

# 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠腹膜炎模型的建立

孙琦,王湘雨,陈诗琪,司徒莉芳,赵卫,万成松\*

(南方医科大学 公共卫生与热带医学学院 BSL-3 实验室,中国广东 广州 510515)

**摘要:**“超级细菌”耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)是诱发连续腹膜透析患者腹膜炎的常见细菌,且治疗困难。目前缺少 MRSA 腹膜炎动物模型。腹腔注射  $2\times 10^9\sim 2\times 10^{10}$  CFU/mL 7 组不同浓度的 MRSA 感染小鼠,观察小鼠死亡时间,测定肝脏与脾脏细菌定植量,进行肝、脾病理分析,确定适宜的建模浓度。研究发现,小鼠感染细菌浓度最小致死剂量为每只  $2\times 10^9$  CFU,最适建模浓度为每只  $1.4\times 10^9$  CFU。结果表明建立了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠腹膜炎模型,为 MRSA 致腹膜炎的致病机制研究、疫苗的研制提供实验基础。

**关键词:**耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA);腹膜炎;小鼠模型

中图分类号:R-33

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2015)01-0054-05

## Establishment of Mouse Peritonitis Model of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

SUN Qi, WANG Xiang-yu, CHEN Shi-qi, SITU Li-fang,  
ZHAO Wei, WAN Cheng-song\*

(BSL-3 Laboratory, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

**Abstract:** "Super bacteria" methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a frequent cause of peritonitis in continuous peritoneal dialysis, and the treatment is difficult. Meanwhile, MRSA peritonitis animal models are lacking. It was performed with mice divided into seven groups and given intraperitoneal injection  $2\times 10^9\sim 2\times 10^{10}$  CFU/mL of MRSA. At the same time, the time of death was recorded. Besides, the bacteria amount of liver and spleen was measured and the pathological analysis of liver and spleen was performed. Then appropriate modeling concentration was determined. The results showed that the minimal lethal dose of the clinical isolated MRSA was  $2\times 10^9$  CFU each mouse and the optimal concentration of modeling was  $1.4\times 10^9$  CFU each mouse. The mouse peritonitis model of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* was constructed successfully, which provided a reliable animal model for the research of peritonitis caused by MRSA and development of the vaccine.

**Key words:** methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); peritonitis; mouse model

(*Life Science Research*, 2015, 19(1): 054-058)

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)自 1961 年在英国首次发现,全球范围内均有广泛报道。近

年来由于抗生素的广泛使用,MRSA 的分离率逐年增加,已成为医院感染最常见的致病菌<sup>[1,2]</sup>。由于 MRSA 耐药谱广、感染率高、病情严重、治疗困

收稿日期:2014-06-05; 修回日期:2014-10-09

基金项目:广东省自然科学基金项目(S2013010014393)

作者简介:孙琦(1988-),男,山西晋城人,硕士研究生,主要从事大肠杆菌致病机制研究;\* 通讯作者:万成松(1965-),男,湖北荆州人,南方医科大学公共卫生与热带医学学院教授,博士,主要从事病原微生物基因组学及致病机理研究,Tel: 020-61648304, E-mail: gzwcs@126.com。

难,且多重耐药现象日益严重,一般只对万古霉素敏感,所以 MRSA 被称为“超级细菌”<sup>[3]</sup>。MRSA 可引起菌血症、心内膜炎、肺炎等,同时也可导致腹膜炎<sup>[4]</sup>。由 MRSA 引起的腹膜炎主要发生在腹膜透析治疗中,腹膜透析是一种治疗急、慢性肾功能衰竭的重要方法,腹膜炎为其主要并发症,在腹膜透析腹膜炎患者中常可分离到 MRSA<sup>[5]</sup>。目前国内外缺少 MRSA 腹膜炎动物模型。本实验中用不同浓度的 MRSA 菌液腹腔注射小鼠,筛选建立耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠腹膜炎模型,为进一步研究 MRSA 致腹膜炎疾病提供了实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA 临床分离株,由南方医院检验科分离,本实验室保存。对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类和含酶抑制剂的复方制剂耐药。

