



论文

用线性梯度平板准确测定药物敏感性和分离抗药性菌株

刘玉庆^①, 李靖冉^③, 杜加法^①, 胡明^①, 白华^①, 齐静^①, 高超^③, 魏甜甜^③, 苏红^①, 金健玲^②, 高培基^{②*}

① 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 济南 250100;

② 山东大学生命科学学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100;

③ 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109

* 联系人, E-mail: gaopj@sdu.edu.cn

收稿日期: 2011-07-04; 接受日期: 2011-08-08

国家自然科学基金(批准号: 81171621)、山东省中青年科学家奖励基金(批准号: 2006BS02008)、中国博士后科学基金(批准号: 20080440451)资助项目

摘要 菌群在药物的最低抑菌浓度附近的动力学过程是抗生素药理学研究的核心问题. 建立一种能确定精确的 MIC 且又能准确分离抗药性菌株的方法, 是目前临床对药敏实验新的要求. 根据 Fick 扩散定律制备了线性梯度平板: 将 15 mL 含适当浓度恩诺沙星的琼脂培养基在 9 cm 培养皿中倾斜凝固, 刚好覆盖整个平板底面, 然后水平放置, 再在其上层加入同样体积的无药琼脂培养基, 凝固 12 h 后, 药物浓度达到扩散平衡而呈均匀连续线性梯度. 通过实测验证药物浓度在平板表面呈线性梯度分布. 将待检 *E.coli* 菌群均匀涂布在梯度平板上, 培养 12 h 后, 随恩诺沙星浓度提高依次形成连续密集小菌落区和离散大菌落区, 根据两区域的分界线可以确定菌群自然形成的真实的 MIC, 与常规药敏实验方法测定结果一致. 大菌落重新涂布高梯度平板, 分界线显著上升, 并检测出抗药性基因突变, 表明该方法很容易筛选出菌群中的抗药性菌株. 梯度平板可以方便地呈现整个菌群在 MIC 附近的动力学过程和遗传生理变化, 并预警该抗生素使用后可能出现的抗药性, 从而指导临床抗菌药物的选择和使用.

关键词

线性梯度平板

E. coli

恩诺沙星

MIC

抗药性

检测致病菌对抗生素的敏感性是临床实验室的重要工作, 美国临床实验室标准化研究所(clinical and laboratory standard institute, CLSI)等机构制定的大多数药敏实验(antibiotic susceptibility test, AST)方法都结合 PK/PD 和临床疗效确定折点值(breakpoint), 据此判断具有一定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和抑菌圈直径的菌群是敏感还是

抗性, 是临床选择抗菌药物的主要依据^[1-3]. 多年来, 各国致力于药敏实验的标准化和监测网络建设^[4-7], 但目前随着抗菌药物广泛使用, 细菌抗药性水平显著提高, 且越来越普遍^[8-10], 菌群在远高于药物折点值的 MIC 附近的动力学过程是抗生素药理学研究中较重要的问题. 建立一种能测定精确的 MIC, 且又能准确分离抗药性“超级”菌株的方法, 是临床对药敏

英文版见: Liu Y Q, Li J R, Du J F, et al. Assessing accurate antibiotic susceptibility and screening resistant strains of bacterial population by linear gradient plate. *Sci China Life Sci*, 2011, 54, in press

实验新的要求.

实际上,早在1952年Bryson和Szybalski^[11]就已经经验性地建立了梯度平板方法分离抗药性细菌.但长期以来,其主要用于抗性菌株的筛选,而未能用于药敏实验^[12-14].本文以恩诺沙星与大肠杆菌为例,根据Fick扩散定律^[11,15]制备了一个“药物浓度达到扩散平衡而呈均匀连续线性梯度”的平板,用化学方法实测平板表面药物浓度,表明其呈现线性梯度分布.将待检菌群涂布在适当浓度范围的梯度平板上,培养得到其自然形成的连续密集小菌落区和离散大菌落区,根据两区域的分界线可以准确判定菌群直接形成的MIC,并可预警该抗生素使用后可能导致的菌群抗药性变化,对临床抗菌药物的选择和使用发挥指导作用.

1 材料与方 法

1.1 材料

E. coli ATCC25922, 1.5%琼脂固体培养基, 1.5%琼脂固体LB培养基, 9 cm培养皿, 5 mL离心管, 96孔板, 恩诺沙星, 磷酸-三乙胺缓冲液, 荧光分光光度计(HITACH F4500型)等.

1.2 微量稀释法测定恩诺沙星对 ATCC25922 的 MIC

分别设置3种倍比稀释梯度: 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.016, 0.008 $\mu\text{g/mL}$, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.006 $\mu\text{g/mL}$, 0.6, 0.3, 0.15, 0.075, 0.038, 0.019, 0.009, 0.0045 $\mu\text{g/mL}$, 按照CLSI标准操作^[3].

