

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.07.004

· 论 著 ·

秀丽隐杆线虫—泛耐药肺炎克雷伯菌感染模型的建立

王 讯, 孙树梅, 欧阳妮, 张亚莉, 芮勇宇

(南方医科大学南方医院, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的 建立泛耐药肺炎克雷伯菌(XDRKP)感染秀丽隐杆线虫感染模型。方法 在液体条件下, 利用临床分离的 XDRKP 菌株感染秀丽隐杆线虫, 观察线虫存活及体内细菌数量变化情况。结果 线虫感染 XDRKP 后活动明显迟缓, 不同浓度的 XDRKP 对线虫的致死情况不同。log-rank 检验显示, 1.5×10^6 CFU/mL XDRKP 组与 *E. coli* OP₅₀ 对照组的生存曲线差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.08, P > 0.05$); 1.5×10^7 、 1.5×10^8 CFU/mL 组与 *E. coli* OP₅₀ 对照组的生存曲线差异均有统计学 (χ^2 值分别为 229.37、275.98, 均 $P < 0.001$), 1.5×10^8 与 1.5×10^7 CFU/mL XDRKP 组线虫的生存率低于对照组。实验获得上清悬液, 经细菌纯培养后进行细菌鉴定和药敏测试, 证实为 XDRKP。XDRKP 感染线虫 4、6、12、24 h 后, 线虫体内细菌总量分别为 $(0.28 \pm 0.02) \times 10^5$ 、 $(0.50 \pm 0.38) \times 10^5$ 、 $(1.73 \pm 0.56) \times 10^5$ 、 $(2.62 \pm 0.53) \times 10^5$ CFU/mL, 不同时间线虫体内细菌总数存在统计学差异 ($F = 1363.39, P < 0.001$)。结论 成功建立了秀丽隐杆线虫—XDRKP 感染模型。

[关键词] 秀丽隐杆线虫; 泛耐药; 肺炎克雷伯菌; 感染; 模型

[中图分类号] R383.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)07-0457-04

Establishment of an infection model using *Caenorhabditis elegans*-extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*

WANG Xun, SUN Shu-mei, OUYANG Ni, ZHANG Ya-li, RUI Yong-yu (Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective** To establish an infection model using *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)-extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* (XDRKP) system. **Methods** Clinically isolated XDRKP strains were used to infect *C. elegans* in the liquid killing assay, the nematode survival and the number of bacteria in *C. elegans* digestive tract was observed. **Results** *C. elegans* was significantly retarded after being infected by XDRKP, different concentrations of XDRKP led to different patterns of the worm death. Log-rank test showed that survival curves of *C. elegans* infected with 1.5×10^6 CFU/mL of XDRKP and *E. coli* OP₅₀ (control) were not significantly different ($\chi^2 = 0.08, P > 0.05$); survival curves of *C. elegans* infected with 1.5×10^7 CFU/mL, 1.5×10^8 CFU/mL of XDRKP and *E. coli* OP₅₀ were significantly different ($\chi^2 = 229.37, 275.98$, respectively, both $P < 0.001$). The survival rates of 1.5×10^8 and 1.5×10^7 CFU/mL XDRKP groups were both lower than that of the control group. Supernatant suspension obtained from test was performed bacterial culture, identification and antimicrobial susceptibility testing, XDRKP was determined. After being infected with XDRKP 4, 6, 12, and 24 hours, the total number of bacteria in *C. elegans* were $(0.28 \pm 0.02) \times 10^5$ CFU/mL, $(0.50 \pm 0.38) \times 10^5$ CFU/mL, $(1.73 \pm 0.56) \times 10^5$ CFU/mL, and $(2.62 \pm 0.53) \times 10^5$ CFU/mL, respectively, the number of bacteria in *C. elegans* digestive tract was significantly different at different time points ($F = 1363.39, P < 0.001$). **Conclusion** The infection model of *C. elegans*-XDRKP is established successfully.

[收稿日期] 2016-03-08

[基金项目] 2010 年度院长基金(2010C001)

[作者简介] 王讯(1989-), 女(汉族), 河北省定州市人, 硕士研究生, 主要从事儿科感染性疾病研究。

[通信作者] 孙树梅 E-mail: sunshumei99@126.com

[Key words] *Caenorhabditis elegans*; extensively drug resistance; *Klebsiella pneumoniae*; infection; model

[Chin J Infect Control, 2016, 15(7): 457 - 460]

