

· 论 著 ·

表皮葡萄球菌生物膜形成与细菌耐药性的相关性分析

叶杨芹, 包裕杰, 马珂, 张雯雁, 奚婷, 陈芳莹, 宗明, 范列英
(上海市东方医院/同济大学附属东方医院检验科, 上海 200120)

摘要:目的 探讨表皮葡萄球菌临床分离株生物膜的形成情况, 分析其生物膜形成与细菌耐药性的相关性。方法 收集 2014 年 1 月至 2015 年 2 月住院患者血标本分离出的表皮葡萄球菌 62 株, 采用生物膜形成试验和聚合酶链式反应(PCR)扩增试验检测细菌生物膜, 并采用纸片扩散法(K-B 法)进行细菌药物敏感性试验。结果 利用生物膜形成试验检出生物膜阳性菌株 23 株, 检出率为 37.1%; PCR 扩增试验检出 *icaA* 基因 27 株, 检出率为 43.5%, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 两种方法同时阳性的菌株为 14 株。生物膜阳性菌株对所测抗菌药物的耐药率普遍高于生物膜阴性菌株, 其中对庆大霉素、青霉素 G、苯唑西林、左旋氧氟沙星、头孢西丁的耐药率比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 所有菌株对万古霉素、利奈唑胺、奎奴普丁/达福普汀均敏感。结论 两种方法对表皮葡萄球菌生物膜的检出率无明显差异, 生物膜阳性菌株耐药率普遍高于生物膜阴性菌株。

关键词:表皮葡萄球菌; 生物膜; 耐药性; *ica* 操纵子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)05-0618-03

Analysis on correlation between biofilm formation and bacterial resistance in *Staphylococcus epidermidis*

Ye Yangqin, Bao Yujie, Ma Ke, Zhang Wenyan, Xi Ting, Chen Fangying, Zong Ming, Fan Lieying

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai East Hospital/East Hospital

Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China)

Abstract: **Objective** To investigate the formation of biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*, and to analyse the correlation between biofilm formation and antibacterial resistance of *Staphylococcus epidermidis*. **Methods** A total of 62 strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood specimens of inpatients with bloodstream infection, from January 2014 to February 2015, were collected. The biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* was detected by using the semi-quantitative adherence assay and polymerase chain reaction(PCR) amplification experiment. The antibacterial susceptibility test was carried out according to K-B method. **Results** The positive rate of biofilm formation detected by using the semi-quantitative adherence assay and PCR for *icaA* gene were 37.1% (23 strains) and 43.5% (27 strains) respectively, and there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). There were 14 positive strains detected by both methods. The resistance rates of strains producing biofilm to antibacterial agents were generally higher than those of non-producing biofilm strains, and there were statistically significant differences in resistance rates of strains to gentamicin, penicillin, oxacillin, levofloxacin and ceftiofuran ($P < 0.05$). All bacteria were sensitive to vancomycin, linezolid and quinupristin/dalfopristin. **Conclusion** There is no significant difference between the two methods in detecting biofilm formation. The resistance rates of strains producing biofilm to antibacterial agents were generally higher than those of non-producing biofilm strains.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*; biofilm; drug resistance; *ica* operon

表皮葡萄球菌是一类凝固酶阴性的革兰阳性球菌, 是寄生于人体的正常菌群之一, 属于条件致病菌。近年来, 随着多种插管、透析技术、人工心瓣膜、人工晶体、人工关节等侵入性医疗材料的使用, 表皮葡萄球菌已经成为医院感染的主要病原菌之一。表皮葡萄球菌容易黏附于异物表面, 形成细菌生物膜, 增加临床治疗难度, 造成严重危害^[1]。本研究以引起血流感染的表皮葡萄球菌为研究对象, 利用生物膜形成实验及分子生物学方法筛选生物膜阳性细菌, 并进一步分析表皮葡萄球菌对抗菌药物的耐药特征, 以期更好地了解表皮葡萄球菌耐药性与生物膜形成的相关性, 为指导临床有效地预防及控制表皮葡萄球菌感染奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集本院 2014 年 1 月至 2015 年 2 月住院患者血液标本分离得到的表皮葡萄球菌 62 株(单瓶血培养瓶阳性检视为污染菌, 不作为实验用菌株)。以表皮葡萄球菌 ATCC12228(SE ATCC12228)为生物膜形成的阴性对照株, 以

