

中图分类号: R965; R978.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)11-0033-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.11.007



活菌核酸微定量技术评价抗菌药物对胞内鲍曼不动杆菌感染的影响*

翁邦碧¹, 李玉良¹, 罗丹², 枉前^{1△}

(1. 中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院, 重庆 400038; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院, 云南昆明 650032)

摘要:目的 建立测定细胞内活菌含量的活菌核酸微定量技术, 考察临床常用抗菌药物对胞内鲍曼不动杆菌感染的影响。方法 采用抗菌药物-病原菌-上皮细胞共培养模型, 以改良叠氮溴化丙锭-实时荧光定量聚合酶链反应(PMA_{xx}-qPCR)法测定不同种类和不同浓度的抗菌药物对鲍曼不动杆菌侵袭人支气管上皮(HBE)细胞形成胞内菌数量的影响; 显微镜下观察0.1倍最低抑菌浓度(MIC)庆大霉素对绿色荧光蛋白融合鲍曼不动杆菌(AB-GFP)侵袭HBE细胞的影响。结果 与对照组比较, 经0.1倍、1倍、10倍MIC的阿奇霉素、左氧氟沙星、头孢哌酮舒巴坦、替加环素, 以及10倍、1倍MIC的多西环素、庆大霉素干预的鲍曼不动杆菌侵袭HBE细胞形成胞内菌的数量均显著降低($P < 0.001$); 经0.1倍MIC的庆大霉素干预的胞内鲍曼不动杆菌的数量均显著升高($P < 0.001$)。在0.1倍MIC的庆大霉素作用下, AB-GFP侵袭进入HBE细胞的量显著增加。结论 0.1倍、1倍、10倍MIC的阿奇霉素、左氧氟沙星、头孢哌酮舒巴坦、替加环素、庆大霉素、多西环素均不能有效杀灭胞内菌。该方法操作简便、结果准确, 能快速地测定胞内鲍曼不动杆菌的浓度, 可用于评价抗菌药物对胞内鲍曼不动杆菌感染的影响, 以及胞内鲍曼不动杆菌对抗菌药物的敏感性。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 胞内菌; 改良叠氮溴化丙锭; 实时荧光定量聚合酶链反应; 最低抑菌浓度; 抗菌药物

Evaluation of the Efficiency of Antibiotics on the Intracellular Infection of *Acinetobacter Baumannii* Based on the Micro-Quantification Method of Nucleic Acid for Live Bacteria

WENG Bangbi¹, LI Yuliang¹, LUO Dan², WANG Qian¹

(1. The First Affiliated Hospital of the Army Medical University, Chongqing, China 400038; 2. The 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, Kunming, Yunnan, China 650032)

Abstract: Objective To establish a micro-quantification method of nucleic acid for live bacteria for detecting intracellular viable bacterial content, and to investigate the effect of commonly used antibiotics on the intracellular infection of *Acinetobacter baumannii*. **Methods** Through the improved azide bromide propidium real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PMA_{xx}-qPCR) method, a co-culture model of antibiotics-pathogens-epithelial cells was adopted to determine the effect of different types and concentrations of antibiotics on the number of intracellular bacteria formed by *Acinetobacter baumannii* invading human bronchial epithelial (HBE) cells. The effect of 0.1 times minimum inhibitory concentration (MIC) of gentamicin on the HBE cells invaded by *Acinetobacter baumannii* with green fluorescent protein fusion (AB-GFP) was observed under the microscope.

*基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目[81802117]; 重庆市卫生健康委员会医学科科研项目[2022WSJK013]。

第一作者: 翁邦碧, 女, 硕士研究生在读, 药师, 研究方向为抗感染药理学, (电子信箱)bd19901126@126.com。

△通信作者: 枉前, 男, 博士, 副主任药师, 研究方向为医院药学与抗感染药理学, (电子信箱)xqwq411@126.com。

2012, 18(2): 136-139.

[6] 李丽丽, 田文仓, 刘茵, 等. 砂仁中化学成分及其药理作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(22): 4390-4396.

[7] 李庆耀, 梁生林, 褚洪标, 等. 陈皮促胃肠动力有效部位的筛选研究[J]. 中成药, 2012, 34(5): 941-943.

[8] 许家其, 张海红. 广藿香作用的研究进展[J]. 神经药理学报, 2020, 10(3): 27-32.

[9] 吕琪新. 沉香化气丸加多潘立酮治疗功能性消化不良餐后不适综合征37例[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2012, 20(11): 517-518.

[10] 潘玄玄, 宋粉云, 李华. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术的沉香化气丸化学成分分析[J]. 中草药, 2018, 49(13): 2984-2992.