### 1.2 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,雌性,6~8 周龄,体质量(20±2) g,购自南方医科大学实验动物中心,实验过程中供给专用饲料及饮水,所有的试验程序符合美国 NIH(National Institutes of Health)有关动物保护和利用的条例。

### 1.3 菌株 $OD_{600}$ -CFU 标准曲线的建立

MRSA 临床分离株复苏,37℃ 200 r/min 摇菌过夜,取菌液,LB 固体培养基划线,37℃ 培养 24 h,挑取单菌落,再摇菌培养 12 h。

取摇菌后菌液增菌培养(1:100),2 h 后,取菌液测  $OD_{600}$ ,之后每 0.5 h 测一次  $OD_{600}$ ,当  $OD_{600}$  大于 1 时,停止测量。每次测量,取菌液 1 mL,离心弃上清,用无菌生理盐水洗涤 2 次,用 1 mL 无菌生理盐水重悬。当  $OD_{600}$  大于 1 时,停止测量。

将重悬后的菌液倍比稀释(1:10)10 次,每份稀释液 1 mL,取各稀释浓度 0.1 mL,加入无菌平皿后,倒入已熔化的 LB 培养基(45℃),与菌液混匀,待冷却凝固后,37℃ 培养 24 h,菌落计数。同一稀释浓度制两块平板。计算原菌液单位体积细菌数,其对数值  $\lg$ CFU 与稀释液对应的  $OD_{600}$  值建立  $OD_{600}$ -CFU 标准曲线。

### 1.4 感染菌液的制备

将小鼠随机分为 8 组,组号分别为 1~8,每组 10 只小鼠。1~7 组为实验组,第 8 组为空白对照组。

取 MRSA 临床分离株,过夜培养后,增菌培

养(1:100) 3 h,测定  $OD_{600}$ ,根据  $OD_{600}$ -CFU 标准曲线确定菌液内活菌浓度,离心后弃上清,用无菌生理盐水洗涤 2~3 次再重悬,调整菌液浓度为  $2 \times 10^9$  CFU/mL、 $6 \times 10^9$  CFU/mL、 $8 \times 10^9$  CFU/mL、 $1.2 \times 10^{10}$  CFU/mL、 $1.4 \times 10^{10}$  CFU/mL、 $1.8 \times 10^{10}$  CFU/mL、 $2 \times 10^{10}$  CFU/mL。

### 1.5 MRSA 腹膜炎小鼠模型的建立

将小鼠随机分为 8 组,组号分别为 1~8,每组 10 只小鼠。1~7 组为实验组,第 8 组为空白对照组。注射前 12 h 禁食,自由饮水。

1~7 组小鼠经腹腔分别注射  $2 \times 10^9$  CFU/mL、 $6 \times 10^9$  CFU/mL、 $8 \times 10^9$  CFU/mL、 $1.2 \times 10^{10}$  CFU/mL、 $1.4 \times 10^{10}$  CFU/mL、 $1.8 \times 10^{10}$  CFU/mL、 $2 \times 10^{10}$  CFU/mL 的菌液每只 0.1 mL,第 8 组空白对照组每只注射 0.1 mL 无菌生理盐水。实验后将小鼠放回笼内,给予食物及饮水。

### 1.6 MRSA 腹膜炎小鼠模型的评估

小鼠生存率:小鼠感染 MRSA 后分别于 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、16 h、24 h、48 h、72 h、95 h、120 h 观察,记录小鼠死亡情况,绘制各感染浓度 120 h 内小鼠生存曲线。

病理学检查:小鼠感染 MRSA 后,第 24 h、72 h、120 h 颈椎脱臼处死,取肝脏与脾脏,生理盐水清洗,浸入 4%多聚甲醛溶液中固定,H.E 染色,显微镜下观察。正常小鼠做空白对照。