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)属肠杆菌科细菌,是引起医院感染的常见条件致病菌。近年来,随着碳青霉烯类抗生素的长期、大量、广泛使用,导致耐碳青霉烯类肠杆菌科(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)菌株的检出率呈上升趋势。2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测结果发现,绝大多数肠杆菌科细菌中均存在 CRE 菌株,以克雷伯菌属最多,该菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率均 $>10\%$ [1]。由于 CRE 菌株往往呈泛耐药(extensively drug resistance, XDR)或全耐药(pandrug resistance, PDR)的特征,导致感染患者可能陷入无药可用的困境[2]。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是一种国际公认、简单有效的模式生物,其具有结构简单、遗传背景清晰、生命周期短等特点,在病原菌研究中的应用越来越广泛。目前,已证实约 40 种人类致病菌(包括革兰阳性菌、革兰阴性菌和真菌)会对线虫造成感染[3],其致病机制与其在哺乳动物中的表现极相似。鉴于国内外关于 KP 感染秀丽隐杆线虫少有报道,本研究利用临床上分离的泛耐药肺炎克雷伯菌(extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, XDRKP),建立秀丽隐杆线虫-泛耐药肺炎克雷伯菌感染模型,为研究病原菌致病机制及抗感染药物筛选奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 线虫和细菌 野生型秀丽隐杆线虫(WT Bristol N2)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) OP₅₀由中山大学实验室惠赠;临床分离的 XDRKP 由广州市南方医院临床微生物室提供,采用美国 BD 公司生产的 Phoenix-100 型全自动细菌鉴定和药敏测试系统,依据 2015 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)M100-S25 药敏试验标准判定[4]。

1.1.2 培养基 NGM(nematode growth media)培养基:胰蛋白胨 25 g,琼脂粉 17 g,NaCl 3 g,加入蒸馏水 975 mL,高温高压灭菌后冷却至 55℃,分别加入无菌胆固醇溶液(5 mg/mL,无水乙醇)1 mL, PBS 液(pH = 6.0)25 mL,1 mol/L MgSO₄ 1 mL,1 mol/L CaCl₂ 1 mL,1 mol/L 制霉菌素 1 mL,分装

至直径 10 cm 的培养皿中,备用;LB(Luria-Bertani)培养基按常规方法配制。

1.1.3 缓冲液及试剂 M9 缓冲液:6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄,5 g NaCl,0.25 g MgSO₄ · 7H₂O,加入蒸馏水 1 L,高压灭菌后备用;线虫裂解液:4 mL 蒸馏水,2 mL 次氯酸钠溶液,0.45 g NaOH,现用现配;叠氮化钠(NaN₃)、5-氟-2-脱氧尿嘧啶(FUDR)均购置于 Sigma 公司。

1.2 方 法

1.2.1 线虫的培养 线虫按照国际标准程序[5]进行培养。

1.2.2 线虫同期化处理 用 M9 缓冲液从 NGM 培养板上洗下虫体,收集、离心(3 500 r/min, 3 min)、弃上清,剩余 3.5 mL,加入 1.5 mL 线虫裂解液,剧烈震荡约 8 min,M9 洗涤 3 次,即从妊娠的成体线虫中分离得到虫卵,后 20℃ 振荡过夜孵育,获得 L1 期幼虫,将其置于新的 NGM 平板 *E. coli* OP₅₀ 菌苔上,20℃ 培养 48 h,即得到同步化的 L4 期线虫。

1.2.3 菌悬液的配制 将冻存的菌株复苏,划线培养,挑取单个菌落,再接种于 5 mL 的 LB 液体培养基中,37℃,150 r/min 震荡培养一定时间,备用。

1.2.4 线虫感染致死实验 用 M9 缓冲液从平板上洗下培养至 L4 期线虫,离心(3 500 r/min, 3 min),重复 2~3 次,悬浮后取 10 μL 在显微镜下观察线虫悬液中线虫的数量,然后取含有 20~30 条线虫的悬液置于 96 孔板中,感染组分别加入终浓度为 1.5 × 10⁸、1.5 × 10⁷、1.5 × 10⁶ CFU/mL 的 XDRKP,阴性对照组加入终浓度为 1 × 10⁹ CFU/mL 的 *E. coli* OP₅₀,空白对照组加入 20% LB 溶液;每种菌液做 5 个平行,其中为防止 N2 线虫繁殖,滴加 0.2 mmol/L 的 FUDR,96 孔板放置于相对湿度 80%~85%的培养箱,20℃ 培养,每天记录线虫的存活数。所有组均重复 3 次。

1.2.5 线虫肠道内细菌计数 选取 1.5 × 10⁸ CFU/mL XDRKP 感染线虫,每隔一定的时间,挑取 10 条经细菌感染的线虫,用含有 1 mmol/L NaN₃(麻醉剂)的 M9 缓冲液清洗 3 遍,以清除线虫体表的细菌,然后转移至装有 400 mg 石英砂的小试管,加 1 mL PBS 缓冲液涡旋振荡 2~3 min,得到的上清悬浮液稀释涂布、计数,以确定每条线虫体内