[11] ZHU B, CAO H, SUN L, et al. Metabolomics-based mechanisms exploration of Huang-Lian-Jie-Du decoction on cerebral ischemia via UPLC-Q-TOF/MS analysis on rat serum[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 216: 147-156.

[12] 世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药, 2021, 16(4): 527-532.

[13] 刘洋, 何春雨, 李彤, 等. 鳖甲煎丸通过HIF-1 α /NF- κ B信号通路调控巨噬细胞极化的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(19): 9-16.

[14] HU C, LIANG Q, TANG X, et al. In vivo metabolite identification of bakuchiol in rats by UPLC/ESI-PDA-QTOF-MS[J]. Fitoterapia, 2015, 106: 129-134.

[15] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战[J]. 中草药, 2020, 51(18): 4789-4797.

(收稿日期: 2022-08-23; 修回日期: 2022-12-10)

Results Compared with those in the control group, the number of intracellular *Acinetobacter baumannii* invading epithelial cells significantly reduced after MIC intervention of azithromycin, levofloxacin, cefoperazone / sulbactam, tigecycline at concentrations of 0.1, 1, 10 times MIC respectively, and doxycycline and gentamicin at concentrations of 10, 1 times MIC ($P < 0.001$), the number of intracellular *Acinetobacter baumannii* significantly increased after the intervention of gentamicin at the concentration of 0.1 times MIC ($P < 0.001$). Under the action of gentamicin at the concentration of 0.1 times MIC, the invasion of AB - GFP to HBE cells significantly increased. **Conclusion** 0.1, 1, 10 times MIC of azithromycin, levofloxacin, cefoperazone and sulbactam, tigecycline, gentamicin, doxycycline can not effectively kill intracellular bacteria. This method is simple and accurate, which can quickly determine the concentration of intracellular *Acinetobacter baumannii*. It can be used to evaluate the effect of antibiotics on intracellular infection of *Acinetobacter baumannii* and the sensitivity of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; intracellular bacteria; PMAxx; qPCR; minimum inhibitory concentration; antibiotics

鲍曼不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* (AB) 为非发酵革兰阴性杆菌, 是引起呼吸道感染的主要条件致病菌。随着侵入性治疗措施的频繁操作、抗菌药物的大量和不合理使用, 引起多耐药、泛耐药、全耐药 AB 不断涌现, 导致临床可用治疗药物和策略十分有限^[1]。虽然临床是根据抗菌药物敏感性试验 (简称药敏试验) 最低抑菌浓度 (MIC) 选择合适的药物和治疗路径, 但其临床治疗结果与预期仍有差距, 重要原因为 AB 感染后可进入细胞内, 形成胞内菌感染^[2-3], 是造成感染迁延不愈、感染复发的重要原因^[4-5]。细菌一旦进入细胞内部, 一部分可因抗原暴露导致细胞自噬而重新暴露于抗菌药物环境被杀灭, 另一部分则可通过改变自身蛋白或调节代谢强度而长期生存于胞内, 可躲避抗菌药物的接触及免疫细胞的捕获, 在细胞内长期生存, 在宿主免疫力低下时可能会引发慢性感染或感染复发^[6]。AB 通常被认为是专性胞外细菌, 可不同程度地进入细胞内^[7-9], 但尚未明确抗菌药物对 AB 入侵细胞内数量的影响。目前, 多采用庆大霉素保护实验 (GPA) 的平板计数法检测细胞内细菌^[10-11], 但该方法存在耗时、工作量大、重复性差的缺点; 实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 也常被用于胞内细菌检测^[12], 但难以消除被药物杀灭的胞外死菌对检测的干扰。课题组前期采用月桂酰基肌氨酸钠 (SLS) / 改良叠氮溴化丙锭 (PMAxx) 去除非活性细菌基因组干扰, 构建了 1 种活菌核酸微量定量技术 (PMAxx - qPCR), 成功运用于 AB 快速表型药物敏感性的测定^[13]。本研究将该技术应用于胞内活菌数量的检测, 以评价抗菌药物对胞内 AB 感染数量的影响, 以及细胞参与时抗菌药物对 AB 药物敏感性的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与菌株

仪器: Sorvall ST 16R 型冷冻高速离心机, 481 型全温摇床, B6120 型微生物培养箱, 3111 型二氧化碳培养箱, 均购自美国 Thermo Fisher 公司; SW - CJ - 2FD 型超净台 (江苏苏净集团有限公司); PMA - Lite LED 光解仪 (美国 Biotium 公司); CFX - 96 型荧光定量 PCR (美国 BIO - RAD 公司); OSE - DB - 01 型五段程控金属浴

