

慢性感染临床微生物样本中持留菌的特性研究*

秦 琴,王 慧,庄绪冉,吴林洪,李 虎,王 靖,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 了解慢性感染患者微生物样本中持留菌的持留特性,明确持留菌与感染时间及抗生素之间的关系。方法 将41株持留菌分离株(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)置于不同抗生素种类和浓度($10\times\text{MIC}$, $50\times\text{MIC}$ 和 $100\times\text{MIC}$)以及营养不足的生长条件下,通过其在各环境中的特异性生长曲线分析其持留水平。结果 随着抗生素浓度增加,持留菌比例逐渐下降,抗生素浓度到达100MIC其基本可以将持留菌全部清除;同一株持留菌对不同抗生素的持留水平不同,其中大肠埃希菌对头孢噻肟的持留水平最低,肺炎克雷伯菌对环丙沙星的持留水平最低,铜绿假单胞菌对左氧氟沙星的持留水平最低,金黄色葡萄球菌对亚胺培南的持留水平最低;持留菌对于营养不足的生长条件耐受明显要高于对照株(存活率 10^{-3} : 10^{-6} , $P<0.05$);用独立样本的单因素方差分析同一患者不同感染时期持留菌的持留水平差异没有统计学意义($P>0.05$)。结论 持留株对不同种类和浓度的抗生素具有不同的耐受能力。这为深入了解持留菌与慢性感染的关系、持留菌在临床中的不同持留特性提供了重要信息。

关键词:持留菌;抗生素种类;抗生素浓度;感染时间

中图分类号:R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)05-005-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.002

Characteristics of Persisters Isolated from Chronic Infected Patients

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

(Department of Clinical Laboratory Diagnostics,

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

Abstract: **Objective** To investigate the characteristics of persisters isolated from the chronic infected patients and clarify the relationship between the infection time and persistence as well as antibiotic drugs, so as to provide scientific basis for clinical effective measures to prevent, control and treatment of persister-associated chronic infection. **Methods** The tolerant ability of the 41 persisters (4 strains of *Escherichia coli*, 23 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 8 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and 6 strains of *Staphylococcus aureus*) under different kind and concentration of antibiotics and nutritional deficiencies conditions were detected. In addition, analysis of the homologous strains isolated from the same patients with different infection time was performed. **Results** The study found that with the increase of concentration of antibiotics, the proportion of persisters would gradually decrease. The tolerance ability of the same persister strain to different antibiotics was dissimilar, and different species persisters also had various tolerance ability to the same kind of antibiotics. Persisters were more able to withstand the lack of nutrition. What's more, there is no significant difference between the resistant ability of the homologous strains isolated from the same patients with different infection time ($P>0.05$). **Conclusion** Persisters have different ability to stand the kill of different kinds and concentration of antibiotics and they can even be completely removed when exposed to sufficiently high concentrations of antibiotic.

Keywords: persister; types of antibiotics; lewis concentration of antibiotics; infection duration

持留菌(persisters)是细菌种群中所占比例(0.001%~0.1%)很少的一类特殊亚群,具有与种群内普通菌、抗性突变菌所不同的特征。持留菌的存在与细菌的潜在感染、生物被膜的多重耐药性,特别是慢性感染之间存在着密切的关系^[1~3],研究证明^[4]慢性感染复发与持留菌之间具有直接关系。

课题组在前期的工作中通过对我院2013年1月~2014年12月共14216份临床微生物样本进行回顾性分析,分离鉴定了41株慢性感染持留菌变异菌株(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)。为了进一步深入的对分离到的持留菌进行研究,明确其与

* 基金项目:国家自然科学基金(81202353,81273282,81300748),军队科研基金(BWS14J023),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。

感染时间及抗生素用药之间的关系,从而为临床采取有效措施预防、控制和治疗持留菌所引起慢性感染提供合理依据,我们对41株持留分离株进行持留特性研究,观察其在不同种类抗生素、不同浓度抗生素、营养不足条件下的生长情况,以及随着感染时间延长,持留菌持留水平的变化情况。

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,引物用 Invitrogen 公司合成,MLST 分析测序由华大基因完成。

1.2 方法

1.2.1 持留菌对抗生素用量及种类的耐受能力检测:分别用 $10\times\text{MIC}$, $50\times\text{MIC}$, $100\times\text{MIC}$ 的环丙沙星检测 35 株革兰阴性菌持留株(大肠埃希菌 4 株、肺炎克雷伯菌 23 株、铜绿假单胞菌 8 株)的抗生素耐受能力^[5],计数抗生素作用 3 h 后菌液中持留菌浓度(CFU/ml);同样, $10\times\text{MIC}$, $50\times\text{MIC}$, $100\times\text{MIC}$ 的氨苄西林则用于检测 6 株金黄色葡萄球菌持留株的抗生素抗性。另外,研究分析革兰阴性菌大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌

