

- [8] 王美玲,李燕,罗丹,等.早发型重度子痫前期合并胎儿生长受限期待治疗的妊娠结局分析[J].中国妇幼保健,2016,31(14):2810-2812.
- [9] 王芳,潘展鹏,卢晓声,等.早发型重度子痫前期终止妊娠时机和分娩方式的探讨[J].中国妇幼保健,2015,30(32):5546-5548.
- [10] 刘爽,孙丽娟,吴青青.超声心动图评价早发型重度子痫前期孕妇左心室收缩功能研究[J].北京医学,2015,37(7):650-653.
- [11] 朱锦明,李蕾,李敏,等.早发型重度子痫前期孕妇血浆及胎盘组织中血栓调节蛋白的表达[J].中华妇产科杂志,2015,50(10):752-756.
- [12] 张娜娜,吕英璞,杨石芳,等.早发型重度子痫前期分娩前后 Th1/Th2 及 CD28+/CTLA-4+ 的相关研究[J].中国妇幼保健,2016,31(12):2553-2555.
- [13] 刘琼,卫家芬,徐晓锋.定期产检对早发型重度子痫前期母婴结局的影响[J].医学临床研究,2016,33(4):784-786.
- [14] 袁新华.不同孕周早发型重度子痫前期待治疗与围生结局的相关性[J].中外医学研究,2016,14(3):105-107.
- [15] 胡建文,杨娜.孕早,中期血清 TSP-1 表达对预测子痫前期发生的价值研究[J].中国妇幼卫生杂志,2014(3):45-46.
- [16] 张永兴.血小板反应蛋白 1/2 及其类似物调节血管化的分子基础和临床应用进展[J].医学综述,2016,22(9):1669-1673.
- [17] 刘其伟,刘云霞,崔连群.含血小板凝血酶敏感蛋白的解聚蛋白样金属蛋白酶-1 水平的检测及临床意义[J].临床心血管病杂志,2011,27(6):433-436.
- [18] 张亦弛.ADAMTS13 活性与先兆子痫患者凝血障碍的相关性分析[J].世界临床医学,2017,11(2):127,130.

(收稿日期:2017-12-26 修回日期:2018-02-16)

• 短篇论著 •

亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌临床菌株的影响

王助良

(北京市顺义区妇幼保健院检验科,北京 101300)

摘要:目的 探讨亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌临床菌株的影响。方法 收集该院表皮葡萄球菌临床菌株,按照临床实验室标准化协会推荐的方法进行药敏试验。采用免疫比浊法检测亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌增殖的影响,并采用结晶紫染色法检测亚抑菌浓度红霉素对其生物膜形成的影响。最后,利用实时荧光定量 PCR 检测亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌黏附基因表达的影响。结果 共收集 5 株临床分离表皮葡萄球菌,最低抑菌浓度分别为 16、32、16、64 和 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。亚抑菌浓度的红霉素(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对表皮葡萄球菌浮游菌的增殖无影响($P>0.05$),但能显著抑制其生物膜的形成($P<0.05$)。8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的红霉素还能显著抑制黏附基因 *icaA* 和 *icaD* 基因的表达($P<0.05$)。结论 亚抑菌浓度红霉素能抑制表皮葡萄球菌临床菌株生物膜的形成及黏附基因的表达。

关键词:亚抑菌浓度; 红霉素; 表皮葡萄球菌; 生物膜**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.15.033**中图法分类号:**R446.6**文章编号:**1673-4130(2018)15-1904-03**文献标识码:**B

表皮葡萄球菌是一种革兰阳性球菌,亦是一种常定植于人体皮肤表面的正常菌群。当有侵入性操作或机体免疫力下降时,常可引起机会性感染,已成为院内获得性感染的常见病原菌之一^[1]。其自身分泌毒力因子的能力弱,但能黏附于医疗器械表面(如中心静脉导管、人工心脏瓣膜和人工关节等)形成生物膜,随着侵入性操作的进行进而导致机会性感染^[1],增加患者的住院率和病死率。生物膜是细菌的群体存在形式,具有三维结构,与相应的浮游菌相比,可使细菌的耐药性极大的增加^[2]。因生物膜的物理屏障作用,常使到达生物膜内部的抗菌药物得到稀释,而亚抑菌浓度的抗菌药物往往难以有效杀灭细菌,甚至进一步促进其生物膜的形成^[3]。红霉素是一种常用的大环内酯类抗菌药物,临床上常用于治疗敏感菌革

兰阳性菌引起的感染。而亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌临床菌株的影响尚未完全阐明。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 30 株临床分离表皮葡萄球菌于 2017 年 1 月至 2017 年 5 月分离自本院住院患者的标本。同一患者不同时期分离的同种菌株只统计一次。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及药敏试验 细菌分纯培养后,通过 VITEK 全自动微生物鉴定系统进行鉴定。最低抑菌浓度(MIC)的分析按照临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的方法进行^[4]。并以铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为质控菌株。根据 MIC 试验结果,选取亚抑菌浓度红霉素 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行后续实验。