(北京天根生化科技有限公司); LDZX - 50KBS 型高压灭菌锅 (上海申安医疗器械厂); CKX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

试剂: 营养琼脂平板 (重庆庞通医疗器械有限公司, 批号为 22J2404); 卢里亚 - 贝尔塔尼 (LB) 培养基 (北京索莱宝科技有限公司, 批号为 318Q031); SLS (批号为 F321BA0023), 引物 (批号为 9015629), 均购自上海生工生物工程股份有限公司; PMAxx (美国 Biotium 公司, 升级版, 批号为 19P0725); QuantiNova SYBR Green PCR Kit (批号为 169017812), 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (批号为 163043064), 均购自德国 Qiagen 公司; RPMI 1640 培养基 (美国 HyClone 公司, 批号为 AH29755233); 胎牛血清 (德国 PAN - Biotech 公司, 批号为 P140109); 0.25% Trypsin (苏州新赛美生物科技有限公司, 批号为 20230105); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号为 WH0023N171); 罗丹明鬼笔环肽 (武汉爱博泰克生物科技有限公司, 批号为 96201203004); Triton X - 100 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 批号为 DH351 - 464L00150); 4',6 - 二脒基 - 2 - 苯基吡啶 (DAPI, 上海碧云天生物技术有限公司, 批号为 03052120706); 抗菌药物 (中国食品药品检定研究院)。

菌株: AB 标准菌株 ATCC 17978、aba 242, 人支气管上皮 (HBE) 细胞由本院临床机构提供; 绿色荧光蛋白融合 AB (AB - GFP) 以基因组重组技术构建, 可稳定表达绿色荧光蛋白, 由陆军军医大学药学与检验系邹全明教授课题组惠赠。

1.2 方法

1.2.1 AB 特异性诊断基因 (*blaOXA - 51*) 检测

针对 *blaOXA - 51* 基因设计合成引物和探针, 并进行局部序列排比检索 (BLAST) 验证。正向引物为 5' - GGTAATGATCTTGCTCGTGCTT - 3', 反向引物为 5' - TGTGGTGGTTGCCCTTATGGT - 3'^[2]。采用试剂盒方法提取细菌基因组 DNA, 随后进行 qPCR 检测。反应条件为 95 °C 预变性 2 min (95 °C 5 s → 60 °C 10 s), 40 个循环, 溶解曲线 65 °C 5 s → 95 °C, 收集 SYBR 荧光信号。qPCR 软件自动计算荧光阈值 (C_t)。

1.2.2 细胞外活菌检测

参照课题组前期已建立的细胞外活菌检测方法^[2],取700 μL 基因组样本,12 000 g 离心5 min,弃上清液655 μL ,加PMA_{xx} 5 μL ,涡旋15 s,瞬时离心,置暗处孵育5 min,使PMA_{xx}充分渗入死菌细胞,再置光解仪中光照5 min,按QIAamp DNA Mini Kit说明书提取细菌基因组。以上述细菌基因组为模板,加入2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μL 、正/反向引物各0.8 μL 、无酶水6.4 μL 、模板2 μL ,对AB特异性鉴别基因 bla_{OXA-51} 进行扩增。

1.2.3 标准曲线建立

取对数生长期的ATCC 17978,麦氏比浊至0.5麦氏,10倍比稀释7个浓度,得到包括原液在内的8个溶液。按细菌基因组提取试剂盒说明书提取细菌基因组,进行qPCR检测。采用平板稀释法测定菌液原始浓度,以 $\log(\text{cfu}/\text{mL})$ 为横坐标(X)、荧光 C_t 值为纵坐标(Y),以最小二乘法绘制标准曲线。

1.2.4 HBE细胞培养及细菌感染细胞模型建立

以90% RPMI 1640培养基及10%胎牛血清为完全培养基,在细胞传代3次后,将细胞收集于15 mL离心管中,对细胞悬液进行计数,以完全培养基稀释至 1×10^5 个/ mL ,加500 μL 至24孔培养板,置细胞培养箱孵育。待细胞生长至约90%密度时,弃上清液,PBS洗涤细胞2次,加RPMI 1640培养基500 μL ,适应性培养1 h,加 5×10^7 cfu/ mL 菌液共同培养,感染复数(MOI)约为100。

