论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2252-03

临床分离表皮葡萄球菌的大环内酯耐药性与生物膜形成能力、icaA基因型的关系

枉 前,孙凤军,夏培元 (第三军医大学西南医院药学部,重庆 400038)

摘 要:目的 研究68株临床分离表皮葡萄球菌大环内酯耐药性与生物膜形成能力、icaA基因型之间的关系,初步预测采用大环内酯抗菌药物预防表皮葡萄球菌生物膜感染的有效性。**方法** 以琼脂平板稀释法测定菌株的最小抑菌浓度,采用微孔测定法考察临床分离表皮葡萄球菌生物膜形成能力,通过PCR法测定icaA基因型,探讨三者之间的关系。**结果** 临床分离表皮葡萄球菌对大环内酯耐药程度较高(88.2%),且耐药菌生物膜形成能力较敏感菌显著增强($P<0.05$),耐药菌与敏感菌的icaA阳性比率没有统计学差异($P>0.05$)。**结论** 红霉素、阿奇霉素、克拉霉素等常用的大环内酯类药物可能难以有效地预防表皮葡萄球菌生物膜感染。

关键词:表皮葡萄球菌;细菌生物膜;大环内酯;icaA
中图法分类号:R372;R378.11;R969.3 **文献标识码**:A

Relationship of macrolide-resistant phenotypes with biofilm formation and icaA-genetypes of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis*

WANG Qian, SUN Feng-jun, XIA Pei-yuan (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the macrolide-resistance, ability of biofilm formation and icaA-genetypes of 68 stains of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) so as to explore the efficacy of macrolide to prevent biofilm-associated infections caused by *S. epidermidis*. **Methods** Minimum inhibitory concentration (MIC) were detected by agar-plate dilution method, and microtiter-plate assay was used to investigate the ability of biofilm formation, and icaA genetype was identified by PCR. **Results** High macrolide-resistant rate (88.2%) was showed for clinical isolated *S. epidermidis*, and biofilms for macrolide-resistant strains were significantly stronger than that of macrolide-sensitive strains, but there was no dependability found between these two for icaA positive rate. **Conclusion** Frequently-used macrolide such as erythromycin, azithromycin, and clarithromycin may incompetence to prevent biofilm-associated infections caused by *S. epidermidis*.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*; bacterial biofilm; macrolides; icaA

表皮葡萄球菌(staphylococcus epidermidis)属机会致病菌,通常情况下定植于人体皮肤和黏膜,致病力很低,但其可黏附于植入的医学高分子材料表面,如导管、人工心脏瓣膜、假体、人工关节等,并在体内形成难以清除的细菌生物膜(bacterial biofilm)[1]。随着这些医学高分子材料应用的增加,表皮葡萄球菌生物膜感染已日趋常见[2]。细菌生物膜是细菌附着于固体物质表面,并利用自身分泌的含水聚合物质粘附成团,形成的一种与浮游细胞相对应的具特殊微结构的群落。由于生物膜菌对抗菌药物的耐受性比浮游菌提高了数百至上千倍,同时细菌生物膜还具有可播散的特点,因此在临床上细菌生物膜感染常表现为反复发生并不易彻底清除,是临床难治性感染的重要原因[3]。

预防给药仍是植入医疗器械生物膜感染的主要防治手段之一,但临床分离的凝固酶阴性葡萄球菌(其中主要为表皮葡萄球菌)的耐药率逐年增加[4],这在客观上要求临床预防用药时应根据临床耐药变迁情况合理地选择。大环内酯类药物具广谱抗菌作用,临床应用普遍,也应用于葡萄球菌的抗感染治疗。本研究通过考察临床分离表皮葡萄球菌的常用大环内酯药物耐药情况,并结合菌株体外细菌生物膜形成的能力,初步预测采用大环内酯类药物预防表皮葡萄球菌生物膜感染的有效性。

基金项目:国家自然科学基金(30572366)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30572366)
作者简介:枉 前,男,四川省泸州市人,博士研究生,主管药师,主要从事抗感染药理学方面的研究。E-mail: wangqian@mail.tmmu.com.cn
通信作者:夏培元,E-mail: py_xia@yahoo.com.cn
收稿日期:2009-08-28;**修回日期**:2009-09-09

