

• 论 著 •

共培养状态下金黄色葡萄球菌对铜绿假单胞菌多重耐药性的影响

张圆圆, 陈 坤

东南大学附属中大医院江北院区检验科, 江苏南京 210048

摘 要:**目的** 探讨共培养状态下金黄色葡萄球菌对铜绿假单胞菌多重耐药性的影响。**方法** 选择 2021 年 9 月至 2022 年 9 月该院收集的 153 例标本,使用血平板进行细菌的分离。将分离细菌以 1 : 1 的比例共培养后,测试其对 10 种抗菌药物混合物(阿米卡星、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林、氨曲南、米诺环素、环丙沙星、左氧氟沙星、甲氧苄啶)的耐药性。以 1 : 0、1 : 0.1、1 : 0.2、1 : 0.5、1 : 1、1 : 2、1 : 5、1 : 10 这 8 种比例共培养,培养方式为产生生物膜的静置培养或摇菌培养,随后使用 10 种抗菌药物进行耐药性的测试,并检测铜绿假单胞菌关键耐药基因 FosA、AmpC β -内酰胺酶(AmpC)和 APH(3')-II b 的表达水平。**结果** 153 例标本共分离出细菌中比例超过 10% 的有 6 种,如:表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌。金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌共培养可以显著提升对抗菌药物混合物的耐药性($P<0.05$)。产生生物膜的静置培养或摇菌培养时,1 : 1 共培养比例均能提升细菌对这 10 种抗菌药物的耐药性。金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌共培养后,无论是产生生物膜的静置培养还是摇菌培养,这 10 种抗菌药物单独处理后均能限制提升 FosA、AmpC 和 APH(3')-II b 的表达水平($P<0.05$)。**结论** 金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌共培养后,铜绿假单胞菌耐药基因 FosA、AmpC 和 APH(3')-II b 的表达水平上升,显著增强其多重耐药性。

关键词:金黄色葡萄球菌; 铜绿假单胞菌; 多重耐药性; FosA; AmpC β -内酰胺酶; APH(3')-II b

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.22.020 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2023)22-2796-05 **文献标志码:**A

Effect of multi-drug resistance of *Staphylococcus aureus* on *Pseudomonas aeruginosa* under co-culture condition

ZHANG Yuanyuan CHEN Kun

Department of Laboratory, Jiangbei Hospital of the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210048, China

Abstract:**Objective** To investigate the effect of multi-drug resistance of *Staphylococcus aureus* to *Pseudomonas aeruginosa* under co-culture condition. **Methods** One hundred and fifty-three specimens collected by Jiangbei Hospital of the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University from September 2021 to September 2022 were collected and the bacteria were isolated using blood plates. The isolated bacteria were co-cultured at a ratio of 1 : 1 and tested for their resistance to a mixture of 10 antibiotics (amikacin, ceftazidime, imipenem, meropenem, piperacillin, aztreonam, minocycline, ciprofloxacin, levofloxacin, trimethoprim) resistance. Eight ratios of 1 : 0, 1 : 0.1, 1 : 0.2, 1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10 were co-cultured in biofilm-producing static or shaking cultures, followed by resistance testing using 10 antibiotics test and the expression levels of key resistance genes FosA, AmpC and APH(3')-II b of *P. aeruginosa* were examined. **Results** Of the 153 specimens with a total of 153 isolated bacteria, the percentage of which exceeded 10% were six species, as follows: *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The co-culture of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* significantly increased the resistance to the antibiotic mixture ($P<0.05$). When producing biofilm in static culture or shake culture, the ratio of 1 : 1 co-culture can improve the resistance of bacteria to these 10 antibiotics. After co-culture of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, both biofilm-producing static culture and shaking culture, these 10 antibiotics alone could limit elevated expression levels of FosA, AmpC and APH(3')-II b after treatment ($P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of *Pseudomonas aeruginosa* resistance genes FosA, AmpC and APH(3')-II b increased after co-culture of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, significantly enhancing

their multi-drug resistance.