1.2.5 侵袭时间及MOI考察

侵袭时间:细胞适应性培养1 h后,加 5×10^7 cfu/ mL ATCC 17978菌液500 μL ,分别与HBE细胞共同培养2,4,6,8 h。

MOI:细胞适应性培养1 h后,分别加入 5×10^6 cfu/ mL 、 1×10^7 cfu/ mL 、 2.5×10^7 cfu/ mL 、 5×10^7 cfu/ mL ATCC 17978菌液500 μL ,与HBE细胞共同培养6 h。

弃上清液,每孔加1 mL PBS洗涤3次,再加500 μL 含庆大霉素(质量浓度为1 mg/ mL)的RPMI 1640培养基,继续孵育1 h,以去除细胞外细菌。PBS以1 mL每孔再次洗涤细胞3遍,以去除上清液中的庆大霉素。加200 μL 0.25% Trypsin - 0.4% TritonX - 100裂解液(1:1, V/V),充分裂解细胞后取100 μL 均匀涂布于营养琼脂平板,24 h后计数。

1.2.6 胞内菌定量检测方法的检测结果比较

加细胞裂解液,待细胞内细菌释放后,分别以平板计数法、qPCR法、PMA_{xx} - qPCR法进行胞内ATCC 17978细菌检测,并比较结果。

平板计数法:取100 μL 细胞裂解液,均匀涂布于营养琼脂平板,24 h后计数。

qPCR法:参照QIAamp DNA Mini Kit说明书提取细胞内细菌基因组。以上述细菌基因组为模板,加2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μL 、正/反向引物各0.8 μL 、无酶水6.4 μL 、模板2 μL ,对AB特异性鉴别基因 bla_{OXA-51} 进行扩增。

PMA - qPCR法:加细胞裂解液,待胞内菌释放后,同1.2.2项下方法操作。

1.2.7 不同抗菌药物对胞内菌感染的影响

细胞适应性培养1 h后,弃上清液,加含药RPMI 1640及ATCC 17978菌液,轻晃摇匀,使细菌与细胞充分接触,共同置细胞培养箱孵育。弃上清液,每孔加1 mL PBS洗涤3次,再加500 μL 含庆大霉素(质量浓度为1 mg/ mL)的RPMI 1640培养基,继续于细胞培养箱孵育1 h,以去除细胞外细菌。PBS以1 mL每孔再次洗涤细胞3遍,以去除上清液中的庆大霉素。取100 μL 0.25% Trypsin处理细胞2 min,加完全培养基100 μL 、RPMI 1640培养基300 μL ,充分混匀后转移至1.5 mL EP管,离心(转速为12 000 r/ min)5 min,取180 μL 按细菌基因组提取试剂盒说明书提取细菌基因组,进行qPCR检测,计算胞内细菌浓度。

1.2.8 0.1倍MIC庆大霉素对AB侵袭HBE细胞的影响

操作同1.2.7项下至“去除上清液中的庆大霉素”。加4%多聚甲醛1 mL室温固定细胞15 min,PBS漂洗3遍,每次3 min,加0.1% TritonX - 100 1 mL处理细胞5 min,PBS漂洗3遍,每次3 min;加200 μL 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 罗丹明鬼笔环肽避光染细胞骨架30 min,PBS漂洗3遍,每次3 min;加200 μL 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI避光染细胞核5 min,PBS漂洗3遍,每次3 min;以800 μL PBS浸润细胞,激光共聚焦显微镜下观察结果。

1.3 统计学处理

采用Graphpad Prism 8.3软件进行统计与作图。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,两组比较采用 t 检验,3组及以上比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

