

念珠菌生物膜的检测及其耐药性分析

路秀文 张照亮 由君 王金良

作者单位:300040 天津市,天津市公安医院检验科

【摘要】 目的 探讨念珠菌生物膜形成对其耐药性的影响。**方法** 选择临床分离的念珠菌 30 株,用平板黏附法培养念珠菌的生物膜,并用结晶紫染色测量其吸光度定量,对照药敏结果分析两者相关性。**结果** 生物膜为阳性的菌株检出率为 76.7%(23/30)。生物膜阳性菌对抗菌药物的耐药性均高于生物膜阴性菌,且除两性霉素 B 外差异均具有统计学意义(P 均 <0.05)。**结论** 形成生物膜的念珠菌对抗菌药物有较强的耐药性。

【关键词】 念珠菌;生物膜;耐药性

The detection of biofilm in *Candidas* and it's drug resistance analysis

LU Xiu-Wen, ZHANG Zhao-liang, YOU Jun, et al. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Gong-An Hospital, Tianjin 300040, China

【Abstract】 Objective To investigate the correlation of biofilm and the drug resistance of *Candidas*. **Methods** 30 strains *Candidas* were selected from clinical. Modified plate culture method was used to establish the *Candidas* biofilm. The results of crystal violet staining were measured by microplate reader and the results of drug resistance were analyzed. **Results** The detection rate of biofilm positive bacterium was 76.7%(23/30). The drug resistance rates of biofilm positive bacterium to antibacterials were all higher than biofilm negative bacterium and the differences all had statistical significance except amphotericin B (P all <0.05). **Conclusion** The formation of biofilm in *Candida* can decrease the antibacterial activity of antibacterials.

【Key words】 *Candidas*; Biofilm; Drug resistance

广谱抗生素、免疫抑制剂、抗肿瘤等药物的广泛应用,以及介入性手术的开展,使酵母样真菌感染日益增多,念珠菌被认为是引起院内感染的主要原因之一。生物膜的特性决定了生物膜一旦形成,再杀灭这种细菌会极为困难,也正是因为生物膜的存在,使抗生素的疗效显著降低。目前,真菌生物膜逐渐成为研究者关注的热点。本文对念珠菌的生物膜进行检测并分析其与耐药性的关系,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 选择我院 2008 年 4 月至 2008 年 12 月分离的念珠菌 30 株(包括白色念珠菌 23 株,热带念珠菌 2 株,近平滑念珠菌 3 株,克柔念珠菌 2 株,均经 VITEK 自动分析仪鉴定),其中痰标本 24 株,血标本 4 株,尿标本 2 株。白色念珠菌质控菌株 ATCC64548 购自卫生部临床检验中心。

1.2 培养基 血平板、营养肉汤、96 孔培养板,均购自天津金章科技发展有限公司。真菌 IDS-96 检测药敏板购自珠海迪尔生物科技有限公司。

1.3 仪器与试剂 结晶紫染液,应用浓度为 1 g/L,由辽宁东药生物科技有限公司提供。采用 Model 680 型酶标仪,由北京元业伯乐科技发展有限公司提供。

1.4 方法

1.4.1 生物膜的培养 将念珠菌转种沙氏平板,30℃培养 24 h,配成 0.5 McFarland 菌液,吸取 200 μ l 于 96 孔培养板中,30℃培养 24~48 h,弃去培养液,换肉汤 35℃培养 48 h;以质控菌株 ATCC64548 为阴性对照,同时做三份。

1.4.2 结晶紫染色 弃去肉汤,加 200 μ l 无菌蒸馏水洗 1 min,弃去,每孔加入 200 μ l 结晶紫(浓度为 1 g/L)反应 5 min,无菌蒸馏水洗 1 min,晾干,加 200 μ l 95%酒精,用酶标仪于 490 nm 波长读取吸光度值 A 。 A 大于 0.1(A 为阴性对照均值的 2 倍以上)判为阳性,即该菌形成了生物膜, A 小于 0.1 为阴性,即该菌没有形成生物膜。