Key words: *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; multi-drug resistance; FosA; AmpC; APH(3')-II b

铜绿假单胞菌是目前最重要的鼻腔内病原体之一^[1]。此外,这种微生物是囊性纤维化患者和慢性阻塞性肺部疾病患者慢性感染的一个普遍原因^[2]。铜绿假单胞菌能在不同栖息地成功定植主要依赖于其代谢的多样性和稳健性^[3]。此外,这种细菌病原体在其核心基因组中藏有大量毒力决定因素,使其能够定植/感染各种宿主,从单细胞生物到人类。然而,这些不仅仅是在医院感染患者所需的唯一条件^[4]。考虑到受感染的患者经常接受抗菌药物治疗,还需要有避免抗菌药物作用的能力。在这个意义上,铜绿假单胞菌对目前用于治疗的几种抗菌药物表现出特有的低敏感性。事实上,铜绿假单胞菌在感染期间可能存在与其他细菌共感染的情况,并且可能面临的条件或化合物诱导内在抗性基因的表达,会影响抗菌药物治疗这种感染的效果^[5]。此外,在囊性纤维化患者的肺部、假体或导管中经常遇到的铜绿假单胞菌生物膜,对抗菌药物的敏感性很低,与顽固性和疾病恶化有关。基于此,本研究旨在探讨共培养状态下金黄色葡萄球菌对铜绿假单胞菌多重耐药性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 血平板购自上海朝瑞生物科技有限公司(货号:024070)。BHI 培养基购自北京克必隆分子诊断技术有限公司(货号:23-0215)。MTT 试剂购自广州德为生物科技有限公司(货号:B7777-500)。Amikacin 购自北京欣盛百泰科技有限公司(货号:39831-55-5)。ceftazidime 购自深圳市文乐生物科技有限公司(货号:B3539-1g)。imipenem 购自上海陶术生物科技有限公司(货号:T1505-25)。meropenem 购自上海皓元生物医药科技有限公司(货号:HY-13678A)。piperacillin 购自中山市铭顺生物科技有限公司(货号:HY-B1286)。aztreonam 购自上海陶术生物科技有限公司(货号:T1029-1)。minocycline 购自广州创融生物科技有限公司(货号:S4226)。ciprofloxacin 购自创融科技(广州)有限公司(货号:GC13550)。levofloxacin 购自北京奇松生物科技有限公司(货号:QS81005261)。trimethoprim 购自广州创融生物科技有限公司(货号:S3129)。TRIzol 试剂购自上海玻尔化学试剂有限公司(货号:B645504)。Prime Script™ RT Master Mixture 购自 Takara 公司(货号:RR036Q)。SYBR Prime Script miRNA RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司(货号:H351A)。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离与培养 选择 2021 年 9 月至 2022

年 9 月本院收集的 153 例标本,包括痰、咽拭子、血液送检标本。使用血平板进行细菌的分离,步骤如下:将标本不同比例稀释后涂布于血平板中,将血平板置于 37 ℃ 培养箱共培养 3 d,3 d 内每天挑取单克隆于 BHI 培养基中培养,随后将菌液进行 16S 测序,将测序结果比对 NCBI 典型菌株库。分离得到的表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌均使用 BHI 培养基在 37 ℃ 下进行培养。

1.2.2 生物膜细菌抑制实验 细菌接种到 BHI 培养基中进行过夜培养,并在新鲜培养基中稀释到 1×10^7 CFU/mL。生物膜在 96 孔聚苯乙烯微孔板中培养。在无菌平底 96 孔聚苯乙烯微孔板的每个孔中加入 100 μ L 稀释的细菌培养物,并在 30 ℃ 下培养 24 h。对于生物膜根除试验,将微孔板在 30 ℃ 下培养 24 h,以使生物膜形成。然后将已建立的生物膜在 30 ℃ 下补充了所示抗菌药物的 BHI 中培养。生物膜中的细胞存活率通过 MTT 试验进行评估。所有的试验都是在每个处理的 6 个重复中进行的,所有的试验都进行了 3 次。

1.2.3 浮游细菌抑制试验 将 BHI 培养基中 4 mL 的细菌(10^5 CFU/mL)与所示的抗菌药物的连续稀释液在 30 ℃ 下振荡培养 24 h。之后,将细胞悬浮液铺在 MRS 平板上,在 30 ℃ 下培养 24 h。随后通过 MTT 试验进行评估。所有的试验都是在每个处理的 6 个重复中进行的,所有的试验都进行了 3 次。