对环丙沙星、头孢呋辛、头孢噻肟、左氧氟沙星、卡那霉素、四环素等不同抗生素种类的耐受能力是否有差异,抗生素浓度为 $10\times\text{MIC}$ 。

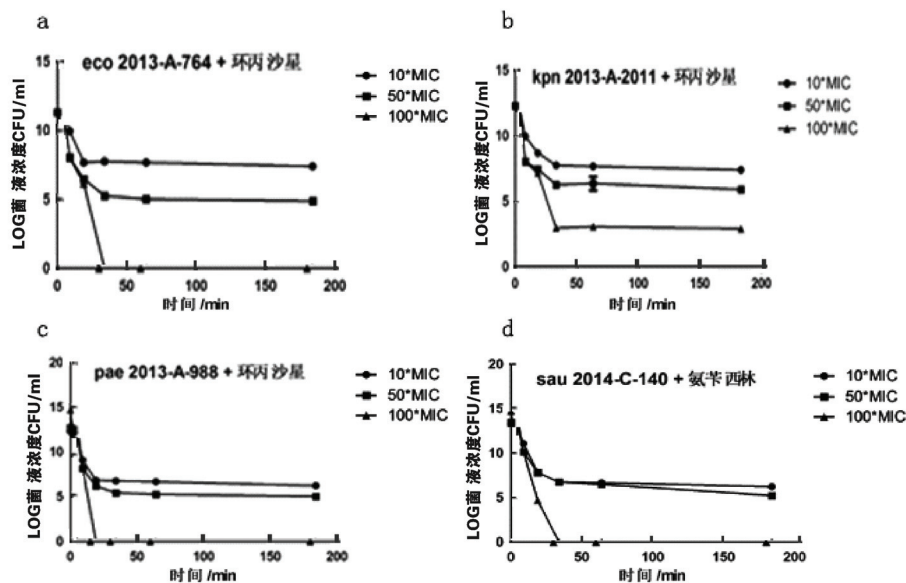
1.2.2 持留菌在营养不足条件下的耐受力:将细菌培养至静止生长期后,延长培养时间至 72 h,并计算菌群中持留菌所占比例($C_{t=72\text{h}}/C_{t=0}$),比较不同持留株在营养不足条件下的存活状况。

1.2.3 MLST 分型:采用 MLST 分型通用引物(<http://www.mlst.net/>),PCR 反应中大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌各组基因的退火温度分别为 58, 56, 55, 58℃。测序结果用 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer 进行序列分析,并将各样本的 7 个等位基因序列上传到网站 <http://pubmlst.org/>和 <http://www.pasteur.fr/mlst/>,以确定各菌株的序列类型(sequence type, ST)。该部分实验由华大生物公司协助完成。

1.3 统计学分析 采用 SPSS17.0 for windows 进行统计学分析,计量资料采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示,数据满足正态分布及方差齐性,两组资料的比较采用配对 t 检验,多组资料之间的比较采用独立样本的单因素方差分析;两样本率、多个样本率之间的比较用 χ^2 检验,水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 持留菌对抗生素用量的耐受能力 见图 1。分别用 $10\times\text{MIC}$, $50\times\text{MIC}$, $100\times\text{MIC}$ 的环丙沙



注:图 1a~c 为大肠埃希菌持留株、肺炎克雷伯菌持留株以及铜绿假单胞菌持留株在 $10\times\text{MIC}$, $50\times\text{MIC}$, $100\times\text{MIC}$ 的环丙沙星作用下的生长曲线。图 1d 为金黄色葡萄球菌持留株在 $10\times\text{MIC}$, $50\times\text{MIC}$, $100\times\text{MIC}$ 的氨苄西林作用下的生长曲线。

图 1 持留菌对抗生素用量的耐受能力

星检测 35 株革兰阴性菌持留株(大肠埃希菌 4 株、肺炎克雷伯菌 23 株、铜绿假单胞菌 8 株)以及 $10 \times \text{MIC}$, $50 \times \text{MIC}$, $100 \times \text{MIC}$ 的氨苄西林检测 6 株金黄色葡萄球菌持留株的抗生素耐受能力。结果显示,随着抗生素浓度的升高,持留菌的比例将逐渐下降,而抗生素深度到达一定值时甚至可以将持留菌全部清除。

2.2 持留菌对不同种类抗生素($10 \times \text{MIC}$)的耐受能力 见图 2。持留菌对不同抗生素均有耐受能力,具有多药耐药的表型,分别用环丙沙星、头孢呋辛、头孢噻肟、左氧氟沙星、卡那霉素、四环素等作用于大肠埃希菌持留株,但对不同抗生素的持留水平不同,其中大肠埃希菌对头孢噻肟的持留水平最低,肺炎克雷伯菌对环丙沙星的持留水平最低,铜绿假单胞菌对左氧氟沙星的持留水平最低。

