

# 痤疮患者痤疮丙酸杆菌对克林霉素和甲硝唑的敏感性分析

唐慧菁, 孙菲, 邓向军, 张霞, 朱和玲, 阮建波

**[摘要]** 目的 了解本地区痤疮患者痤疮丙酸杆菌对克林霉素(CLI, Clindamycin)和甲硝唑(MNZ, Metronidazole)的耐药情况。方法 体外分离、培养痤疮丙酸杆菌,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术进行鉴定,并按照琼脂稀释法进行药敏实验。结果 212例痤疮患者中分离出156株痤疮丙酸杆菌,对CLI和MNZ的耐药率分别为:28.21%(44/156)和100%(156/156),CLI和MNZ能抑制90%受试菌所需的最低抑菌浓度(MIC<sub>90</sub>)为:MIC<sub>90</sub>CLI ≥ 256, MIC<sub>90</sub>MNZ ≥ 256。结论 本地区痤疮患者痤疮丙酸杆菌对MNZ 100%耐药、CLI 28.21%耐药,且均为高度耐药。

**[关键词]** 痤疮丙酸杆菌; 克林霉素; 甲硝唑; 药物敏感性试验

[中图分类号] R 758.73<sup>+</sup>3 [文献标识码] A [文章编号] 1001-7089(2018)01-0026-03

[DOI] 10.13735/j. ejdv. 1001-7089. 201706093

## Susceptibility Analysis of *Propionibacterium acnes* to Clindamycin and Metronidazole in Acne Patients

TANG Huijing, SUN Fei, DENG Xiangjun, ZHANG Xia, ZHU Heling, RUAN Jianbo

(Jinan University Medical School Affiliated Hospital of Dongguan, Dongguan 523905, China)

**[Corresponding author]** RUAN Jianbo, Email: tpry-yijiaoke@163.com

**[Abstract]** **Objective** To acquaint the regional drug resistant situation of clindamycin (CLI) and metronidazole (MNZ) in acne vulgaris patients. **Methods** First in vitro to isolate and culture the *Propionibacterium acnes*, and then to evaluate them with the method of matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), last agar dilution method was used to conduct the drug resistance test. **Results** Among the 212 acne cases, 156 strains of *P. acnes* were isolated. The resistance rates of clindamycin and metronidazole were: 28.21% (44/156) and 100% (156/156) respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) required for clindamycin and metronidazole to inhibit 90% of the tested bacteria in this batch was: MIC<sub>90</sub>MNZ ≥ 256 and MIC<sub>90</sub>CLI ≥ 256 respectively. **Conclusion** Acne patients in this region were 100% resistant to metronidazole and 28.21% resistant to clindamycin. Both antibiotics showed high degree of drug resistance.

**[Key words]** *Propionibacterium acnes*; Metronidazole; Clindamycin; Drug sensitivity test

[基金项目] 东莞市社会科技发展项目(2013108101042)

[作者单位] 暨南大学医学院附属东莞医院, 广东 东莞 523905

[通讯作者] 阮建波, E-mail: tpry-yijiaoke@163.com

[网络出版时间] 2017-12-14 12:53 [网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1197.R.20171214.12:53.009.html>

痤疮丙酸杆菌 (*propionibacterium acnes*, *P. acnes*) 是一种寄生于人和动物体内,构成人体的正常菌群的革兰氏阳性厌氧菌<sup>[1]</sup>,在毛囊皮脂腺中的增殖被认为是引起痤疮炎症反应的重要原因<sup>[2]</sup>,针对痤疮丙酸杆菌使用抗生素是主要的治疗方法之一。1979 年美国首次报道痤疮丙酸杆菌耐药株以来,世界各地陆续报道耐药情况<sup>[3-5]</sup>。克林霉素 (CLI) 和甲硝唑 (MNZ) 是临床常用的抗生素药物,为此,本课题收集 2015 年 6 月 - 2016 年 10 月暨南大学东莞附属医院皮肤科门诊痤疮患者进行痤疮丙酸杆菌分离和培养,并对 CLI 和 MNZ 进行药敏分析,结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 共收集 212 例痤疮患者,其中男 122 例,女 90 例;年龄 11 ~ 45 岁,平均 (21.2 ± 5.65) 岁。根据 pillsbury 分类法进行临床分度,Ⅰ度 22 例,Ⅱ度 83 例,Ⅲ度 81 例,Ⅳ度 26 例。入选标准:年龄在 10 ~ 50 岁之间;参照《中国临床皮肤病学》符合“寻常痤疮”诊断,颜面部有粉刺、丘疹、脓疱、结节、囊肿等皮损;参加受试前 1 个月未使用 (包括口服和外用) 任何抗菌药物治疗“痤疮”或其他疾病。排除标准:年龄 < 10 岁或 > 50 岁;参加受试前 1 个月内使用过 (包括口服和外用) 抗菌药物治疗“痤疮”或其他疾病;因其他原因 (如艾滋病、精神病、结核病及依从性差等) 不适合参与本研究。