1.2.4 RNA 抽取与实时荧光定量 PCR 使用 TRIzol® 试剂提取总 RNA,并使用 Prime Script™ RT Master Mixture 合成 cDNA。使用 SYBR Prime Script miRNA RT-PCR 试剂盒来检测和定量相应基因的表达,以 GAPDH 为内参进行标准化,引物列表见表 1。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 统计学软件进行。两组比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分离细菌共培养对多重耐药性的影响 153 例标本共分离出细菌中比例超过 10% 的有 6 种:表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌,见表 2。将这 6 种细菌以 1 : 1 的比例共培养后,测试其对 10 种抗菌药物混合物(抗菌药物种类和混合后的浓度见表 3)的耐药性,发现金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌共培养可以显著提升对抗菌药物混合物的耐药性($P < 0.05$),见图 1。

表 1 引物序列

基因	正向引物序列	反向引物序列
FosA	5'-CGT TCT ACT TCC TCG ACC CG-3'	5'-CGA AAC GCA TTC CCG CAT AG-3'
AmpC	5'-CCG TAG CCA TCA GCC TGA AA-3'	5'-GTG AAG GTC TTG CTC ACC GA-3'
APH(3')-Ⅱ b	5'-GCT GGC GTA CTT CAG GCT AT-3'	5'-GCC GTT GTA CCT CGT TTT CG-3'
GAPDH	5'-ATG GGC AAT ACG GTG GTG TT-3'	5'-TGA CGT TGA TCA CTC CTG GC->3'

表 2 153 例标本分离细菌比例[n(%)]

细菌	病例占比
表皮葡萄球菌	36(23.53)
肺炎克雷伯菌	34(22.22)
鲍曼不动杆菌	31(20.26)
大肠埃希菌	24(15.69)
金黄色葡萄球菌	19(12.42)
铜绿假单胞菌	17(11.11)

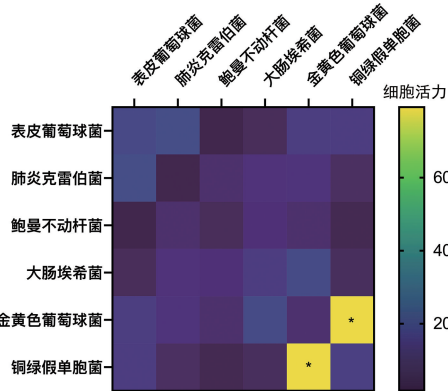
表 3 本研究所用的抗菌药物和相应功能

抗菌药物名称	分子靶标	终浓度(mg/L)
阿米卡星	细胞壁	2.0
头孢他啶	细胞壁	4.0
亚胺培南	细胞壁	0.5
美罗培南	细胞壁	0.5
哌拉西林	细胞壁	2.0
氨曲南	细胞壁	1.0
二甲胺四环素	蛋白质合成	1.0
环丙沙星	蛋白质合成	2.0
左氧氟沙星	蛋白质合成	1.0
甲氧苄氨嘧啶	叶酸生物合成	2.0

2.2 金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌不同比例共培养后对多重耐药性的影响 为了探讨金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌不同比例共培养后对多重耐药性的影响。使用 1 : 0、1 : 0.1、1 : 0.2、1 : 0.5、1 : 1、1 : 2、1 : 5、1 : 10 这 8 种比例共培养,随后使用 10 种

抗菌药物进行耐药性的测试,发现产生生物膜的静置培养时,1 : 0.5、1 : 1、1 : 2 共培养比例均能提升细菌对这 10 种抗菌药物的耐药性,比例为 1 : 1 时耐药性最高,见图 2A。当摇菌培养时,1 : 0.5 和 1 : 2 共培养比例能提升细菌对头孢他啶、哌拉西林、二甲胺四环素、甲氧苄-氨嘧啶这 4 种抗菌药物的耐药性,而 1 : 1 共培养比例均能提升细菌对这 10 种抗菌药物的耐药性,比例为 1 : 1 时耐药性最高,见图 2B。

