个无抗微生物药的对照平板。其中一个平板标记“pre-O<sub>2</sub>”（检查需氧菌污染），另外一个平板标记“pre-Ana”（厌氧菌最初生长对照）。最后，再次接种两个平板，标记为“post-O<sub>2</sub>”和“post-Ana”，来证实最终病原菌生长力和纯度。每个平板均接种标准菌株 NCTC737、迟缓优杆菌 ATCC 43055。

## 2 结果

### 2.1 痤疮丙酸杆菌的培养结果

#### 2.1.1 痤疮患者中痤疮丙酸杆菌的培养结果

本试验收集临床痤疮病人的痤疮内容物 60 例，使用自制 CDC 血琼脂培养基，在厌氧环境中，成功分离培养了 33 株经鉴定明确的 *P. acnes*，培养率为 55%。经菌落形态、镜下形态、触酶试验、硝酸盐试验和吲哚试验鉴定明确为 *P. acnes*，后予 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定卡鉴定，均符合 *P. acnes*。

#### 2.1.2 不同性别的痤疮丙酸杆菌的培养结果

60 例患者中培养出 *P. acnes* 33 株，其中有 19 株来自男性患者，14 株来自女性患者。详见下表：

表 2-1: 不同性别 *P. acnes* 培养阳性情况

Tab2-1 : *P. acnes* 's cultivation to different sexuality

	<i>P. acnes</i> ( + )	<i>P. acnes</i> ( - )	合计
男性	19	20	39
女性	14	7	21
合计	33	27	60

$\chi^2=1.747$   $P=0.277 > 0.05$ ，两组间 *P. acnes* 培养阳性率比较无显著性差异。

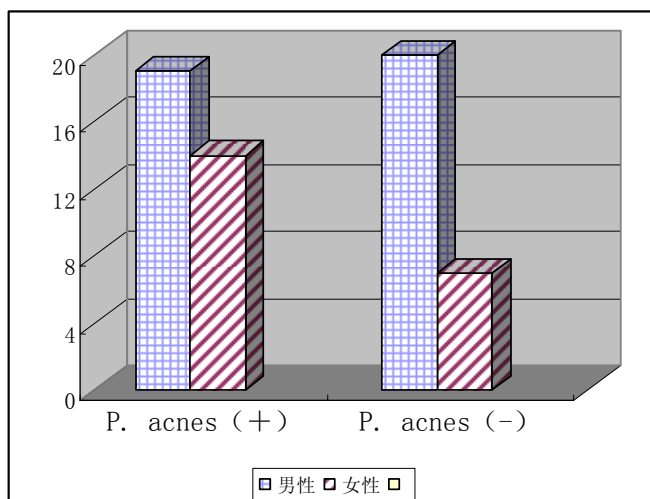


图 2：不同性别 P. acnes 培养阳性情况  
Fig 2：P. acnes `s cultivation to different sexuality

### 2.1.3 不同年龄的痤疮丙酸杆菌的培养结果

60 例患者中以 18 岁分为两个年龄段，培养出的 33 株 P. acnes 中有 20 株 P. acnes 阳性培养来自 18 岁以下的青少年，13 株来自 18 岁以上的成年人。详见下表：

表 2-2: 不同年龄的 P. acnes 培养阳性情况  
Tab2-2: P. acnes `s cultivation to different age

	P. acnes ( + )	P. acnes ( - )	合计
<18 岁	20	16	36
18 岁	13	11	24
合计	33	27	60

$\chi^2=0.011$   $P=1.000 > 0.05$ ，两组间 P. acnes 培养阳性率比较无显著性差异。

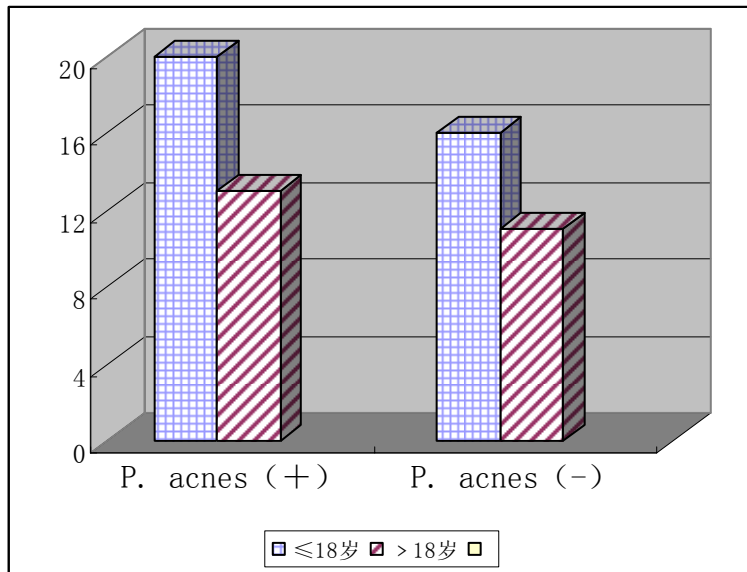


图 3: 不同年龄的 P. acnes 培养阳性情况

Fig3 : P. acnes `s cultivation to different age

## 2.2 药敏试验结果

本试验采取标准药敏实验方法——琼脂稀释法检测了 33 株 P. acnes 对 4 种常用于痤疮治疗的抗生素的敏感水平，以了解重庆地区近年来 P. acnes 耐药情况。4 种抗生素分别是红霉素、四环素、克林霉素、甲硝唑。各抗菌药敏性的判断标准详见表 2-3。（表 2-3 来自《厌氧菌的抗微生物药敏感试验方法》，此方法是在卫生部颁发的《全国临床检验操作规程》（第三版）的基础上，依据美国国家临床实验室标准化委员会（National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS）M11-A5 文件—厌氧菌的抗微生物药敏感试验方法（已批准的标准—第五版）[ISBN 1-56238-429-5]，结合中国国情及卫生系统的实际情况和要求制定。）

表 2-3: 痤疮丙酸杆菌对四种抗生素的敏感判断标准 (MIC  $\mu\text{g/ml}$ )

Tab2-3: the judgement standards of the four kind antibiotics about *Propionibacterium acnes*

抗微生物药	敏感 ( $\mu\text{g/ml}$ )	中介 ( $\mu\text{g/ml}$ )	耐药 ( $\mu\text{g/ml}$ )
红霉素	$\leq 0.5$	1-4	8
四环素	$\leq 4$	8	16
克林霉素	$\leq 2$	4	8
甲硝唑	$\leq 8$	16	32

### 2.2.1 四种抗生素对痤疮丙酸杆菌的 MIC 值

33株 *P. acnes* 对四种抗生素的 MIC 值见图7。根据药敏标准表2-3以及C. Oprica的<sup>[9]</sup>报道, 判断本研究中, 33株 *P. acnes* 中有19株对红霉素耐药, 13株对甲硝唑耐药, 5株对四环素耐药, 3株对克林霉素耐药, *P. acnes* 对红霉素的耐药率较高, 为57.6%, 且均表现为较高水平耐药, MIC 值在8 $\mu\text{g/ml}$ 以上。对甲硝唑的耐药率为39.4%。对克林霉素和四环素耐药率较低分别为9.1%和15.2%, 具体见表2-4。