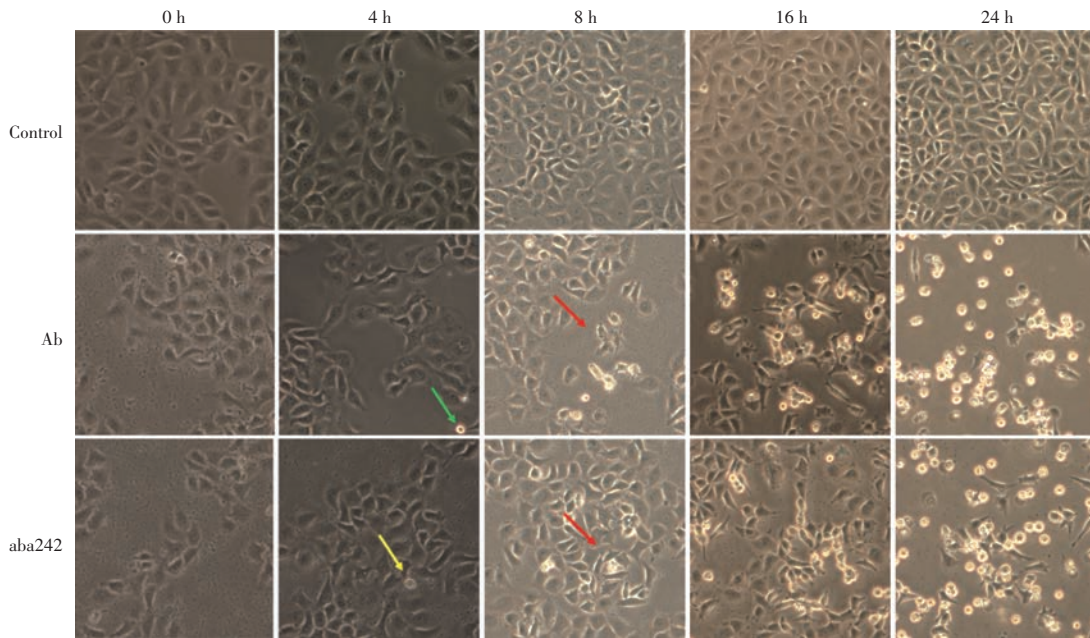
2 结果

2.1 标准曲线

按1.2.3项下方法进行线性回归,得回归方程 $Y = -3.2351X + 42.076$ ($R^2 = 0.9943$, $n = 6$)。结果ATCC 17978浓度在2~7 $\log(\text{cfu}/\text{mL})$ 范围内与 C_t 值线性关系良好,提示 C_t 值可较准确地反映细菌数量。

2.2 HBE细胞培养及细菌感染细胞模型

结果显示,空白HBE细胞在24 h内正常生长,ATCC 17978及aba 242感染的HBE细胞在8 h起出现固缩、脱落、坏死,随着感染时间的延长,细胞脱落及坏死逐渐增加,表明已成功建立AB的细胞感染模型。详见图1。

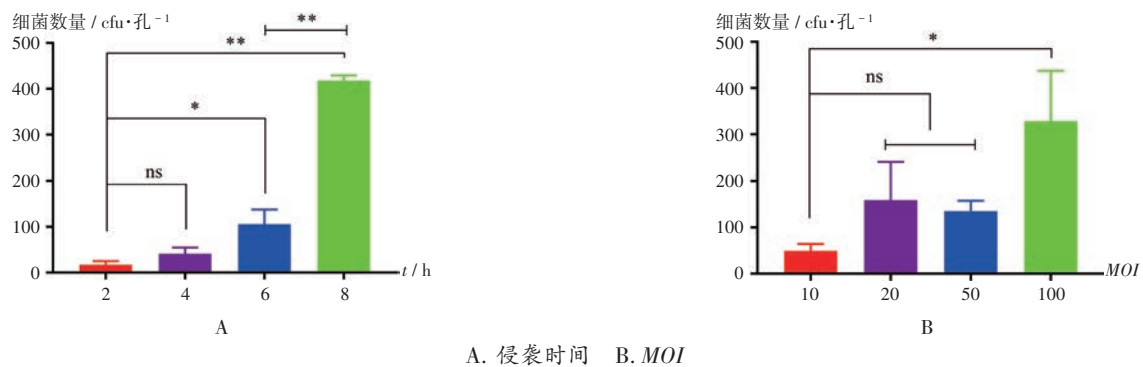


注:绿色箭头为脱落细胞,黄色箭头为固缩细胞,红色箭头为成片死亡细胞;Control为不加菌液的HBE细胞正常生长对照,Ab为ATCC 17978标准株,aba242为临床分离AB菌株。

图1 鲍曼不动杆菌对HBE细胞的侵袭作用($\times 200$)

Note:The green arrow refers to detached cells,the yellow arrow refers to pyknotic cells,and the red arrow refers to patches of dead cells. Control is the normal growth control of HBE cells without bacterial solution,Ab refers to the ATCC 17978 standard strain,and aba242 refers to the clinically isolated AB strain.

Fig. 1 Microscopic view of the invasion of *Acinetobacter baumannii* to HBE ($\times 200$)



注:ns为 $P > 0.05$;组间比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ 。图3同。

图2 鲍曼不动杆菌对HBE细胞的侵袭时间及MOI考察

A. Invasion time B. MOI

Note:ns refers to $P > 0.05$; * refers to $P < 0.01$, and ** refers to $P < 0.001$ among different groups (for Fig. 2-3).

