

慢性感染临床微生物样本中持留菌的筛选及分布特点*

秦 琴,王 慧,庄绪冉,吴林洪,邓安梅

(第二军医大学长海医院实验诊断科,上海 200433)

摘要:目的 了解长海医院慢性感染微生物样本中持留菌的分离及分布情况,为临床采取有效措施预防、控制和治疗持留菌所引起的慢性感染提供合理依据。**方法** 采用 WHONET5.6 软件对医院 2013 年 1 月~2014 年 12 月收集的微生物样本进行分析,选取阳性分离率最高的 4 种致病菌,结合临床资料聚焦于慢性感染病例样本,用活菌平板计数法确定菌液浓度,绘制每个临床样本在抗生素作用条件下的生长曲线图,根据曲线特点,筛选出持留菌株,并观察其在临床的分布情况。**结果** 14 216 份微生物样本共筛选得到 862 株慢性感染病例样本,最终共筛得 4 株大肠埃希菌,23 株肺炎克雷伯菌,8 株铜绿假单胞菌,6 株金黄色葡萄球菌持留变异株。**结论** 对长海医院临床微生物样本进行回顾性分析,筛选获得 41 株持留菌,持留菌的临床分离率仍较低,主要来源于痰标本,烧伤科是持留菌的主要分布科室。肺炎克雷伯菌持留变异株分离率相对较高,应注意防控。

关键词:慢性感染;持留菌;持留菌生长曲线

中图分类号:R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)03-001-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.001

Distribution Characteristics of Persisters Isolated from Chronic Infected Patients

QIN Qin, WANG Hui, ZHUANG Xu-ran, WU Lin-hong, DENG An-mei

(Department of Clinical Laboratory Diagnostics,

Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical distribution characteristics of persisters isolated from the chronic infected patients, so as to provide scientific basis for effective clinical measures to prevent, control and treat persister-associated chronic infection. **Methods** Clinical microbial samples cultured from Jan. 2013 to Dec. 2014 were analysed by WHONET5.6. Four bacteria species with the highest isolation rate were performed for screening of chronic infection. Concentration of bacteria were detected by viable plate count method and then the growth curve were drew of each sample under the presence of antibiotics. Persisters were confirmed according to the specific growth curve under the presence of antibiotics. **Results** Four highest isolated bacteria species of the clinical samples were *Escherichia coli* (13.2%), *Klebsiella pneumoniae* (9.6%), *Pseudomonas aeruginosa* (8%) and *Staphylococcus aureus* (6.6%). 862 chronic infection samples were generated out of 14 216 microbial samples and 41 persisters (4 strains of *Escherichia coli*, 23 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 8 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and 6 strains of *Staphylococcus aureus*) were isolated finally. **Conclusion** With such a comprehensively retrospective analysis of the hospital clinical microbial samples, can tell that the ratio of persisters in chronic infection was not high. And chronic infections are mostly caused by gene-mutated drug-resistant bacteria. However, the isolation rate of *Klebsiella pneumoniae* was relatively high, of which more attention should be paid to the prevention and control.

Keywords: Chronic infection; Persister; Growth curve

持留菌是菌群中所占比例很低(0.001%~0.1%)的一群高度多药耐受的细菌。Lewis 等^[1]认为持留菌具有可逆转的耐药表型,与具有稳定、可遗传耐药特性的耐药突变株有区别,其形成机制复杂,包括形成生物被膜,毒素-抗毒素组件机制,微生物代谢率降低进入休眠状态等^[1,2]。陆续有文献报道,一些公认的微生物感染与控制难题如潜在

的细菌感染、细菌生物被膜的多药耐受性特别是慢性感染治疗的失败都与持留菌的存在密切相关^[3,4]。如持留状态结核分枝杆菌具有对现有抗结核药物表型耐药的特征,被认为是结核病病程迁延和感染复发的主要原因。而 Mulcahy 等^[5]人也通过对囊性纤维病患者进行长期随访,证实了慢性感染复发与持留菌之间具有直接联系。