器官带菌量测定:感染 MRSA 小鼠,每 24 h 取一只,颈椎脱臼处死,取肝脏与脾脏,研磨匀浆,倍比稀释(1:10)4 次,取 0.1 mL 稀释液加入无菌平皿,倒入已融化 LB 培养基(45℃),混匀,培养基冷却凝固后,37℃ 培养 24 h,菌落计数。计算肝、脾细菌定植量。

## 2 结果

### 2.1 菌株 $OD_{600}$ -CFU 标准曲线

2 h、2.5 h、3 h、3.5 h 测定菌液  $OD_{600}$ ,分别为 0.185、0.576、0.929、1.256。活菌计数实验中,2 h、2.5 h、3 h、3.5 h 菌液的第 7 次稀释浓度的平均菌落生长数分别为 5.5 个、17 个、26 个、36.6 个。

每毫升菌液活菌数=平均菌落生长数×稀释倍数×10,计算得 2 h、2.5 h、3 h、3.5 h 菌液细菌量为  $5.5 \times 10^8$  CFU/mL、 $1.7 \times 10^9$  CFU/mL、 $2.6 \times 10^9$  CFU/mL、 $3.65 \times 10^9$  CFU/mL。以  $OD_{600}$  值为横坐标,以  $\lg$ CFU 为纵坐标,绘制菌株  $OD_{600}$ -CFU 标准曲线,见图 1。

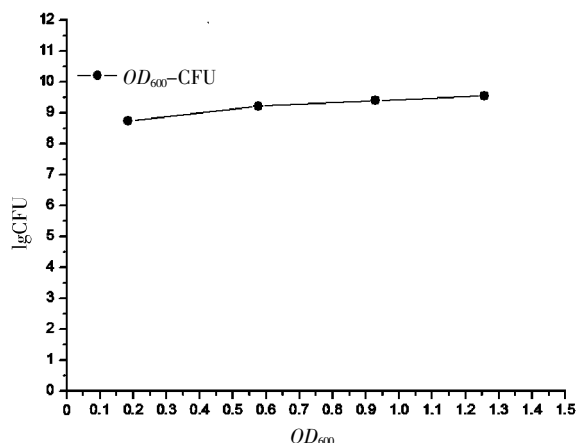


图1 MRSA 临床分离株  $OD_{600}$ -CFU 标准曲线

Fig.1 Clinical isolates of MRSA  $OD_{600}$ -CFU standard curve

## 2.2 感染后小鼠症状

不同剂量 MRSA 感染小鼠后,1 组小鼠精神尚可,无明显变化。2~3 组小鼠精神稍差,活动减少,于 16 h 开始出现死亡,死前出现惊厥抽搐等表现,24 h 后小鼠存活率稳定。4~7 组小鼠精神状态差、蜷缩不动、厌食、毛发杂乱蓬松、眼部充血,于 8 h 开始出现死亡,死前出现惊厥抽搐等表现,24 h 后仍不断有小鼠死亡。空白对照组小鼠精神食欲等无明显变化。

2~7 组未死亡小鼠于感染后体重下降,72 h 体重降至最低,96 h 开始回升。1 组与空白对照组小鼠体重持续增加。

## 2.3 小鼠生存率

小鼠注射不同剂量 MRSA 菌液,低浓度组小鼠无死亡,随着 MRSA 菌液浓度增加,小鼠死亡率不断升高。当菌液浓度达到  $1.4 \times 10^{10}$  CFU/mL 时,24 h 小鼠死亡 60%,120 h 小鼠全部死亡,认为该浓度适合建立小鼠模型。当菌液浓度达到  $2 \times 10^{10}$  CFU/mL 时,小鼠在 24 h 内全部死亡,每只小鼠注射 0.1 mL 菌液,则该菌株的最小致死剂量为每只  $2 \times 10^9$  CFU(图 2)。

