DOI:10.16016/j.1000-5404.201506051

不同亚抑菌浓度头孢他啶抑制大肠埃希菌生物膜形成的量效分析

孙艺璇,史惠卿,孙凤军,戴 青,冯 伟,夏培元 (400038 重庆,第三军医大学西南医院药剂科)

[摘要] **目的** 分析亚抑菌浓度头孢他啶在抑制临床分离大肠埃希菌株生物膜形成过程中的浓度变化以及其作用机制。**方法** 根据 CLSI 倍比稀释法检测大肠埃希菌临床耐药株 E46 对 15 种抗生素的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC),通过 PCR 检测其超广谱 β-内酰胺酶(superspectrum β-lactamase,ESBLs)相关基因的表达,采用高效液相色谱法(HPLC)分析头孢他啶在抑制 E46 生物膜形成过程中药物的浓度变化。**结果** E46 仅对亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、呋喃妥因敏感,对头孢他啶等 9 种抗菌药物耐药,头孢他啶在 1/16 ~ 1/2 MIC 范围内呈剂量依赖性地抑制 E46 生物膜的形成($P<0.05$),E46 携带 TEM 和 CTX-M-15 型酶,在对 E46 生物膜的抑制过程中,头孢他啶的浓度逐渐降低。**结论** 亚抑菌浓度的头孢他啶可以抑制大肠埃希菌临床耐药株 E46 生物膜的形成,但其作用浓度随时间延长降低显著。

[关键词] 大肠埃希菌;头孢他啶;生物膜;超广谱 β-内酰胺酶
[中图法分类号] R378.21; R915; R963 [文献标志码] A

Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime on biofilm formation of *Escherichia coli*

Sun Yixuan, Shi Huiqing, Sun Fengjun, Dai Qing, Feng Wei, Xia Peiyuan (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the inhibitory effect of different sub-inhibitory concentrations of ceftazidime on the biofilm formation of the clinically isolated stains of *Escherichia coli* and investigate the underlying mechanism in this process. **Methods** The minimum inhibitory concentrations (MIC) of 15 antibiotic agents on *Escherichia coli* 46 (E46) was tested by the agar double dilution method according to the Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2010 Edition) by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). PCR was used to detect the expression of the genes related to superspectrum β-lactamases (ESBLs). Furthermore, high efficiency liquid chromatography (HPLC) was used to analyze the change of the concentrations of ceftazidime in the inhibition of E46 during its biofilm formation. **Results** E46 was only sensitive to imipenem, meropenem, ami-kacin and macrodantin, and resistant to ceftazidime and other 8 agents. Ceftazidime in the range of 1/2MIC to 1/16MIC inhibited biofilm formation of E46 in a dose-dependent manner ($P<0.05$). E46 carried TEM and CTX-M-15 enzymes, and the concentration of ceftazidime was gradually decreased in inhibiting the biofilm formation. **Conclusion** The sub-inhibitory concentration of ceftazidime inhibits the biofilm formation of the clinical drug resistant strain E46, but its concentration is significantly degraded over time.

[**Key words**] *Escherichia coli*; ceftazidime; biofilm; superspectrum β-lactamases

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81373451). Corresponding author: Xia Pengyuan, E-mail: peiyuan_xia2013@163.com

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)是临床常见致病菌,其分离率在革兰阴性菌中居首位,也是生物膜感染的常见病原菌。细菌生物膜是细菌黏附于非生物或生物表面,将其包裹在自身分泌物中所形成的一种具有立体结构的细胞群落,临床上 80% 的感染都和生物膜有关[1-2],形成生物膜的细菌具有高度的耐药性并能够逃避免疫系统的攻击[3],给临床治疗带来极大困难[4]。前期研究发现,亚抑菌浓度头孢他啶能够显著

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373451)
[通信作者] 夏培元,E-mail:peiyuan_xia2013@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151202.1623.004.html(2015-12-02)