1.3 琼脂稀释法测定恩诺沙星对 ATCC25922 的 MIC

设置倍比稀释梯度为1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.016, 0.008 $\mu\text{g/mL}$, 按照CLSI标准操作.但是接种量分别为 10^8 CFU和 10^3 CFU, 将点种改为涂布平板^[3].

1.4 恩诺沙星对 ATCC25922 的浓度-杀菌曲线 (concentration-killing curve, CKC)

制备线性梯度(0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04, 0.045, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)的琼脂平板, 每个平板接种约1000个菌细胞, 涂布均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h, 计数各

平板中菌落.以药物浓度为横坐标, 每平板的菌落数为纵坐标, 用GraphPad Prism 4.0软件拟合数据曲线,

方程为: $N = \frac{N_0}{1 + e^{r(x - BC_{50})}}$, N_0 为接种的菌数, N 为药物浓度为 x 时残余菌数, BC_{50} 是半数杀菌浓度, $r = -\frac{\text{slope}}{N_0/4}$, 由曲线在 BC_{50} 处斜率与 N_0 共同决定的常数^[16].

1.5 测定恩诺沙星在琼脂培养基中的浓度

绘制恩诺沙星荧光强度与浓度的标准曲线.用pH 3.0的磷酸-三乙胺缓冲液配制0.1, 0.01, 0.001, 0.0001和0.00001 $\mu\text{g/mL}$ 的恩诺沙星溶液, 于F4500型荧光分光光度计进行荧光检测.激发波长278 nm, 吸收波长446 nm, 电压600 V^[17].

将融化的1.5%琼脂固体培养基15 mL, 倾倒入9 cm培养皿中, 配制含1, 2, 4和8 $\mu\text{g/mL}$ 恩诺沙星的药物琼脂, 待凝固后压制出直径为10 mm的圆形琼脂块, 测定每个琼脂块净重.全部揭取后, 每块分别置于含1 mL的pH 3.0的磷酸-三乙胺缓冲液的5 mL离心管中, 置水浴锅加热溶解琼脂, 加热及冷却过程中不可晃动离心管, 静置使琼脂沉降.取样品上清液测定恩诺沙星荧光强度.根据恩诺沙星荧光强度与浓度的标准曲线计算单位质量琼脂中的恩诺沙星浓度, 计算琼脂中药物回收率.

1.6 制备线性梯度平板

配制13.5和15 mL的1.5%琼脂固体LB培养基, 融化; 13.5 mL培养基待温度降到55 $^{\circ}\text{C}$ 左右时, 加入恩诺沙星1.5 mL充分混匀后(终浓度为2 $\mu\text{g/mL}$)倾倒入9 cm培养皿中.在水平仪上放置玻璃板, 倾斜一定角度, 放上培养皿使其底面高端刚好浸没琼脂, 并用箭头标记倾斜方向.待凝固后, 将培养皿放平在水平仪上, 将另一份不加药物的15 mL琼脂培养基倾倒入药物琼脂上, 制备24个理论浓度为0~2 $\mu\text{g/mL}$ 梯度平板(图1(A)).

将融化的1.5%琼脂固体培养基15 mL, 倾倒入9 cm培养皿中, 凝固后压制出直径为10 mm的圆形琼脂块.待梯度平板上层琼脂凝固后, 将梯度平板置于等格线上, 沿倾斜轴将所制的新鲜圆形琼脂块等距离紧密贴于表面, 每个梯度平板设3排重复(图1(B)),

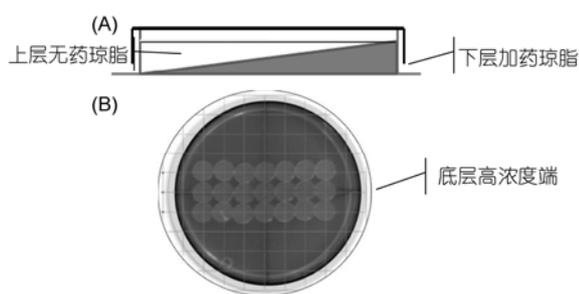


图1 线性梯度平板

每排7个. 将24个梯度平板置于37℃培养箱, 每1h按顺序迅速揭取一个培养皿中的圆形琼脂块, 每块分别置于含1 mL pH 3.0的磷酸-三乙胺缓冲液的5 mL离心管中. 按1.2小节方法测定单位质量琼脂中的恩诺沙星浓度.