由图 2 可见,小鼠注射菌液后,第 1 组小鼠无死亡;第 2 组小鼠 24 h 内死亡 1 只,至 120 h 无新增死亡数;第 3 组小鼠 24 h 内死亡 2 只,至 120 h 无新增死亡数;第 4 组小鼠 24 h 内死亡 4 只,至 120 h 共死亡 8 只小鼠;第 5 组小鼠 24 h 内死亡 6 只,至 120 h 10 只小鼠全部死亡;第 6 组小鼠 24 h 内死亡 7 只,至 120 h 全部小鼠死亡;第 7 组小鼠 24 h 内全部死亡。空白对照组小鼠无死亡。

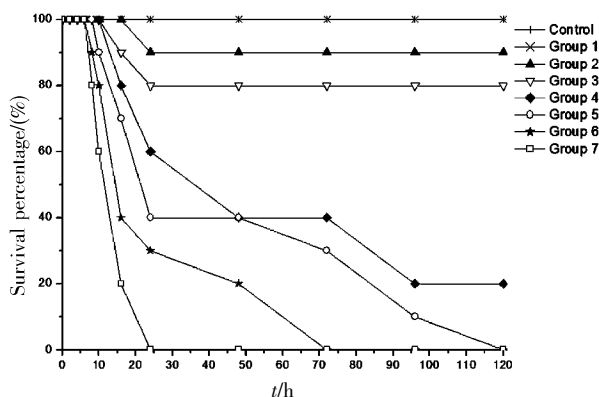


图2 小鼠生存曲线

Fig.2 Mouse survival curve

## 2.4 病理学检查

以  $1.4 \times 10^{10}$  CFU/mL 浓度 MRSA 感染小鼠,于 24、72、120 h 解剖小鼠并观察,可见小鼠腹腔有渗出液,腹膜不光滑、粘连,部分小鼠可见腹腔内有脓肿物形成。取小鼠肝脏与脾脏,HE 染色制作病理切片,显微镜下观察。镜下可见在 24 h~120 h 期间内,肝、脾组织渐进性坏死,细胞逐步出现变性坏死,组织结构溶解消失。24 h 镜下未见炎性细胞,72 h 与 120 h 可见中性粒细胞浸润。24 h 肝脏与脾脏可见大量细菌团块,72 h 与 120 h 细菌团块明显减少消失。

MRSA 感染小鼠 24 h 肝脏病理切片镜下观察,肝组织结构较空白对照组变化不明显,肝血窦小血管中以及肝实质细胞内可见大量细菌团块,未见炎性细胞浸润。72 h 肝脏病理切片可见肝组织局部出现点状坏死,核固缩,肝细胞肿大,可见炎细胞聚集。120 h 肝脏病理切片可见肝组织结构消失,破坏明显,未见明显肝索,肝细胞明显肿大,胞质疏松,可见散在肝细胞气球样变性,脂肪样变性。局部可见碎片状坏死,核固缩,核溶解明显,可见中性粒细胞浸润。图 3A、B、C 分别为第 24 h、72 h、120 h 切片。

MRSA 感染小鼠 24 h 脾脏病理切片镜下观察,可见脾组织结构局部溶解消失,脾组织内存在大量细菌团块。72 h 脾脏病理切片可见脾组织坏死明显,出现空洞结构,可能为巨噬细胞吞噬作用造成。120 h 脾脏病理切片可见脾组织结构消失,细胞松散,炎性细胞浸润。图 4 A、B、C 分别为第 24 h、72 h、120 h 切片。

## 2.5 器官带菌量测定

以  $8 \times 10^9$  CFU/mL(第 3 组)、 $1.4 \times 10^{10}$  CFU/mL(第 5 组)、 $2 \times 10^{10}$  CFU/mL(第 7 组)浓度菌液感染

