·老年人呼吸系统疾病专栏·

铜绿假单胞菌在不同老年呼吸道感染中的生物学特性研究

赵铁梅*,杨晓丹,苏宪灵
(解放军总医院呼吸内科,北京 100853)

【摘 要】 **目的** 研究慢性阻塞性肺疾病(COPD)急性发作和机械通气相关肺炎(VAP)老年患者呼吸道标本分离所得铜绿假单胞菌的生物学特性是否存在差异。**方法** 收集2012年1月至2014年3月解放军总医院呼吸内科收治的COPD急性发作和VAP患者呼吸道标本分离得到的铜绿假单胞菌共48株,分为两组:COPD组($n=22$)和VAP组($n=26$)。应用结晶紫染色法检测铜绿假单胞菌的生物被膜形成能力;应用氯仿萃取法测定铜绿假单胞菌的绿脓菌素含量;应用弹性蛋白-刚果红染色方法检测弹性蛋白酶活性。**结果** COPD组和VAP组分离所得铜绿假单胞菌的生物被膜形成能力无显著性差异($P>0.05$),但存在个体差异。COPD组与VAP组间绿脓菌素和弹性蛋白酶的含量差异无统计学意义($P>0.05$),但存在个体差异。**结论** 在COPD急性发作和VAP中,铜绿假单胞菌感染后的生物被膜形成能力和产生的主要毒力因子能力相似。

【关键词】 铜绿假单胞菌;慢性阻塞性肺疾病;机械通气相关肺炎;生物被膜;毒力因子
【中图分类号】 R563.9; R592 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.03.042

Biologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from elderly with different respiratory infections

ZHAO Tie-Mei*, YANG Xiao-Dan, SU Xian-Ling
(Department of Respiratory Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine whether there are biologic differences in the *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from respiratory specimens among the elderly patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or those with ventilator associated pneumonia (VAP). **Methods** A total of 48 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the respiratory specimens of the elderly with acute exacerbation of COPD and VAP who admitted in our department from January 2012 to March 2014 were collected; and among them, 22 were from the COPD patients and 26 from the VAP patients. Biofilm formation was quantified and classified with crystal violet staining. The production of pyocyanin was measured with chloroform extraction method, and the elastase activity was determined with elastin-congo red staining. **Results** Biofilm formation abilities were similar in the strains isolated from respiratory specimens of COPD group and VAP group ($P>0.05$), but there existed individual differences. No obvious differences were observed in the production of main virulence factors (pyocyanin and elastase) between the 2 groups ($P>0.05$). **Conclusion** *Pseudomonas aeruginosa* strains from the elderly with acute exacerbation of COPD and VAP have similar biofilm formation abilities and production of main virulence factors.

【**Keywords**】 Pseudomonas aeruginosa; chronic obstructive pulmonary disease; ventilator associated pneumonia; biofilm; virulence factors
This work was supported by the Supporting Fund of Clinical Scientific Research of Chinese PLA General Hospital (2013FC-TSYS-2001).
Corresponding author: ZHAO Tie-Mei, E-mail: ztm1111@sina.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)急性发作和机械通气相关肺炎(ventilator associated pneumonia,VAP)是常见的与生物被膜相关的呼吸道感染性疾病,铜绿假单胞菌为常见致病菌[1,2]。虽然铜绿假单胞菌在COPD和VAP中都可以形成导致治疗困难的生物被膜,但COPD和VAP的疾病特点和发病情况各有差异:COPD常呈慢性过程,而VAP常常为急性发病。那么,铜绿假单胞菌在这些感染中的生物学特性是否不同呢?绿脓菌素和弹性蛋白酶是铜绿假单胞菌重

收稿日期:2016-12-08;**修回日期**:2017-01-16
基金项目:解放军总医院临床科研扶持基金(2013FC-TSYS-2001)
通信作者:赵铁梅,E-mail:ztm1111@sina.com

要的毒力因子,与肺部感染密切相关,那么,铜绿假单胞菌在 COPD 和 VAP 中的毒力是否也不同呢?为解决上述疑问,我们收集了 COPD 和 VAP 患者呼吸道标本分离得到的铜绿假单胞菌进行细菌生物被膜形成能力和主要毒力因子的检测。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2012年1月至2014年3月解放军总医院呼吸内科收治的 COPD 急性发作和 VAP 患者(>60岁)的呼吸道标本(合格痰标本、经气道吸引物、肺泡灌洗液)分离得到的铜绿假单胞菌共48株。除外 COPD 患者发生 VAP 期间分离到的菌株。分为两组:COPD 组($n=22$)和 VAP 组($n=26$)。