1.4.3 药物敏感试验 挑取单个菌落制备 1 个麦氏单位菌悬液,取 100 μ l 加到真菌药敏培养液中,吸

取 100 μ l 加入测试板培养孔中,30 $^{\circ}$ C 湿盒内培养,24–72 h 判读结果,混浊为阳性,清亮为阴性。结果判定(S:敏感;R:耐药;单位:mg/L):两性霉素 B(≤ 1 为 S, ≥ 4 为 R),伊曲康唑(≤ 0.12 为 S, ≥ 1 为 R),氟康唑(≤ 8 为 S, ≥ 64 为 R),5-氟胞嘧啶(≤ 4 为 S, ≥ 32 为 R),伏立康唑(≤ 2 为 S, ≥ 4 为 R)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。生物膜阳性与阴性菌株耐药性比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 念珠菌生物膜检测结果 共检测了 30 株念珠菌,生物膜为阳性的菌株 23 株,检出率为 76.7%,生物膜为阴性的菌株 7 株。

2.2 生物膜阳性菌株与阴性菌株的耐药性分析 生物膜阳性念珠菌对检测的抗菌药物的耐药率均高于生物膜阴性菌株,经 χ^2 检验,显示二者对除两性霉素 B 以外其余四种抗菌药物耐药性差异均有统计学意义(P 均 <0.05),见表 1。

表 1 生物膜阳性菌株与阴性菌株的耐药性分析[n(%)]

抗菌药物	阳性菌株 (n= 23)	阴性菌株 (n= 7)	χ^2 值	P 值
两性霉素 B	2(8.6)	0(0.0)	0.025	>0.05
伊曲康唑	15(65.2)	2(28.6)	4.743	<0.05
氟康唑	18(78.3)	3(42.9)	5.111	<0.05
5-氟胞嘧啶	17(73.9)	2(28.6)	6.441	<0.05
伏立康唑	19(82.6)	2(28.6)	9.898	<0.05

3 讨论

目前,在免疫力低下人群抗感染治疗中,酵母样真菌的耐药问题已成为亟待解决的问题。这一现象可直接导致机会感染的增加以及全身性真菌感染。抗生素抗性一般定义为:当适当抗生素治疗时仍然发生持续性的进行性的感染。在接触药物前,微生物就表现对药物抗性,通常称之为原发性抗性。而接触药物后微生物发展成对药物抗性则称为继发性抗性。本文研究的 30 份标本中,多以呼吸道标本为主,痰标本 $>70\%$;在科室分布以呼吸科和 ICU 为主,造成这一结果的原因主要是呼吸科和 ICU 的患者病情重、病程长,机体免疫功能下降,抵抗力弱,且侵入性治疗如气管插管、插导尿管等操作频繁,另外患者长期使用广谱抗菌药物,造成菌群失调,也可导致念珠菌继发性感染。

白色念珠菌生物膜耐药是其细菌本身的内在特性。当白色念珠菌生物膜被破坏或重新悬浮后置于

抗真菌药物环境中,这些白色念珠菌细胞对抗真菌药物耐药^[1,2]。生物膜相关微生物耐药机制包括:生物膜细胞低生长率;细胞外基质(extracellular matrix, ECM)生成后产生物理屏障,妨碍药物渗透入生物膜;生物膜耐药相关基因的表达^[3]。Baillie^[1]等比较了不同生长率的白色念珠菌生物膜对两性霉素 B 的敏感性,结果发现在各种生长率下,完整生物膜均对两性霉素 B 高度耐药,作为对照的游离态白色念珠菌则只在低生长率时对两性霉素 B 耐药。因此生长率与白色念珠菌生物膜对两性霉素 B 耐药关系不大,其仅与游离态白色念珠菌耐药性有关。在静止和振荡条件下培养白色念珠菌生物膜,可使其 ECM 产生量分别达到最高和最低。Baillie 等^[4]发现白色念珠菌生物膜在以上两种培养条件下,对抗真菌药物敏感性没有差异,此结果表明,ECM 产生的多少与白色念珠菌生物膜耐药相关性不大,ECM 不能形成防止抗真菌药物扩散的屏障。然而失去 ECM 的重新悬浮白色念珠菌生物膜细胞对两性霉素 B 的耐药性下降 20%,这表明 ECM 可能在生物膜耐药中起一定的作用^[1]。