* 基金项目:国家自然科学基金(81202353),长海医院学科特色培育基金(CH125530300)。

作者简介:秦 琴(1978-),女,硕士,主治医师,研究方向为临床微生物学及细菌耐药机制研究。E-mail:qinq78@163.com。

通讯作者:邓安梅,主任医师, Tel:021-31162061, E-mail:amdeng70@163.com。

由于持留菌在细菌种群中比例极低,其分离鉴定比较困难。目前公认的筛选标准为持留菌在抗生素环境下的杀伤曲线及拖尾现象^[6],即处于对数生长期的持留菌菌群,用高浓度抗生素对其作用后,细菌数量急剧下降,降到一定程度后,细菌数量保持恒定不变,此为持留菌与敏感菌、突变耐药菌最突出的区别,敏感菌在高浓度抗生素环境下,细菌全部死亡,而耐药突变株在抗生素环境下,细菌仍然分裂生长^[7]。目前,国内对于持留菌的研究主要集中在结核分枝杆菌方面,尚没有对临床微生物样本进行持留菌的系统性筛选及临床流行病学调查。因此本研究拟通过对我院2013年01月~2014年12月共14 216份临床微生物样本进行回顾性分析,从中筛选出慢性感染病例样本,进一步对样本中存在的持留株进行分离鉴定,从而了解我院持留菌的分离率和分布特点,为临床采取有效措施预防、控制和治疗持留菌所引起的慢性感染提供合理依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象及试剂 标准菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922,铜绿假单胞菌 ATCC 15442,肺炎克雷伯菌 ATCC 700721,金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 均购自中国微生物菌种库-美国 ATCC 菌种库;临床分离株:大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌等来源于第二军医大学长海医院检验科;抗生素:氨苄西林、环丙沙星、四环素,均购自 sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 慢性感染病例样本的筛选:用 WHONET

软件分析 2013.01~2014.12 期间微生物样本的分离率,选出临床分离率最高的革兰阴性菌和阳性菌(分别为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌);慢性感染的临床定义为感染时间持续超过 2 月,为适当扩大筛选范围,本课题设定的持留待查样本入选标准为:多次送检(≥ 2 次),最长送检时间相隔 >30 天,每次标本类型相同,且前后分离鉴定结果一致。

1.2.2 持留菌筛选试验:确定慢性感染病例样本后,首先用高浓度抗生素($10 \times \text{MIC}$)排除敏感菌,随后对剩余样本进行持留菌筛选。将单个菌落接种至新鲜肉汤培养基中, 37°C ,200 r/min 条件下震荡培养约 2.5 h,使其达到对数生长期,计数 $t=0$ 时的菌液浓度,向菌液中加入抗生素,其中大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌用环丙沙星进行筛选,金黄色葡萄球菌用氨苄西林进行筛选,菌液中抗生素终浓度为 $10 \times \text{MIC}$ 值;在加入抗生素后的第 5,15,30,180 min,分别取 $10 \mu\text{l}$ 菌液稀释后进行平板计数;根据各时间点的计数结果绘制抗生素条件下细菌生长曲线图,判断该曲线是否符合持留菌生长曲线。该操作每个样本重复 3 遍。

2 结果

2.1 慢性感染临床样本分析 采用 WHO-NET5.6 软件对 14 216 份微生物样本进行分析,临床分离率前三的革兰阴性菌分别为大肠埃希菌(1 878 株,13.2%)、肺炎克雷伯菌(1 371 株,9.6%)、铜绿假单胞菌(1 137 株,8.0%),革兰阳性菌中分离率最高的为金黄色葡萄球菌(946 株,6.7%),见图 1。

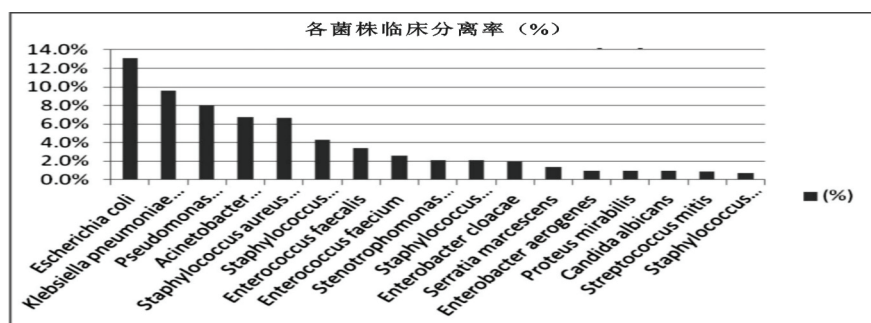


图1 我院2013.01~2014.12临床微生物样本菌株分离率

结合临床资料,对检出率最高的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌进行慢性感染筛查,共获得 862 株慢性感染临床微生物样本,包括 96 例患者共 217 株反复送检大肠埃希菌样本、81 例患者共 220 株反复送检肺炎克雷伯菌样本、107 例患者共 298 株反复送检铜绿假单