1　材料与方法

1.1　实验菌株及来源

68 株表皮葡萄球菌(编号 010 ~ 077)分离于本院 2007 年 8 月至 2008 年 9 月住院患者的临床送检标本,经美国产 BBLCRYSTAL™ AUTOREADER 快速细菌自动鉴定仪鉴定。药敏质控株金黄色葡萄球菌 ATCC29213,为本院国家药品临床研究基地保存。

1.2　药物与试剂

万古霉素(vancomycin)、红霉素(erythromycin)、阿奇霉素(azithromycin)、克拉霉素(clarithromycin)均购自美国 Sigma 公司,M-H 培养肉汤(北京路桥技术公司,CM901),胰胨大豆培养基(TSA)和胰胨大豆培养肉汤(TSB)购自美国 Sigma 公司,结晶紫(美国 Omiga 公司),PCR 试剂盒(上海 Promega 公司),其余试剂均为分析纯。

1.3　实验仪器

多点接种仪(日本 Sakuma 公司),SPX-150-Z 型恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),THZ-92B 型恒温震荡培养箱(上海跃进医疗器械厂),SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏净集团安泰空气技术有限公司),电子天平(Sartorius 公司,BP221S 型),酶标仪(奥地利 Sunrise Tecan 公司),PCR 扩增仪(英国 HYBAID 公司, SRRT001 型),电泳仪(美国 Bio-Rad 公司,Power 300 型),凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司,Gel Doc 2000 型),低温离心机(法国 Jouan 公司,MR23i 型)。

1.4　方法

1.4.1　临床分离表皮葡萄球菌大环内酯药物的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,MIC)测定　　采用标准琼脂平板倍比稀释法。步骤为:M-H 肉汤过夜培养的金黄色葡萄球菌稀释 0.5 McFarland 单位(约 10^{11} CFU/L),再1∶10 稀释后,以多点接种仪接种 1 ~ 2 μl 菌液到含不同浓度药物的 M-H 琼脂平板,每点约 10^7 CFU/L,37 ℃孵育 20 h 后判断结果。

将平板置于暗色、无反光物体表面上判断试验终点,以能完全抑制细菌生长的药物浓度为 MIC。以质控菌种 ATCC29213 作为对照,参照 2007 版“实验室标准化协会”(clinical and laboratory standards institute, CLSI)公布的 MIC 质控范围,当其对应药物 MIC 值位于质控范围内,方可认为实验结果有效。药敏结果判读参照 CLSI 标准 2007 版。

1.4.2　临床分离表皮葡萄球菌生物膜形成能力的测定　　临床分离菌株生物膜形成能力测定采用微孔测定法,参照文献[5]方法并作适量改进。主要步骤如下:表皮葡萄球菌转 TSA 平板 37 ℃培养过夜,挑单菌落于 TSB 培养液中摇菌培养(约 130 r/min)过夜,以比浊法将菌液稀释至约 1.0×10^{10} CFU/L,以每孔 200 μl 加入灭菌的 96 孔平底培养板,再于 37 ℃培养箱中有氧孵育。24 h 后,小心吸取培养液,以每孔 200 μl 生理盐水轻柔冲洗 2 次,置通风阴凉处倒置风干固定。次日,以每孔 150 μl 1% 结晶紫溶液染色 5 min 后,以流水冲洗至空白染色孔肉眼未见明显颜色,再置通风阴凉处倒置风干;风干后以每孔 150 μl 30% 冰醋酸溶液充分溶解染色液,将染色液以蒸馏水 1∶10 稀释后于酶标仪 590 nm 处测定吸收度值[D(590)]。

1.4.3　临床分离表皮葡萄球菌 icaA 基因型的鉴定　　icaA 基因型的鉴定以 PCR 法进行。细菌基因组 DNA 提取参照文献[6]方法并作适当修改。首先,于 TSA 中划线培养的菌落,挑单菌落于 TSB 中摇菌(130 r/min)过夜。次日吸取菌液 1.5 ml 于 EP 管中,离心 12 000 × g,3 min;以灭菌去离子水洗涤沉淀 1 次重悬于裂解缓冲液(NaCl 0.44 g,EDTA 0.93 g,Tris 0.24 g,去离子水加至 100 ml) 450 μl 再加 50 g/L 的溶菌酶 50 μl,37 ℃水浴 45 min;加 50 μl 10% SDS,50 μl 10 g/L 蛋白酶 K,55 ℃水浴 2 h;200 μl 5 mol/L NaCl,600 μl 氯仿,室温 0.5 h;离心12 000 × g,3 min,转移水相入新的离心管;加 1 倍体积异丙醇,混合后离心 12 000 × g,3 min;70% 乙醇洗涤沉淀 2 遍(重悬,离心 12 000 × g,3 min),干燥后溶于适量灭菌去离子水。