1.7 梯度平板测定MIC

取过夜培养的 *E. coli* ATCC25922 菌液(10^9 CFU/mL)100 μ L, 均匀涂布于制备终浓度为0.01, 0.02, 0.04, 0.08和0.1 μ g/mL, 放置扩散12 h的梯度平板上, 置于37℃培养12 h. 选取菌落边缘居中平板, 沿倾斜轴分别测量最低浓度点到分界线和离散菌落边缘的距离, 按线性关系计算MIC.

1.8 梯度平板上菌群特征

挑选所有离散大菌落和密集小菌落, 接种到无药液体培养基, 再涂布到同样的较高浓度的梯度平板, 观察菌群生长变化; 同时分别提取其总DNA, 扩增 *gyrA*, *gyrB* 和 *parC*, *parE* 的喹诺酮耐药决定区基因, 进行抗药性突变位点分析(表1)^[18].

反应条件: 94℃变性5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共30个循环. 最后72℃延伸7 min, 4℃保护.

表1 *gyrA*, *gyrB* 和 *parC*, *parE* 基因 PCR 扩增引物序列特征

目的基因	引物序列(5'→3')	长度(bp)	扩增片段(bp)
<i>gyrA</i>	F: TGCCAGATGTCCGAGAT	17	269
	R: GTATAACGCATTGCCGC	17	
<i>gyrB</i>	F: GCCTTCTTCACTTTGTACAGCG	23	269
	R: GTGACGGCGGTACTCACCTG	20	
<i>parC</i>	F: TATGCGATGTCTGAAC	16	264
	R: GCTCAATAGCAGCTCGGAAT	20	
<i>parE</i>	F: CTGACCGAAAAGCTACGTCAACC	22	264
	R: CGTTCGGCTTGCCTTCTTG	20	

2 结果与分析

2.1 微量稀释法测定恩诺沙星对 ATCC25922 的 MIC

如图2, 3种梯度设置得到3种结果, 0.025 μ g/mL较为准确, 但仍然是人为设置的梯度. 当菌株抗性较高时, MIC 较高, 这时由于梯度设置导致的误差将更大. 这种方法也无法区分和分离菌群中的抗药性菌株.

2.2 琼脂稀释法测定恩诺沙星对 ATCC25922 的 MIC

本方法也存在着人为设置梯度对测定结果的影响, 但能够通过特定的梯度分离出抗药性菌株. MIC为0.0625 μ g/mL, 当接种量提高到 10^8 CFU时, MIC提高到0.125 μ g/mL(图3).

上述两类通用的CLSI推荐的药敏实验方法存在的问题, 详见文献[19].

2.3 恩诺沙星对 ATCC25922 的 CKC

如图4, 通过CKC能全面动态地描述随着恩诺沙星浓度提高, 累积杀菌力的增加, 并拟合得到 $BC_{50}=0.0205$ μ g/mL, $BC_1=0.0364$ μ g/mL. 数据准确、全面, 消除了人为设置梯度的误差, 但实验过程中的梯度仍然是间断的, 只能在 BC_{50} 到 BC_1 之间特定梯度上得到离散菌落, 但基本排除了突变菌落的出现. 该方法接种量低于1000 CFU, 以便于菌落计数^[17].

2.4 恩诺沙星在梯度平板表面浓度的测定和线性分析

恩诺沙星浓度与其荧光强度的标准曲线 $y=52666x+306.2$, 为强线性相关, $R^2=0.998$. 依照1.2小节方法测定含1, 2, 4和8 μ g/mL恩诺沙星的琼脂块, 回收率达99%, 表明琼脂(1.5%, 质量体积比)对恩诺沙星无显著吸附作用.