1.2.2 表皮葡萄球菌浮游菌增殖的检测 将菌株进

行两组不同的处理, LB 肉汤中加红霉素处理的设置为实验组, 用 LB 肉汤将红霉素母液稀释至 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并分别加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 过夜孵育的表皮葡萄球菌, 调节其浊度, 即酶标仪检测 600 nm 处的吸光度 (A_{600}) 至 0.03, 并于摇床 (37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min) 连续培养 16 h 后, 分别取 200 μL 菌悬液于酶标仪检测 A_{600} 。LB 肉汤中不加红霉素的设置为对照组, 其余处理与实验组相同。

1.2.3 表皮葡萄球菌生物膜的检测 用 LB 肉汤将红霉素母液稀释至 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别向 96 孔板中加入 195 μL /孔。再分别向每孔中加入 5 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 过夜摇菌孵育的表皮葡萄球菌。于湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 24 h, 弃去浮游菌, 用生理盐水漂洗 3 遍, 再向每孔中再分别加入 200 μL 1% 的结晶紫溶液, 静置染色 15 min。再用生理盐水洗去未与细菌结合的结晶紫溶液, 晾干后, 分别加入 200 μL 95% 乙醇溶液, 并于酶标仪检测 570 nm 处的 A_{570} ^[5]。

1.2.4 表皮葡萄球菌黏附基因表达量的检测 表皮葡萄球菌用含 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或不含红霉素的 LB 肉汤于摇床 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 摇菌孵育 16 h 后, 按照试剂说明书提取细菌总 RNA, 并用逆转录试剂盒将其转化为 cDNA 后, 按照试剂盒说明书进行 qPCR 检测。所用引物序列见表 1^[6]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析, 方差齐的两独立样本以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MIC 30 株临床分离表皮葡萄球菌的 MIC 范围在 16~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 亚抑菌浓度红霉素对浮游菌增殖无抑制作用 表皮葡萄球菌浮游菌的增殖通过检测其生长浊度, 即 A_{600} 来反映。由表 2 可知, 亚抑菌浓度的红霉素 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 30 株临床分离表皮葡萄球菌浮游菌的增殖无影响, 实验组和对照组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

表 1 表皮葡萄球菌黏附素相关基因引物

检测目标	引物	序列(5'至 3')	产物大小 (bp)
icaA	正向	ACA CTT GCT GGC GCA GTC AA	188
	反向	TCT GGA ACC AAC ATC CAA CA	
icaD	正向	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198
	反向	AGT ATT TTC AAT GTT TAA AGC AA	
16S rRNA	正向	GGG CTA CAC ACG TGC TAC AA	176
	反向	GTA CAA GAC CCG GGA ACG TA	

2.3 亚抑菌浓度红霉素抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成 表皮葡萄球菌生物膜的形成通过结晶紫染色进行半定量分析, 通过检测 A_{570} 来反映。亚抑菌浓度

的红霉素 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 能显著抑制 30 株临床分离表皮葡萄球菌生物膜的形成 (均 $P < 0.05$), 见表 3。

表 2 分组处理的 30 种表皮葡萄球菌 A_{600} 的检测情况 ($\bar{x} \pm s, n=30$)

分组	A_{600}
对照组	1.105 \pm 0.074
实验组	1.087 \pm 0.063
t	0.323
P	> 0.05

表 3 分组处理的 30 种表皮葡萄球菌 A_{570} 的检测情况 ($\bar{x} \pm s, n=30$)

分组	A_{570}
对照组	1.432 \pm 0.104
实验组	0.748 \pm 0.096
t	5.297
P	< 0.01

2.4 亚抑菌浓度红霉素抑制表皮葡萄球菌黏附基因的表达 亚抑菌浓度的红霉素 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 能显著抑制表皮葡萄球菌黏附基因 *icaA* ($P < 0.01$) 和 *icaD* ($P < 0.01$) 基因的表达。见表 4。

表 4 亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌黏附基因表达的影响

分组	<i>icaA</i> (%)	<i>icaD</i> (%)
对照组	100 \pm 4.82	100 \pm 5.18
实验组	63.26 \pm 2.37	63.69 \pm 6.28
t	13.190	8.421
P	< 0.01	< 0.01

3 讨 论

本研究通过比浊法检测了亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌浮游菌增殖的影响。并通过 96 孔板体外构建了表皮葡萄球菌生物膜模型, 进一步探讨了亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌生物膜形成的影响。还利用实时荧光定量 PCR 技术检测了亚抑菌浓度红霉素对表皮葡萄球菌黏附素相关基因的影响。