## 1.2 方法

**1.2.1 采集样本** 患者用清水和洗面奶清洁面部后,75% 酒精对取材处皮损消毒 3 次,再用高压灭菌粉刺挑取器尖端刺破丘疹或脓疱表面,环端挤压出丘疹或脓疱内容物。挑取出内容物,迅速接种至厌氧血琼脂平板 (购于江门市凯林贸易有限公司)。

**1.2.2 痤疮丙酸杆菌的分离与培养** 将接种患者痤疮内容物的平板,迅速装入厌氧培养罐,使用多功能微生物培养系统 (广州市尤德生物科技有限公司) 置换气体成为厌氧环境,36℃ CO<sub>2</sub> 温箱培养 48h。培养 48h 后,用无菌接种环挑取单独菌落进行革兰氏染色及显微镜检查,镜下可见 G<sup>+</sup>,一端钝圆、一端尖细,呈“人”字型或“V”字型杆菌。挑取单独菌落在新的平板划四区纯化,重复上述步骤再次培养 48h。

**1.2.3 痤疮丙酸杆菌的鉴定** 挑取单独菌落,使用法国梅里埃公司 MALDI-TOF-MS 质谱仪,选择 VITEK MS Plus 质谱检测系统进行鉴定,步骤参考文献<sup>[6]</sup>。

**1.2.4 体外药敏试验** 采用琼脂稀释法分别制备 CLI 和 MNZ 0.062 5 ~ 256g/mL 药物浓度梯度平板,并与空白平板和需氧平板做对照。制备菌悬液:15min 内,从厌氧血琼脂平板上挑选 48h 孵育产生的单独菌落,用 0.9% 生理盐水稀释,调整浊度等于 0.5 麦氏浊度标准 (相当于 10<sup>5</sup> CFU/点)。使用多点加液仪将所有 *P. acnes* 菌悬液接种到厌氧血琼脂表面,最后将平板放入厌氧环境 36℃ 恒温孵育 48h。测定菌株对 CLI 和 MNZ 的最低抑菌浓度值 (MIC)。

**1.2.5 判读标准** 根据 CLSI 琼脂稀释试验标准,在质控菌株 MIC 值质控允许范围之内进行判读。抗菌药物解释标准和相对应 MIC 值 (μg/mL) 见表 1。CLI 及 MNZ 的解释标准均参照 CLSI。

表 1 解释标准和相对应 MIC 值 (MIC μg/mL)

Tab. 1 Explain the standard and the corresponding MIC value (MIC μg/mL)

抗生素	敏感	中介	耐药
CLI	≤2	4	≥8
MNZ	≤8	16	≥32

## 2 结果

**2.1 细菌分离培养鉴定结果** 212 例患者中,分离培养获得临床株 228 株,经质谱仪鉴定:156 株痤疮丙酸杆菌、40 株表皮葡萄球菌、10 株颗粒丙酸杆菌、5 株贪婪丙酸杆菌、4 株头状葡萄球菌、2 株金黄色葡萄球菌、2 株产气肠杆菌、2 株结核硬膜杆菌、1 株嗜冻菌、1 株肺炎克雷伯菌、1 株蜡样芽孢杆菌、1 株产气芽孢杆菌、1 株人型葡萄球菌、1 株毗邻颗粒杆菌和 1 株口腔链球菌。

**2.2 药敏试验结果** 见表 2。156 株 *P. acnes* 对 MNZ 的 MIC 值均 ≥ 256 μg/mL (耐药 MIC ≥ 32 μg/mL), 全部耐药, MIC<sub>90</sub> ≥ 256 μg/mL, 高度耐药; 156 株 *P. acnes* 中, 44 株 (占 28.21%) 对 CLI 耐药 (耐药 MIC ≥ 8 μg/mL), MIC<sub>90</sub> ≥ 256 μg/mL, 其中 37 株 MIC ≥ 256 μg/mL, 高度耐药。

## 3 讨论

据统计, 60% 的痤疮患者使用了抗生素<sup>[7]</sup>, 随着抗生素的大量、长期滥用, *P. acnes* 的耐药已经引起重视。2014 年《中国痤疮治疗指南》建议, 治疗痤疮首选四环素类抗生素, 次选大环内酯-林可酰胺-链阳霉素 B 类抗生素, 但近年来大环内酯和林可酰胺类抗生素的滥用, 痤疮患者耐药严重。

2014 年 Ioanna 等<sup>[3]</sup> 在希腊进行一项关于痤疮患者 *P. acnes* 抗生素耐药与病史关系的研究, 共收集 191 例痤疮患者, 分离、培养出 90 株 *P. acnes* 并

表 2 156 株 *P. acnes* 对 2 种抗生素的 MIC 分布 (  $\mu\text{g/mL}$  )

Tab. 2 The MIC distribution of 156 *P. acnes* on two kinds of antibiotics

Antibiotic	$\leq 0.0625$	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	$\geq 256$	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
MNZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	156	256	256
CLI	96	7	3	4	1	1	-	2*	-	1	1	3	37	0.0625	256

Note: The number is *P. acnes* strains. \* : the standard value for the drug MIC; MIC<sub>90</sub>: the lowest drug concentration to inhibit 90% bacterial growth.

