

汉赛巴尔通体红霉素体外诱导耐药研究

宋秀平, 刘起勇, 刘云彦, 栗冬梅*

1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 世界卫生组织媒介生物监

测与管理合作中心 北京 102206

摘 要: 【目的】体外诱导汉赛巴尔通体对红霉素的耐药菌株, 初步探索其耐药的发生规律。

【方法】选取对红霉素均敏感的汉赛巴尔通体参考株 Houston-1 (ATCC 49882) 和 6 株国内猫分离株作为出发菌株。出发菌株连续培养 3 代后开始诱导, 红霉素起始浓度为出发菌株初始 MIC 的 1/4, 逐级倍增诱导浓度, 直至菌株停止生长或诱导成高度耐药菌株。采用 E-test 法和琼脂稀释法测定耐药前后试验菌株对红霉素和其他 10 种抗生素的最低抑菌浓度 (minimal inhibition concentrations, MICs)。同时测定出发菌株无药传代后菌株的 MICs 值。【结果】经过 12 代诱导, 6 株菌除获得对红霉素耐药 (MIC 值 > 256 $\mu\text{g/mL}$) 外, 对阿奇霉素和克林霉素也差生耐药, MIC 值 > 256 $\mu\text{g/mL}$ 。出发菌株自然传代 30 次后, 有 4 株菌对克林霉素产生了一定的耐药, 对其他抗生素耐药情况没有变化。【结论】通过体外浓度递增法首次成功诱导汉赛巴尔通体对红霉素耐药, 并产生对同系药物阿奇霉素的耐药和林克酰胺类克林霉素的耐药, 提供了苛养、包内寄生菌耐药菌株模型, 为今后进一步研究巴尔通体对大环内脂类抗生素的相关耐药机制奠定了基础。

关键词: 汉赛巴尔通体; 红霉素; 诱导耐药; 最低抑菌浓度; 猫抓病

基金: 国家自然科学基金 (No. 81101286)

作者简介: 宋秀平, 女, 1972.6.5, 副主任技师, 硕士, 主要从事巴尔通体病原学及分子生物学研究, songxiuping@icdc.cn

* 通讯作者: 栗冬梅, E-mail: lidongmei@icdc.cn

Acknowledgement: This project was supported by NSFC (The grant No. 81101286).

Corresponding author. Mailing address: P. O. BOX5, Changping, Beijing 102206, China. E-mail: lidongmei@icdc.cn.

In Vitro Induction of Erythromycin Resistant in *Bartonella henselae*

SONG Xiu-Ping, LIU Qi-Yong, LI Dong-Mei*

WHO Collaborating Center for Vector Surveillance and Management, Department of Vector Biology and Control, State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract:[Objective] Erythromycin has been often used to treat *Bartonella*-associated infections. Our aim here was to induction of erythromycin resistant in *B. henselae*. [Methods] The reference strain Houston-1 (ATCC 49882) and the six wild strains were selected as the candidates for the induction of erythromycin resistant, which were all susceptible to erythromycin. The original strains, which were subcultured three passages after recovery were used to induce drug resistance. The initiative concentration of erythromycin was $1/4 \times \text{MIC}$. In vitro induction was carried out on serial doubling concentrations of antibiotics incorporated into agar. MICs for erythromycin and the other antibiotics were determined using the agar dilution and E-test methods. The blank control of *B. henselae* strain was measured MICs for detecting whether subcultures have an effect on the development of resistance. [Results] After 12 passages on antibiotics plates, six strains acquired resistance to erythromycin and azithromycin with MICs $> 256 \text{ mg/L}$. The six erythromycin-resistant mutants also displayed resistant to clindamycin. All were sensitive to other antibiotics. After 30 passages on plates, four strains had a certain level of resistance to clindamycin, the others had not changed. [Conclusion] *Bartonella henselae* can be induced to be resistant to erythromycin and azithromycin in vitro by increasing drug concentration serially and

the acquired erythromycin-resistant strains were resistant to clindamycin. The study provided a model of fastidious, facultative intracellular bacilli for the further study of mechanism of *Bartonella* resistance to macrolides.