表 2-4: 33 株痤疮丙酸杆菌对四种抗生素的敏感情况

Tab 2-4: the sensitive situation of *Propionibacterium acnes* to the four kind antibiotics

Antibiotic	Breakpoint ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			Resistant isolates(%)
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range	
红霉素	0.5	16	64	0.0625-128	57.6%
甲硝唑	8	4	64	0.25-128	39.4%
四环素	4	1	16	0.25-16	15.2%
克林霉素	2	0.5	1	0.0625-8	9.1%



质控菌株对四种抗生素均在敏感范围内，其 MIC 值见下表：

表 2-5: 质控菌株对四种抗生素的 MIC

Tab2-5: quality control strain's MIC to antibiotic

抗生素	P. acnes MIC ( $\mu$ g/mL)	E.lentum MIC ( $\mu$ g/mL)
红霉素	0.25	2
克林霉素	0.5	0.125
四环素	0.5	0.25
甲硝唑	2	2

在对红霉素和克林霉素的耐药菌中，对红霉素耐药同时也对克林霉素耐药的菌株有 2 株，占 6.1%。对红霉素耐药，但是对克林霉素敏感的占 51.5%。

### 3 讨论

痤疮的病因和发病因素很复杂，包括内分泌因素、毛囊及皮脂腺的导管角化异常、微生物的感染、免疫因素等<sup>[10]</sup>。其中微生物的感染是目前研究的热点。目前在痤疮的治疗常常应用抗生素。有研究证实，本病患者皮疹处 P. acnes 增多，用抗菌药物治疗后，痤疮丙酸杆菌数量减少，与临床症状的改善呈平行关系。

痤疮丙酸杆菌耐药性的出现已引起重视。由于各个国家和地区抗菌素的应用情况不同，使得 P. acnes 抗菌素耐药谱也存在着地方性差异。随时监测当地 P. acnes 耐药性的变化，给提供临床医生及时、可靠的药敏资料，用来指导临床用药，避免抗生素的滥用，从而减少耐药菌株的产生具有重要意义。目前，许多国家都对本地 P. acnes 的耐药情况进行了监测，而我国在这方面的资料尚缺乏，重庆地区目前还没有做有关于 P. acnes 的药敏研究。本实验收集了重庆地区 60 例痤疮患者的痤疮内容物，培养出 33 株经过三级鉴定明确的 P. acnes。对这 33 株 P. acnes 进行了 4 种抗生素的敏感水平检测，初步了解了本地区 P. acnes 的耐药情况，以期对临床医生在痤疮的治疗过程中抗生素的选择有所帮助。

### 3.1 痤疮的诊断和分级

#### 3.1.1 痤疮的诊断

痤疮是皮肤科的常见疾病，其诊断并不难，其诊断要点<sup>[1]</sup>包括:(1)好发年龄:多累及 15-30 岁青年男女。(2)好发部位:面颊、额部，其次是胸部、背部及肩部等皮脂溢出部位。(3)临床表现:皮损初起为与毛囊一致的圆锥型丘疹，早期皮脂淤积于皮脂腺开口处形成白头粉刺或黑头粉刺，病情逐渐加重时可出现结节、囊肿、脓肿、甚至瘢痕。(4)一般无自觉症状，炎症明显时可有疼痛。(5)病程慢性，时轻时重，多数至青春期后缓解，少数至中年期方愈，可遗留色素沉着、肥厚性或萎缩性瘢痕。

#### 3.1.2 痤疮的分级

临床上多采用 Pillsbury 分类标准<sup>[7]</sup>，根据主要皮疹的类型、数目、发生部位对痤疮的严重程度进行评估和分级，将痤疮分为 I-IV 度：

I 度(轻度)表现为散发至多发的黑头粉刺，散在分布的炎性丘疹；

II 度(中等度)表现为 I 度+炎症性皮损数目增多并出现浅在性脓疮，但局限于面部；

III 度(重度)表现为 II 度+深在性脓疱，分布于颜面、颈部和胸背部；

IV 度(重度-集簇性)表现为 III 度+结节、囊肿，伴瘢痕形成，发生于上半身；

#### 3.1.3 标本的选择

在本实验中严格按照上述诊断标准选择患者 60 例。I 度痤疮的患者痤疮内容物较少，且不易取到深在的标本，因此选取 II-IV 度痤疮患者的痤疮内容物作为标本培养。

### 3.2 痤疮丙酸杆菌检出情况

鉴于 *P. acnes* 的培养要求较高，且周期较长，一般不列为常规培养。分离培养 *P. acnes*，提高检出率的一个方面是在于标本的采集。由于人体表面存在着含厌氧菌的正常菌群，因而，采集标本的重要原则是避免被正常菌群所污染，故每次采集标本前 CDC 培养基置于厌氧环境中 12-24 小时预还原，在痤疮皮损处严格消毒。

痤疮内容物不能用注射器注入厌氧袋或是厌氧容器。如暴露在空气中转运至实验室，则不利于 *P. acnes* 的存活。因此采用取标本后立即分区划线接种于培养皿后，在厌氧罐中采取烛缸的方法（即：在密闭的环境中点燃蜡烛燃烧耗氧的方法），转运到实验室，即与抽气换气，因而减少了厌氧菌与氧气的接触。另外本研究中所用培养基均在用前 1-2 天内新鲜制备，使用前均予预还原。采取以上方式，从而提高了 *P. acnes* 的检出率（55%）。

痤疮脂栓标本中可能含有多种细菌，在刘蔚等<sup>[11]</sup>的报道中，67 例患者共检出 102 株菌，其中 *P. acnes* 33 株占 32.4%，其余还有颗粒丙酸杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、棒状杆菌、溶血葡萄球菌、孔氏葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、B 群链球菌，即 *P. acnes* 的检出率为 49.3%。本实验是针对 *P. acnes* 做的研究，故未做需氧和其他厌氧菌的培养。本研究中检出率稍高于上述报道，并且高于童明庆等报道的 32.72%<sup>[12]</sup>和李纯德等报道的 53.1%<sup>[13]</sup>，略低于国外的报道 56.7%<sup>[14]</sup>。

在本实验中用统计方法检验了性别和年龄与 *P. acnes* 的培养阳性率的关系，均无显著差异。这可能与样本量较小有关，可在以后的研究中进一步扩大样本量来研究其是否有相关性。

### 3.3 痤疮丙酸杆菌的鉴定

#### 3.3.1 三级鉴定

由于厌氧菌的分离鉴定，手续麻烦，花时间多，工作量大，对开展厌氧菌的研究是一个沉重的负担。同时花很长时间来鉴定厌氧菌的种属，对临床的抗菌药物治疗不能起指导作用。因此对厌氧菌应该鉴定到什么程度，是一个有争议的问题，国外不少实验室提出由初级到高级的所谓“三级鉴定”<sup>[15-17]</sup>。