进行体外耐药性分析, 52 株对 CLI 耐药(根据 EU-CAST 标准, 耐药 MIC  $\geq 0.25$ ), 耐药率为 57.87% (52/90), MIC<sub>90</sub>  $\geq 256$ , 高度耐药。2014 年 Keisuke 等<sup>[4]</sup>对日本 91 例痤疮患者分离、培养出 69 株 *P. acnes*, 其中 18.84% (13/69) 对 CLI 耐药, MIC<sub>90</sub> = 128, 高度耐药。国内 Fan Y 等<sup>[5]</sup>2014 年在中国 5 个地区(重庆、四川、云南、陕西、湖北)共收集 364 例痤疮患者, 分离、培养出 312 株 *P. acnes* 进行体外药敏试验, 结果显示, 林可霉素在重庆、四川、云南、陕西、湖北耐药率分别为 40.91% (45/110), 57.14% (32/56), 44.19% (19/43), 42.31% (22/52), 60.78% (31/51), MIC<sub>80</sub> 均 > 512, 高度耐药。本课题研究东莞地区 156 株 *P. acnes* CLI 耐药情况, 28.21% (44/156) 对 CLI 耐药, 其耐药率高于日本 18.8%<sup>[4]</sup>, 但低于希腊<sup>[3]</sup>和中国其他 5 个地区耐药报道<sup>[5]</sup>, 可能与各地区使用 CLI 治疗痤疮频率相关。

甲硝唑为硝基咪唑衍生物, 通过硝基还原酶使药物的硝基还原成一种细胞毒, 从而作用于细菌的 DNA 代谢过程, 抑制细菌的脱氧核糖核酸的合成, 干扰细菌的生长、繁殖, 最终导致细胞死亡, 对厌氧菌有强大的抗菌活性, 临床常有文献报道使用 MNZ 治疗痤疮有效。2006 年张萍等<sup>[8]</sup>临床观察 807 例痤疮患者, 随机分为两组, 治疗组口服甲硝唑, 对照组口服四环素, 4 周后治疗组和对照组的总有效率分别是 88.84% 和 71.20%。2015 年万建勳等<sup>[9]</sup>研究 34 例丘疹脓疱型玫瑰痤疮患者, 随机分为两组, 对照组口服 MNZ, 治疗组双波长强脉冲光(IPL)联合 MNZ 口服治疗, 前 4 周两组均口服 MNZ, 治疗组从第 4 周开始双波长 IPL 治疗, 12 周后结果显示, 治疗组和对照组有效率分别为 82.61% 和 42.11%。但本研究体外药敏试验表明 *P. acnes* 对 MNZ 100% 耐药且高度耐药, 与国内 Fan Y 等<sup>[5]</sup>报道药敏结果一致。本文 212 例痤疮患者分离出 228 株 15 种厌氧或兼性厌氧菌, 以 *P. acnes* 为主, 占 68.42%。甲硝唑治疗痤疮临床有效而体外药敏试验耐药, 可能与杀灭其他厌氧菌减轻痤疮炎症反应有关。体外的药敏实验只针对痤疮丙酸杆菌, 体内服用甲硝唑时

同时可杀灭其它厌氧菌, 以此减轻痤疮炎症反应。

总之, 东莞地区 156 株 *P. acnes* 体外药敏试验, 28.21% 对 CLI 耐药, 100% 对 MNZ 耐药, 临床应引起高度重视。

### 【参 考 文 献】

- [1] Achermann Y, Goldstein EJ, Coenye T, et al. Propionibacterium acnes: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen [J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(3): 419-440.
- [2] 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.
- [3] Grech I. Susceptibility profiles of Propionibacterium acnes isolated from patients with acne vulgaris [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2014, 2(1): 35-38.
- [4] Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, et al. Relationship between the severity of acne vulgaris and antimicrobial resistance of bacteria isolated from acne lesions in a hospital in Japan [J]. J Med Microbiol, 2014, 63(Pt 5): 721-728.
- [5] 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.
- [6] 凌勇活, 孙菲, 李明, 等. 基质辅助激光解吸附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.
- [7] Del RJQ, Leyden JJ, Thiboutot D, et al. Antibiotic use in acne vulgaris and rosacea: clinical considerations and resistance issues of significance to dermatologists [J]. Cutis, 2008, 82(2 Suppl 2): 5-12.
- [8] 张萍, 张培华. 甲硝唑治疗寻常痤疮 421 例疗效观察 [J]. 宁夏医学杂志, 2006, 28(6): 465-466.
- [9] 万建勳, 肖洁平, 丁街生, 等. 双波长强脉冲光联合甲硝唑片治疗轻、中度丘疹脓疱型玫瑰痤疮 24 例临床观察 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2015, 29(4): 435-437.

[收稿日期] 2017-06-30 [修回日期] 2017-09-07