抑制临床分离大肠埃希菌生物膜的形成[5]。前期研究中我们选择抑制作用明显但是不影响细菌生长的1/4最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)作为实验浓度,但是由于临床分离细菌的MIC差别较大,1/4 MIC的药物浓度差别也很大。而了解药物在抑制细菌生物膜形成过程中的浓度变化可以为研究其抑制生物膜机制提供有益的数据支持。因此,本研究以前期研究发现的对头孢他啶耐药的临床分离株E46为研究对象,分析亚抑菌浓度头孢他啶对其生物膜形成的影响,采用PCR检测E46超广谱内酰胺酶(ESBLs)相关基因的表达,并通过高效液相色谱法(HPLC)分析头孢他啶在抑制细菌生物膜过程中的浓度变化,从而探究大肠埃希菌的耐药机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株及来源 *E. coli* 46(E46)来自第三军医大学西南医院住院患者的临床送检标本,并采用BBL Crystal Auto Reader快速细菌自动鉴定仪(美国)进行鉴定,*E coli* 实验室菌株ATCC25922为西南医院国家药物临床试验机构保存菌株。

1.1.2 药品与试剂 头孢他啶、氨苄西林/舒巴坦、呋喃妥因、亚胺培南、美罗培南购自美国Sigma公司;头孢曲松、头孢哌酮、庆大霉素、氨曲南、氨苄西林、环丙沙星、左氧氟沙星、头孢吡肟、妥布霉素、阿米卡星购自中国食品药品检定研究院。M-H琼脂、胰蛋白胨和酵母提取物购自英国Oxoid公司。细菌基因组DNA提取试剂盒和琼脂糖购自北京天根公司;引物由Invitrogen公司合成;2×Es *Taq* Master Mix购自北京康为世纪生物科技有限公司。结晶紫购自美国Sigma公司,三氯乙酸购自Aladdin公司;磷酸二氢钾为分析纯;乙腈、甲醇为色谱纯。

1.1.3 主要设备 电子天平(Sartorius公司,BP221D型);多点接种仪(日本Sakuma公司);酶标仪(Thermo公司,美国);1200系列高效液相色谱系统(美国Agilent公司);1100系列VWD检测器(美国Agilent公司);色谱柱(迪马公司,Diamonsil C_{18},250 mm×4.6 mm,5 μm);PCR扩增仪、电泳仪和凝胶成像系统均为Bio-Rad公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 抗菌药物对临床分离株E46 MIC值测定 采用标准琼脂平板倍比稀释法测定抗菌药物对临床分离株E46的MIC值。大肠埃希菌E46划线接种于M-H琼脂平板,37 ℃培养过夜。挑取单菌落至灭菌生理盐水稀释校正为0.5 McFarland单位(约10^8 CFU/mL)。以多点接种仪将1~2 μL菌液接种至含药物的M-H琼脂平板,37 ℃孵育18 h观察结果。以能够完全抑制细菌生长的最低药物浓度为该药物对细菌的MIC。MIC结果根据美国国家临床实验室标准委员会(CLSI,2010)标准判读。*E. coli* 菌株ATCC25922作为药敏质控菌株。

1.2.2 E46 ESBLs相关基因的检测 针对国内常见的ESBLs基因类型,采用Genne Tool软件及参考文献[6]设计引物(表1)。基因组DNA的提取按照细菌基因组DNA提取试剂盒操作说明进行。PCR反应体系(20 μL):2×Es *Taq* Master Mix 10 μL,引物各0.3 μL,DNA 0.4 μL,ddH_2O 9 μL。PCR反应条件:94 ℃,5 min→94 ℃,30 s→退火(表1),30 s→72 ℃,30 s×35个循环→72 ℃,10 min。PCR反应产物以1%琼脂糖凝胶(含EB 0.5 μg/mL)电泳,上样10 μL,电压5 V/cm×30 min,以凝胶成像系统成像并观察结果。