一级鉴定：从标本来源估计，性状鉴定，标本的直接涂片、染色、镜检。初代培养菌落的观察，及其镜检结果。

二级鉴定：获得纯培养后，要观察菌落形态、溶血性、色素产生、菌落凹陷区琼脂内及经紫外灯照射有无荧光现象等。

1. 菌落的图片、染色、镜检：涂片染色结果互相对照，初步决定是何种厌氧菌，在进一步作生化反应。

2. 生化反应：在上述的基础上，可进行触酶试验、脲酶试验、多聚茴香磺酸钠的敏感试验、卵磷脂酶和聂格尔试验、脂酶试验、吲哚斑点试验、20%胆汁试验、乙醇芽孢试验和细菌动力试验等约 10 个试验，能在比较短的时间内鉴定厌氧菌。

三级鉴定：在一、二级鉴定的基础上，增加生化反应。

### 3.3.2 本研究中的鉴定方法

1. 标本来源于痤疮患者的痤疮内容物；
2. 培养的菌株在厌氧环境生长而需氧环境下不生长，可以判断其为厌氧菌；
3. 其染色为革兰氏阳性染色，镜检无芽孢，判断为革兰氏阳性无芽孢厌氧菌；
4. 触酶试验、吲哚试验、硝酸盐试验均符合 *P. acnes* 的特点
5. 最后用 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定。

厌氧菌的鉴定常常要借助于 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定卡才能确定，但是革兰氏阳性无芽孢厌氧杆菌，如果触酶和吲哚反映都是阳性，可以初步鉴定为 *P. acnes*<sup>[12][18]</sup>。本研究中经菌落形态、镜下形态、触酶试验、硝酸盐试验和吲哚试验鉴定明确为 *P. acnes* 的有 33 株，后予 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定卡鉴定 33 株菌株均符合 *P. acnes* 的标准。厌氧菌的分离培养和鉴定，难度较大，花时较多，减少了 VITEK 全自动微生物分析系统、ANI 厌氧菌鉴定卡鉴定，虽然可能存在较小的实验误差，但是能够节约实验费用和实验时间，有利于 *P. acnes* 的相关研究的开展。因此，在日后的研究中可根据菌体形态、染色性、镜下形态、触酶试验、吲哚反应和硝酸盐反应来鉴定。

### 3.4 厌氧菌的药物敏感试验方法

细菌对抗菌药物的敏感试验，是指在体外测定抗菌药物抑制细菌生长能力的试验（简称药敏试验）。药敏试验的主要目的为：为临床提供疗效最佳的抗菌药物；进行流行病学调查，以了解某些病原菌耐药性变化的动态。

厌氧菌药敏试验，主要有稀释法和扩散法两类。扩散法的抑菌圈直径与稀释法的 MIC 结果，除生长较快的厌氧菌基本符合外，一般均有相当的距离，故迄今厌氧菌的药敏试验方法尚未标准化。一般认为稀释法的结果比较可信，并且稀释

法比较精确，常被作为经典的方法用于对照性试验，个别菌株、厌氧菌以及某些特殊的抗菌药物，往往需要采用稀释法。稀释法又分为琼脂稀释法和肉汤稀释法。琼脂稀释法可同时做多株菌株的 MIC 的测定，结果的重复性优于肉汤稀释法，且易于发现污染或耐药突变菌。琼脂稀释法是 NCCLS 推荐用于检测厌氧菌药敏试验的方法，因此在本研究中选用琼脂稀释法作为药敏的研究方法。

### 3.5 药敏结果

本实验显示 *P. acnes* 在重庆地区对红霉素、四环素、克林霉素、甲硝唑均产生了不同的耐药率。其中红霉素的耐药率最高，达到 57.6%，高于 1998 年经 Leeds 的皮肤研究所报道的 53.4%<sup>[19]</sup>。对克林霉素和四环素的耐药率均较低。上述现象可能与红霉素属于广谱抗生素，对革兰氏阳性和阴性细菌均有作用，其中对革兰氏阳性菌作用相对较强。红霉素给药方便、副作用少、价格低，自二十世纪五十年代问世以来，被认为是最普及和最安全有效的抗生素之一，因而广泛的应用于痤疮的治疗有关。

红霉素与克林霉素对于由葡萄球菌和厌氧菌引起的皮肤和软组织感染有较好的疗效，并且口服吸收好，是门诊患者治疗的重要选项。同时，红霉素和克林霉素也是青霉素或头孢菌素过敏患者的选择性药物。然而，对大环内酯类抗生素耐药的菌株对克林霉素可能存在结构或诱导耐药性。对大环内酯类抗生素耐药机制之一在于核糖体靶位的改变（由 *erm* 基因介导），从而导致了大环内酯类抗生素及克林霉素的失活，称为大环内酯-林可霉素-链阳霉素 B (MLS<sub>B</sub>) 耐药。常规药敏试验中，红霉素耐药的克林霉素结构型耐药菌株能被正常检出，而诱导性耐药菌株可能被漏检，如此容易把诱导性耐药菌株与对红霉素耐药而真正对克林霉素敏感的菌株混淆<sup>[19][20]</sup>。因此，克林霉素的耐药率低并不能说明其对 *P. acnes* 的敏感性高。

尽管抗菌药种类不同，他们之间耐药率的上升可能会相互影响，但并不意味着某种抗菌药的使用与细菌对抗菌药的耐药率存在着直接的线性关系。例如，本实验中四环素的耐药率达 5.8%，而目前四环素因其副作用等原因在临床上已经很少应用。国外有研究表明，在长期接受四环素治疗的痤疮患者中，四环素对 *P. acnes* 的最低抑菌浓度 (MIC)，是那些未予抗生素治疗的痤疮患者或健康受试者的四到

五倍。在长期接受红霉素的患者中红霉素的平均 MIC 是其他患者或健康受试者的 100 倍以上<sup>[21]</sup>。Diane 等<sup>[22]</sup>研究发现,使用红霉素治疗和未用过红霉素的座疮患者, *P. acnes* 对红霉素的耐药率分别为 51%、 3%。国内外很多研究资料显示,长时间大剂量地使用抗生素可以导致细菌的耐药性增加。因此,长期用抗生素治疗可能是导致 *P. acnes* 的耐药性不断发展的重要原因<sup>[23-25]</sup>。