icaA 基因的扩增按照 PCR 试剂盒说明进行。所采用 PCR 引物为:icaA 正义 5′-AGTTTCAGGCACTAACATCC-3′,反义 5′-CGCAGTTACAGGTAATCCAC-3′;gyrB 正义 5′-AAGGGTATTATGGCTTCACG-3′,反义 5′-TTTCACTTTCTTCAGGGTTC-3′。PCR 反应条件:94 ℃,3 min 预变性 1 次;94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 30 次循环;末次循环后于 72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存。反应结束后,产物以 1% 琼脂糖凝胶 (EB 浓度为 0.5 mg/L)电泳,上样量 5 μl,电压 100 V,30 min,凝胶成像系统成像观察结果。结果判读:以扩增出 gyrB 和 icaA 目的条带为 icaA 基因阳性;如扩增出 gyrB 未扩增出 icaA 目的条带,则视为 icaA 基因阴性;如未扩增出 gyrB,则重新提取 DNA 模板再行扩增。

1.5　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件行 t 检验及 χ^2 检验。

2　结果

2.1　临床分离表皮葡萄球菌大环内酯药物的 MIC 测定

在测定的 68 株临床分离表皮葡萄球菌中,所有临床分离菌对万古霉素敏感,红霉素、阿奇霉素、克拉霉素 3 种大环内酯类药物呈现了高度的交叉耐药性,其中耐药 60 株,敏感 8 株,耐药率均为 88.2%。见表 1。

表 1　68 株临床分离表皮葡萄球菌的 MIC 分布情况

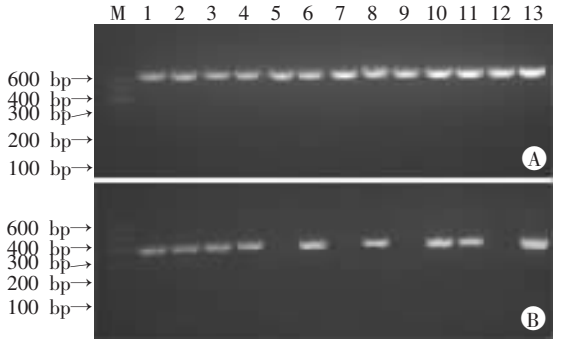
药物浓度(mg/L)	万古霉素	红霉素	阿奇霉素	克拉霉素
>128	0	57	57	52
64	0	0	0	1
32	0	1	0	1
16	0	2	0	3
8	0	0	3	3
4	0	0	0	0
2	46	0	0	0
1	22	1	0	0
0.5	0	1	0	0
0.25	0	1	0	1
0.125	0	1	0	0
<0.125	0	4	8	7

2.2 临床分离菌的大环内酯耐药性与生物膜形成能力的关系

按微孔法测定的68株临床分离表皮葡萄球菌体外生物膜形成 $D(590)$ 为(0.441 ± 0.371)。按 MIC 测定结果分类,将对红霉素耐药(MIC≥8 mg/L)的菌株与敏感菌株的生物膜形成能力平均值作比较分析,耐药株在体外的生物膜形成能力为(0.464 ± 0.384),敏感株在体外的生物膜形成能力为(0.272 ± 0.187),耐药株要显著强于敏感株($P < 0.05$)。提示临床分离表皮葡萄球菌对大环内酯类药物耐药的菌株在体外具有更高的生物膜形成能力。

2.3 临床分离菌 icaA 基因型的鉴定结果及其与体外生物膜形成能力、大环内酯耐药的关系

按 1.4.3 方法,在 gyrB 能够扩增出目的条带时,icaA 能扩增出目的条带的为阳性,icaA 未能扩增出目的条带的为阴性。其中 Se.024 ~ 037 PCR 产物电泳图见图 1。鉴定结果显示,在68株临床分离菌中,icaA 阳性的菌株有 39 株,占 57.4%;icaA 阴性的菌株有 29 株,占 42.6 %。