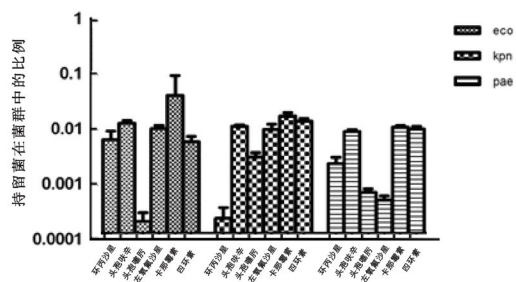


图 2 大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌持留菌株对不同抗生素的耐受能力

2.3 持留菌在营养不良条件下的耐受能力 见图 3。将细菌培养至静止生长期后,继续培养 72 h,制造营养不足、代谢废物堆积的生长环境,以各菌种的标准菌株为敏感对照,计算 $C_{t=72\text{h}}/C_{t=0}$ 的比值确定细菌最终存活率。各菌种持留菌在 72 h 后的存活率明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

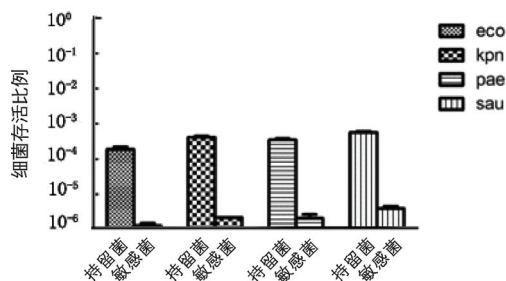


图 3 持留菌在营养不良条件下的耐受能力

2.4 不同感染时期持留菌持留水平的变化 见图 4。本课题筛选得到的持留菌样本中,有 12 例患者分离到的持留菌 ≥ 2 株,采用 MLST 分型对这 12 例患者样本中分离到的 28 株持留菌进行同源性分析。每组细菌的同源性相同,确定在同一患者的慢

性感染过程中,病原体是同一来源,没有发生二次感染。

通过对同一患者不同感染时期持留菌的持留水平进行比较,检测各分离株在 $10 \times \text{MIC}$ 抗生素条件下作用 3 h 后的存活比例(大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌持留株用 $10 \times \text{MIC}$ 环丙沙星处理,金黄色葡萄球菌用 $10 \times \text{MIC}$ 氨苄西林处理),并未发现统计学差异 ($P > 0.05$),感染前期后期,持留菌持留水平未见提高。

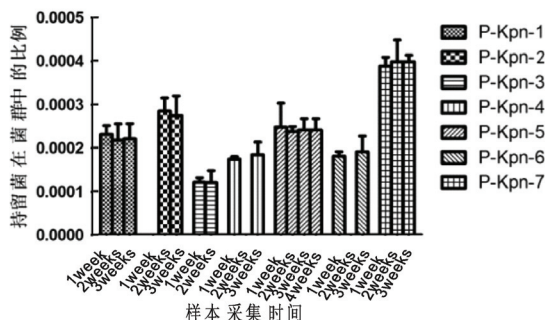
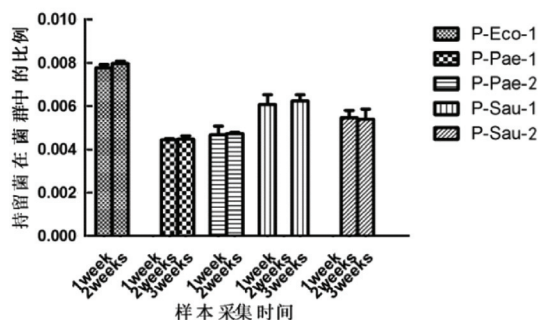


图 4 同一患者不同感染时期持留菌样本持留水平

3 讨论 菌群的持留水平主要通过菌落中持留菌所占的比例以及其对不同杀伤因素的耐受能力判定。课题组实验发现,同一株持留菌对不同抗生素的持留水平不同,而且在同种抗生素作用条件下,不同种类菌株的持留水平也不同,其中大肠埃希菌对头孢噻肟的持留水平最低,肺炎克雷伯菌对环丙沙星的持留水平最低,铜绿假单胞菌对左氧氟沙星的持留水平最低,金黄色葡萄球菌对亚胺培南的持留水平最低。该结果对持留菌感染的临床用药具有一定的指导意义。Keren 等^[6]用 *E. coli* K12(AT984 dapAzde-264::Tn10)进行持留特性研究时发现,该菌株对氧氟沙星的持留水平比氨苄西林高,而 Spoering 等^[7]用 *E. coli* K12 野生型菌株进行相同实验时却得到相反的结果。对于本部分实验获得的持留菌持留水平数据,我们推测,各分离株的持留水平不同,可能是由患者感染时间长短及接受抗生素治疗时间不同所导致。