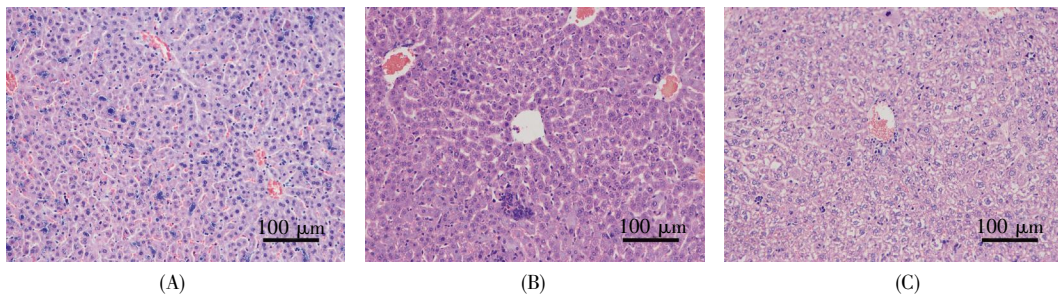


图 3 MRSA 感染小鼠肝脏病理变化(HE 染色,200×)

Fig.3 Liver histopathologic examination of MRSA-infected mice (HE staining,200×)

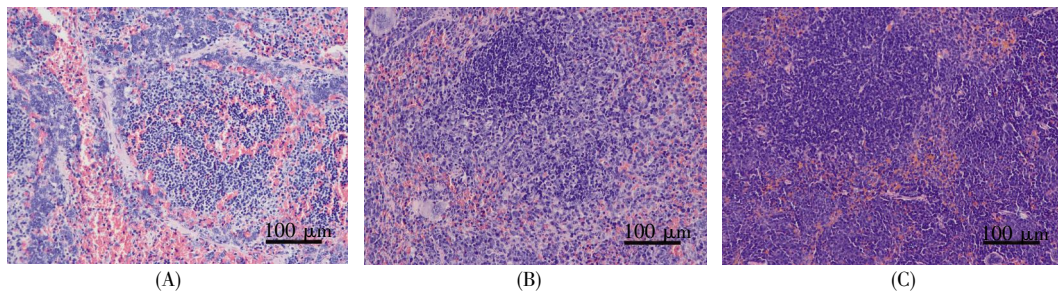


图 4 MRSA 感染小鼠脾脏病理变化(HE 染色,200×)

Fig.4 Spleen histopathologic examination of MRSA-infected mice (HE staining,200×)

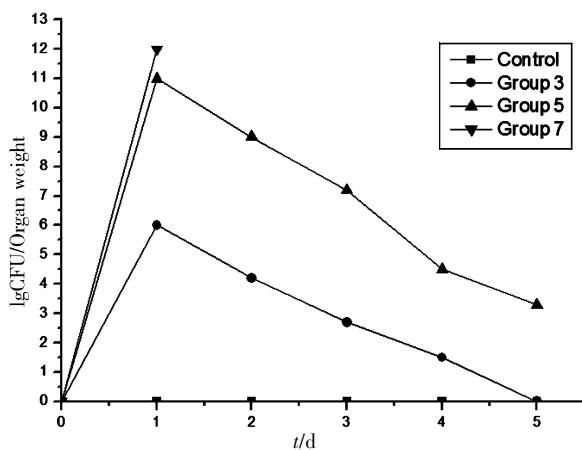


图 5 MRSA 感染小鼠肝脏细菌定植量

Fig.5 Liver bacteria amount of MRSA-infected mice

小鼠,小鼠肝脏与脾脏均有细菌定植,在感染 24 h 后定植菌量达到高峰,之后数日不断下降。对照组小鼠肝脏与脾脏均无细菌定植。见图 5 与图 6。

### 3 讨论

由于近年来抗生素的滥用,MRSA 的检出率呈现逐年上升的趋势,已成为医院最常见的致病菌之一<sup>[1,2]</sup>,MRSA 感染率高,感染后病情凶猛,不及时治疗有很大的死亡风险<sup>[3]</sup>。而 MRSA 耐药谱广且多重耐药现象日益严重,一般只对万古霉素敏感<sup>[4]</sup>,甚至近年来发现对万古霉素耐药的 MRSA<sup>[6]</sup>,这无疑增加了 MRSA 感染的治疗难度,可见研制