抗菌药的不合理使用,包括治疗时间过长、大量使用抗菌药,给药方式不合理等,在耐药菌的产生方面起着非常重要的作用。在我国,目前抗菌药的滥用问题应该引起足够重视。有资料显示我国 67%~80%的住院患者使用抗生素,加上近年来我国各地医疗费用上升很快,患者自行购买抗生素的人数不断扩大,加强对抗生素使用与耐药性关系的认识十分迫切。根据卢平,杨永弘作的 1991 至 1995 年畅销药调查<sup>[26]</sup>,前 15 位畅销药中抗菌药占 10 至 11 位。可见抗菌药物滥用非常严重。其后果不仅干扰了细菌学检查结果,使细菌培养阳性率大大降低,而且会使抗菌药的应用逐渐升级,使两者互为因果,导致耐药菌株增多。因此,减少抗菌药物的滥用,降低耐药菌株的产生与流行显得十分必要。

### 3.6 如何阻止 *P.acnes* 耐药性的扩展

本研究表明 *P. acnes* 的耐药性在重庆地区并不乐观,因此需要采取措施来延缓或阻止 *P. acnes* 的耐药性扩展。根据座疮丙酸杆菌产生耐药性的原因, G Perera 等<sup>[27]</sup>提出了以下建议: 1 不常规给予患者口服抗生素,应予患者局部使用抗生素或维 A 酸类药物无效后再给与系统性的抗生素治疗; 2 口服抗生素的时间不超过 4-6 个月,局部使用抗生素的时间不超过 3-4 个月。在上述治疗期限内,如果无明显疗效,那么延长治疗时间没有意义; 3 如果需要再次系统使用抗生素治疗时,最好选用以前使用过的疗效较好的抗生素以避免交叉耐药; 4 在系统治疗后予过氧化苯甲酰外用一周以清除表皮的耐药菌株; 5 不要频繁的换用抗生素; 6 避免同时口服和外用化学结构不同的抗生素; 7 根据抗生素的使用和耐药性,向患者强调用药的依从性和正确的给药方法。

另外 *P. acnes* 代谢产生大量内源性卟啉,吸收蓝色可见光(415 nm)后被激活为高能的不稳定卟啉. 与三态氧结合形成不稳定的单态氧. 单态氧与细胞膜上的化合物结合后损伤细胞膜<sup>[28,29]</sup>. 从而导致细菌死亡。因此使用蓝光治疗也是减少 *P. acnes* 产生耐药的方法之一。

## 结 论

1. 本研究采集了 60 例患者的痤疮内容物标本，分离培养出的菌株中经过三级鉴定明确为 *P.acnes* 的菌株有 33 例。

2. 本研究比较了一般的形态、镜下、生化方法鉴定的 *P.acnes* 和 VITEK 全自动微生物分析系统鉴定的 *P.acnes* 相符合。建议，在日后的研究中可根据菌体形态、染色性、菌落形态、触酶试验、吲哚反应和硝酸盐反应来鉴定 *P.acnes* 即可。虽然可能存在较小的实验误差，但是能够节约实验费用和实验时间，有利于 *P. acnes* 的相关研究的开展。

3. 本研究在各个环节均减少氧气与标本或菌株的接触，并且在厌氧罐中培养细菌，提高了 *P. acnes* 的检出率，达到 55%。

4. 用琼脂稀释法对 33 株 *P. acnes* 做药敏检测，得到 19 株对红霉素耐药，13 株对甲硝唑耐药，5 株对四环素耐药，3 株对克林霉素耐药。其耐药率分别为：57.6%、39.4%、15.2%、9.1%。

5. 本研究中比较了治疗组和未治疗组患者标本培养出的 *P. acnes* 的耐药率，有显著性差异，即治疗组患者的标本培养出 *P. acnes* 的耐药率高于未治疗组的。

6. 痤疮是皮肤科常见病，*P. acnes* 是导致痤疮产生的机制之一，*P. acnes* 耐药性的产生和抗生素的不合理应用相关，临床皮肤科应掌握病原菌流行趋势和耐药特征，对其耐药机制进行及时准确的检测，这对于控制耐药菌株的流行和蔓延，指导临床合理使用抗生素有着十分重要的意义。

## 参考文献

- [1] 赵辩主编.临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2001, 4: 935-938.
- [2] Webster GF. Inflammatory acne represents hypersensitivity to Propionibacterium acnes[J]. Dermatology, 1998, 196(1): 80-81.
- [3] 朱莲花,金哲虎.痤疮丙酸杆菌在痤疮发病中的作用[J].中国美容医学,2006,15(4):476-477.
- [4] LeydenSemin JJ .The evolving role of Propionibacterium acnes in acne[J]. Cutan Med Surg, 2001; 20(3): 139-43.
- [5] Eady EA, Jones CE, Gardner KJ et al. Tetracycline resistant propionibacteria from acne patients are cross-resistant to doxycycline but sensitive to minocycline.[J] . Br J Dermatol ,1993; 128: 556–60.
- [6] Ozolins M, Eady EA, Avery A. Comparison of five antimicrobial regimens for treatment of mild to moderate inflammatory facila acne vulgaris in the community: randomised controlled trial[J]. Lancet, 2004; 364: 2188–95.
- [7] 吴志华主编.皮肤性病学[M]. 广州:广东科技出版社, 2003;336-338.
- [8] 张颖悟,蓝鸿泰,郑家齐,等.临床微生物学[M]. 第一版.大连出版社出版,1990;649.
- [9] C Oprica,CE.Nord. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of Propionibacterium acnes[J]. Clin Microbiol In-fect 2005; 11: 204–213
- [10]A Koreck,A Pivarcsi, et al.The role of innate immunity in the pathogenesis of acne [J]. Dermatology,,2003,206:96-105.
- [11]刘蔚 ,蒋献,陈慧莉,等. 高强度窄谱蓝光对寻常痤疮表皮分离菌的抗菌作用研究 [J]. 中华皮肤科杂志,2005; 38 (11) : 683-684.
- [12]童明庆,施瑞华,戴传箴,等.寻常痤疮致病菌的分离及其药敏结果 [J]. 临床检验杂志,1996;14(6): 291-293.
- [13]李纯德 王菊珍 痤疮的细菌及抗体水平实验研究[J]. 中国医学检验杂志



2003;8(4):4.

- [14] Nishijima S, Kurokawa I. The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of propionibacterium acnes and staphylococcus epidermidis isolated from acne lesions[J]. Dermatol, 2000; 27(5): 318-323.
- [15] Sutter VL et al Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual[M]. 4th ed. Star Publishing Co. Belmont, Calif. U.S.A., 1985. 8, 21~70
- [16] Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology[M]. 7th ed. The C.V. Mosby Co. St. Louis, USA, 1986
- [17] Lennette EH et al Manual of clinical microbiology[M]. 4th ed. U.S.A. 1985
- [18] 洪秀华, 刘远德, 李向阳, 等. 临床微生物检验[M]. 第1版. 中国医药科技出版社. 2004; 367.
- [19] Siberry GK, Tekle T, Carroll K, et al. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus expressing inducible clindamycin resistance in vitro[J]. Clin Infect Dis, 2003, 37: 1257-1260.
- [20] Jorgensen JH, Crawford SA, McElmeel ML, et al. Detection of inducible clindamycin resistance of Staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing[J]. Clin Microbiol, 2004, 42(4): 1800—1802.
- [21] Eady EA, Gloor M, Leyden JJ. Propionibacterium acnes resistance: a worldwide problem[J]. Dermatology, 2003, 206(1): 54-56.
- [22] Tan HH. Antibacterial therapy for acne: a guide to selection and use of systemic agents[J]. Am J Clin Dermatol, 2003, 4(5): 307-314.
- [23] Espersen F. Resistance to antibiotics used in dermatological practice[J]. Br J Dermatol, 1998, 139: 4-8.
- [24] 卢平, 杨永弘, 许淑珍, 等. 北京儿童医院 1991-1995 年畅销药比较分析. 中国药房 [J]. 1996; 7: 170-171.
- [25] Leyden JJ, McGinley KJ, Cavalieri S, Webster GF, Mills OH, Kligman AM. Propionibacterium acnes resistance to antibiotics in acne patients [J]. Am Acad Dermatol. 1983; 8: 41-45.