M:标准;1 ~ 13:分别为 24 ~ 29、31 ~ 37 号表皮葡萄球菌

A:gryB;B:icaA

图 1 临床分离表皮葡萄球菌的 icaA 基因型鉴定

按所鉴定的 icaA 基因型,分别统计 icaA 阳性的菌株和 icaA 阴性的菌株的体外生物膜形成能力,二者分别为(0.521 ± 0.418)、(0.337 ± 0.266)。icaA 阳性株的体外生物膜形成能力要显著强于 icaA 阴性株($P < 0.05$),提示 icaA 阳性株具更强的体外生物膜形成能力。

在 60 株大环内酯耐药菌中有 icaA 阳性菌株 35 株,在 8 株敏感菌中有 icaA 阳性菌株 4 株,差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示大环内酯耐药特性与 icaA 基因型无关。

3 讨论

表皮葡萄球菌生物膜感染一旦发生,抗感染治疗通常难以彻底清除,因此医疗器械植入手术中的预防用药尤为重要,在围手术期用药中,大环内酯类药物时有采用[7,8]。药敏试验结果显示,我院分离的表皮葡萄球菌对大环内酯类耐药现象较为严重,与文献[4]报道基本一致。本研究表明,细菌生物膜形成能力较强的菌株通常具有更高的大环内酯耐药性,这将使本就不佳的预防效果可能更难以发挥。因此本研究结果提示,在植入医疗器械的围手术期采用大环内酯类药物可能难以有效地预防生物膜感染。

由于体外细菌生物膜形成的测定尚不能完全反应体内情况,因此我们对 icaA 基因型也进行了测定。icaA 基因是葡萄球菌生物膜形成的关键性调节因子之一,通常认为 icaA 基因阳性的菌株更能形成较强的生物膜[9],本实验结果也支持这一点。但经统计分析并未显示其与大环内酯耐药的相关性,而目前也尚少见 icaA 基因型与耐药性具相关性的报道,其原因可能有二:细菌间耐药基因的传递通常由抗生素压力引起[10],而生物膜基因的传递机制目前尚不清楚,可能存在不同的机制;icaA 基因虽然和生物膜形成能力密切相关,但也不足于完全决定其生物膜形成能力。

值得注意的是,细菌生物膜形成能力与耐药的相关性可能不仅局限于大环内酯类药物[11],客观上增加了生物膜感染预防用药选择的难度。一方面,需要根据流行病原菌的特点选择敏感性相对较强的药物;另一方面,应参考大量实验室证据选择对强生物膜株也相对敏感的药物,以使细菌生物膜感染的预防效果达到最佳。

参考文献:

[1] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318 - 1322.

[2] McCann M T, Gilmore B F, Gorman S P. Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management[J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(12): 1551 - 1571.

[3] Nishimura S, Tsurumoto T, Yonekura A, *et al*. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases[J]. J Orthop Sci, 2006, 11(1): 46 - 50.

[4] 肖永红, 王 进, 赵彩云, 等. 2006 - 2007 年 Mohnarin 细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(8): 1051 - 1056.

[5] Vranes J. Effect of subminimal inhibitory concentrations of azithromycin on adherence of Pseudomonas aeruginosa to polystyrene[J]. J Chemother, 2000, 12(4): 280 - 285.

[6] Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria[J]. Trends Genet, 1995, 11(6): 217 - 218.

[7] 项青青. 我院围手术期抗菌药物使用调查分析[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(11): 940 - 941, 953.

[8] 王秀丽, 杨文斌. 我院外科围手术期抗菌药物预防性使用分析[J]. 中国药业, 2008, 17(20): 47 - 48.

[9] Mack D, Becker P, Chatterjee I, *et al*. Mechanisms of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses[J]. Int J Med Microbiol, 2004, 294(2 - 3): 203 - 212.

[10] 罗 羽, 夏培元, 王仙园, 等. 院内感染耐药黄杆菌携带 β-内酰胺酶基因的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(9): 827 - 829.

[11] 张丽萍, 李 清, 古丽娜依明, 等. 葡萄球菌生物膜检测及与耐药性的关系[J]. 右江医学, 2008, 36(3): 252 - 254.

(编辑 王小寒)