金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为药敏质控菌株及 *icaA* 阴性对照菌株。

1.2 仪器与试剂 Micro-Scan Walkaway-96 全自动微生物鉴定系统(德国西门子公司), ABI-7000 荧光定量聚合酶链式反应(PCR)分析仪(美国应用生物系统公司), Tanon-2500 凝胶成像系统(上海天能公司), Biotek-Elx808U 酶标仪(美国伯滕仪器有限公司)。PCR 反应所需试剂及引物购自美国 Invitrogen 公司; LB 肉汤、结晶紫、Bouin 固定液、琼脂糖均为国产分析纯; 抗菌药物纸片购自英国 Oxoid 公司; 血琼脂平板、M-H 琼脂平板购自北京赛默飞世尔有限公司。

1.3 方法

1.3.1 表皮葡萄球菌生物膜形成实验 按文献[2]方法, 略作改动。将表皮葡萄球菌接种于新鲜配制的 LB 液体培养基中, 35 °C 培养过夜。将培养过夜的菌液用新鲜的 LB 肉汤按 1 : 200 比例稀释后取 200 μL LB 肉汤分别加入到无菌的 96 孔平底细胞培养板中, 每株分别接种 4 孔。每一细胞培养板中设置

空白对照(同体积的无菌 LB 肉汤)4 孔、阴性对照菌株(SE ATCC 12228)4 孔。35 °C 培养 20 h 过夜后,吸于每孔菌液,然后用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗板 3 次,将未黏附的细菌洗去。晾干后,每孔加入 200 μL Bouin 固定液固定 1 h,冲洗晾干后,每孔加入 200 μL 结晶紫染色 10 min,去离子水冲洗未黏附的细菌,晾干后,每孔加入 200 μL 无水乙醇,轻微振荡。在酶标仪下读取每孔在 570 nm 处的吸光度值(A 值),以阴性对照孔的 A 值为参考,结果大于 $\bar{x} + 3s$ 则判为阳性。记录数据,备分析用。

1.3.2 PCR 扩增检测 icaA 基因 (1)表皮葡萄球菌基因组 DNA 的提取:将临床分离的表皮葡萄球菌及指控菌株接种于血平板上,35 °C 培养过夜。用接种环取适量菌于 300 μL 无菌生理盐水中,充分混匀后 12 000 r/min 离心 5 min,去上清。在上清中加入 300 μL 无菌水,充分混匀,煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 5 min,留上清。(2)PCR 扩增检测 icaA 基因:通过 PCR 的方法特异性扩增 icaA 基因。50 μL PCR 扩增体系:25 mmol/L 氯化镁(MgCl₂)3 μL,10 mmol/L 三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)1 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL,0.5 μL),10×PCR (25 mmol/L,5 μL),上游引物 5'-GAT GGG CTC AAG GCG GGC AT-3'(50 pmol/L,1 μL),下游引物 5'-GAT GGG CTC AAG GCG GGC AT-3'(50 pmol/L,1 μL),DNA 模板 5 μL。PCR 反应扩增条件:94 °C 5 min,94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,共 30 个循环,72 °C 5 min。(3)PCR 扩增产物的分析:1%琼脂糖凝胶于 1×TAE 缓冲液,用 0.5 μg/mL 溴化乙锭染色,150 V 电压下电泳约 30 min,将 PCR 扩增所得特异性片段克隆测序,并在 MegaBlast 上进行基因序列比对。

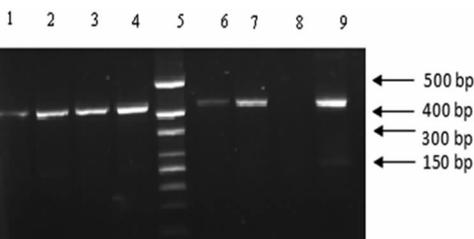
1.3.3 药敏试验 采用纸片扩散法(K-B 法)对所有表皮葡萄球菌临床分离株及质控菌株做药物敏感性试验,结果按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2013 版判断标准执行^[3]。

1.4 统计学处理 采用 WHONET5.6 软件进行细菌耐药性分析。采用 SAS6.12 软件进行数据处理与统计分析,计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验进行比较分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 半定量黏附试验结果 利用生物膜形成实验检出生物膜阳性菌株 23 株,检出率为 37.1%,部分结果见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 PCR 扩增结果 62 株表皮葡萄球菌临床分离株中有 27 株检出 icaA,检出率为 43.5%,特异性片段长度在 300~400 bp 之间,见图 2。将 PCR 扩增得到特异性片段克隆测序,得到片段长度为 386 bp,经与 GeneBank 比对为 icaA 基因。