Fig. 2 Invasion time and MOI of *Acinetobacter baumannii* to HBE cells

2.3 侵袭时间及MOI

侵袭时间:ATCC 17978入胞量呈时间依赖性,8 h时达到本次实验最大值(图2 A),但8 h时感染细胞已开始逐渐出现固缩、脱落现象(图1),故选取6 h为实验所需时间。

MOI:在MOI为10~50范围时,ATCC 17978侵袭量无显著变化;当MOI升至100时,ATCC 17978侵袭量显著增加,故选取MOI为100进行实验。详见图2 B。

2.4 胞内菌定量检测方法的检测结果比较

由表1可知,PMAXX-qPCR法与平板计数法所测结

果接近,但前者耗时更短(< 2 h,平板计数法为18~24 h);传统qPCR法与PMAXX-qPCR法检测时效相当(< 2 h),但传统qPCR法所测结果较另外2种方法均偏高,提示传统qPCR法无法排除死菌及胞外黏附菌对检测结果的干扰,而PMAXX-qPCR法则兼具平板计数法的准确性及传统qPCR法的时效性,可用于细胞内AB检测。

2.5 不同抗菌药物对胞内AB感染的影响

由图3可知,0.1倍、1倍、10倍MIC的阿奇霉素、左氧氟沙星、头孢哌酮舒巴坦、替加环素,以及1倍、10倍MIC的多西环素、庆大霉素,均能抑制ATCC 17978侵袭

表1 3种方法的胞内鲍曼不动杆菌定量检测结果($\bar{X} \pm s$)

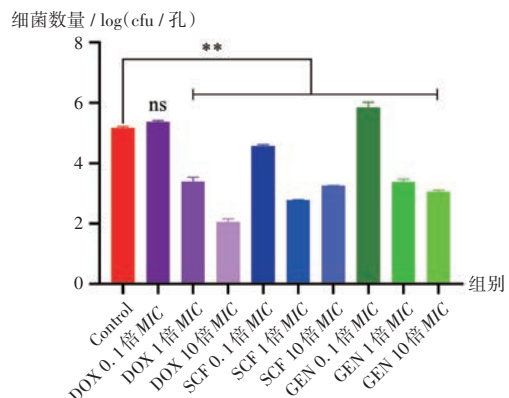
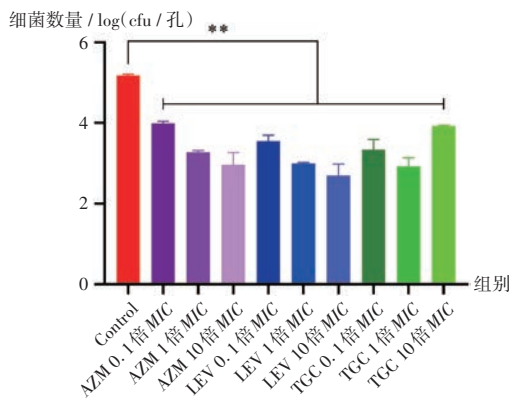
Tab.1 Quantitative detection results of intracellular bacteria obtained by three different methods ($\bar{X} \pm s$)

MOI	log(cfu/mL) / C _t 值		
	平板计数法	qPCR法	PMAxx - qPCR法
200	2.27 ± 0.51	5.36 ± 0.02 / 23.31 ± 0.06	2.69 ± 0.14 / 32.14 ± 0.48
100	2.22 ± 0.62	5.15 ± 0.02 / 23.98 ± 0.05	2.63 ± 0.15 / 32.34 ± 0.48
20	1.78 ± 0.15	4.31 ± 0.08 / 26.78 ± 0.26	2.35 ± 0.04 / 33.28 ± 0.14

HBE细胞形成胞内AB;阿奇霉素、左氧氟沙星、多西环素对胞内AB的形成可能具有剂量依赖性的抑制作用;0.1倍MIC的庆大霉素对胞内AB的形成可能具有促进作用;0.1倍、1倍、10倍MIC的阿奇霉素、左氧氟沙星、头孢哌酮舒巴坦、替加环素、多西环素、庆大霉素,均不能有效杀灭胞内ATCC 17978。

2.6 0.1倍MIC庆大霉素对AB侵袭HBE细胞的影响

由图4可知,在0.1倍MIC的庆大霉素作用下,AB-GFP侵袭进入HBE细胞的量显著增加,与PMAxx - qPCR法测定胞内ATCC 17978的结果一致,表明0.1倍MIC庆大霉素对AB侵袭HBE细胞具有促进作用。