- [26] Diane S, Berson MD, Daniel K .Current concepts in the treatment of acne:report from a clinical roundtable[J] .Cutis,2003,72:6-12
- [27] A. M. Layton.A review on the treatment of acne vulgaris.International[J] Journal of Clinical Practice .2006, 60:64-72.
- [28] P Papageorgiou, A Katsambas, A Chu. Phototherapy with blue(415 nm)and red (660 nm)light in the treatment of acne vulgaris[J]. Br J Dermatol, 2000, 142: 973-978.
- [29] KJ McGinley, GF Webster, JJ Leyden.Facial follicular porphyrin Fluorescence: correlation with age and density of Propionibacterium acnes[J]. Br J Dermatol, 1980, 102: 437—441.

## 论文附图

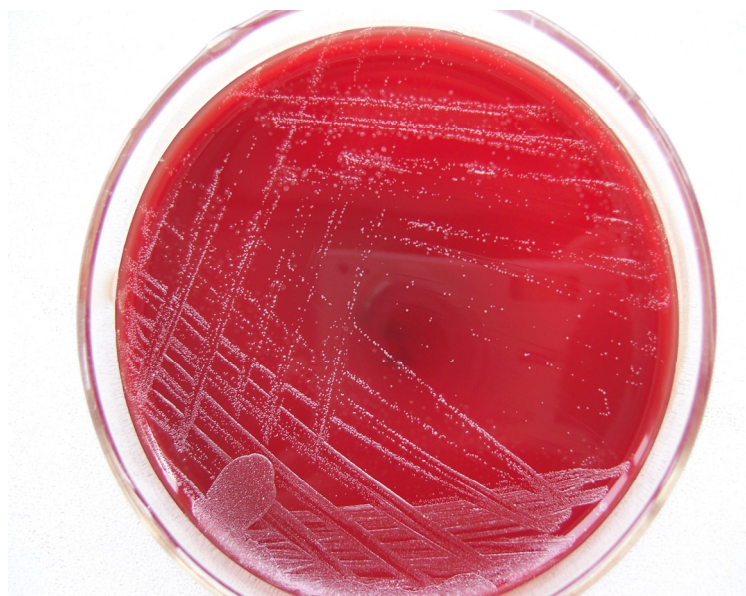


图 4: 痤疮丙酸杆菌的菌落

Fig4: the colony of *Propionibacterium acnes*

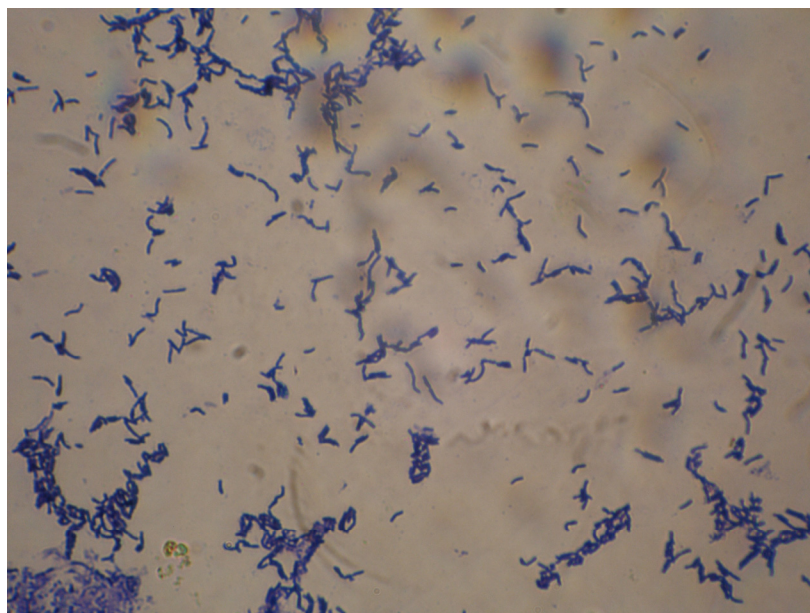


图 5: 标准菌株在镜下的形态 ( × 1000 )

Fig5: the image of standard strain in microscope ( × 1000 )