细菌数量。

1.2.6 感染线虫肠道细菌鉴定 经上述 1.2.5 步骤得到的上清悬液,经细菌纯培养后,进行细菌重新鉴定及药敏测试^[4]。

1.3 统计分析 应用 SPSS 20.0 软件,线虫生存时间采用 Kaplan-Meier 方法进行生存分析,log-rank 检验法对组间的数据进行差异显著性分析。计量资料采用完全随机设计方差分析,两两比较采用 SNK 检验分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 XDRKP 对线虫的感染致死判定 XDRKP 感染秀丽隐杆线虫,显微镜下观察,活虫呈正弦曲线特征,咽部肌肉运动;而 XDRKP 感染的死亡线虫呈直线型,咽部无运动,见图 1。



虚线箭头:线虫处于存活状态;实线箭头:线虫处于死亡状态

图 1 XDRKP 感染秀丽隐杆线虫死亡/存活状态

Figure 1 Death / survival status of *C. elegans* infected with XDRKP

2.2 秀丽隐杆线虫生存时间比较 采用不同浓度 XDRKP 感染秀丽隐杆线虫,以线虫是否死亡为结局变量,记录线虫的生存状况以及作生存分析。结果显示,其中 7 d 观察线虫生存状况,不同细菌浓度 (1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 CFU/mL XDRKP, 以及 *E. coli* OP₅₀ 对照组) 的线虫平均存活率分别为 0%、25.31%、83.95%、100%。随着细菌浓度降低,线虫的最长存活时间与线虫半数致死时间 (lethal time of 50%, LT50) 有所延长。见表 1。采用 log-rank 检验显示, 1.5×10^6 CFU/mL XDRKP 组与 *E. coli* OP₅₀ 对照组的生存曲线无统计学差异 ($\chi^2 = 0.08, P > 0.05$); 1.5×10^7 、 1.5×10^8 CFU/mL 组与 *E. coli* OP₅₀ 对照组的生存曲线差异均有统计学 (χ^2

值分别为 229.37、275.98,均 $P < 0.001$), 1.5×10^8 与 1.5×10^7 CFU/mL XDRKP 组的生存率低于对照组。

2.3 线虫肠道内细菌鉴定及计数 选取 1.5×10^8 CFU/mL XDRKP 感染线虫,观察不同时间线虫存活数量和状态。实验得到的上清悬液,经细菌纯培养后,进行细菌鉴定和药敏测试,证实为 XDRKP。感染 XDRKP 4、6、12、24 h 后,线虫体内细菌总量分别为 $(0.28 \pm 0.02) \times 10^5$ 、 $(0.50 \pm 0.38) \times 10^5$ 、 $(1.73 \pm 0.56) \times 10^5$ 、 $(2.62 \pm 0.53) \times 10^5$ CFU/mL。经方差分析,不同时间线虫体内细菌总数存在统计学差异 ($F = 1363.39, P < 0.001$); 经 SNK 检验显示,各时间点间体内细菌总量均有统计学差异 ($P < 0.05$), 说明在实验时间范围内,随时间延长, XDRKP 感染线虫体内细菌总量逐渐增加。

表 1 不同浓度 XDRKP 感染的秀丽隐杆线虫生存时间

Table 1 Survival time of *C. elegans* infected with different concentrations of XDRKP

细菌种类	细菌浓度 (CFU/mL)	线虫最长存活时间 (d)	LT50 (d)
空白对照	0	18	12.00 ± 0.70
<i>E. coli</i> OP ₅₀	10^9	21	12.00 ± 0.42
XDRKP	1.5×10^6	18	12.00 ± 0.79
XDRKP	1.5×10^7	10	6.00 ± 0.20
XDRKP	1.5×10^8	7	3.00 ± 0.17

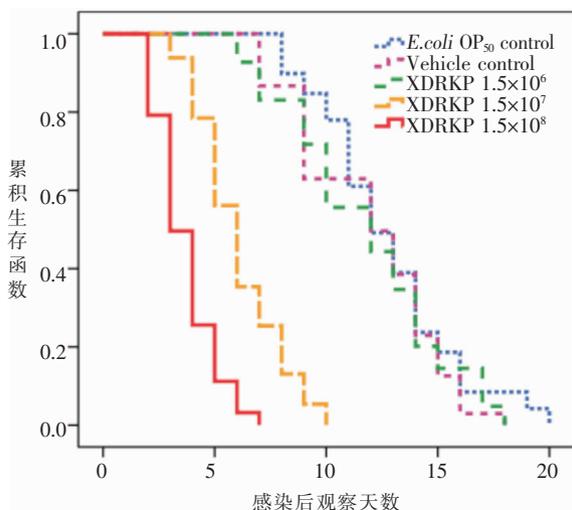


图 2 不同浓度 XDRKP 感染的秀丽隐杆线虫生存曲线

Figure 2 Survival curves of *C. elegans* infected with different concentrations of XDRKP

