

引发医院感染表皮葡萄球菌生物被膜的检测*

贾宁^{1,2} 徐志凯¹ 索继江² 邢玉斌²

(第四军医大学微生物教研室 西安 710032)¹ (解放军总医院医院感染与疾病控制科 北京 100853)²

摘要: 为了解引发医院感染的表皮葡萄球菌中 *ica* 操纵元的存在与生物被膜的产生的关系及其对抗生素敏感性的影响, 收集了引发医院感染的表皮葡萄球菌 106 株, 采用定量和定性法检测生物被膜的产生, PCR 法检测 *ica* 操纵元基因的存在以及测量细菌对红霉素 (ERY)、氨苄青霉素 (AMP)、头孢西丁 (FOX)、头孢曲松 (CRO)、替考拉宁 (TEC)、环丙沙星 (CIP)、四环素 (TCY)、复方新诺明 (SXT)、万古霉素 (VAN) 的最小抑菌浓度 (MIC); 106 株表皮葡萄球菌分离株中, 有 33 株检测出 *icaABC* (31.1%); *ica*⁺ 菌中产膜菌的检出率高于 *ica*⁻ 菌 ($P=0.001$); 葡萄糖和 NaCl 可提高产膜菌的检出率; *ica*⁺ 浮游菌对红霉素, 头孢西丁和头孢曲松的耐药率高于 *ica*⁻ 浮游菌株, 但对氨苄青霉素, 环丙沙星, 四环素和复方新诺明的耐药率与 *ica*⁻ 菌相似; *ica* 位点基因的存在与引发表皮菌医院感染密切相关, 但生物被膜内菌耐药机制还需进一步研究。

关键词: 表皮葡萄球菌 生物被膜 *ica*

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0088-04

Biofilm Production in *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Nosocomial Infection*

JIA Ning^{1,2} XU Zhi-Kai¹ SUO Ji-Jiang² XING Yu-Bin²

(Department of Microbiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)¹

(Department of Nosocomial Infection and Disease Control, the General Hospital of PLA, Beijing 100853)²

Abstract: To determine the relationship between the intercellular adhesion operon (*ica*) and the biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infection, and the affection of *ica* on the antibiotic susceptibility of the isolates, we collected 106 strains. *epidermidis* isolates from nosocomial infection specimen to detect their biofilm production by quantitative and qualitative method and investigate the existence of *ica* operon by PCR. The minimal inhibitory concentration (MIC) to erythromycin, ampicillin, cefoxitin, ceftriaxone, teoplanin, ciprofloxacin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and vancomycin were tested. Among the isolates, 33 (31.1%) of them were detected out carrying *ica* operon. The rate of biofilm production of the *ica*-positive isolates was higher than that of the *ica*-negative ($P=0.001$). By adding glucose and NaCl into the culture the detection rate of biofilm production could be increased. The antibiotic susceptibility of the plankton cells of *ica*-positive isolates to erythromycin, cefoxitin and ceftriaxone, except ampicillin, ciprofloxacin, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole, were lower than those of *ica*-negative isolates. This study showed that the existence of *ica* operon was close related to the biofilm formation in *S. epidermidis* isolates from nosocomial infection. However, the mechanism of antibiotic resistance of the strains inside the biofilm still needed to be illustrated.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*, Biofilm, *Ica* operon

表皮葡萄球菌 (以下简称表皮菌) 是寄居在人体皮肤和粘膜的正常菌群, 但随着

* 国家自然科学基金资助 (No. 30300296)

通讯作者 Tel: 01089642138, E-mail: jianing@263.net

收稿日期: 2005-08-31, 修回日期: 2006-01-05

各种侵入性操作、人工假体使用的增多,其引发的生物被膜相关感染在不断地增加,成为引起医院内感染菌血症的主要致病菌之一,细菌形成生物被膜后不仅难以去除,而且其引发的感染常常难以治疗,近些年对生物被膜的研究已成为热点。生物被膜形成过程中的荚膜多糖粘附因子(PS/A)和多糖细胞间粘附因子(PIA)的合成与 *ica* 操纵元(Intercellular adhesion operon)有关,为了深入了解引发医院感染的表葡萄菌中 *ica* 操纵元的存在与生物被膜的产生的关系及其对抗生素敏感性的影响,我们收集了引发医院感染的表葡萄菌并进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

收集 2003.6~2003.12 间住院时间超过 3d,临床出现感染病人的标本,分离出表葡萄菌 106 株,对于送检的血液标本,为了防止污染,采用多次培养均为阳性才作出诊断;所有标本均经凝固酶试验和 API 细菌鉴定试剂条(购自法国生物梅里埃公司)鉴定,标准菌株: *S. epidermidis* ATCC 12228。

1.2 抗生素敏感试验

按 NCCLS 2004^[1] 版的检测方法和判读标准,测定菌株对红霉素(ERY)、氨苄青霉素(AMP)、头孢西丁(FOX)、头孢曲松(CRO)、替考拉宁(TEC)、环丙沙星(CIP)、四环素(TCY)、复方新诺明(SXT)、万古霉素(VAN)的最小抑菌浓度(MIC),试剂盒购自天津金章生物有限公司;细菌对头孢西丁耐药预报 MRSE(耐甲氧西林表皮葡萄球菌)。