表1 ESBLs相关基因引物序列

基因	序列(5′→3′)	引物长度	退火条件
TEM	F:CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC R:CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800 bp	52 ℃ 30 s
SHV	F:AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC R:ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713 bp	52 ℃ 30 s
GES	F:AGTCGGCTAGACCGGAAAG R:TTTGTCCGTGCTCAGGAT	399 bp	52 ℃ 30 s
PER	F:GCTCCGATAATGAAAGCGT R:TTCGGCTTGACTCGGCTGA	520 bp	52 ℃ 30 s
VEB	F:CATTTCCCGATGCAAAGCGT R:CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	648 bp	52 ℃ 30 s
OXA-1	F:GGCACCAGATTCAACTTTCAAG R:GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	564 bp	52 ℃ 30 s
CTX-M group I[a]	F:GACGATGTCACTGGCTGAGC R:AGCCGCCGACGCTAATACA	499 bp	55 ℃ 30 s
CTX-M group Ⅳ[b]	F:GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG R:GTAAGCTGACGCAACGTCTG	474 bp	62 ℃ 30 s
ampC	F:TAAACACCACATATGTTCCG R:ACTTACTTCAACTCGCGACG	663 bp	50 ℃ 1 min

a:CTX-M group Ⅰ包括CTX-M-1, 3, 10 to 12, 15 (UOE-1), 22, 23, 28, 29和30;b:CTX-M group Ⅳ包括CTX-M-9, 13, 14, 16 to 19, 21, 27和Toho-2; F:正义链;R:反义链

1.2.3 亚抑菌浓度CAZ影响E46生物膜形成的剂量-效应分析 采用96孔板结晶紫染色法[7-8]。具体方法为:E46在LB琼脂平板37 ℃培养过夜,挑单菌落至10 mL LB培养液中,37 ℃恒温培养过夜,以比浊法将过夜培养菌液稀释至0.5 McFarland单位(约10^8CFU/mL),转移入96孔平底细胞培养板,每孔体积200 μL,实验分为6组,分别为空白对照组、CAZ组

(1/32 MIC、1/16 MIC、1/8 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC)。37 ℃恒温培养 24 h 后,小心移除培养液,以每孔 200 μL PBS 缓冲液轻柔冲洗 2 次,晾干后,以 1%结晶紫溶液(每孔200 μL)染色 15 min,移除结晶紫溶液,水洗 3 次,再次晾干。24 h 后每孔加入 100 μL 30%醋酸溶液,小心吹打溶液以完全溶解染色液,于 590 nm 处进行光密度检测。

1.2.4 HPLC 法测定 LB 中 CAZ 的浓度

1.2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil 反相 C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-含 0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲盐溶液(pH 值调为 2.5,体积比 10.4∶89.6),流速为 1.2 mL/min,检测波长:254 nm,柱温:30 ℃,进样体积:20 μL。

1.2.4.2 药物在 LB 培养液中标准曲线的建立 精密称取 CAZ 20.00 mg 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇∶水(8∶2)定容至刻度,备用;从 CAZ 对照液(2 mg/mL)中取出 40 μL 加入到 960 μL LB 培养液中,混匀 30 s,即为 80 μg/mL CAZ 的 LB 溶液,按此法配制一系列标准浓度的 CAZ 溶液:80、40、20、10、5、2、1、0.5 μg/mL。上述标准液各取 0.4 mL 加入 0.16 mL 10% 三氯乙酸溶液,振荡混匀 2 min,13 000 r/min 离心 5min,转上清液至进样瓶中,取 20 μL 进样。以峰面积对样品浓度作回归计算,绘制标准曲线。

1.2.4.3 药物样品及对照品溶液的制备 将过夜培养的 E46 菌液稀释 1 000 倍,再向其中加入 CAZ(终浓度为 1/4 MIC),对照组不加菌;将样品、对照品溶液于 37 ℃恒温振荡培养,分别于 0、2、4、6 h 取出菌液离心(12 000 r/min,10 min),取 0.4 mL 上清液与 0.16 mL 10% 三氯乙酸溶液振荡混匀 2 min,13 000 r/min 离心 5 min,转上清液至进样瓶,取 20 μL 进样。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对生物膜形成的差异进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 抗生素对临床分离株 E46 MIC 值测定