2.3 金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌共培养后对耐药基因表达的影响 为了探讨金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌共培养对多重耐药性提升的潜在机制,本研究检测了铜绿假单胞菌关键耐药基因 FosA、AmpC 和 APH(3')-Ⅱ b 的表达水平,发现共培养后,无论是产生生物膜的静置培养还是摇菌培养,这 10 种抗菌药物单独处理后均能限制提升 FosA、AmpC 和 APH(3')-Ⅱ b 的表达水平($P<0.05$),见图 3。



注: $P<0.05$ 。

图 1 分离细菌共培养对多重耐药性的影响

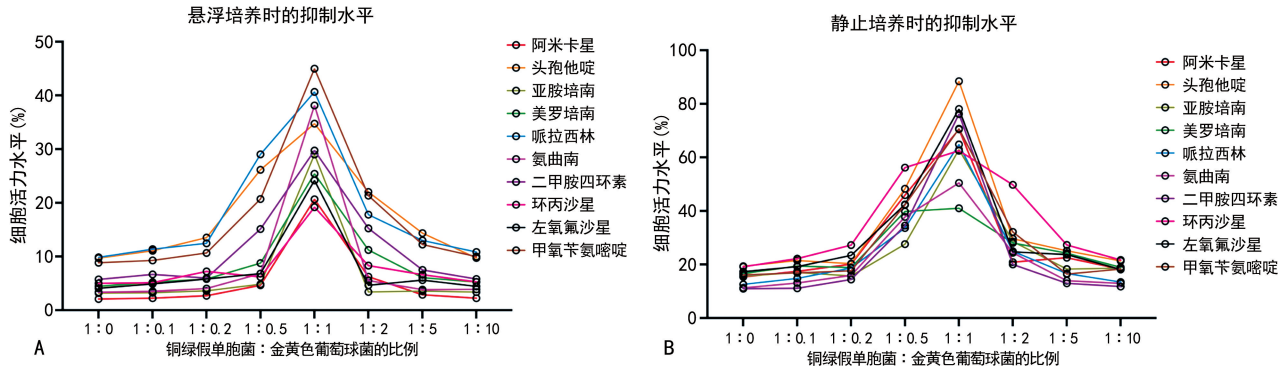


图 2 金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌不同比例共培养后对多重耐药性的影响

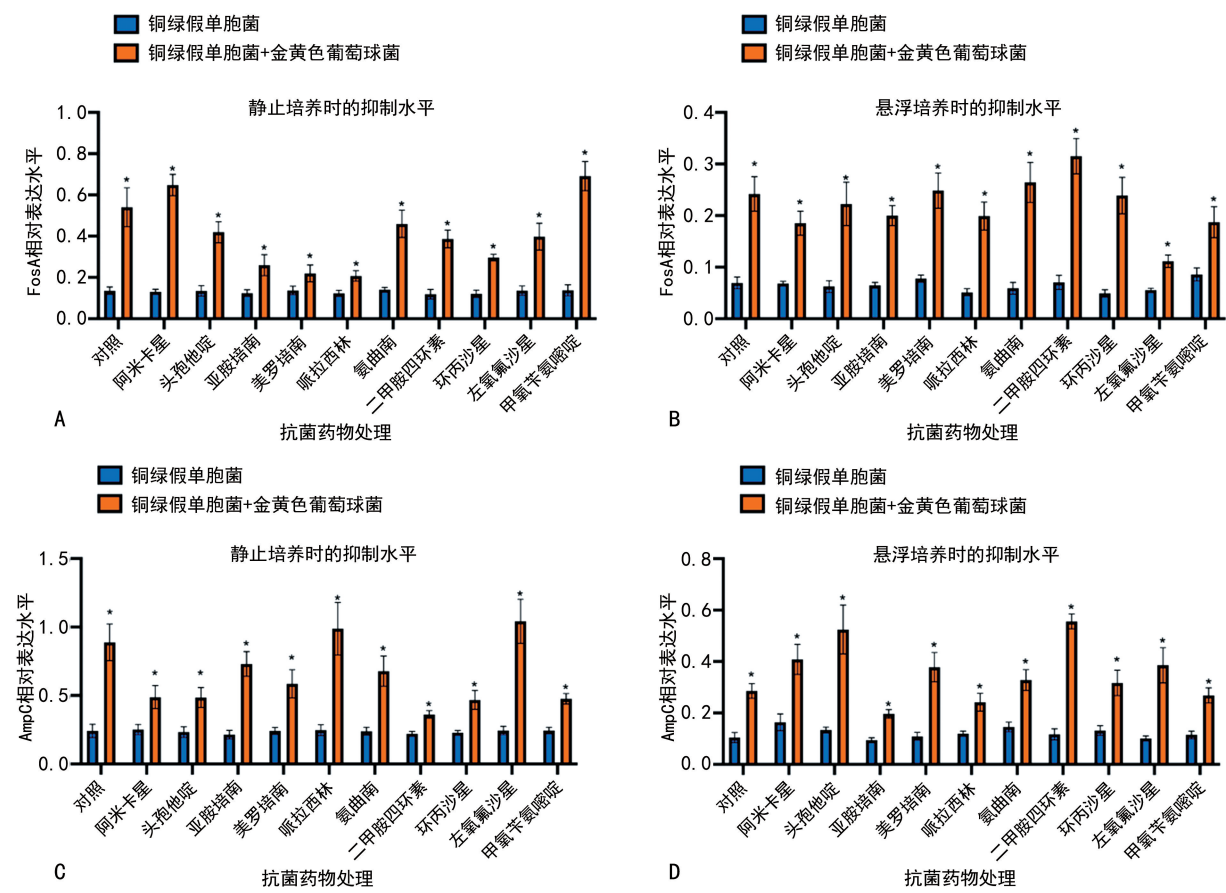


图 3 金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌共培养后对耐药基因表达的影响

3 讨 论

导致人类感染的细菌可以分为两类：一类是能够在任何人身上产生感染，不管他们的基本健康状况如何；另一类是只在身体虚弱的人身上引起感染^[6]。第一类可被视为“专业”病原体。第二类是由机会性病原体组成的，它们很少感染社区，但它们构成了医院感染的一个相关问题。在广泛使用抗菌药物之前，大多数机会性病原体是共生微生物组的成员^[7]。这些细菌能很好地适应与宿主组织接触但生活在宿主组织之外，不会引起健康问题；然而，它们转移到其他身体位置就会引起感染。一旦抗菌药物开始被广泛使用，第二类机会性病原体在医院里的流行程度就会增加^[8]。这一类由环境细菌组成，主要是非发酵性革兰阴性菌，对目前诊所使用的抗菌药物敏感性低^[9]。本研究从 153 例标本共分离出多重细菌，其中比例超过 10% 的有 6 种：表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌，均为机会性病原体。