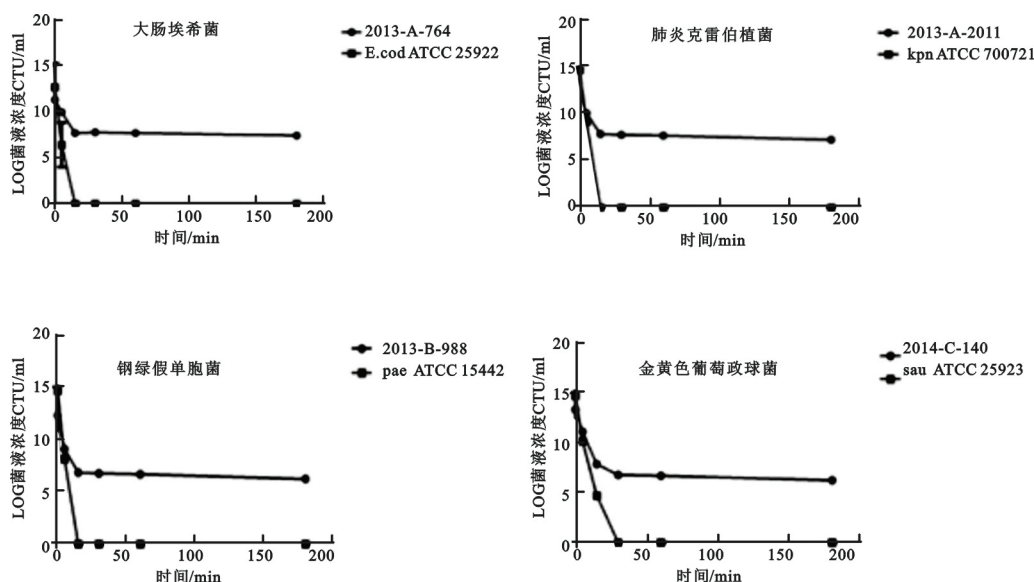
胞菌样本以及 52 例患者共 127 株金黄色葡萄球菌样本。

2.2 慢性感染微生物样本中持留菌的分离鉴定

对 862 株慢性感染临床微生物样本进行持留菌鉴定分离,共筛得 4 株大肠埃希菌、23 株肺炎克雷伯菌、8 株铜绿假单胞菌、6 株金黄色葡萄球菌持留变

异株,各持留菌株在抗生素条件下的生长曲线符合双相生长的特性,见图2。各持留菌株在多个临床科室均有分布,主要集中于烧伤科(10株,24%)、神经外科(7株,17%)、神经内科(5株,12%)、急诊

ICU(4株,10%)、重症医学科(3株,7%)、老年病科及整形外科(均为2株,5%)。临床标本种类来源情况见表1。



图中分别为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌持留菌与敏感株的生长曲线图,各菌种挑选一株代表株。已培养至对数生长期的细菌,加入 $10 \times \text{MIC}$ 抗生素后,持留菌样本中细菌浓度迅速降低,在 $t=15 \text{ min}$ 时降至最低点,随后细菌浓度保持不变,在图中表现为拖尾现象;而作为对照的敏感株,在 $t=15 \text{ min}$ 时,细菌已全部被抗生素杀死(如金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 在 $t=30 \text{ min}$ 时全部被清除)。

图2 抗生素条件下各菌的生长曲线图

表1 分离持留菌的样本种类来源情况($n=41$)

样本种类	分离株数	分离率(%)
痰	26	63
清洁尿	6	15
分泌物	4	10
咽拭子	3	7
人工导管	2	5

3 讨论 随着抗生素的大量使用,细菌耐药已经引起了越来越多的关注,而持留菌则被证实治疗中不能完全清除从而导致治疗失败,其与细菌的潜在感染、生物被膜的多耐药性特别是慢性感染之间存在着密切的关系,是临床微生物感染治疗和防控的主要障碍之一。在体外试验中,持留菌在抗生素条件下表现为双相生长,即在抗生素作用初始阶段,细菌数量急剧减少,随后细菌数量保持稳定,呈拖尾现象。此特性是分离持留菌的理论基础。

本科室2013年1月~2014年12月微生物样本统计分析显示,革兰阴性菌分离率最高的菌种依次为大肠埃希菌(13.2%,1 878/14 216株)、肺炎克雷伯菌(9.6%,1 371/14 216株)、铜绿假单胞菌(8.0%,1 137/14 216株),革兰阳性菌中分离

率最高的是金黄色葡萄球菌(6.6%,946/14 216株)。在此我们选取这4种分离率最高的病原菌并筛选出其中的慢性感染样本共862份,通过绘制细菌在抗生素作用条件下的生长曲线图鉴定并分离样本中存在的持留菌株。最终,共获得4株大肠埃希菌持留株、8株铜绿假单胞菌持留株、23株肺炎克雷伯菌持留株、6株金黄色葡萄球菌持留株,共计41株样本。持留菌样本类型主要为痰(26/41株)、清洁尿(6/41株)、分泌物(4/41株)、咽拭子(3/41株)和人工导管(2/41株);持留菌样本的科室分布主要集中于烧伤科(10/41株)、神经外科(7/41株)和神经内科(5/41株)。烧伤患者由于体表、体内防御屏障破坏,伴广泛组织坏死,且机体免疫功能下降,易发生体内外菌群侵袭引起全身感染,或造成病原体在局部定植,形成慢性感染,迁延不愈^[8,9]。脑血管病患者长期卧床,易发生吸入性肺炎或坠积性肺炎,且由于患者肌张力降低等原因导致肺部引流不畅,单凭药物治疗很难彻底治愈肺炎,由此可导致炎症向慢性、顽固性发展^[10]。因此,在本研究的筛选结果中,这两类患者的持留菌分离率较高。