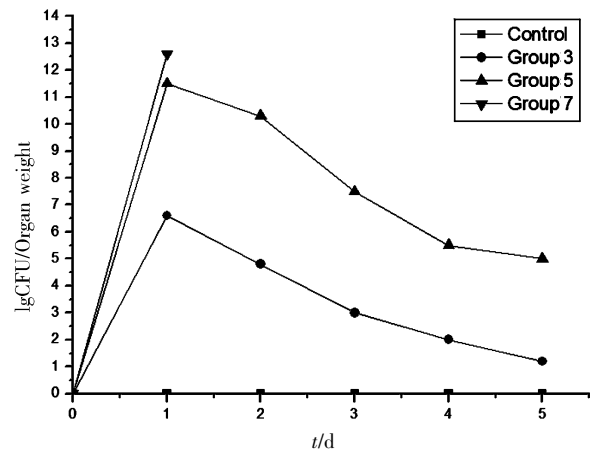


图 6 MRSA 感染小鼠脾脏细菌定植量

Fig.6 Spleen bacteria amount of MRSA-infected mice

新型药物治疗 MRSA 感染的紧迫性与必要性。而研制 MRSA 的致病机理及其治疗药物,首先需要建立其感染动物模型,目前,国内外建立的 MRSA 小鼠模型主要分 3 种:脓毒血症全身感染模型、局部损伤模型如皮肤脓肿感染模型、肺部感染模型<sup>[7]</sup>。国外有学者建立了金黄色葡萄球菌小鼠腹膜炎模型<sup>[8]</sup>,但缺少 MRSA 小鼠腹膜炎模型。实际上,小鼠急性细菌性腹膜炎模型是临床研究的经典的动物模型之一,且 MRSA 亦会引起细菌性腹膜炎的发生:肝硬化患者由于腹水的产生易发生由 MRSA 引起的自发性腹膜炎<sup>[9]</sup>,肝移植等腹部手术后引起感染性腹膜炎<sup>[10]</sup>,而由 MRSA 感染引起的细菌

性腹膜炎最常发生在终末期肾脏疾病与连续腹膜透析患者中<sup>[5]</sup>。腹膜透析作为晚期肾衰竭病人常用的治疗手段之一,由于其破坏了皮肤屏障功能,且腹膜导管缺乏免疫作用,故常在其出口处发生细菌感染,引发腹膜透析主要的并发症——腹膜炎<sup>[11]</sup>。最常见的导致腹膜透析相关腹膜炎的细菌是革兰阳性细菌,尤其是抗生素耐药的革兰阳性细菌正越来越普遍地成为腹膜透析相关腹膜炎的致病菌<sup>[12]</sup>。数据显示,1994~2005年间,香港进行腹膜透析治疗的2065个病例中,245个病例发生了腹膜炎(11.9%):由金黄色葡萄球菌引起的腹膜炎有152例,占其中的62.4%,由MRSA引起的腹膜炎有45例,占有腹膜炎病例的18.4%<sup>[13]</sup>。且MRSA引起的腹膜炎治愈率仅有7.7%,远低于其他细菌所致腹膜炎的治愈率<sup>[5]</sup>。对MRSA腹膜炎的致病机制及药物研究刻不容缓,而动物模型是研究的基础,因此建立MRSA小鼠腹膜炎模型是非常有必要的。

本实验中,我们对小鼠腹腔注射7个不同浓度的菌液以诱发小鼠腹膜炎,其中第1组小鼠5日内无死亡,说明该感染浓度过低,不足以引起小鼠腹膜炎的发生;第7组小鼠24h内全部死亡,故该组小鼠每只的注射剂量 $2 \times 10^9$  CFU,是这株MRSA菌株的最小致死剂量(minimal lethal dose, MLD)。考虑到小鼠模型常用于评价药品的药效,故感染的菌液浓度过低,小鼠死亡数过少体现不出药物的作用,而感染浓度过高,小鼠很快全部死亡,药物难以起保护作用,亦观察不到药物作用。而第5组 $1.4 \times 10^{10}$  CFU/ml组小鼠24h内死亡6只,达到了总数的半数左右,至第5日10只小鼠全部死亡,故以该浓度菌液感染小鼠后再用药物进行保护,可以明显地观察到药物的保护效力,故认为该浓度感染的小鼠建模最为合适。