1.3 刚果红培养(CRA test)^[2]

细菌划线接种于刚果红琼脂平板 I(刚果红 0.8g/L,脑心浸液 37g/L,蔗糖 5g/L,琼脂 10g/L,NaCl 40g/L),和刚果红琼脂平板 II(刚果红 0.8g/L,脑心浸液 37g/L,琼脂 10g/L)需氧 37℃ 培养 24h 后,室温放置 24h 读结果。判读标准:阳性(产被膜):黑色菌落,带干结晶体;阴性(不产被膜):粉红色菌落,偶见中心变黑,似牛眼状菌落;可疑:菌落呈黑色,但未见干结晶体;阴性对照为不产生物被膜的 *S. epidermidis* ATCC 12228;阳性对照为已知产生物被膜的 *S. epidermidis* 1457。

1.4 生物膜产生的定量检测^[3]

取新鲜菌落接种于 10mL TSB(含 0.5% 葡萄糖),37℃ 摇动增菌 18h,菌液用增菌液 1:100 稀释后,取 200μL 接种于 96 孔组织培养板,37℃ 培养 24h,用蒸馏水洗涤 3 次后,56℃ 干燥 1h,0.4% 结晶紫染色 2min,于 570nm 处用分光光度计测量 OD 值,OD 值大于 0.1 为阳性结果(产被膜),*S. epidermidis* ATCC 12228 为阴性对照,每个标本重复测量三次。

1.5 *ica* 操纵元的检测

取新鲜 TSB 增菌液 100μL 离心,用 45μL 双蒸水重悬浮,加入 5μL 溶葡萄球菌素(2mg/mL, Sigma),37℃ 孵育 30min,加入 5μL 蛋白酶 K 和 150μL Tris-HCl(pH 9.0),37℃ 孵育 30min 后,100℃ 5min 制备细菌 DNA;引物 *icaA*^[4]: 5'-GACCTCGAAGTCAAT-AGAGGT-3', 5'-CCCAGTATAACGTTGGATACC-3', 95℃ 变性 5min 后,95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1min, 30 个循环,72℃ 延伸 7min;扩增产物为 814bp; *icaB*: 5'-ATGGCTTA-AAGCACACGACGC-3', 5'-TATCGGCATCTGCTGTGACAG-3', 95℃ 变性 5min 后,95℃

1min, 56℃ 1min, 72℃ 1.5min, 30 个循环, 72℃ 延伸 7min, 扩增产物为 526bp; icaC: 5'-ATAAACTTGAATTAGTGTATT-3', 5'-ATATATAAACTCTCTTAACA-3', 95℃ 变性 5min 后, 95℃ 30 s, 42℃ 1min, 72℃ 1.5min, 30 个循环, 72℃ 延伸 7min, 扩增产物为 989bp; PCR 仪为 Perkin-Elmer, GeneAmp PCR System 9600. dNTP、Taq 酶、DNA marker 购自 TaKara 公司, 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.6 统计

采用 CHISS (奇思) 2004 统计软件, χ^2 检验或 Fisher's 精确检验对相关数据进行统计分析。



图 1 CRA test

黑色菌落为产膜菌, 灰色菌落为不产膜菌

2 结果

2.1 表葡萄菌生物被膜产生的检测

106 株表皮葡萄球菌分离株中, 有 33 株检测出 icaABC (31.1%); ica⁺ 菌中无论用定量 (分光光度计测量) 和定性检测 (CRA test) 法产膜菌的检出率均高于 ica⁻ 菌 ($P=0.001$); 生物膜定量和刚果红定性培养 I 法均可较好的检出产膜菌 ($P=0.68$), 且优于刚果红定性培养法 II ($P=0.001$), 即刚果红培养平板中添加葡萄糖和 NaCl 可提高产膜菌的检出率 (见表 1, 图 1)。

表 1 不同方法对表葡萄菌株中产膜菌的检出率比较

检测方法	ica ⁺ 株 (n=33)	ica ⁻ 株 (n=73)
定量检测	30	2
CRA test	29	5
	7	0

2.2 ica 与细菌耐药性

ica⁺ 菌株对红霉素, 头孢西丁和头孢曲松的耐药性高于 ica⁻ 菌株, 但对氨苄青霉素, 环丙沙星, 四环素、替考拉宁和复方新诺明的耐药率与 ica⁻ 菌株相似 (见表 2)。

表 2 106 株表葡萄菌对抗生素敏感性的比较

抗生素	ica ⁺ 组 (n=33) (%)	ica ⁻ 组 (n=73) (%)	P 值
Ery	12.1	36.9	0.008
Amp	6.1	8.2	>0.05
Fox	30.3	50.7	0.027
CRO	45.5	65.8	0.048
Tec	96.9	100	>0.05
CIP	69.7	64.4	>0.05
TCY	42.4	41.1	>0.05
SXT	63.6	71.2	>0.05
Van	100	100	-