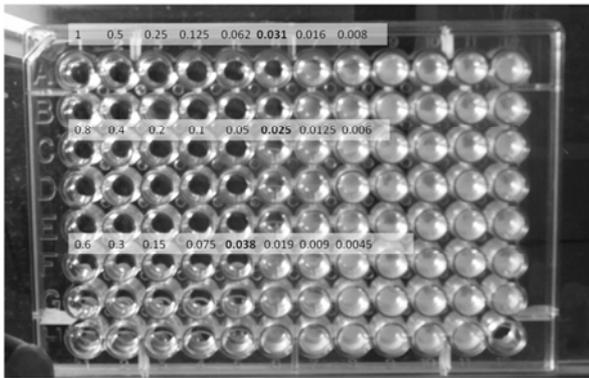


图2 微量稀释法测定恩诺沙星对 ATCC25922 的 MIC 分别为 0.031, 0.025 和 0.038 $\mu\text{g/mL}$

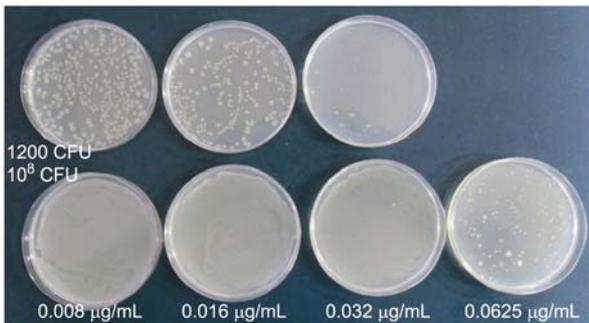


图3 琼脂稀释法测定恩诺沙星对 ATCC25922 的 MIC 分别为 0.0625 和 0.125 $\mu\text{g/mL}$

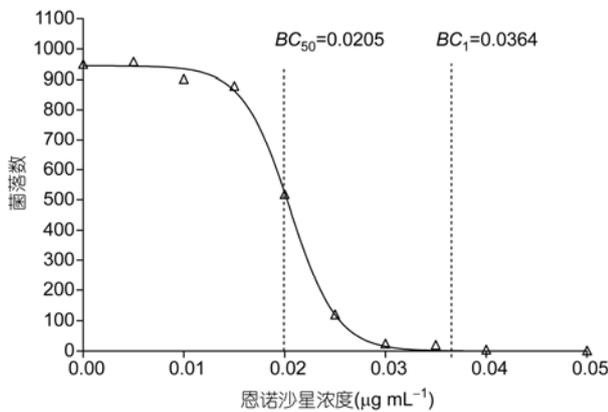


图4 恩诺沙星对 *E.coli* ATCC25922 的浓度-杀菌曲线

图5显示了恩诺沙星浓度在梯度平板表面不同区域(按坡度方向以直径1cm中心位置表征)随时间变化的动态图,在12h以前,扩散至各位点的药物浓度随时间进程增加,距底层坡度高端越近,扩散速率越快;而12h以后,扩散趋于平衡,各位点浓度趋于

稳定.用一元线性方程可以很好地拟合12h后浓度与位点到底层坡度高端距离(图6).由于药物浓度呈现连续均匀的分布,所以药物在琼脂表面沿坡度方向任一位点的浓度都可以被准确测定和计算.

2.5 用梯度平板测定 *E. coli* ATCC25922 对恩诺沙星的 MIC

在由0.03125 $\mu\text{g/mL}$ 的恩诺沙星制备的梯度平板上,随着远离浓度最低点,大肠杆菌菌群依次形成2个明显的区域:平滑的密集连续小菌落区,离散大菌落区(图7(A));按照其线性梯度关系,边缘线浓度为 $\text{MIC}=0.018 \mu\text{g/mL}$.梯度平板能全面显示大菌落群在浓度连续增加的药物作用下菌群的形态、区域分布的变化,简便易行,正是CKC曲线的直观表现,且能从菌群中筛选出抗药性菌落,进一步进行遗传生理分析.

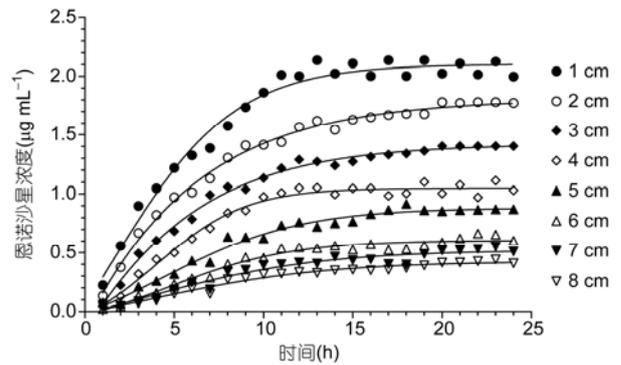


图5 各位置在不同时间的药物浓度
各曲线图例表示到最高浓度点距离

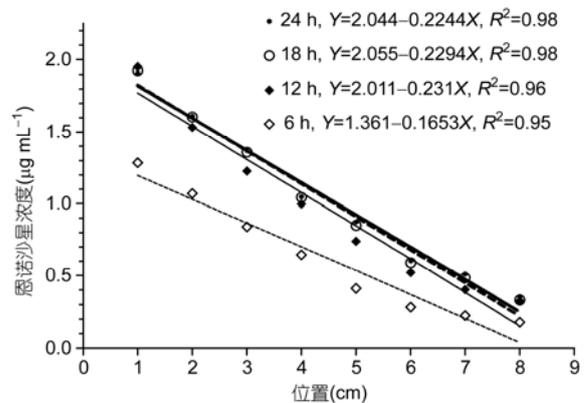


图6 各位置在不同时间的琼脂块中恩诺沙星浓度实测值(点)和一元线性方程拟合结果(线)