本实验中,我们观察到小鼠在感染高浓度MRSA后,体重下降,之后逐渐回升。小鼠有典型的急性腹膜炎表现,解剖小鼠检查肝脏与脾脏发现,肝脏与脾脏呈渐进性损害,感染MRSA 120h后细胞损害严重且有炎性细胞浸润,主要为中性粒细胞与巨噬细胞。对小鼠肝脏与脾脏进行细菌定植量测定,发现感染24h时有大量细菌定植,之后细菌量逐步下降。以上表现符合细菌性腹膜炎

的临床与病理表现。

MRSA小鼠腹膜炎模型的建立,为今后MRSA致腹膜炎疾病的致病机制的研究、治疗MRSA腹膜炎疾病的药物药效评价以及疫苗的研发等奠定了实验技术基础。

#### 参考文献(References):

- [1] BENNER E J, MORTHLAND V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial susceptibility[J]. The New England Journal of Medicine, 1967,277(13):678-680.
- [2] WANG L, BARRETT J F. Control and prevention of MRSA infections[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, 391: 209-225.
- [3] 王丽春, 李大江, 熊中华, 等. 金黄色葡萄球菌医院感染的临床及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志(WANG Li-chun, LI Da-jiang, XIONG Zhong-hua, et al. Nosocomial infections due to *Staphylococcus aureus*: Clinical characteristics and resistance analysis[J]. Chinese Journal of Nosocomiology), 2008, 18(10): 1485-1488.
- [4] ROOIJAKKERS S H, VAN KESSEL K P, VAN STRIJP J A. Staphylococcal innate immune evasion[J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(12): 596-601.
- [5] DAVENPORT A. Peritonitis remains the major clinical complication of peritoneal dialysis: the London, UK, peritonitis audit 2002-2003[J]. Peritoneal Dialysis International, 2009, 29(3): 297-302.
- [6] SMITH T L, PEARSON M L, WILCOX K R, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. The New England Journal of Medicine, 1999, 340(7): 493-501.
- [7] 王婷婷, 左钱飞, 刘开云, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠全身感染模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报(WANG Ting-ting, ZUO Qian-fei, LIU Kai-yun, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of systemic MRSA infection[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica), 2012, 20(6): 61-64.
- [8] RAUCH S, DEEDENT A C, KIM H K, et al. Abscess formation and alpha-hemolysin induced toxicity in a mouse model of *Staphylococcus aureus* peritoneal infection[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(10): 3721-3732.
- [9] CAMPILLO B, DUPEYRON C, RICHARDET J P. Epidemiology of hospital-acquired infections in cirrhotic patients: effect of carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and influence of previous antibiotic therapy and norfloxacin prophylaxis[J]. Epidemiology and Infection, 2001, 127(3): 443-450.
- [10] TAKATSUKI M, EGUCHI S, YAMANOUCI K, et al. The outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after living donor liver transplantation in a Japanese center[J]. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences, 2010, 17(6): 839-843.
- [11] LIN S Y, HO M W, LIU J H, et al. Successful salvage of peritoneal catheter in unresolved methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peritonitis by combination treatment with daptomycin and rifampin[J]. Blood Purification, 2011, 32(4): 249-252.
- [12] SALZER W. Antimicrobial-resistant gram-positive bacteria in pd peritonitis and the newer antibiotics used to treat them[J]. Peritoneal Dialysis International, 2005, 25(4): 313-319.
- [13] SZETO C C, CHOW K M, KWAN B C, et al. *Staphylococcus aureus* peritonitis complicates peritoneal dialysis: review of 245 consecutive cases[J]. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2007, 2(2): 245-251.