Key words: *Bartonella henselae*; Erythromycin; Induction of resistance; MICs; Cat scratch disease

汉赛巴尔通体 (*Bartonella henselae*, Bh) 是革兰氏阴性菌，是引起猫抓病 (Cat scratch disease, CSD) 的主要病原，还可引起心内膜炎、杆菌性血管瘤 (Bacillary angiomatosis, BA)、肝紫癜 (Peliosis hepatitis, PH)、视神经炎等多种疾病^[1]。红霉素是治疗 CSD、BA^[2]、PH^[3] 的首选药物，并且成功的治愈了一些病人。也有文献报道^[2, 4]，使用红霉素治疗时间少于 15 天，感染经常复发，故治疗周期要达到 3 至 4 个月，但长期用药是否会诱导 Bh 产生耐药且其相关的耐药机制研究仍较少，为了解汉赛巴尔通体红霉素耐药发生规律，本研究应用浓度递增法体外诱导汉赛巴尔通体菌株对红霉素产生耐药，采用 Etest 法分析对抗生素敏感性变化及诱导后的耐药谱，为阐明巴尔通体耐药机制和指导临床用药奠定基础。

1. 材料与方法

1.1 菌株：汉赛巴尔通体国际标准菌株 Houston-1 (ATCC 49882) 和 6 株本实验室分离自北京、河南省和山东省猫血的 Bh 分离株：M6BJ、M9BJ、M22BJ、M45SHD、M70SHD 和 M51HN。

药敏试验质控菌株使用金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 (美国临床实验标准化委员会 (NCCLS) 在 NCCLS 琼脂稀释法和肉汤稀释法中推荐质控菌株。)

1.2 抗生素

1.2.1 琼脂稀释法用抗生素标准品：红霉素 (EM)，纯度 95.3%，含 1.2% 水，Dr.

Ehrenstorfer GmbH 生产。

1.2.2 E-test 药敏试纸条： AB Biodisk（瑞典），冻存于-20℃，抗生素种类见表 1。

Table 1 The Etest strips in the study

表 1 Etest 药敏试纸条		
抗生素种类	抗生素名称（缩写）	浓度范围 MIC(mg/L)
Antibiotics types	Antibiotics list (Ab.)	Concentrations range of MICs (mg/L)
头孢类	头孢噻吩钠 (CE)	0.016-256
Cephalosporins	头孢他啶 (TZ)	0.016-256
氨基糖苷类	妥布霉素 (TM)	0.016-256
	丁胺卡那霉素 (AK)	0.016-256
	庆大霉素 (GM)	0.016-256
aminoglycosides		
大环内酯类	红霉素 (EM)	0.016-256
macrolides	阿奇霉素 (AZ)	0.016-256
林可酰胺类	克林霉素 (CM)	0.016-256
Lincosamides		
四环素类	强力霉素 (DC)	0.016-256
tetracyclines		
氟喹诺酮类	环丙沙星 (CI)	0.002-32
fluoroquinolones		
酰胺醇类抗生素		
Amide alcohols	氯霉素 (CL)	0.016-256
antibiotics		
安沙霉素类	利福平 (RI)	0.002-32
ansamycins		
青霉素类	苋星青霉素 (PG)	0.002-32
Penicillins		

1.3 培养方法

用含 5% 去纤维羊血的胰酶大豆琼脂培养基 (TSA) (BD, 美国) 复苏培养巴尔通体菌株, 培养条件为 5% CO₂、潮湿环境中 35 °C 培养 5 – 7 d。

1.4 MICs 测定

采用 Etest 法测定 EM、TZ、CE、AZ、CM、CL、PG、TM、RI、DC、GM、CI 和 AK 对不同菌株的 MICs 值。考虑细菌传代生长也可引起菌株变异产生耐药, 故同时各菌株均在无药平板传代 30 次, 测定传代 30 次后的 MICs, 以确认传代可否引起相关耐药。

1.5 EM 体外耐药诱导:

参考文献^[5]方法诱导耐药菌株。首先用 95% 乙醇将红霉素标准品溶解, 再用灭菌三蒸水配制成 2000 mg / L 的抗生素储备液。按照 NCCLS 推荐的琼脂稀释法测定菌株的最低抑菌浓度(MIC) , 在无抗生素平板上培养 3 代以后, 用于诱导实验; 以出发菌株初始 MIC 的 1/4 为起始浓度, 培养 6 天后, 以相同浓度再传一代, 培养 6 天后, 接种到 1/2×MIC (0.004 mg/L) 抗生素浓度的培养基上, 培养 6 天后观察菌生长情况; 重复以上步骤, 直至 Bh 停止生长或诱导成高度耐药菌株 ER-Bh。当细菌生长不良时, 可同一浓度或重复传代培养 3 次, 若仍旧持续 7 天无细菌生长则弃去。检测指标: 经 Etest 法测定, 诱导菌株的 MIC 大于或等于 256 mg/L。 为保证 ER-Bh 选择性耐药的稳定性, 诱导结束后在无抗生素培养基上传代 3 次。用 E-test 法重新测定对红霉素、头孢他啶等 13 种抗生素的 MICs 值, 观察有无明显变化。