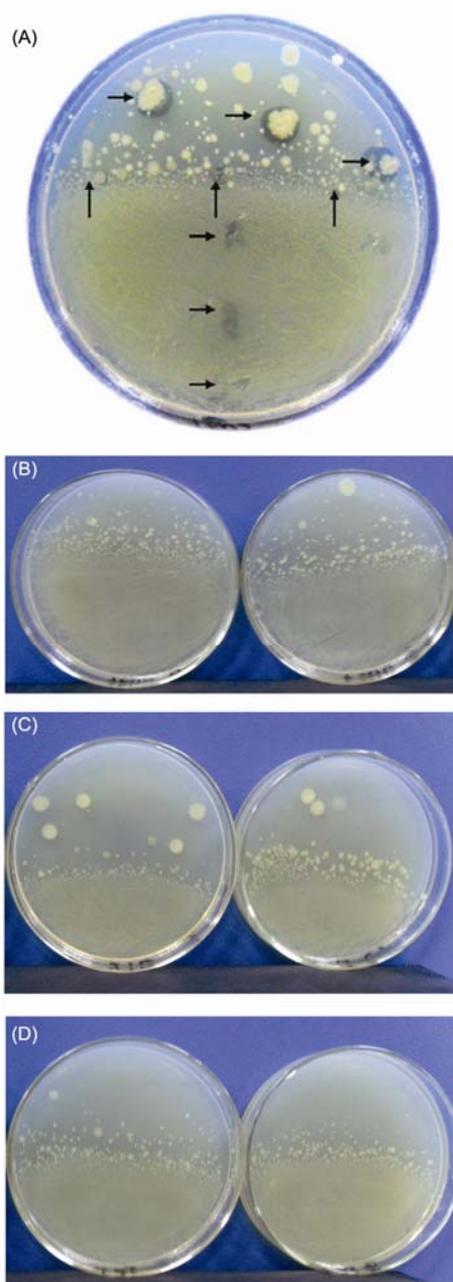


图 7

(A) *E. coli* ATCC25922 在 0.03125 µg/mL 恩诺沙星制备的梯度平板上的密集菌落、离散菌落。箭头标注的较亮部位为取样点; (B) 取自(A)中连续密集区不同位置的菌群在 0.03125 µg/mL 恩诺沙星制备的梯度平板上的菌落分布; (C) 取自(A)中离散区的 3 个小菌落在 0.125 µg/mL 恩诺沙星制备的梯度平板上的菌落分布; (D) 取自(A)中离散区的 3 个大菌落在 0.5 µg/mL 恩诺沙星制备的梯度平板上的菌落分布

增加接种量时, 离散大菌落数量增加, 但不影响 MIC 线的位置(图略).

2.6 梯度平板上菌群性质

分别从连续密集区取上中下 3 个不同位置菌落, 从离散区取 3 个大菌落和 3 个小菌落, 接种到液体 LB 培养基培养 8 h, 再涂布到新的较高制备浓度的梯度平板上.

由图 7(B)可见, 连续密集区菌落重新涂布梯度平板, 形成的菌落分布与图 7 完全一致, 表明作为原菌群主体的敏感菌的性质未受药物影响, 而原菌群中已存在抗性菌株, 它在连续密集区被占优势的敏感菌抑制, 未能扩增为单菌落, 而在离散区自由生长形成可以分辨的大菌落.

小菌落重新涂布 0.125 µg/mL 的恩诺沙星制备的梯度平板, 菌落分布格局与图 7 一致, 分界线浓度提高约 4 倍(图 7(C)); 离散大菌落相似, 但是分界线浓度显著提高, 达到 16 倍(图 7(D)).

两个区域所有菌落的 *gyrB*, *parC*, *parE* 均未出现基因突变.

离散小菌落的 *gyrA* 都在 87 位点发生了突变: 由 GGC→TAC, 甘氨酸(Gly)→酪氨酸(Tyr).

离散大菌落的 *gyrA* 都在 87 位点发生了突变: 其中两个菌落由 GGC→TAC, 甘氨酸(Gly)→酪氨酸(Tyr); 一个菌落由 GGC→GAC, 甘氨酸(Gly)→天冬氨酸(Asp).