随着抗菌药物的不合理使用, 亚抑菌浓度抗菌药物诱导的细菌耐药性增加已成为当代研究的热点。有报道发现, 亚抑菌浓度的阿奇霉素和克拉霉素能够抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成^[7]; 四环素还可通过抑制生物膜形成相关基因的表达而抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成^[8]; 此外, 亚抑菌浓度的利福平也能体外抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成^[9]。本研究发现亚抑菌浓度的红霉素也能抑制表皮葡萄球菌生物膜的形成, 这与前期研究报道的结果相似。但亚抑菌浓度的红霉素对浮游菌的增殖并无影响。

除菌体本身外, 生物膜的胞外基质主要包括胞外

多糖、胞外蛋白质和胞外 DNA^[10]。表皮葡萄球菌的胞外多糖主要成分是细胞间多糖黏附素(PIA),PIA 主要由 ica 操纵子基因进行调控,其分泌量与 ica 基因的表量呈正相关^[11]。ica 操纵子由基因簇 icaA、icaB、icaC 和 icaD 基因组成,其表达水平受到 icaR 基因的调控^[12]。此外,群体密度感应系统是生物膜内部细菌的通讯系统,能精确调节细菌生物膜的生理周期^[13]。群体密度感应系统主要包括自诱导信号分子,信号受体、相关通路和靶基因等成分组成。细菌自身分泌信号分子称为自诱导信号分子,当这些信号分子的浓度在生物膜内部不断累积,超过一定的阈值时,能与相应的受体结合,通过信号通路,抑制或促进靶基因的表达,从而调控生物膜的形成和分散^[14]。有研究发现,表皮葡萄球菌的群体密度感应系统 agr 和 luxS 在接受到信号分子的刺激后,可通过信号通路的级联放大效应调节 ica 基因的表达,从而通过调控 PIA 的形成而调节其生物膜的形成^[15]。本研究发现亚抑菌浓度的红霉素能抑制 ica 基因的表达,这可能是亚抑菌浓度的红霉素能干扰表皮葡萄球菌的群体密度感应系统的正常生理功能而抑制 ica 基因的表达,从而抑制其生物膜的形成。

4 结 论

亚抑菌浓度的红霉素虽然对表皮葡萄球菌浮游菌的增殖并无显著影响,但能通过抑制 ica 基因的表达而抑制其生物膜的形成。在临床治疗表皮葡萄球菌引起的感染时,应根据药敏实验结果,合理使用抗菌药物,避免亚抑菌浓度的抗菌药物形成。

参考文献

- [1] GOMES F, TEIXEIRA P, OLIVEIRA R. Mini-review: Staphylococcus epidermidis as the most frequent cause of nosocomial infections; old and new fighting strategies[J]. Biofouling, 2014, 30(2): 131-141.
- [2] FEY P D, OLSON M E. Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis[J]. Future Microbiol, 2010, 5(6): 917-933.
- [3] KOUIDHI B, QURASHI Y M, CHAIEB K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment[J]. Microb Pathog, 2015, 80(1): 39-49.
- [4] HATHROUBI S, FONTAINE-GOSSELIN S E, TREMBLAY Y D, et al. Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of Actinobacillus pleuropneumoniae[J]. Vet Microbiol, 2015, 179(3/4): 277-286.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S25 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.
- [6] AKA S T, HAJI S H. Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa in the presence of chlorhexidine[J]. Braz J Microbiol, 2015, 46(1): 149-154.
- [7] ARGUDN M A, VANDERHAEGHEN W, VANDENDRIESSCHE S. Biofilm formation of ica operon-positive Staphylococcus epidermidis from different sources[J]. AP-MIS, 2015, 123(12): 1081-1089.
- [8] HE H J, SUN F J, WANG Q, et al. Erythromycin resistance features and biofilm formation affected by subinhibitory erythromycin in clinical isolates of Staphylococcus epidermidis[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2016, 49(1): 33-40.
- [9] RACHID S, OHLSEN K, WITTE W, et al. Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming Staphylococcus epidermidis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(12): 3357-3363.
- [10] SZCZUKA E, KAZNOWSKI A. Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against Staphylococcus epidermidis in biofilm[J]. Folia Microbiol, 2014, 59(4): 283-288.
- [11] NADELL C D, DRESCHER K, WINGREEN N S, et al. Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms[J]. ISME J, 2015, 9(8): 1700-1709.
- [12] O'GARA J P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus[J]. FEMS Microbiol Let, 2007, 270(2): 179-188.
- [13] WU Y, LIU J, JIANG J, et al. Role of the two-component regulatory system arlRS in ica operon and aap positive but non-biofilm-forming Staphylococcus epidermidis isolates from hospitalized patients[J]. Microbial Pathogenesis, 2014, 76(1): 89-98.
- [14] SINGH R, RAY P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance[J]. Future Microbiol, 2014, 9(5): 669-681.
- [15] LE K Y, OTTO M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview[J]. Front Microbiol, 2015, 6(10): 1174.

(收稿日期:2017-12-20 修回日期:2018-03-13)