2 结果

2.1 各种抗生素对汉赛巴尔通体出发菌株的 MICs

采用琼脂稀释法测定了 13 种抗生素对 7 株汉赛巴尔通体菌株的 MICs, 结果见表 2 所示。结果显示 7 株菌对 EM、AZ 和 CL 均敏感, 与文献报道一致[6]。

表 2 13 种抗生素对汉赛巴尔通体亲本株的 MICs (Etest 法)

Table 2 The MICs of 13 antibiotics against 7 parental strains of *B. henselae* by Etest (mg/L)

Antibiotics	Houston-1	M45SHD	M6BJ	M70SHD	M9BJ	M22BJ	M51HN
EM	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016
CI	0.064	0.5	0.25	0.38	0.25	0.19	0.5
CL	<0.016	<0.016	0.19	0.094	<0.016	0.023	0.094
CM	4	0.094	12	3	1.5	6	8
GM	<0.016	0.25	2	0.38	0.5	0.75	0.5
AZ	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016
TM	0.75	0.094	1.5	0.25	0.5	0.75	0.75
TZ	0.023	0.064	0.047	0.094	0.064	0.047	0.25
AK	6	6	8	8	16	12	16
CE	32	>256	>256	>256	>256	>256	>256
DC	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016
RI	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
PG	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016

2.2 红霉素体外诱导及 MICs 检测结果

2.2.1 EM 诱导情况：经 EM 体外诱导后，汉赛巴尔通体菌对 EM 的 MICs：琼脂稀释法测定红霉素浓度为 0.008 mg/L 时初始菌株开始出现生长抑制，因此，起始诱导浓度从 0.002 mg/L ($1/4 \times \text{MIC}$) 开始。经体外诱导，在含 4.0 mg/L 红霉素的培养基上, M6BJ、M9BJ、M22BJ、M45SHD、M70SHD、M51HN 生长良好，经 Etest 法检测，除 M9BJ 外，其余 6 株菌对 EM 的 MICs 均大于 256 mg/L（见表 3），对红霉素产生耐药。

2.2.2 诱导后 MICs 检测结果：经诱导对红霉素高度耐药的 6 株菌对阿奇霉素、克林霉素^[7-8]的 MIC 均>256，呈高度耐药，对强力霉素和环丙沙星等其他 10 种抗生素的 MICs 均无明显变化（表 3）。

表 3 汉赛巴尔通体菌体外诱导实验后 MICs 值

Table 3 MICs for *B. henselae* strains after the induction of resistance determined by Etest (mg/L)

Antibiotics	Houston-1	M45SHD	M6BJ	M70SHD	M9BJ	M22BJ	M51HN
EM	>256	>256	>256	>256	4	>256	>256
CI	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	2
CL	0.064	0.047	0.16	0.125	4	0.25	0.25
CM	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
GM	0.38	0.38	0.38	0.19	0.5	0.25	0.38
AZ	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
TM	0.125	0.19	0.25	0.19	0.38	0.25	0.38
TZ	0.094	0.094	0.032	0.094	0.047	0.064	0.25
AK	8	6	16	6	12	16	24
CE	32	>256	>256	>256	>256	>256	>256
DC	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016
RI	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
PG	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016

2.3 出发菌株无药传代 30 次后 MICs 检测结果：出发菌株在无抗生素平板上传代 30 次后，对 EM、AZ、DC 等抗生素敏感，只有 M22BJ、M51HN 对 CM 的 MICs 大于 256，高度耐药。见表 4

表 4 初始菌株传代 30 次后的 MICs

Table 4 the MICs of the original stains after 30 passages

	Houston-1	M45SHD	M6BJ	M70SHD	M9BJ	M22BJ	M51HN
EM	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016
CI	0.5	0.25	0.25	0.5	0.25	0.38	0.25
CL	0.094	0.047	0.19	0.094	0.064	0.094	0.094
CM	6	0.19	4	3	1.5	>256	>256
GM	0.25	0.5	1.5	0.38	0.38	0.5	0.25