Mulcahy 等^[4]曾对囊性纤维病婴儿进行纵向

跟踪,时间长达8年,研究发现患者8年后痰样本中的持留菌水平明显高于研究初期痰样本的持留水平。为进一步分析持留菌感染时间与持留水平之间的关系,我们对12例有多株(≥ 2 个)持留菌分离株患者的样本进行了分析,而结果显示不同时间点分离到的同源持留菌持留水平无明显统计学差异($P>0.05$)。该结果可能是因为每位患者的样本量过少造成的,本课题进行样本筛选采用的是回顾性方法,且患者由于住院时间限制,又缺乏出院后的随访,因此每位患者筛选得到的样本量最多只有4株,样本采集时间前后跨度不超过2个月,在短时间内,菌群的持留水平可能尚未得到有效提高。我们将在后期的研究中进一步加大样本数量和延长样本分离时间跨度,对这一部分研究进行补充。

目前国内对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研究分析。本研究在前期对于临床慢性感染持留菌株分离的基础上,进一步对这些持留变异株在不同种类和浓度的抗生素、营养不足的生长条件下以及不同的感染时间持留水平进行了研究,为深入了解持留菌与慢性感染的关系、持留菌在临床中的不同持留特性提供了重要的信息,

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。

参考文献:

- [1] Lewis K. Persister cells[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64(1): 357-372.
- [2] Lafleur MD, Qi Q, Lewis K. Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1): 39-44.
- [3] Edmiston CE, McBain AJ, Roberts C, et al. Clinical and microbiological aspects of biofilm-associated surgical site infections [J]. Adv Exp Med Biol, 2015 (830): 47-67.
- [4] 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.
- [5] Kaldalu N, Joers A, Ingelman H, et al. T. A general method for measuring persister levels in *Escherichia coli* cultures[J]. Methods Mol Biol, 2016 (1333): 29-42.
- [6] Keren I, Mulcahy LR, Lewis K. Persister eradication: lessons from the world of natural products[J]. Methods Enzymol, 2012(517): 387-406.

收稿日期:2016-01-12

修回日期:2016-03-15

(上接4页)“药品质量保证世界卫生组织合作中心”质量管理遵循了这些规范及相关的技术指导原则,在我国现有的 CNAS-CL01 基础上,补充了相关规则。目前,我们对有关体外诊断技术和产品质量评价 WHO CC 的质量管理体系了解的较少。

3.3 解决方案 ①关注亚太地区,促进区域发展。西太平洋地区的澳大利亚 WHO CC 距离亚太地区较远,同时经济和社会情况与亚太地区差别也很大,而菲律宾 WHO CC 也只是疟疾快检试剂的质量评价,对于 WHO 关注的艾滋、结核、肝炎、梅毒等传染病检测试剂质量评价,在亚太地区还没有 WHO CC。我们应该发挥我国诊断产业发展迅速的优势,我国体外诊断产业不论在先进的检验方法,还是简便易行的快检技术,都有一定的积累,也有很多产品及对产品质量控制的经验,应多创造机会介绍中国模式和经验,采取积极参与的方针,发挥地区中的作用。②以建立 WHO CC 为契机,提高监管技术能力。我国在发展体外诊断技术、促进体外诊断产业发展的监管过程中积累了丰富的经验,尤其作为监管的技术支撑部门,应梳理总结这些经验教训并进行传播,与面临类似挑战的国家分享。同时,通过加强合作交流,充分利用 WHO 的

经验和资源,深入了解国际机制,参与 WHO 全球规划总体框架,积极拓展合作领域、合作渠道和资金来源,丰富合作内容。同时注意对国际合作项目实施中的先进经验学习和推广,使其产出更大的效益。③完善质量管理体系,与国际接轨。促进 WHO CC 发展的关键是严格审批和持续管理。WHO 在指定 CC 时关注的是技术能力,从申请、管理等方面要求严格、过程严肃、公正评价,因此充分保障了合作中心高水平和技术上可信赖。我们应该以建立 WHO CC 为契机,通过多种形式交流学习,提升实验室人员能力,完善质量管理体系,与国际接轨。

4 结论 通过建立 WHO CC,加强技术及管理的国际交流合作,将对我国体外诊断试剂检测能力提升,加快与国际水平接轨有积极促进作用。

参考文献:

- [1] WHO Collaborating Centres Database Portal[OL]. <http://apps.who.int/whocc/>.
- [2] WHO Guide for WHO collaborating centres[OL]. <http://www.who.int/collaborating-centres/information/en/>.

收稿日期:2016-03-31

修回日期:2016-07-25