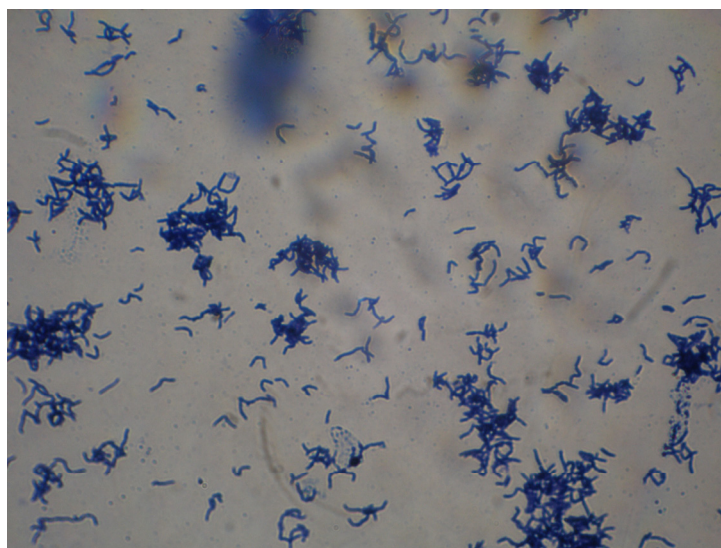


图 6: P30 在镜下的形态

Fig6: the image of P30 in microscope

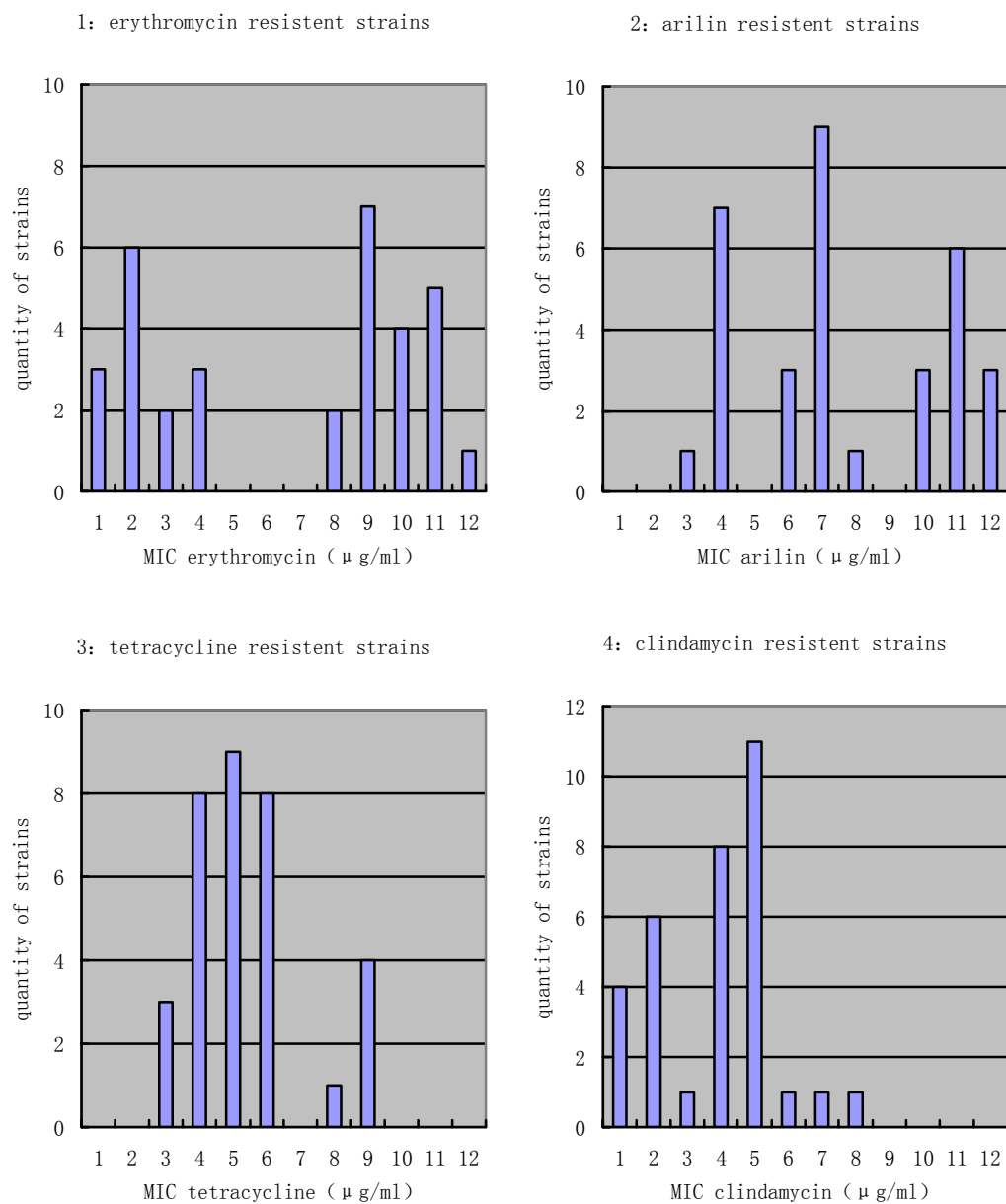


图 7: 四种抗生素对 33 株 *P. acnes* 的 MIC 值

Fig 7: the MIC of four antimicrobial agents against 33 isolates of *P. acnes*  
 (1:0.0625μg/ml 2:0.125μg/ml 3:0.25μg/ml 4:0.5μg/ml 5:1μg/ml 6:2μg/ml  
 7:4μg/ml 8:8μg/ml 9:16μg/ml 10:32μg/ml 11:64μg/ml 12:128μg/ml)

## 文献综述

### 痤疮的抗生素治疗及耐药现状

**[摘要]:** 痤疮丙酸杆菌在痤疮发生中起重要作用。抗生素因为能够抑制痤疮丙酸杆菌的生长并减少其炎性介质的释放,而成为治疗痤疮的药物之一。局部或系统使用抗生素治疗痤疮的炎症性损害,取得了很好的疗效。然而,近年来有关痤疮丙酸杆菌耐药导致痤疮治疗失败的报道逐年增多。本文概述了目前抗生素治疗痤疮的现状,痤疮丙酸杆菌的耐药现状及其发生机制,以及如何能够尽可能减少或避免耐药菌的产生,从而提高药物疗效。

**[关键词]:** 痤疮, 痤疮丙酸杆菌, 抗生素, 耐药性。

痤疮是一种毛囊皮脂腺的慢性炎症性疾病。痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*) 是一种革兰染色阳性的短杆菌,是一种细胞内寄生菌,属于皮肤的正常菌群,一般寄居在皮肤的毛囊及皮脂腺中。随着青少年的发育成熟,毛囊口出现角栓,皮脂腺分泌功能也明显增加,因皮脂含有较多脂肪酸等成分,适合 *P. acnes* 的生长繁殖,从而成为痤疮最主要的病因之一。因此近年来系统或局部应用广谱抗生素治疗痤疮,取得了一定显著的疗效。但是随着抗生素的广泛应用, *P. acnes* 耐药现象明显增多,而且存在交叉耐药,降低了药物的疗效。本文就痤疮的抗生素治疗及耐药现状做一综述。

#### 一、系统应用抗生素

对于严重的、局部使用抗生素疗效不佳以及病变面积较大的痤疮最好的治疗是给予口服抗生素。口服抗生素在治疗痤疮中有两个重要作用:第一,也是最明显的就是抑制痤疮丙酸杆菌的生长,从而减少炎性介质的释放;第二,可以减轻炎症反应。四环素类药物和红霉素类药物能减少趋化因子以降低中性粒细胞的趋化作用<sup>[1]</sup>。Kurokawa et al.曾用以下几种常用的抗生素:氨苄青霉素、克林霉素、红霉素、四环素、多西环素、氧氟沙星、米诺环素、头孢氨苄、庆大霉素检测 50 株 *P. acnes* 的敏感性。结果显示,对红霉素和克林霉素的敏感性最高,接下来依次是米诺环素、头孢氨苄、多西环素、氧氟沙星、四环素<sup>[2]</sup>。并且米诺环素的潜在不良反应较四环素类严重,近来的用药原则是当患者已经使用过第二代环化素,那

么四环素类的药物应为首选<sup>[3]</sup>。

虽然口服抗生素在很多痤疮病人的治疗中都取得了很好的疗效，但是抗生素弱的渗透性和其副作用限制了它的应用。在活体外通过试验对 *P. acnes* 非常敏感的抗生素，不表示其在系统性用药时会有很好的疗效。很多抗生素难以渗透至 *P. acnes* 聚居的微环境，因其包含有高浓缩的脂质，因此亲水的药物难以渗透，亲脂的药物更容易渗透此微环境，并在治疗痤疮患者时取得细菌学以及临床的疗效<sup>[4]</sup>。青霉素，头孢类药物因为几乎不能渗透此微环境，很少用于痤疮的治疗<sup>[1]</sup>。在口服给药时，亲脂类的抗生素比如米诺环素、四环素、多西环素更能有效的减少 *P. acnes* 的数量<sup>[5]</sup>。