1.2 方法

1.2.1 仪器及试剂 主要试验仪器为比浊仪(bioMerieux公司,法国)和 RT-6000 全自动酶标仪(雷杜公司,美国)。胰酶大豆肉汤(tryptic soy broth,TSB)和 MH 肉汤(Muller-Hinton broth,MHB)均购自美国 BD 公司,结晶紫购自国药集团化学试剂有限公司,弹性蛋白酶-刚果红购自 Sigma 公司,0.1 mol/L Tris-HCl/1 mmol/L $CaCl_2$ 缓冲液购自 Promega公司,甲醇、乙醇、蛋白胨、硫酸钾、氯化镁、无水氯化钙、三羟甲基氨基甲烷和乙二胺四乙酸购自北京化学试剂公司。6孔聚苯乙烯平板购自美国 Costar 公司。

1.2.2 铜绿假单胞菌生物被膜形成能力的检测 参照 Stepanovic 等[3]的方法检测生物被膜的生成能力。铜绿假单胞菌在 TSB 中隔夜培养18 h,次日用 TSB 配制 0.5 McFarland 菌悬液,稀释至 1.5×10^6 CFU/ml,接种于96孔聚苯乙烯平板(0.2 ml),TSB 做阴性对照。培养24 h后,用250 μl 无菌磷酸盐缓冲液(pH 7.2)洗3次,99%甲醇固定后1%的结晶紫染色20 min,95%的乙醇作用10 min,吸出溶液至另一块96孔聚苯乙烯平板,酶标仪570 nm下检测吸光度(absorbance,A)值。重复检测3次,取平均值。参照 Stepanovic 等[4]的标准判断生物被膜的生成能力:临界值(ODc)=阴性对照平均值+(3×阴性对照标准差)。OD≤ODc:无生物被膜生成(-);ODc<OD≤2×ODc:生物被膜生成能力较弱(+);2×ODc<OD≤4×ODc:生物被膜生成能力中等(++);OD>4×ODc:生物被膜生成能力强(+++)。

1.2.3 绿脓菌素检测[5] 细菌在 LB 培养液(950 ml去离子水+胰化蛋白胨10 g+酵母提取物5 g+氯化钠10 g)中培养16 h,离心后收集菌体,用新鲜 PB 培养液(含2%蛋白胨、1%硫酸钾和0.14%氯化镁)洗涤,悬浮,$A_{600\ nm}=0.05$,继续培养16~18 h后,用新鲜 PB 培养液稀释至 $A_{600\ nm}=0.05$。于新鲜 PB 培养液加入5 ml 细菌悬液,37℃恒温培养箱200转/min 振荡孵育24 h。取上述细菌悬液5 ml加入3 ml 氯仿,振荡混匀,静置15~30 min,再以12 000 g 离心20 min,将氯仿层转入新试管,加入1 ml 0.2 mol/L 的盐酸,轻轻振荡混匀,静置15 min,取上层红色水相100 μl,在520 nm 处测 A 值。计算绿脓菌素浓度(μg/ml)=$A_{520\ nm}\times17.072$。

1.2.4 弹性蛋白酶活性的测定[6] 挑取新鲜生长的菌落接种于2 ml PTSB 液体培养基(每1000 ml 双蒸水中加人蛋白胨50 g、TSB 2.5 g,高压蒸汽灭菌20 min,冷却后置于4℃冰箱备用)中过夜增菌,比浊仪稀释至菌悬液为 10^5 CFU/ml,加入2 ml 菌悬液于18 ml PTSB 培养基中,37℃恒温振荡培养4 h。10 000 g 4℃离心15 min 后,吸取上清液,用一次性滤器(0.45 μm)过滤除菌。15 ml 振荡培养管中加入20 mg 弹性蛋白-刚果红和1 ml 反应缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl/1 mmol/L $CaCl_2$,pH 7.2),之后加入1.0 ml 细菌培养物的过滤上清液,在37℃、250转/min 振荡条件下恒温振荡反应18 h后,加入0.1 ml 0.12 mol/L 的乙二胺四乙酸终止反应,将反应物置于冰上。通过10 000 g 4℃离心20 min 去除不可溶的弹性蛋白酶-刚果红,取上清。在495 nm 处读取 A 值。背景 A 值为未加弹性蛋白酶-刚果红时的 $A_{495\ nm}$ 值,酶-底物反应的 A 值减去背景 A 值,即为最终的 A 值。