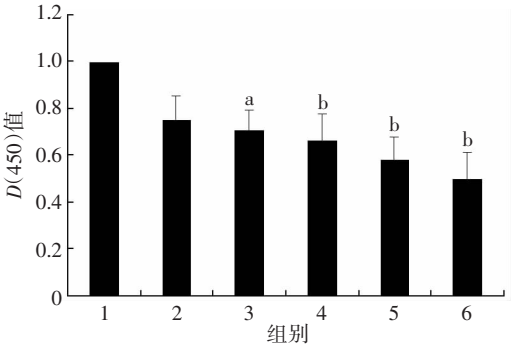
结果显示,临床分离株 E46 仅对亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、呋喃妥因敏感,对头孢吡肟、妥布霉素呈中度敏感性,而对头孢曲松、头孢哌酮、头孢他啶、庆大霉素、氨曲南、氨苄西林/舒巴坦、氨苄西林、环丙沙星、左氧氟沙星呈高度耐药性。其中,头孢他啶对 E46 的 MIC 为 256 μg/mL。

2.2 E46 ESBLs 相关基因的检测

PCR 检测结果显示,临床分离株 E46 仅有 TEM 和 CTX-M group Ⅰ基因扩增阳性,未扩增出其他 ESBLs 耐药基因。blaCTX-M group 经测序鉴定为 CTX-M-15。

2.3 亚抑菌浓度 CAZ 影响 E46 生物膜形成的剂量-效应分析

结果如图 1 所示,CAZ 在 1/16 ~ 1/2 MIC 范围内呈剂量依赖性抑制 E46 生物膜的形成,其中 1/2 MIC CAZ 对生物膜的抑制作用最强,但是 1/2 MIC CAZ 对 E46 的生长有抑制作用,因此在后续的实验中均选用 1/4 MIC CAZ 进行研究。



1:空白对照组;2:1/32 MIC CAZ 组;3:1/16 MIC CAZ 组;4:1/8 MIC CAZ 组;5: 1/4 MIC CAZ 组;6:1/2 MIC CAZ 组

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较

图 1 亚抑菌浓度 CAZ 对 E46 生物膜形成的剂量-效应关系

2.4 HPLC 法测定 LB 中 CAZ 的浓度

LB 中 CAZ 浓度在 0.5 ~ 80 μg/mL 的范围内线性回归方程为 Y = 15.164 96X + 10.051 48,相关系数 r = 0.999 9。将各时间点样品的峰面积代入回归方程,换算出 CAZ 的浓度(图 2)。结果显示,1/4 MIC(64 μg/mL)CAZ 加入 LB 培养液中发生了部分降解,在 LB 和 E46 培养液中分别降解了 12.32% 和 14.38%。随着培养时间的延长,在不含 E46 的培养液中,CAZ 的浓度几乎保持不变;而在含有 E46 的培养液中,CAZ 的浓度逐渐降低,6 h 后降解了 60.67%。

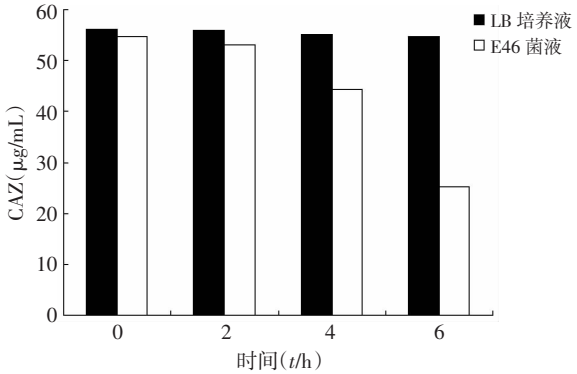


图 2 不同时间点 LB 培养液与 E46 菌液中 CAZ 的浓度

3 讨论

根据课题组前期实验结果,临床分离的大肠杆菌

对临床常规使用的抗菌药物具有较高的耐药性,并且可以形成生物膜,且1/4MIC抗菌药物可以抑制生物膜的形成[5]。为进一步探索其抑制细菌生物膜形成的机制,我们在分析细菌的耐药背景后采用高效液相色谱法对菌株的耐药基因和头孢他啶的作用浓度进行分析。本研究结果显示大肠埃希菌E46携带TEM和CTX-M-15型酶,由于ESBLs可以降解3代头孢菌素等抗菌药物[9-10],提示头孢他啶在与E46作用过程中的浓度会有较大的变化。