3 讨论

对于 CLSI 等提出的药敏实验方法和标准存在的问题, 本实验室已作了评述^[19]. 纸片扩散法简便易行, 是最普遍应用的药敏实验方法, 已有近 40 年的历史, 并为世界卫生组织推荐^[2-4]; *E*-test、螺旋梯度终点法(spiral gradient endpoint method)的应用也有 20 余年历史, 把倍比增加浓度药物固定在试纸条上的技术仍然是专利, 价格昂贵^[20,21]. 这两种方法药物在琼脂平板上的扩散都是三维半球形, 由于非线性的梯度分布, 药物分子的物理化学性质不同, 很难用一个普适性的模型去拟合^[22-26], 因此抑菌圈边缘的 MIC 难以计算, 测量精确度也差, MIC 实测值都未见报道, 纸片扩散法多数以抑菌圈直径来衡量. 另外, 因为检测条件, 如纸片尺寸和药物用量、细菌接种量、琼脂浓度、培养时间、温度等, 都会对抑菌圈产生影响, 多年来对其有效性的讨论和改进一直不断^[27-31].

由于无法直接测定抑菌圈边缘的药物浓度,因此建立K-B法把标准条件下测定的抑菌圈直径与相应的MIC进行线性回归,实际上并非一一对应.当对大量菌株进行检测时,也会出现一个抑菌圈直径对应多个MIC和一个MIC对应多个抑菌圈直径的情况^[32].

即使采用琼脂稀释法建立倍比或均匀的药物梯度,也难以提供连续的线性梯度,测定的浓度只能是浓度范围.防止一次突变浓度(one-step mutation prevention concentration, MPC)的测定也存在同样的问题^[33].CKC法能描述随着药物线性增加时菌群数量的动态变化,得到药物浓度从 BC_{99} 到 BC_1 表现为不同曲率的CKC曲线,并能计算 BC_{50} 等参数^[17,34,35];基于浊度法的差分分析法可排除菌群中休止细胞的干扰,结合二维等值线图的应用,可同时给出药物浓度和作用时间的复合作用^[36];这两种方法都可为PK/PD测定提供重要信息^[37,38].

上述方法的缺陷导致它们都不能直接测定准确的MIC,且只能得到MIC附近几个间断浓度下或抑菌圈内的混杂菌群,不易分离出菌群中的抗药性菌株.如果能建立一种线性梯度的琼脂平板,这些困难将迎刃而解.

Fick扩散定律 $\frac{dC}{dt} = D \frac{d^2C}{dx^2}$,是对小分子物质在均匀液相中一维扩散的动态表征, D 为扩散系数, C 是溶质的浓度, x 是溶质分子在 x 方向的位移, t 是扩散时间^[15,39].由于药物分子在底层琼脂中浓度 C 是相同的,在垂直于下层琼脂坡面方向扩散,随时间延长, $\frac{d^2C}{dx^2}$ 迅速减少,当 t 无穷大时, $\frac{d^2C}{dx^2}$ 趋近于0,则 $\frac{dC}{dx}$ 为大于0的常数,因此垂直于琼脂坡面方向药物形成连续的线性梯度,而上层琼脂表面以一定角度与其相交,表面药物必然形成线性梯度.这是梯度平板的理论基础.本文以恩诺沙星在LB琼脂培养基中的扩散为例,通过实测数据验证了这一定律,当时间延长到12h即已经接近了扩散平衡,形成线性梯度.大接种量菌群在抗菌药物梯度平板上呈现明显分区现象,由此确定恩诺沙星准确的MIC,并从离散菌落区分得到了两类突变菌株.

梯度平板虽然不能像倍比稀释法那样快捷找到MIC范围,但由于提供了连续线性梯度,具有显著优点和重要用途,可以在抗药性研究和临床药敏实验中应用.

(i) 测定准确可靠的MIC.菌群在梯度平板上自然形成了2个区域,而不是像试管或琼脂稀释法那样人为的倍比稀释,根据2个区域的边缘可精确测定MIC.与经典方法比较,一般地,微量稀释法得到MIC,而琼脂稀释法得到MBC要高于MIC,但是都会由于梯度的设置不同导致测定结果的差异,在高抗药性菌株测定时尤其严重.梯度平板与CKC法异曲同工,分别展示了在连续线性梯度的药物中杀菌力和抗药性. BC_{50} (0.0205 $\mu\text{g/mL}$)和密集菌落边缘浓度(0.018 $\mu\text{g/mL}$)很接近,相当于微量稀释法测定的最小的MIC(0.025 $\mu\text{g/mL}$),3种结果比较,自然形成的密集菌落边缘浓度0.018 $\mu\text{g/mL}$ 是菌群主体更为真实可靠的MIC.