口服给予抗生素常有副作用。红霉素类的药物常引起胃肠道反应，四环素类的药物常导致骨和牙齿的色素沉着，因此不能用于未成年人<sup>[1]</sup>。米诺环素常导致过敏性荨麻疹，眩晕症状，皮肤的色素沉着。多西环素可能引起光敏反应<sup>[6]</sup>。并且口服抗生素和其他药物常有相互作用，比如其可以和口服避孕药相互作用，降低后者的血浆浓度。这已经引起一定的关注。因为那些年轻妇女常患有痤疮，也在用口服抗生素治疗<sup>[1]</sup>。虽然口服抗生素治疗偶尔会引起口服避孕药的失败，但是目前还没有有力的临床药物代谢动力学能证明，抗生素能改变口服避孕药的血药浓度<sup>[7]</sup>。并且，Helm 等曾经明确证明抗生素的治疗对于妊娠率没有显著的影响<sup>[8]</sup>。

## 二、抗生素的局部使用

局部给予抗生素治疗痤疮具有显著的疗效。可供选择用于局部治疗的药物有：红霉素、克林霉素、甲硝唑、任二酸、过氧化苯甲酰、和过氧化苯甲酰与红霉素或克林霉素的联合制剂<sup>[6][9]</sup>。局部予抗生素不仅减少痤疮丙酸杆菌的数量，并且通过减少炎性介质和白细胞的趋化作用而减轻炎症反应。经 144 例临床试验分析后证实局部用克林霉素或红霉素治疗和过氧化苯甲酸的疗效相当。而局部用四环素的疗效是最差的<sup>[10]</sup>。

过氧化苯甲酰与红霉素或克林霉素的联合制剂在减少 *P. acnes* 的数量上有显著疗效。临床试验结果显示在治疗痤疮时，上述两种药物联合应用疗效明显优于单独使用其中任何一种药物。一项包括 1250 个中到重度寻常痤疮患者的临床研究显示：5%的过氧化苯甲酰和 1%的克林霉素的联合制剂在减少炎症性或非炎症性痤疮以及抑制 *P. acnes* 的增殖的疗效上明显优于单独应用其中一种<sup>[7]</sup>。

### 三、P. acnes 的耐药现状

用抗生素治疗痤疮已有三十多年的历史。在过去的十年中，P. acnes 对抗生素的敏感性在逐渐降低，有关于 P. acnes 临床耐药性的报道也逐渐增多<sup>[11]</sup>。70 年代末，在美国检测并报道了第一例痤疮丙酸杆菌的耐药菌株开始后，欧洲、澳大利亚、日本等也先后报道了痤疮丙酸杆菌出现耐药菌株。到 1998 年，经 Leeds 的皮肤研究中心鉴定，痤疮丙酸杆菌的耐药率对于红霉素达 53.4%，对于克林霉素达 46%，对于土霉素达 23.3%<sup>[12]</sup>。最近，经 NHS 的研究，证实用四环素和米诺环素治疗对四环素耐药的 P. acnes，其疗效明显降低<sup>[13]</sup>。

很多年以来，认为长期用抗生素治疗是导致 P. acnes 的耐药性不断发展的重要原因。在 33 例长期接受四环素治疗的痤疮患者中，四环素对痤疮丙酸杆菌的最低抑菌浓度（MIC），是那些未予抗生素治疗的痤疮患者或健康受试者的四到五倍。在长期接受红霉素的患者中红霉素的平均 MIC 是其他患者或健康受试者的 100 倍以上<sup>[14]</sup>。

### 四、P. acnes 的耐药机理

Burkhart GN<sup>[15]</sup> 根据 PA 的生物膜模型可解释为何用抗生素治疗痤疮的疗程较长而对一般细菌感染的疗程可以较短。PA 在生物膜中可耐受更高浓度的抗生素，是由于这些抗菌药物穿透到生物膜多糖体中的速度较慢，而且这种生物膜中的微生物其生长速度也变慢。此外，在生物膜中的其基因型表达也与游离状态的菌体有所不同。在生物膜基质中的 PA 可合理组合并能更好地利用营养，发生许多不同的微细异样改变形成很多微环境<sup>[2]</sup>。Mah TF<sup>[16]</sup>等发现在生物膜为环境中的菌株耐药性是独立菌株耐药性的 50-500 倍。

Ross 等<sup>[17]</sup>对 38 株耐四环素的菌株进行基因的序列分析后发现，其中有 34 株菌株在 16SrRNA 的 1058 位发生碱基置换 G-C。Roberts<sup>[18]</sup>发现两组编码四环素耐药性的基因，其中四环素 K 和 L 基因编码主动转运蛋白，通过主动转运将药物转运出菌体，不引起米诺环素的耐药性，而四环素 M 和 O 基因编码核糖体保护蛋白，可同时诱导对米诺环素的耐药性，说明痤疮丙酸杆菌具有对四环素和米诺环素产生交叉耐药的机制。

Westh 等<sup>[19]</sup>发现痤疮丙酸杆菌对红霉素的耐药性取决于红霉素 ermA、ermB 和 ermC 的基因存在，erm 基因表达细菌 23SrRNA 基因甲基化酶，使大环内酯类抗



菌药物与核糖体亲和力下降而导致耐药。Eady, E. A.<sup>[20]</sup>等从 1982 年至 1988 年期间经抗生素治疗的 89 个病人中分离得到的 77 株对红霉素耐药的菌株,进行了 8 种抗生素交叉耐药的模式,耐药性痤疮丙酸杆菌可分为以下四类: I 类,对多种抗生素耐药(48 株); II 类,可诱导至对多种抗生素耐药(2 株); III 类对红霉素低度耐药,对 16 环的大环内酯类较敏感(15 株); IV 类,对 14 环和 16 环的大环内酯类抗生素均高度耐药,对林肯(酰)胺低度耐药。大环内酯类、林可酰胺类抗生素等交叉耐药和 I 类耐药菌 2058 位发生碱基置换 A-G 有关,这些菌株对红霉素的 MIC>512mg/ml;第 2059 位发生的碱基置换 A-G,这个基因突变和 IV 类耐药菌对所有的大环内酯类抗生素高度耐药相关;其它被证实的突变还有 2057 位发生的碱基置换 G-A,和耐红霉素的 III 类耐药菌有关。这些耐药基因和曾经用 MIC 的测定分四类中的三类相符<sup>[21]</sup>。Ross 等<sup>[17]</sup>对其他国家痤疮患者中痤疮丙酸杆菌耐药机制的研究也获得上述一致的结果。这些结果表明,痤疮患者皮肤痤疮丙酸杆菌可能自发耐药,其发生率取决于皮肤表面敏感菌的密度、突变率、抗生素使用疗程和用药依从性等。