实验过程中以CAZ的浓度为自变量(X),峰面积为因变量(Y),分别建立了CAZ在不含E46的LB溶液中的标准曲线及回归方程:Y = 15.164 96X + 10.051 48(r=0.999 9),CAZ在含有E46的LB溶液中的标准曲线及回归方程:Y=11.482 29X+8.333 89(r=0.998 5),由于细菌合成ESBLs使抗菌药物降解,在含有细菌的溶液中建立的标准曲线,相关系数较低,因此本实验只采用不含E46的LB溶液中的标准曲线及回归方程。结果显示LB培养液中,头孢他啶比较稳定,随着时间的延长,头孢他啶的浓度变化不大。而在含有大肠埃希菌临床分离株E46的培养基中发现,随着培养时间的延长,头孢他啶的浓度逐渐降低,随着时间的延长,细菌浓度增加,使得ESBLs表达也增加,细菌浓度的增加使抗菌药物浓度降低更显著。

根据实验发现在亚抑菌浓度头孢他啶抑制细菌生物膜形成过程中,头孢他啶快速降解但却依然可以抑制生物膜的形成,同时实验中发现其抑制作用存在明显的量效关系,提示头孢他啶的降解虽不能使抑制作用消失,但是可以明显抑制其效能,头孢他啶抑制细菌生物膜形成可能作用于生物膜形成的整个过程。头孢他啶是临床常用的抗菌药物,研究发现在发挥其抗菌作用的同时,可以明显抑制生物膜的形成,对于耐药的菌株也具有相同作用。有研究报道其亚抑菌浓度对铜绿假单胞菌具有类似的作用[11-12]。因此,在深入研究其抑制生物膜形成机制的同时应该确定这种作用是否在其他菌种中存在,为其在临床上治疗生物膜的相关感染提供理论依据。

参考文献:

[1] Vo G D, Brindle E, Heys J. An experimentally validated immersed boundary model of fluid-biofilm interaction[J]. Water Sci Technol, 2010, 61(12): 3033-3040. DOI: 10.2166/wst.2010.213

[2] Conlon B P, Nakayasu E S, Fleck L E, *et al*. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection[J]. Nature, 2013, 503(7476): 365-370. DOI: 10.1038/nature12790

[3] Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, *et al*. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria[J]. Science, 2011, 334(6058): 982-986. DOI: 10.1126/science.1211037

[4] Lee J H, Regmi S C, Kim J A, *et al*. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157: H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats[J]. Infect Immun, 2011, 79(12): 4819-4827. DOI: 10.1128/IAI.05580-11

[5] Shi H Q, Sun F J, Chen J H, *et al*. Opposite effects of cefoperazone and ceftazidime on S-ribosylhomocysteine lyase/autoinducer-2 quorum sensing and biofilm formation by an *Escherichia coli* clinical isolate[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5): 2334-2340. DOI: 10.3892/mmr.2014.2540

[6] Pitout J D, Hossain A, Hanson N D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and Klebsiella spp[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5715-5721. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5715-5721.2004

[7] Kim Y H, Lee Y, Kim S, *et al*. The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in the formation of biofilms[J]. Proteomics, 2006, 6(23): 6181-6193. DOI: 10.1002/pmic.200600320

[8] Teh K H, Flint S, French N. Biofilm formation by Campylobacter jejuni in controlled mixed-microbial populations[J]. Int J Food Microbiol, 2010, 143(3): 118-124. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.037

[9] Livermore D M, Andrews J M, Hawkey P M, *et al*. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(7): 1569-1577. DOI: 10.1093/jac/dks088

[10] Perez F, Endimiani A, Hujer K M, *et al*. The continuing challenge of ESBLs[J]. Curr Opin Pharmacol, 2007, 7(5): 459-469. DOI: 10.1016/j.coph.2007.08.003

[11] Bowler L L, Zhanel G G, Ball T B, *et al*. Mature Pseudomonas aeruginosa biofilms prevail compared to young biofilms in the presence of ceftazidime[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9): 4976-4979. DOI: 10.1128/AAC.00650-12

[12] Garske L A, Beatson S A, Leech A J, *et al*. Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the quorum sensing signals of Pseudomonas aeruginosa[J]. Pathology, 2004, 36(6): 571-575.

(**收稿**:2015-06-10;**修回**:2015-08-07)

(编辑 张 维)