泳道 1~4、6、7、9:表皮葡萄球菌临床分离株;泳道 8:金黄色葡萄球菌 ATCC25923;泳道 5:DL500 ladder。

图 2 PCR 扩增结果

2.3 两种方法检测生物膜的结果比较 ica 基因检测与半定量黏附试验检测菌株生物膜阳性率比较,差异无统计学意义

($\chi^2 = 0.41, P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两种方法检测生物膜的结果比较(n)

半定量黏附试验	ica 基因检测		合计
	阳性	阴性	
阳性	14	13	27
阴性	9	26	35
合计	23	39	62

2.4 药敏试验结果 生物膜阳性菌株与生物膜阴性菌株对庆大霉素、青霉素 G、苯唑西林、左旋氧氟沙星、头孢西丁的耐药率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);对其余检测药物的耐药性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 表皮葡萄球菌临床分离株细菌耐药性比较[n(%)]

抗菌药物	生物膜阳性菌株(n=23)	生物膜阴性菌株(n=39)	χ^2	P
庆大霉素	15(66.7)	15(38.9)	4.15	<0.05
青霉素 G	21(91.7)	23(57.8)	2.05	<0.05
苯唑西林	11(45.8)	5(13.9)	9.26	<0.05
万古霉素	0(0.0)	0(0.0)	—	—
红霉素	17(75.0)	28(72.2)	26.66	>0.05
克林霉素	9(37.5)	10(25.0)	48.75	>0.05
复方磺胺甲噁唑	6(25.0)	4(11.1)	51.67	>0.05
左旋氧氟沙星	15(66.6)	12(30.6)	6.98	<0.05
利福平	1(4.2)	1(2.8)	0.15	>0.05
奎奴普汀/达福普汀	0(0.0)	0(0.0)	—	—
利奈唑胺	0(0.0)	0(0.0)	—	—
头孢西丁	11(45.8)	6(14.3)	7.65	<0.05

—:无数据。

3 讨 论

生物膜具有保护细菌、对抗抗菌药物、促进细菌逃避机体免疫系统的作用,使细菌对抗菌药物和机体免疫力的抵抗能力大大增强,出现耐药,甚至多重耐药,为临床预防及治疗细菌感染带来巨大的挑战。因此,正确认识表皮葡萄球菌的生物膜及其形成机制和相关因子的调控,将对临床防治起到有效的指导作用。

3.1 表皮葡萄球菌生物膜形成能力分析 表皮葡萄球菌形成生物膜除了受周围环境的影响外,还受到自身遗传基因的调控。多糖胞间黏附素(PIA)是表皮葡萄球菌生物膜形成的必需成分^[4-8],表皮葡萄球菌可产生大量 PIA。目前,明确的是 PIA 合成的基础为 ica 基因,ica 基因位点包含一个操纵子结构 icaADBC,4 个基因序列依次排列,其中 icaD 基因位于 icaA 和 icaB 基因之间,且与二者有部分重叠。国内邢铭友等^[9]研究发现表皮葡萄球菌 ica 操纵子的存在与生物膜表型密切相关,PIA 的合成是生物膜形成的关键环节。

本研究利用生物膜形成试验(半定量黏附试验)检测出的生物膜阳性菌株为 23 株,检出率为 37.1%;而利用 PCR 扩增 icaA 基因检测生物膜测得阳性菌株 27 株,检出率为 43.5%。基因检测的检出率略高于生物膜形成试验,但经统计学分析两种方法检出率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。有 13 株菌

株 *icaA* 基因检测阳性,而生物膜形成试验结果为阴性。初步认为可能的原因有以下两种:(1)检测到 *icaA* 基因可能由于某种缺失或抑制等原因得不到充分的表达或完全没有表达,因而无法形成生物膜;(2)本试验中检测的 *ica* 基因为 *icaA* 基因型,并没有对 *icaD*、*icaC*、*icaB* 基因型进行检测,而 *icaA*、*icaD* 和 *icaC* 这 3 个基因型,任何缺失或突变都有可能影响生物膜的形成,因此,所测菌株可能由于缺失或突变等原因不表达或弱表达 *icaD*、*icaC*、*icaB* 基因而无法形成生物膜。此外,*icaA*、*icaD*、*icaB*、*icaC* 基因的表达还受其他生物因子(如 SigB 因子、RsbU 因子)及环境因子(氯化钠、乙醇)的影响^[10]。确切原因涉及表皮葡萄球菌生物膜的基因调控等多方面因素,机制较为复杂,需要进一步学习、研究。本研究结果中还有 9 株菌株为生物膜形成试验阳性而基因检测结果为阴性。其原因可能是表皮葡萄球菌生物膜的形成受到除受 *icaA*、*icaD*、*icaB*、*icaC* 调控外,还受到其他调控机制的影响,值得深入探讨^[11-12]。