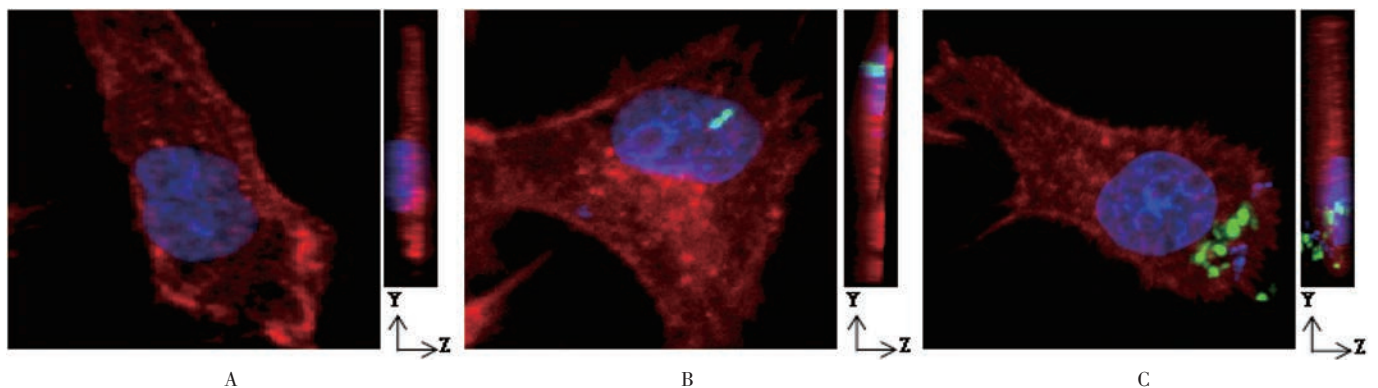


注:AZM为阿奇霉素,LEV为左氧氟沙星,DOX为多西环素,SCF为头孢哌酮舒巴坦,GEN为庆大霉素,TGC为替加环素。

图3 不同种类及不同浓度抗菌药物对胞内鲍曼不动杆菌感染的影响

Note:AZM is azithromycin,LEV is levofloxacin,DOX is doxycycline,SCF is cefoperazoneandsulbactam,GEN is gentamicinand TGC is tigecycline.

Fig.3 Effect of different types and concentrations of antibiotics on the intracellular infection of *Acinetobacter baumannii*



A. HBE细胞 B. HBE细胞 + AB - GFP C. HBE细胞 + AB - GFP + GEN

图4 0.1倍MIC庆大霉素对鲍曼不动杆菌侵袭HBE细胞的影响

A. HBE cells B. HBE cells + AB - GFP C. HBE cells + AB - GFP + GEN

Fig.4 Effect of 0.1 times MIC gentamicin on the invasion of *Acinetobacter baumannii* to HBE cells

3 讨论

AB通常被认为是专性胞外细菌,常以黏附的方式定植于宿主,对细胞的侵袭力较弱^[7]。有研究显示,随着AB耐药株分离率的逐年升高,AB的临床分离株显示出比ATCC 17978更高的细胞侵袭毒力,并具有在上皮细胞内繁殖的能力^[8-9]。基于此,本研究中纳入了临床常用不同种类的抗菌药物,并考察了高、中、低浓度(10倍、1倍、0.1倍MIC)作用下,抗菌药物对AB侵袭入胞的影响。研究发现,在有宿主细胞参与时,中、高浓度(1倍、10倍MIC)的阿奇霉素、左氧氟沙星、头孢哌酮舒巴坦、替加环素、多西环素、庆大霉素均不能有效杀灭胞内AB,提示体外药敏试验可能不能完全反映有宿主参与时细菌对药物的敏感性,可能是感染治疗失败及感染复发的重要原因。LIU等^[2]以上皮细胞为模型,发现不同细菌及不同药物在细胞内外的最低杀菌浓度具有异质性,A549及HepG2上皮细胞内外的最低杀菌浓度可相差高达800倍。LEHAR等^[3]则以巨噬细胞为模型,测试了万古霉素、达托霉素、利奈唑胺、利福平环境

下耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)在巨噬细胞内外的MIC,显示胞内外MIC相差100~12 500倍^[3]。结合本研究结果及文献报道,提示经典的体外MIC试验可能并不能准确反映抗菌药物在体内的治疗效果,需建立更接近体内环境的药物敏感性检测方法,以指导临床合理选择抗菌药物。

体外细胞感染模型是用于评价抗菌药物体内治疗效果的常见选择^[14],细胞的参与使其较传统药敏试验更接近体内环境,但细胞不可避免地会被细菌“劫持”并进入细胞,进入细胞内的细菌通常存在于细胞的空泡中,以此躲避抗菌药物的接触及细胞自噬激活。故建立有细胞参与的MIC测定方法需首先解决细胞内细菌的定量问题。本研究中建立了检测胞内AB活菌的PMA_{xx}-qPCR法,可有效缩短检测时长,并具有操作简便、结果准确、不受死菌干扰的优点,可为建立有宿主参与的药物敏感性评价方法奠定基础。