另外,接种的菌群增大后(图3),仅根据无残留菌落的终点判断,似乎抑菌浓度增加,主要原因是大菌群无法进行菌落计数,不能如图4一样得到杀菌曲线.但是线性连续的梯度平板可以显示菌群主体稳定的MIC.

(ii) 菌群的抗药性分析.菌群增大后,对药物敏感的异质性也体现出来.在恩诺沙星高浓度区出现的离散菌落具有不同的抗药性突变和表型,离散菌落重新涂布梯度平板得到新的MIC,这是MBC和MPC法所无法做到的,是对MBC和MPC法和概念上的改进,离散菌落不限于设想的一步突变.而且不同细菌对不同药物抗药性机制的复杂性决定了离散菌落的多样性,梯度平板提供了很好的研究菌群抗药性表型的新方法.

(iii) 在临床上可以预警药物治疗可能导致感染菌群的抗药性类型.快速筛选抗药性菌落,且连续筛选可以很快获得一系列抗药性菌株,用于研究抗药性表型变化速率,准确测定突变率,并深入研究抗药性的生化机制和分子生物学调控机制.

(iv) 它能动态地展示菌群的个体在药物浓度和时间作用下增殖成菌落或抑制、死亡的动力学变化,评价药物的时间依赖性和浓度依赖性.

基于差分方程和等值线图的应用,本研究提出了表征药物浓度和作用时间的复合作用新方法,它适用于专业性实验室研究药物作用机理以确定PK/PD^[36];而梯度平板简易可行,普通临床实验室便可进行,两种方法相结合,有助于对药物与菌群的相互作用进行较全面地理解.但其普适性、临床应用的有效性和潜在的应用价值仍需不断的检验和改进.