3.2 表皮葡萄球菌生物膜形成与细菌耐药性的相关性 生物膜阳性菌株对庆大霉素、青霉素 G、红霉素、左旋氧氟沙星的耐药率均在 65% 以上,而对苯唑西林、克林霉素、头孢西丁的耐药率在 50% 以下。对复方磺胺甲噁唑和利福平也存在一定程度的耐药。生物膜阴性菌株耐药率整体低于生物膜阳性菌株,其中对庆大霉素、青霉素 G、苯唑西林、左旋氧氟沙星、头孢西丁的耐药率比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示生物膜阳性细菌对上述抗菌药物的耐药性更明显。随着细菌的生长繁殖及抗菌药物的使用,敏感菌群受到抑制,而耐药菌得到优势生长,细菌形成生物膜后定植在体内,难以清除,而生物膜又极大地限制了抗菌药物的作用效果,增加了临床治疗难度。此外,未发现对万古霉素、奎奴普汀/达福普汀和利奈唑胺耐药的菌株。

综上所述,本研究发现表皮葡萄球菌临床分离株有一定的生物膜形成能力,因本次试验所用菌株分离自住院患者血液,分析生物膜形成可能与细菌从皮肤定植部位入侵或静脉留置针使用增加定植黏附风险等有关。形成生物膜的菌株较生物膜阴性菌株耐药率高,提示应该采取有效手段消毒灭菌,降低生物膜形成率,减少医疗及经济负担。

参考文献

[1] Wojtyczka RD, Orlewska K, Kepa M, et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11(5): 4619-4633.

[2] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices[J]. *J Clin Microbiol*, 1985, 22(6): 996-1006.

[3] Clinical Laboratory Standards Institute. M100-S23 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2013.

[4] Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2(1): 38.

[5] Yu D, Zhao L, Xue T, et al. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an *icaR* dependent manner[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(4): 1-12.

[6] Ziebuhr W, Dietrich K, Trautmann M, et al. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis[J]. *Int J Med Microbiol*, 2000, 290(1): 115-120.

[7] Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015(5): 7.

[8] Solati SM, Tajbakhsh E, Khamesipour F, et al. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran[J]. *AMB Express*, 2015, 5(1): 134.

[9] 邢铭友, 刘莉娜, 宋世会, 等. 表皮葡萄球菌 *ica* 操纵子与细胞间多糖黏附素及生物膜表型的相关性[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2008, 37(4): 449-452.

[10] Luther MK, Bilida S, Mermel LA, et al. Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Infect Dis Ther*, 2015, 4(2): 219-226.

[11] Salaberry SR, Saldenberg AB, Zuniga E, et al. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis[J]. *Microb Pathog*, 2015(85): 35-39.

[12] Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015(5): 14.

(收稿日期: 2015-09-26)



(上接第 617 页)

参考文献

[1] 刘春霞, 顾猛, 张虹, 等. 南通地区过敏儿童特异性过敏原检测结果分析及临床意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2014, 18(9): 44-47.

[2] 卢晓芳. 敏筛过敏原检测系统对不同年龄组喘息患儿的过敏原分析[J]. *辽宁医学杂志*, 2013, 27(3): 136-137.

[3] 孙秋风, 蒋吴君, 陈正荣, 等. 血清 25-羟维生素 D3 水平与婴儿喘息关系及临床意义探讨[J]. *中国实用儿科杂志*, 2015, 30(3): 199-202.

[4] 吴艳梅, 张莉莉. 体外过敏原定量检测在哮喘诊断中的应用[J].

陕西医学杂志, 2014, 43(11): 1562-1563.

[5] 张文娟, 孙立清, 张开俊. 儿童哮喘体外过敏原检测 106 例分析[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2012, 4(4): 365-366.

[6] 陈晓, 张融, 徐金梅, 等. 165 例 5 岁以下反复喘息症状患儿的相关过敏原检测及意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2013, 17(19): 172-173.

[7] 许德翔, 高岭. 南京地区哮喘儿童体外过敏原检测分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(24): 3357-3358.

(收稿日期: 2015-12-11)