## 五、应对措施

痤疮皮损表现呈多形性,而且多种皮损可能同时存在,所以在选择治疗药物时应该以下因素:主要的发病原因、皮损类型、病情轻重以及疾病对患者心理状态的影响<sup>[22]</sup>。

根据痤疮丙酸杆菌产生耐药性的原因,G Perera 等<sup>[23]</sup>提出了以下建议:1 不常规给予患者口服抗生素,应予患者局部使用抗生素或维 A 酸类药物无效后再给与系统性的抗生素治疗;2 口服抗生素的时间不超过 4-6 个月,局部使用抗生素的时间不超过 3-4 个月。在上述治疗期限内,如果无明显疗效,那么延长治疗时间没有意义;3 如果需要再次系统使用抗生素治疗时,最好选用以前使用过的疗效较好的抗生素以避免交叉耐药;4 在系统治疗后予过氧化苯甲酰外用一周以清除皮肤的耐药菌株;5 不要频繁的换用抗生素;6 避免同时口服和外用化学结构不同的抗生素;7 根据抗生素的使用和耐药性,向患者强调用药的依从性和正确的给药方法。

综上所述,关于痤疮的治疗发展应尽量降低 *P. acnes* 耐药性,发掘新的治疗方案,因 *P. acnes* 的耐药性与生物膜的形成有一定关系,提示可开发阻碍 *P. acnes* 合

成细胞外基质的药物，影响生物膜的特殊组分的药物，能较好的穿透细胞外基质的药物来治疗痤疮。

### 参考文献

- [1] Sykes NL, Webster GF. Acne. A review of optimum treatment. *Drugs* 1994; 48: 59–70.
- [2] Kurokawa I, Nishijima S, Kawabata S. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne vulgaris. *Eur J Dermatol* 1999; 9: 25–28.
- [3] Dreno B, Bettoli V, Ochsendorf F et al. European recommendations on the use of oral antibiotics for acne. *Eur J Dermatol* 2004; 14: 391–9.
- [4] Leyden JJ, Kaidbey K, Gans EH. The antimicrobial effect in vivo of minocycline, doxycycline & tetracycline. *J Dermatol Treat* 1996; 7: 223–225.
- [5] Grosshans E, Belaich S, Meynadier J, Alirezai M, Thomas L. A comparison of the efficacy and safety of lymecycline and minocycline in patients with moderately severe acne vulgaris. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 161–168.
- [6] Leyden JJ. Topical treatment for acne vulgaris. *N Engl J Med* 1997; 336: 1156–1162.
- [7] Back DJ, Orme ML. Pharmacokinetic drug interactions with oral contraceptives. *Clin Pharmacokinet* 1990; 18: 472–484.
- [8] Helms SE, Bredle DL, Zajic J, Jarjoura D, Brodell RT, Krishnarao I. Oral contraceptive failure rates and oral antibiotics. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 705–710.
- [9] Ellis CN, Leyden J, Katz HI, et al. Therapeutic studies with a new combination benzoyl peroxide/clindamycin topical gel in acne vulgaris. *Cutis* 2001; 67(Suppl. 2): 13–20.
- [10] Eady EA, Hope JH, Jones DN et al. Topical antibiotics for the treatment of acne: a critical evaluation of the literature on their clinical benefit and comparative efficacy. *J Dermatol Treat* 1990; 1: 215–26.
- [11] JJ Leyden Semin The evolving role of *Propionibacterium acnes* in acne. *Cutan Med Surg*, 2001; 20(3): 139-43.
- [12] Eady EA, Jones CE, Gardner KJ et al. Tetracycline resistant propionibacteria from acne patients are cross-resistant to doxycycline but sensitive to minocycline. *Br J Dermatol* 1993; 128: 556–60.
- [13] Ozolins M, Eady EA, Avery A. Comparison of five antimicrobial regimens for

treatment of mild to moderate inflammatory facia acne vulgaris in the community: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 2188–95.

[14] Leyden JJ, McGinley KJ, Cavalieri S, Webster GF, Mills OH, Kligman AM. Propionibacterium acnes resistance to antibiotics in acne patients. *J Am Acad Dermatol*. 1983;8: 41–45.

[15] Burkhart CN, Burkhart CG, Gupta AK. Dermatophytoma: recalcitrance to treatment due to existence of fungal biofilm. *J Am Acad Dermatol* 2002;47: 629 – 31.

[16] Mah TF, O Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2002;47:629-31.

[17] 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. *Br J Dermatol*, 2001, 144:339-346.

[18] Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*, 1996, 19:1-24.

[19] Westh H, Hougaard DM, Vuust J, et al. Prevalence of erm gene classes in erythromycin resistant Staphylococcus aureus strains isolated between 1959 and 1988. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(2):369-373.

[20] Eady EA, Ross JI, Cove JH, Holland KT et al. Cunliffe. Macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS) resistance in cutaneous propionibacteria: definition of phenotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 1989;23:493–502.

[21] Ross JI, Eady EA, Cove JH, et al. Resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria is associated with mutations in 23S rRNA. *Dermatology*, 1998, 196:69-70.

[22] Goulden V. Guidelines for the management of acne vulgaris in adolescents. *Paediatr Drugs*, 2003, 5:301-313.

[23] A. M. Layton. A review on the treatment of acne vulgaris. *International Journal of Clinical Practice* .2006 ,60:64-72.

## 致 谢

值此论文完成之际，首先衷心感谢我的两位导师李惠老师和周维康老师。三年来，导师对我的学习、工作和研究等给予精心指导和谆谆教诲，让我在许多方面都取得了长足的进步，使我受益匪浅，终生难忘！本课题从设计、实施到最后的论文审校都是在导师们悉心指导下完成的，无不包含老师们的心血。导师们渊博的知识、孜孜不倦的敬业精神、严谨求实的治学态度、广博灵活的科研思路是我学习的动力和今后努力的方向。在此，向我的导师们致以崇高的敬意！

非常感谢重庆医科大学附属第一医院皮肤科李桂明教授、张法听教授、陈家秀教授、何晓琴教授、陈爱军老师、单葵老师及各位师兄、师姐、师弟、师妹们在标本收集、实验操作等给予我的帮助。

再一次感谢重庆医科大学附属第一医院皮肤科的各位老师，你们高尚的医德医风和严谨的科学态度让我终生受益。

感谢重庆医科大学微生物教研室刘明方老师、陈淑惠老师在实验过程中给予的鼎力相助。

感谢重庆市第四人民医院检验科的马珍老师在菌种鉴定中给予的无私帮助。

感谢我的家人！

## 研究生在读期间发表文章情况

### 发表文章:

刘丽华, 周维康, 李惠. 痤疮的抗生素治疗及耐药现状[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(1):50-52.