致谢 感谢山东工商学院数学与信息科学学院郭林博士对本文微分方程推导方面的帮助。

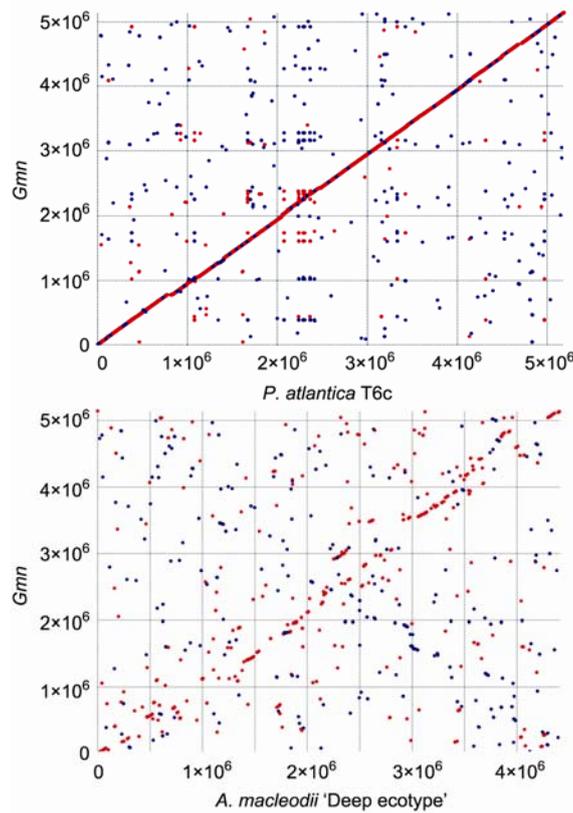
参考文献

- 1 Wheat P F. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48: S1-S4
- 2 Bauer A W, Kirby W M, Sherris J C, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 1966, 45: 493-496
- 3 CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth. Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2010
- 4 World Health Organization. Standardization of methods for conducting microbiology sensitivity tests. Second report of the expert committee on Antibiotics. WHO Technical Report Series, No. 210. WHO, Geneva, 1961
- 5 Gould I M. Towards a common susceptibility testing method? *J Antimicrob Chemother*, 2000, 45: 757-762
- 6 杨启文, 王辉, 徐英春, 等. 中国教学医院细菌耐药监测研究及现状介绍. *中国临床药理学杂志*, 2008, 24: 570-573
- 7 肖永红. 卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarín)介绍. *中国抗生素杂志*, 2008, 33: 577-588
- 8 Taubes G. The Bacteria fight back. *Science*, 2008, 18: 321: 356-361
- 9 Richard G W, Lewis K, Salyers A A, et al. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007
- 10 朱小玲, 齐静, 白华, 等. 山东省动物源大肠杆菌多重抗药性及其遗传稳定性研究. *中国卫生检疫杂志*, 2009, 19: 1473-1476
- 11 Bryson V, Szybalski W. Microbial selection. *Science*, 1952, 116: 45-51
- 12 Shimkets L J, Dworkin M, Keller K H. A method for establishing stable concentration gradients in agar suitable for studying chemotaxis on a solid surface. *Can J Microbiol*, 1979, 25: 1460-1467
- 13 张金儿, 朱江萍, 刘义雄, 等. 从氯霉素抗性突变株筛选赤霉素高产菌株. *中国抗生素杂志*, 2005, 30: 301-303
- 14 陈双雅, 邓子新. 吸水链霉菌井冈变种 JG5008 转化系统的初建. *应用与环境生物学报*, 2000, 6: 267-270
- 15 Philip Nelson, 著. 黎明, 戴陆如, 译. *生物物理学: 能量信息生命*. 上海: 上海科学技术出版社, 2006. 116-118
- 16 Liu Y Q, Zhang Y Z, Gao P J. Novel Concentration-Killing Curve method for estimation of bactericidal potency of antibiotics in an in vitro dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 3884-3891
- 17 王似菊, 沈向忠, 宗俭. 诺氟沙星的荧光分光光度测定法. *中国医药工业杂志*, 1993, 24: 411-413
- 18 Bagel S, Hullen V, Wiedemann B, et al. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43: 868-875
- 19 刘玉庆, 张怀强, 胡明, 等. 药敏实验方法的局限性及改进的建议. *山东大学学报(医学版)*, 2011, 49: 124-132
- 20 Brown D F. Determination of MICs by the E test. *J Antimicrob Chemother*, 1992, 29: 455
- 21 Hill G B, Schalkowsky S. Development and evaluation of the spiral gradient endpoint method for susceptibility testing of anaerobic gram-negative bacilli. *Rev Infect Dis*, 1990, 12: S200-S209
- 22 Cooper K E. Theory of antibiotic inhibition zones in agar media. *Nature*, 1995, 175: 510-511
- 23 Finn R K. Theory of agar diffusion methods for bioassay. *Anal Chem*, 1959, 31: 975-977
- 24 Awerbuch T E, Lustman L. A mathematical model for determining minimum inhibitory concentration (MIC) via diffusion assay. *J Theory Biol*, 1987, 129: 219-230
- 25 Ringertz S, Kronvall G. On the theory of the disk diffusion test. *APMIS*, 1988, 96: 484-490
- 26 Drugeon H B, Juvin M E, Caillon J, et al. Assessment of formulas for calculating critical concentration by the agar diffusion method. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31: 870-875
- 27 Anderson B. Improved susceptibility disk assay method employing an agar overlay technique. *Antimicrob Agents Chemother*, 1978, 14: 761-764
- 28 Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61: 1295-1301
- 29 Andrews J M. The development of the BASA standardized method of disk diffusion testing. *Antimicrob Agent Chemother*, 2001, 48: 29-42
- 30 Turnidge J, Paterson D L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 391-408
- 31 陈秀枢. 纸片扩散法抗菌素敏感性实验的局限性及其补充方法. *临床检验杂志*, 1994, 12: 2-5
- 32 Jorgensen J H, Crawford S A, Fulcher L C, et al. Multilaboratory Evaluation of disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria meningitidis* isolates. *J Clinical Microbiology*, 2006, 44: 1744-1754

- 33 Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: measurement and potential uses of the mutant selection window. *J Infect Dis*, 2002, 185: 561–565
- 34 张怀强, 刘玉庆, 刘波, 等. 分批培养条件下细菌群体生长阶段的区分及生长参数的确定. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35: 502–512
- 35 刘玉庆, 张怀强, 沈建忠, 等. 大肠杆菌群体的生理异质性的对药敏实验的影响. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37: 524–529
- 36 张怀强, 赵越, 何秀丽, 等. 构建大肠杆菌药敏实验新方法的探索. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40: 1063–1073
- 37 Cooper K E, Linton A H, Sehgal S N. The effect of inoculum size on inhibition zones in agar media using staphylococci and streptomycin. *J Gen Microbiol*, 1958, 18: 670–687
- 38 Firsov A A, Vostrov S N, Kononenko O V, et al. Prediction of the effects of inoculum size on the antimicrobial action of trovafloxacin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemoth*, 1999, 43: 498–502
- 39 杨纪珂, 齐翔林, 陈霖. 生物数学概论. 北京: 科学出版社, 1982. 640–722

更正

《中国科学: 生命科学》中文版 2011 年 07 期 p547, 图 4 应为:



特此更正.