白色念珠菌生物膜耐药还可能与某些基因的表达有关。外排泵编码基因 CDR1、CDR2 和 MDR1 的过度表达是游离态白色念珠菌对唑类药物耐药的重要机制之一,他们的过度表达可将进入白色念珠菌细胞内的药物泵出胞外^[5,6]。Mukherjee 等^[6]构建了 CDR1、CDR2、MDR1 双基因和三基因缺失株白色念珠菌,观察以上三基因表达在白色念珠菌生物膜耐药中的作用,结果发现双基因和三基因缺失株在生物膜形成早期对氟康唑的敏感性较野生株生物膜高(MIC 值分别为 64 μ g/ml、16 μ g/ml,野生株 MIC 值 $>256 \mu$ g/ml)。但在培养 12 h 和 48 h 后,双基因和三基因缺失株和野生株白色念珠菌生物膜均对氟康唑耐药,这表明这些外排泵在生物膜形成的早期可能参与了耐药,但在成熟期不参与耐药。另外,还有研究^[7]发现,一种编码白色念珠菌菌丝细胞壁特异性蛋白的基因 HWP1 在生物膜中表达下降。麦角固醇水平在白色念珠菌生物膜形成的中期和成熟期与早期相比有明显下降($P<0.01$)。说明麦角固醇可能参与了中期和成熟期生物膜耐药^[3]。

本文通过结晶紫染色观察 $A>0.1$ 的阳性菌产生生物膜对 96 孔板有黏附性,对两性霉素 B、伊曲康唑、氟康唑、5-氟胞嘧啶、伏立康唑耐药率较 $A<0.1$ 生物膜阴性菌的耐药率高,提示生物膜能使念珠菌降低抗真菌药物的抑制作用。这与生物膜能使念

菌株产生较强耐药性的报道^[7]是一致的。

形成念珠菌生物膜的感染性疾病大都是慢性和难治性的,其原因主要有三个方面:第一,生物膜内的念珠菌具有极强抵抗人类免疫系统的能力,能有有效的抵抗和干扰机体的防御机制;第二,生物膜是念珠菌性感染病灶,当机体内游走病原念珠菌被杀死后,生物膜内的念珠菌细胞会脱离附着释放出来,成为游走念珠菌,引起急性感染,如此反复发生;第三,生物膜内的念珠菌几乎对所有抗真菌药物都不敏感,表现出极强的耐药性,一般不易治愈,形成长期感染,甚至危及生命。

生物膜的特性使生物膜阳性白色念珠菌感染的治疗相当棘手,必须移除生物膜定植的植入物,药物治疗才有效。但大部分的情况下,植入物的移除更换,患者必须承担很大的经济负担,而且有极大的生命危险,很不现实。因此早期检测生物膜的形成对抗念珠菌感染有较大价值。

本文用结晶紫染色定性检测生物膜的形成的方法简易可行,能为临床合理有效选用抗念珠菌药物提供参考。结晶紫染色法念珠菌的生物膜培养时间短,取材方便,操作简单,便于临床微生物室应用,可用作念珠菌生物膜耐药菌的初筛。加强念珠菌生物膜检测及耐药性分析对指导临床合理使用抗菌药

物、了解其流行趋势和防止医院内感染有重要意义。

4 参考文献

- 1 Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 42: 1900-1905.
- 2 Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, et al. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 49: 973-980.
- 3 Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 15: 167-193.
- 4 Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 46: 397-403.
- 5 Morschhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1587: 240-248.
- 6 Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun*, 2007, 71: 4333-4340.
- 7 Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. *J Bacteriol*, 2005, 183: 5385-5394.

(收稿日期:2010-02-15)

(本文编辑:杨军)

消 息

临床实验室生物安全管理研讨会

为进一步提高临床实验室质量与安全生物安全管理水平,经中华医学会与中华医学会检验分会研究决定,国家级继续医学教育项目《临床实验室生物安全管理研讨会》于2010年9月15日至17日在吉林省长春市召开。这是中华医学会检验分会自第一次成立临床实验室管理学组以来举办的第一次有关质量与安全生物安全方面的学术会议。欢迎各级医院检验科主任、检验技术人员及相关管理人员积极参加并踊跃投稿。会议将授予国家级继续教育 I 类学分 6 分。

1 会议征文内容

- (1) 实验室质量安全管理、医疗纠纷防范做法与体会;
- (2) 生物安全管理要求、做法与体会;
- (3) 临床实验室、PCR 实验室、HIV 初筛实验室的建筑设计要求、做法与体会。

2 征文要求

稿件提供 600~800 字左右摘要一份,注明文题、作者姓

名、单位、邮编,正文包括目的、方法、结果和结论,论文要求未在公开发行的刊物上发表,文责自负,概不退稿。

截稿日期:2010 年 8 月 20 日

3 会议时间、费用及相关事宜

会务费:800 元/人,会议统一安排食宿,交通费、住宿费自理。

会议时间:2010-09-15 至 2010-09-17

会议地点:长春市

联系人:许建成

电话:0431-88782595

E-mail: jianchengxu@yeah.net

联系地址:吉林省长春市新民大街 71 号吉林大学第一医院检验科