3 讨论

寄居于皮肤和粘膜的表葡菌致病力较弱, 导致表葡菌感染的主要原因在于其吸附于机体粘膜或生物医学材料表面后, 分泌多糖基质、纤维蛋白、脂多糖等多糖复合物, 相互粘连并克隆产生的生物被膜 (Biofilm), 其引发的感染常常只有移走植入物才能控制。生物被膜的形成分为两步, 首先是细菌粘附于生物材料, 与荚膜多糖粘附因子 (PS/A) 和自溶素等蛋白相关, 接下来细菌聚集和生物被膜的形成与多糖细胞间粘附因子 (PIA) 有关, PIA 和 PS/A 的合成所需的酶由染色体 *ica* 操纵元 (*icaADBC*) 编码^[5,6], 因而 *ica* 位点基因在表葡菌生物被膜感染中起了非常重要的作用, 在我们收集的引发医院感染的菌株中 *ica* 基因的检出率为 31.1% (33/106), *ica*⁺ 菌中无论用定量 (分光光度计测量) 还是定性检测 (CRA test) 法, 产膜菌的检出率均高于 *ica*⁻ 菌 ($P = 0.001$), 证实了 *ica* 位点基因的存在与表葡菌引发生物被膜感染密切相关。

实验结果显示在 *ica* 阳性的表葡菌中, 刚果红定性培养中添加 0.5% 的葡萄糖和 4% NaCl 可促进 *ica* 的表达进而促进生物被膜的形成, 增加产膜菌的检出率; 但葡萄糖浓度进一步增加, 其诱导生物被膜形成的能力反而下降^[7]; 其他研究^[8-10] 也显示厌氧环境、低浓度的抗生素和皮肤表面的酒精成分菌可促进 *ica* 的表达, 但如何调节目前还不太清楚; 在 *ica* 阴性的菌株中, 仍有 5 株可诱导产生物被膜, 说明细菌生长环境的改变除了可诱导 *ica* 的表达, 也可诱导独立于 *ica* 的其它被膜形成机制, 如传感效应的调节 (quorum-sensing) — 附属基因调节系统 (accessory gene regulator system, agr 系统), 当环境变化时, 如细菌密度改变, 或营养条件变化时, 细菌表面产生和分泌表葡信息激素或自身诱导素, 持续产生并聚集达到一定浓度后, 通过调节 *adE* 和 δ 毒素的表达进而调节生物被膜的形成^[11]。可见生物被膜的形成是一个复杂的过程, 除 *ica* 操纵元的表达以外, 还受细菌的生长环境和宿主自身条件等复杂因素的影响。

文献报道膜内表葡菌对抗生素的耐药性比浮游菌增加 10 ~ 1,000 倍, 由于本次实验中抗生素敏感性都是细菌在浮游状况下检测的, 因而实验中 *ica* 阳性分离株除了对红霉素, 头孢西丁和头孢曲松的耐药性高于 *ica*⁻ 菌株外, 对氨苄青霉素, 环丙沙星, 四环素和复方新诺明的耐药率未有明显的差异, *ica* 阳性分离株中 MRSE 较多, 但 Mack 等^[12] 研究结果显示尽管产生物被膜的表葡菌常常是耐甲氧西林表葡菌 (MRSE), 但通过对 *icaADBC* 及其调节基因插入转座子 Tn917, 直接或间接影响 *icaADBC* 的转录水平后, 其对甲氧西林的耐药性没有明显的改变, 提示表葡菌的产膜机制与甲氧西林的耐药性表达机制相对独立。在临床分离的表葡菌检出 *ica* 和 *mecA* 对判断其致病性有提示作用。

参考文献

- [1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004.
- [2] de Silva G D L, Kantzanou M, Justice A. J Clin Microbiol, 2002, **40** (2): 382 ~ 388.
- [3] Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, et al. J Bacteriol, 2003, **185** (9): 2879 ~ 2886.
- [4] Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, et al. Molecular Microbiology, 1999, **32** (2): 345 ~ 356.
- [5] Heilmann C, Hussain M, Peters G, et al. Mol Microbiol, 1997, **24**: 1013 ~ 1024.
- [6] Mckenney D, Hubner J, Muller E, et al. Infect Immun, 1998, **66**: 4711 ~ 4720.
- [7] 靳嘉巍, 张 力, 查锡良, 等. 微生物学报, 2003, **45**: 431 ~ 436.
- [8] Cramton S E, Ulrich M, Gotz F, et al. Infect. Immun, 2001, **69**: 4079 ~ 4085.
- [9] Rachid S, Ohlsen K, Witte W, et al. Antimicrob Agents Chemother, 2000, **44**: 3357 ~ 3363.
- [10] Knobloch J K, Horstkotte M A, Rohde H, et al. J Antimicrob Chemother, 2002, **49**: 683 ~ 687.
- [11] Vuong C, Gerke C, Somerville G A, et al. J Infect Dis, 2003, **188**: 706 ~ 718.
- [12] Mack D, Sabottke A, Dobinsky S, et al. Antimicrob Agent Chemother, 2002, **46** (1): 178 ~ 183.