本研究中主要纳入临床抗呼吸道感染常用抗菌药物,尽管阿奇霉素并不作为常规抗AB药物使用,但其常用于囊性纤维化、支原体肺炎或经验性抗感染治疗。本研究结果提示,阿奇霉素在体外具有抑制胞内AB生长的作用,即使浓度降至0.1倍MIC,仍可显著抑制胞内AB的生长。这可能得益于阿奇霉素良好的组织及细胞穿透性,具有较高的组织及细胞内药物浓度^[15-16]。且阿奇霉素为抑菌剂,可抑制非繁殖期细菌的生长,使入胞后的细菌处于低复制水平^[9]。

使用抗菌药物治疗感染性疾病时,患者不可避免会处于0.1倍MIC阶段^[17-18],而部分0.1倍MIC抗菌药物可通过增强细菌毒力因子的产生来促进不同细菌的入胞及在细胞内的滞留^[2]。本研究中发现,0.1倍MIC庆大霉素可能会促进胞内AB的形成,提示在临床治疗细菌感染时应注意足剂量、足疗程使用庆大霉素,尽量缩短患者处于亚抑菌浓度的时间。

参考文献

[1] ELHOSSEINY NM, ATTIA AS. *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018,7(1):33.
[2] LIU XY, LIU F, DING SY, et al. Sublethal Levels of Antibiotics Promote Bacterial Persistence in Epithelial Cells[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020,7(18):1900840.
[3] LEHAR SM, PILLOW T, XU M, et al. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus* [J]. *Nature*, 2015, 527(7578):323-328.
[4] MODE S, KETTERER M, QUÉBATTE M, et al. Antibiotic persistence of intracellular *Brucella abortus* [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022,16(7):e0010635.
[5] PEYRUSSON F, VARET H, NGUYEN TK, et al. Intracellular

Staphylococcus aureus persists upon antibiotic exposure [J]. *Nat Commun*, 2020,11(1):2200.
[6] PETIT TJP, LEBRETON A. Adaptations of intracellular bacteria to vacuolar or cytosolic niches [J]. *Trends Microbiol*, 2022, 30(8):736-748.
[7] SYCZ G, DI VENANZIO G, DISTEL JS, et al. Modern *Acinetobacter baumannii* clinical isolates replicate inside spacious vacuoles and egress from macrophages [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(8):e1009802.
[8] AMBROSI C, SCRIBANO D, SARSHAR M, et al. *Acinetobacter baumannii* Targets Human Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAMs) for Invasion of Pneumocytes [J]. *mSystems*, 2020,5(6):1-17.
[9] RUBIO T, GAGNÉ S, DEBRUYNE C, et al. Incidence of an Intracellular Multiplication Niche among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates [J]. *mSystems*, 2022,7(1):1-16.
[10] 王莹,张微,李怡璇,等.应用改良庆大霉素保护试验检测肠炎沙门氏菌侵袭力表型[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(11):2459-2466.
[11] GONZÁLEZ MJ, ZUNINO P, SCAVONE P, et al. Selection of Effective Antibiotics for Uropathogenic *Escherichia coli* Intracellular Bacteria Reduction [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020,10:542755.
[12] FU A, YAO BQ, DONG TT, et al. Tumor-resident intracellular microbiota promotes metastatic colonization in breast cancer [J]. *Cell*, 2022,185(8):1356.E26-1372.E26.
[13] 罗丹,李玉良,翁邦碧,等.鲍曼不动杆菌快速表型药敏检测方法的建立和初步应用[J]. *第三军医大学学报*, 2021,43(18):1775-1782.
[14] TAKII T, YAMAMOTO Y, CHIBA T, et al. Simple fibroblast-based assay for screening of new antimicrobial drugs against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002,46(8):2533-2539.
[15] WAETZIG V, RIFFERT J, CORDT J, et al. Neurodegenerative effects of azithromycin in differentiated PC12 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017,809:1-12.
[16] MATZNELLER P, KRASNIQI S, KINZIG M, et al. Blood, tissue, and intracellular concentrations of azithromycin during and after end of therapy [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013,57(4):1736-1742.
[17] WANG S, YANG YB, ZHAO YL, et al. Sub-MIC Tylosin Inhibits *Streptococcus suis* Biofilm Formation and Results in Differential Protein Expression [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:384.
[18] NOLAN C, BEHREND S. Sub-Inhibitory Antibiotic Exposure and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021,10(11):1393.

(收稿日期:2023-02-16;修回日期:2023-03-27)