铜绿假单胞菌能够定植于各种宿主，从单细胞生物到植物、线虫或人类^[10]。此外，它所具有的大多数毒力决定因素都在其核心基因组中编码，表明在铜绿假单胞菌成为人类健康问题之前，它们已经在自然界中进化了^[11]。有研究发现^[12]，抗菌药物进入的低膜渗透性在铜绿假单胞菌的内在抗菌药物耐药性中起

主要作用，是由大多数 OprF 孔蛋白的封闭构象状态造成的^[13]。导致铜绿假单胞菌对抗菌药物低敏感性的另一个因素是存在一组不同的抗菌药物修饰酶，如 FosA、AmpC 和 APH(3')-II b^[14]。本研究发现金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌共培养后，无论是产生生物膜的静置培养还是摇菌培养，这 10 种抗菌药物单独处理后均能限制提升 FosA、AmpC 和 APH(3')-II b 的表达水平($P < 0.05$)。

金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌共培养可以显著提升对抗菌药物混合物的耐药性($P < 0.05$)。相比于摇菌培养，产生生物膜的静置培养能够获得更高的多重耐药性。在临床实践中，微生物生物膜与持续的慢性感染密切相关^[15]。有研究表明^[16]，抗菌药物耐药性可以通过基因组变化或生物膜的形成获得。生物膜通常被定义为附着在表面或界面上的微生物群落，并产生细胞外基质，这些微生物被嵌入其中。有研究表明^[17]，抗菌药物无法促使生物膜灭绝，历史上被认为是由于这些药物在生物膜结构中的渗透性降低。然而，即使在生物膜基质中完全渗透的抗菌药物也无法杀死所有易感的生物膜细菌，这表明抗菌药物渗透性的降低并不能完全解释生物膜对抗菌剂的顽固性在真实的人体环境中，许多其他微生物物种的可能存在显然增加了多物种生物膜行为的复杂性，因为所有纳入的微生物都能够相互竞争、合作和交流，共