1.3 统计学处理

应用 STATA 8.0 软件进行统计分析。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者一般资料

COPD 组和 VAP 组获取呼吸道标本距离发病的时间分别为(7.3±5.3)d 和(3.1±2.6)d,入院前90 d 内应用过抗菌药物治疗者分别占54.5%(12/22)和84.6%(22/26),两组患者均进行了抗菌药物治疗,应用具有抗假单胞菌活性药物者分别占90.9%(20/22)和100.0%(26/26),疗程分别为(10.6±4.9)d 和(16.4±7.7)d。COPD 组患者入院前90 d 内有住院史者达45.5%(10/22),近1年急性发作≥1次者占68.2%(15/22)。VAP 组患者存

在基础疾病者占 69.2%(18/26),合并冠心病和(或)高血压病者占 46.2%(12/26),合并脑部疾病者占 42.3%(11/26)。

2.2 两组生物被膜形成能力比较

各个菌株生物被膜形成能力差异较大,依据所得 A 值分为 4 个级别:无生物被膜生成(-),生物被膜生成能力较弱(+),生物被膜生成能力中等(++)和生物被膜生成能力强(+++)。两组生物被膜形成能力的差异无统计学意义($P>0.05$;表 1)。

2.3 两组绿脓菌素含量比较

各个菌株产生的绿脓菌素含量差异较大,按照检测量分为 4 个数量级:<2,2~4,4~6和>6 μg/ml,结果显示,两组绿脓菌素含量差异无统计学意义($P=0.824$;表 2)。

2.4 两组弹性蛋白酶含量比较

各个菌株产生的弹性蛋白酶含量差异较大,按照检测 $A_{495\ nm}$ 值分为 3 个数量级:<0.1,0.1~0.6 和>0.6,结果显示,两组弹性蛋白酶含量差异无统计学意义($P=0.967$;表 3)。

3 讨 论

铜绿假单胞菌是呼吸系统感染的常见分离菌,研究显示:4%~15% COPD 患者的呼吸道标本中可以分离到铜绿假单胞菌,约 28.7%~34.7% 的重度 COPD 急性发作是由铜绿假单胞菌所致[7,8];26% 的 VAP 是由铜绿假单胞菌所致[9]。虽然铜绿假单胞菌在 COPD 和 VAP 中都可以形成生物被膜,但 COPD 和 VAP 的致病特点各有差异。在 COPD 患者中,铜绿假单胞菌常常由普通型转变为黏液型,长期定植在呼吸道,形成生物被膜,很难清除,一旦被膜内细菌转为足量游离菌或获得新的感染细菌,即会引起急性发作,感染呈慢性过程。相反,在 VAP 中,由于吸引操作及呼吸气流的剪切力使气管插管上的生物被膜解离,细菌播散到下呼吸道,常常引起急性感染,气管插管上的生物被膜细菌成为 VAP 的巨大致病菌储存库[10]。目前国内外对引起上述感染的铜绿假单胞菌的生物学特性研究较少,病例数也较少。西班牙学者 Martínez-Solano 等[11]研究了 13 例 COPD 急性发作分离到的铜绿假单胞菌,结果显示:与重症监护病房中血培养分离到的菌株相比,铜绿假单胞菌可以在某些 COPD 患者呼吸道中长期存在,在此过程中细菌形态可以发生变化,生物被膜形成能力增加但毒力下降。美国学者 Fricks-Lima 等[12]比较了 6 例 VAP 患者和 3 例肺囊性纤维化(cystic fibrosis,CF)患者分离到的铜绿假单胞菌的生物被膜形成能力,结果显示各个 VAP 患者中分离到的铜绿假单胞菌生物被膜形成能力均较强,显著高于 CF 患者。但国内外文献中尚无铜绿假单胞菌在 COPD 和 VAP 中生物被膜形成能力和细菌毒力对比的报道。我们针对此方面进行的研究结果显示:COPD 组与 VAP 组相比,铜绿假单胞菌的生物被

表 1 两组铜绿假单胞菌生物被膜形成能力比较

Table 1 Comparison of biofilm formation abilities of *Pseudomonas aeruginosa* between two groups [n(%)]

Group	n	-	+	++	+++
COPD	22	0(0.0)	3(13.6)	15(68.2)	4(18.2)
VAP	26	1(3.8)	8(30.8)	12(46.2)	5(19.2)

-: non biofilm formation abilities; +: weak biofilm formation abilities; ++: moderate biofilm formation abilities; +++: strong biofilm formation abilities. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; VAP: ventilator associated pneumonia

表 2 两组绿脓菌素含量比较

Table 2 Comparison of pyocyanin production between two groups [n(%)]

Group	n	<2 μg/ml	2-4 μg/ml	4-6 μg/ml	>6 μg/ml
COPD	22	7(31.8)	9(40.9)	2(9.1)	4(18.2)
VAP	26	11(42.3)	9(34.6)	3(11.5)	3(11.5)