AZ	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016
TM	0.19	0.25	0.75	0.25	0.38	0.25	0.19
TZ	0.032	0.016	0.032	0.094	0.032	0.023	0.5
AK	1	4	6	8	8	12	8
CE	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
DC	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016
RI	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
PG	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016

4.讨论

通过本研究可知，体外浓度递增法可以诱导出汉赛巴尔通体红霉素耐药菌株，提示临床上连续低剂量用药可能会导致此类抗生素耐药菌株的出现，导致临床治疗失败或是复发^[9, 10]。需足量使用以减少耐药菌株的产生。文献报道，抗性细菌是通过三个途径来消除环境中的红霉素抗菌作用的：影响红霉素在胞内的积累(大环内酯的外排机制)，革兰氏阳性和阴性菌都可以通过过量表达外排泵这种膜蛋白来产生红霉素抗性作用；破坏红霉素的结构使其失去抗菌作用；改造或修饰红霉素在核糖体上的结合作用位点。汉赛巴尔通体在体外对大环内脂类的抗性是由于糖体大亚基的 23S rRNA 碱基突变和核糖体蛋白质 L4 突变引起的^[11]。6 株诱导高度耐药菌经传代 5 次后，MIC 值无下降。提示临床上用药时，对于耐药菌，即使经过一段时间不使用红霉素，对红霉素的敏感性也不会有所增加，故可以对临床抗生素使用提供指导。经红霉素诱导后的菌株同时对阿奇霉素和克林霉素产生耐药，这与文献报道一致^[11]，说明可产生对同类药物的耐药性，提示在临床上对大环内酯类抗生素耐药时，要做 D 实验^[12, 13]，D 实验阳性者，表示克林霉素也耐药，不应该再使用克林霉素进行治疗。另外，在无药平板中传代也导致初始菌株 M22BJ、M51HN 对 CM 的 MICs 的 MIC 值大于 256，较诱导前有较大的变化，说明细菌可能随着细菌传代引起耐药，使治疗效果不尽人意。

本实验采用人工诱导耐药的方法，通过考查同一菌株在药物的选择压力下，由敏感到耐药的演变过程，复制巴尔通体菌的耐药模型，为其耐药机制的研究奠定基础，为临床合理用药提供可靠的理论依据。下一步研究将检测红霉素耐药相关基因在诱导过程中的突变情况，确认耐药诱导对这些已知耐药基因的影响。

参考文献

1. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella spp.* as emerging human pathogens[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1997, 10:203–219.
2. Koehler JE, Tappero JW. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, 17:612–624.
3. Rolain JM, Maurin MA, Bryskier, et al. In vitro activities of telithromycin (HMR 3647) against *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowasekii*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella bacilliformis*, and *Ehrlichia chaffeensis*[J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2000, 44:1391–1393.
- 4 Tappero JW, Koehler JE, Berger TG, et al. Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1993, 118(5):363-365.
- 5 赵小勇, 邹全明, 郭刚等. 幽门螺杆菌对天然植物成分诱导耐药反应的实验研究[J]. *药物研究*, 2006, 15 (18) :8-10.
- 6 Podsiadly E, Zabicka D, Demkow U, et al. Susceptibility of Polish *Bartonella henselae* Strains[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2012, 61(2):143-5
- 7 Silpak Biswas, Didier Raoult, Jean-Marc Rolain. Molecular Characterization of Resistance to Macrolides in *Bartonella henselae*[J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, 50(9): 3192–3193
- 8 关幼华, 周金凤, 陈梅, 等. 葡萄球菌属中红霉素诱导克林霉素耐药的检测[J]. *中国抗生素杂志*,

2011,36(7):540-542

9 Bass JW, Freitas BC, Freitas AD, et al. Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease[J]. *Pediatric Infectious Diseases*, 1998,17:447–452.

10 Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, et al. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species[J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2004, 48:1921–1933.

11 Biswas S, Raoult D, Rolain JM. Molecular Characterization of Resistance to Macrolides in *Bartonella henselae*[J]. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 2006, 50(9):3192–3193.

12 沈定霞,罗燕萍,徐雅萍,等.葡萄球菌对红霉素和克林霉素的诱导耐药性研究[J].*中华检验医学杂志*,2005,28（4）:401-402.

13 Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci [J]. *Journal of Clinical Microbiology* *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41 (10) :4740-4047.