同形成了生物膜对抗菌药物的抗性。

综上所述,金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌共培养后,铜绿假单胞菌耐药基因 *FosA*、*AmpC* 和 *APH* (3′)-II b 的表达水平上升,显著增强其多重耐药性。

参考文献

[1] QIN S, XIAO W, ZHOU C, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (1):1-27.

[2] NASRIN S, HEGERLE N, SEN S, et al. Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection[J]. *BMC Microbiol*, 2022, 22(1):1-12.

[3] REZK N, ABDELSATTAR A S, ELZOGHBY D, et al. Bacteriophage as a potential therapy to control antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection through topical application onto a full-thickness wound in a rat model [J]. *J Genet En Biotechnol*, 2022, 20(1):1-16.

[4] LABORDA P, MARTÍNEZ J L, HERNANDO-AMADO S. Convergent phenotypic evolution towards fosfomycin collateral sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic-resistant mutants[J]. *Microb Biotechno*, 2022, 15 (2): 613-629.

[5] NAMAKI M, HABIBZADEH S, VAEZ H, et al. Prevalence of resistance genes to biocides in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(3):2149-2155.

[6] RAHMAN M, ALAM M U, LUIES S K, et al. Contamination of fresh produce with antibiotic-resistant bacteria and associated risks to human health: a scoping review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(1):360.

[7] LARSSON D G, FLACH C F. Antibiotic resistance in the environment[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20 (5): 257-269.

[8] TSE SUM BUI B, AUROY T, HAUPT K. Fighting antibiotic-resistant bacteria: promising strategies orchestrated by molecularly imprinted polymers[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 134(8):e202106493.

[9] STRACY M, SNITSER O, YELIN I, et al. Minimizing treatment-induced emergence of antibiotic resistance in bacterial infections [J]. *Science*, 2022, 375 (6583): 889-894.

[10] AMIEVA R, GIL-GIL T, MARTÍNEZ J L, et al. The *mexJK* multidrug efflux pump is not involved in acquired or intrinsic antibiotic resistance in *pseudomonas aeruginosa*, but modulates the bacterial quorum sensing response[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14):7492.

[11] GRAMI E, SALHI N, SEALEY K S, et al. Siphoviridae bacteriophage treatment to reduce abundance and antibiotic resistance of *pseudomonas aeruginosa* in wastewater [J]. *Int J Env Sci Technol*, 2022, 19(4):3145-3154.

[12] MERCOLINO J, LO SCIUTO A, SPINNATO M C, et al. *RecA* and specialized error-prone DNA polymerases are not required for mutagenesis and antibiotic resistance induced by fluoroquinolones in *pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antibiotics*, 2022, 11(3):325.

[13] HERNANDO-AMADO S, LABORDA P, VALVERDE J R, et al. Mutational background influences *P. aeruginosa* ciprofloxacin resistance evolution but preserves collateral sensitivity robustness[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2022, 119 (15):e2109370119.

[14] GUO L, XU H, YUE Z. Antibiotic resistance pattern of *pseudomonas aeruginosa* wound isolates among chinese burn patients; a systematic review and meta analysis[J]. *Asian Pacific J Tropical Med*, 2022, 15(1):17.

[15] DONADU M G, FERRARI M, MAZZARELLO V, et al. No correlation between biofilm-forming capacity and antibiotic resistance in environmental *staphylococcus* spp. : in vitro results[J]. *Pathogens*, 2022, 11(4):471.

[16] CONWELL M, DOOLEY J S G, NAUGHTON P J. Enterococcal biofilm: a nidus for antibiotic resistance transfer? [J]. *J Appl Microbiol*, 2022, 132(5):3444-3460.

[17] SIONOV R V, STEINBERG D. Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(6):1239.

(收稿日期:2023-01-18 修回日期:2023-05-29)