COPD: chronic obstructive pulmonary disease; VAP: ventilator associated pneumonia

表 3 两组弹性蛋白酶含量比较

Table 3 Production of elastase between two groups [n(%)]

Group	n	$A_{495\ nm}$ <0.1	$A_{495\ nm}$ 0.1-0.6	$A_{495\ nm}$ >0.6
COPD	22	18(81.8)	2(9.1)	2(9.1)
VAP	26	22(84.6)	2(7.7)	2(7.7)

COPD: chronic obstructive pulmonary disease; VAP: ventilator associated pneumonia

膜形成能力无显著性差异;但各组的细菌生物被膜形成能力存在个体差异。

绿脓菌素和弹性蛋白酶是铜绿假单胞菌重要的毒力因子[13,14]。CD-1 小鼠的急性肺炎模型研究显示:小鼠不能清除野生型铜绿假单胞菌;但是小鼠可以清除绿脓菌素缺乏突变的铜绿假单胞菌的感染,与野生型铜绿假单胞菌相比,细菌负荷可以下降1000~10 000 倍[15]。弹性蛋白酶可以破坏机体组织的完整性,影响宿主的免疫系统。缺乏弹性蛋白酶的突变株与原菌株相比,更容易被清除。我们的研究显示:铜绿假单胞菌重要的毒力因子绿脓菌素和弹性蛋白酶的含量在 COPD 组与 VAP 组间差异无统计学意义,但存在个体差异。

综上所述,铜绿假单胞菌感染后,其在 COPD 和 VAP 中的生物被膜形成能力及产生的主要毒力因子能力相似。但此结论尚需要大样本的研究去证实。

【参考文献】

[1] Renom F, Yáñez A, Garau M, *et al*. Prognosis of COPD patients requiring frequent hospitalization: role of airway infection[J]. Respir Med, 2010, 104(6): 840-848. DOI: 10.1016/j.rmed.2009.12.010.

[2] 刘又宁, 曹 彬, 王 辉, 等. 中国九城市成人医院获得性肺炎微生物学与临床特点调查[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(10): 739-746. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2012.10.009.
Liu YN, Cao B, Wang H, *et al*. Adult hospital acquired pneumonia: a multicenter study on microbiology and clinical characteristics of patients from 9 Chinese cities[J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2012, 35(10): 739-746. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2012.10.009.

[3] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, *et al*. A modified microtiter plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation[J]. J Microbiol Methods, 2000, 40(2): 175-179. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6.

[4] Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, *et al*. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical reconmmendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*[J]. APMIS, 2007, 115(8): 891-899. DOI: 10.1111/J.1600-0463.2007.apm_630.x.

[5] Essar DW, Eberly L, Hadero A, *et al*. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications[J]. J Bacteriol, 1990, 172(2): 884-900.

[6] Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, *et al*. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cftr(-/-) mice[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3677-3687. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.12.002.

[7] Domenech A, Puig C, Martí S, *et al*. Infectious etiology of acute exacerbations in severe COPD patients[J]. J Infect, 2013, 67(6): 516-523. DOI: 10.1016/j.jinf.2013.09.003.

[8] Gallego M, Pomares X, Espasa M, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors[J]. BMC Pulm Med, 2014, 14: 103. DOI: 10.1186/1471-2466-14-103.

[9] Kollef MH, Chastre J, Fagon JY, *et al*. Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Crit Care Med, 2014, 42(10): 2178-2187. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000510.

[10] Cairns S, Thomas JG, Hooper SJ, *et al*. Molecular analysis of microbial communities in endotracheal tube biofilms[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e14759. DOI: 10.1371/journal.pone.0014759.

[11] Martínez-Solano L, Macia M, Fajardo A, *et al*. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(12): 1526-1533. DOI: 10.1067/mhn.2000.102808.

[12] Fricks-Lima J, Hendrickson CM, Allgaier M, *et al*. Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients[J]. Intern J Antimicrob Agents, 2011, 37(4): 309-315. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.12.017.

[13] Silva LV, Galdino AC, Nunes AP, *et al*. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Int J Med Microbiol, 2014, 304(8): 990-1000. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.07.001.

[14] Usher LR, Lawson RA, Geary I, *et al*. Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection[J]. J Immunol, 2002, 168(4): 1861-1868. DOI: 10.4049/jimmunol.168.4.1861.

[15] Lau GW, Ran H, Kong F, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice[J]. Infect Immun, 2004, 72(7), 4275-4278. DOI: 10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004.

(编辑:吕青远)