3 讨论

秀丽隐杆线虫是一种以细菌为食的小型土壤线虫,因其全身透明易于观察、生命周期短、操作方便简单、培养成本低廉、可操作性强等优点,成为应用广泛的模式生物。但是,唯有病原菌对线虫致病,线虫才有可能作为研究病原菌致病性及抗感染药物筛选的模型。研究表明,粪肠球菌可以在线虫肠内繁殖为更高的滴度,导致持续的感染,不能被根除,但高滴度的屎肠球菌也可以在线虫的肠内累积,但不会影响线虫的寿命^[6];国内也有报道,单核细胞增生李斯特菌不能杀死秀丽隐杆线虫,对线虫无显著致病性,不适合作为研究李斯特菌致病机制的模型^[7]。本研究利用临床分离的 XDRKP 菌株,在液体条件下感染线虫,通过观察线虫的生存状态及线虫肠道细菌数量变化情况,探讨线虫是否可以作为 KP 感染的模型。

目前,国内线虫感染模型多采用经典的固体平板杀线虫方法^[8],其过程繁琐。研究^[9]报道,固体平板实验与液体实验结果相似。本研究采用液体条件下 XDRKP 菌株感染线虫,不足之处是未与传统的固体平板杀线虫方法作对照。感染菌不是线虫常规的食物,研究^[10]表明,线虫能区分不同细菌的气味,从而避开对其有害的食物而拒食。避免线虫为避开感染菌苔而聚集于空白区域而达不到感染目的,固体实验感染菌的菌苔涂布采用全板涂布,但是需排除被皿壁阻挡而死亡的线虫。

一个优秀筛选模型的建立,必须具备良好的可操作性、重复性和稳定性,感染病原菌浓度的选择十分重要,是决定线虫感染程度的重要条件之一。本实验根据病原菌自身生长特点,收集对数生长末期的菌液感染线虫被 XDRKP 感染的线虫活动明显迟缓,效果明显。感染线虫的 XDRKP 浓度为 1.5×10^7 与 1.5×10^8 CFU/mL 时,线虫的存活率低于对照组,线虫的最长生存时间为 7、10 d; XDRKP 浓度为 1.5×10^6 CFU/mL 时,线虫的存活率与对照组一致,说明在 1.5×10^7 、 1.5×10^8 CFU/mL 浓度范围内 XDRKP 对线虫有感染致死效果,初步建立泛耐药肺炎克雷伯菌感染秀丽隐杆线虫感染模型。

本研究证实了线虫的死亡与肠道内 XDRKP 感

染有关。实验中,线虫肠道细菌计数得到的上清悬液,经细菌纯培养,采用全自动细菌鉴定及药敏结果证实为 XDRKP,说明 XDRKP 进入到线虫体内,感染了秀丽隐杆线虫。随着感染时间的延长,线虫肠道体内细菌数不断定植和繁殖,造成线虫的永久性感染直至死亡。

综上所述,本研究利用临床分离的 XDRKP,在液体条件下成功建立了 XDRKP 感染线虫的模型,并证实了 XDRKP 在线虫体内定植,不断繁殖导致其死亡,该研究为下一步研究其致病机理以及药物筛选奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(5):401-410.
- [2] van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(2): 115-120.
- [3] Sifri CD, Begun J, Ausubel FM. The worm has turned-microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans* [J]. Trends Microbiol, 2005, 13(3):119-127.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement [S]. CLSI document, M100-S25, 2015.
- [5] Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* [J]. WormBook, 2006, 2(11):1-11.
- [6] Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(19): 10892-10897.
- [7] 郭欣欣,于新惠,张颖,等. 单核细胞增生李斯特菌对秀丽隐杆线虫致病性的研究 [J]. 微生物学杂志, 2015, 35(4): 7-12.
- [8] 周雨濛,陈代杰,李继安,等. 秀丽隐杆线虫-耐药铜绿假单胞菌感染模型的建立 [J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(7): 511-514.
- [9] 施慧,孙帆,刘仲仲,等. 解淀粉芽孢杆菌杀线虫活性高效筛选模型的建立及应用 [J]. 微生物学报, 2014, 54(5): 589-594.
- [10] Liu J, Hafting J, Critchley AT, et al. Components of the cultivated red seaweed *Chondrus crispus* enhance the immune response of *Caenorhabditis elegans* to *Pseudomonas aeruginosa* through the pmk-1, daf-2/daf-16, and skn-1 pathways [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(23): 7343-7350.

(本文编辑:左双燕)