目前国内对于持留菌的研究 (下转6页)

IMN 患者血清中抗 THSD7A 抗体,使两者互补诊断 IMN 成为可能,但这需要大量的研究来证实。综上血清抗 PLA2R 抗体在 IMN 患者诊断及病情评估中均具有重要的价值,但血清无创性检查能不能在不久的将来取代肾穿刺,这仍需我们医务工作者进一步地进行大样本、多中心的临床研究来定论。

参考文献:

- [1] Beck LH, Bonegi RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med, 2009, 361(1):11-21.
- [2] Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy[J]. N Engl J Med, 2011, 364(7):689-690.
- [3] Hofstra JM, Beck LH Jr, Beck DM, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2011, 6(6):1286-1291.
- [4] Qin W, Beck LH, Zeng C, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(6):1137-1143.
- [5] Hoxha E, Harendza S, Zahner G, et al. An immunofluorescence test for phospholipase A2 receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis [J]. Nephrol Dial

Transplant, 2011, 26(8):2526-2532.

- [6] 周广宇, 金玲, 于晶, 等. 成人膜性肾病患者血清抗 PLA2R 抗体与病情的相关性[J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(2), 111-114.
Zhou GY, Jin L, Yu J, et al. Correlation of anti-M-type phospholipase A2 receptor antibody with disease severity in adult patients with idiopathic membranous nephropathy[J]. Chin J Nephrol, 2012, 28(2), 111-114.
- [7] 曹鹏龙, 李士军, 邹婷婷, 等. 血清抗 M 型磷脂酶 A2 受体抗体与成人特发性膜性肾病的相关性[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(15), 2241-2244.
Cao PL, Li SJ, Hui TT, et al. Correlation of serum anti M A2 receptor antibody and adult idiopathic membranous nephropathy [J]. The Journal of Practical Medicine, 2014, 30(15), 2241-2244.
- [8] Debiec H, Lefeu F, Kemper MJ, et al. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin[J]. N Engl J Med, 2011, 364(22):2101-2110.
- [9] Tomas NM, Beck LH, Meyer-Schwesinger C, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med, 2014, 371(24), 2277-2287.

收稿日期:2015-09-26

修回日期:2015-11-27

(上接 3 页)主要集中在结核分枝杆菌方面,尚没有对临床微生物样本进行持留菌的系统性筛选及临床流行病学调查。本研究首次对此进行了研究报道,为深入了解持留菌与慢性感染的关系、持留菌在临床中的分布特征提供了重要的信息,同时也为我院慢性感染的治疗和防控提供了合理的理论依据。但是,由于本研究为回顾性研究分析以及患者住院时间的限制,在样本筛选过程中难以避免漏检情况。

参考文献:

- [1] Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(1):48-56.
- [2] Dobias Dörr, Kim Lewis, Marin Vulic. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*[J]. PLoS Genet, 2009, 5(12):e1000760.
- [3] Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials [J]. J Bacteriol, 2001, 183(23):6746-6751.
- [4] LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K, et al. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11):3839-3846.

- [5] Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, et al. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis [J]. J Bacteriol, 2010, 192(23):6191-6199.
- [6] Shah D, Zhang Z, Khodursky A, et al. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*[J]. BMC Microbiol, 2006(6):53.
- [7] Verstraeten N, Knapen W, Fauvart M, et al. A historical perspective on bacterial persistence[J]. Methods Mol Biol, 2016(1333):3-13.
- [8] Wolf SE, Phelan HA, Arnoldo BD. The year in burns 2013[J]. Burns, 2014, 40(8):1421-1432.
- [9] 耿波, 刘萍, 梅玉峰. 458 例烧伤患者创面培养菌群分布和耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(6):121-122.
Geng B, Liu P, Mei YF. Population distribution and drug resistance analysis of microbials cultivated from 458 patients with burn wound[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(6):121-122.
- [10] Meisel A, Smith CJ. Stroke: Preventive antibiotics for stroke-associated pneumonia[J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(12):672-673.

收稿日期:2016-01-12

修回日期:2016-02-24