

凝固酶阴性葡萄球菌生物膜形成与多重耐药关系的研究

路秀文 王丽娟 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 探讨临床标本中凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase negative *Staphylococci*, CNS)生物膜形成的状况,及其对细菌耐药的影响和多重耐药的关系,提高临床对 CNS 感染的重视,并帮助临床根据药敏试验结果选用抗菌药物。**方法** 采用微孔板法制备生物膜,结晶紫染色,酶标仪比色检测 42 株 CNS 的生物膜形成情况;对临床标本分离的 CNS 进行鉴定,并采用纸片法进行药敏试验;所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。**结果** 比色法检测 CNS 的生物膜阳性率为 76.19%(32/42)。药敏试验结果显示生物膜阳性的 CNS 耐药情况较严重,尤其是对青霉素 G 和红霉素,耐药率分别为 96.88% 和 78.13%,对复方新诺明、克林霉素、四环素、环丙沙星耐药率亦超过 50.00%,且呈多重耐药;生物膜阴性的 CNS 耐药情况较轻,仅对青霉素 G 和红霉素耐药情况较严重,耐药率分别为 60.00% 和 40.00%;尚未发现对万古霉素耐药的 CNS 菌株。生物膜阳性 CNS 菌株对青霉素 G、红霉素、克林霉素和复方新诺明的耐药率均显著高于生物膜阴性 CNS 菌株,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。CNS 生物膜生成多少与多重耐药的严重程度呈正相关性($r=0.975, P<0.01$)。**结论** 临床标本分离出的 CNS 绝大部分能产生生物膜,对常见抗菌药物的耐药情况严重,且生物膜形成多少与多重耐药情况呈正相关关系。

【关键词】 凝固酶阴性葡萄球菌;细菌生物膜;耐药性;多重耐药;纸片法

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.03.004

The study on relationship between biofilm production and multiple antibiotics resistance of coagulase negative *Staphylococci*

LU Xiu-wen, WANG Li-juan, WANG Jin-liang. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Gong-An Hospital, Tianjin 300040, China

【Abstract】 Objective To study the formation of bacterial biofilm(BBF) of coagulase negative *Staphylococci* (CNS) and the influence on antibiotics resistance as well as the multiple antibiotics resistance by it. So as to draw doctors' attention of this situation and to help them choosing antibiotics based on antibiotics susceptibility testing results correctly. **Methods** BBF of 42 strains CNS was formed by microplate method, detected by crystal violet staining and got colorimetry assay. Identified CNS and detected antibiotics resistance. Data were analyzed by SPSS 17.0 statistical software. **Results** BBF was positive by 76.19%(32/42) to CNS by colorimetry assay. Antibiotics sensitivity testing results shown that CNS with BBF had a high antibiotics resistance to penicillin G, erythromycin, resistance rate were 96.88%、78.13%. And to cotrimoxazole, clindamycin, tetracycline and ciprofloxacin, the resistance rates were all above 50.00%. The drug resistant situation of CNS without BFF was lighter, only to penicillin G and erythromycin's drug resistant rates were higher (60.00%, 40.00%). There was no CNS strain was resistant to vancomycin. The drug resistance rates of CNS with BBF strains to penicillin G, erythromycin, clindamycin and cotrimoxazole were higher than CNS without BBF strains, the differences had statistical significance ($P<0.05$). Also there were multiple antibiotics resistance situations existed and positive correlation with the formation of BBF($r=0.975, P<0.01$). **Conclusion** Certain proportion of CNS clinical isolated could form BBF. CNS had strong multiple antibiotics resistance. And there was a positive correlation between the formation of BBF of CNS and the multiple antibiotics resistance situation.

【Key words】 Coagulase negative *Staphylococci*; Bacterial biofilm; Antibiotics resistance; Multiple antibiotics resistance; Disc diffusion method

细菌生物膜是细菌在生长过程中,为适应生存环境而形成的一种使细菌吸附于非生物或生物表面

的,由细菌自身分泌的细胞外基质,也可将这一细菌群体本身视为细菌生物膜。细菌生物膜作为一种生

物屏障,可以使细菌逃逸机体免疫系统,通过调节细菌代谢状态降低细菌对抗菌药物的敏感性,并能有效阻止药物透过被膜,使直接与菌体接触的抗菌药物浓度降低,从而导致细菌生物膜相关感染反复发作,难以治愈。

凝固酶阴性葡萄球菌 (coagulase negative *Staphylococci*, CNS) 包括表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌和溶血葡萄球菌等,一直以来都被认为是存在于人体皮肤、黏膜的正常菌群,但近年来 CNS 感染渐多,成为了医院感染的主要病原菌,引起了研究者的关注。

CNS 细菌生物膜的形成,目前被认为是其致病与耐药的主要原因。本文研究采用微孔板法对临床分离的 CNS 进行生物膜体外制备、结晶紫染色后经酶标仪比色,并将其结果与耐药、多重耐药进行统计分析,总结耐药情况及多重耐药趋势,以期提高临床对 CNS 感染的重视。同时帮助临床根据药敏结果合理选用抗菌药物,及时有效控制 CNS 医院感染。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2010 年 8 月至 2011 年 1 月自我院临床标本中分离的 CNS 菌株 42 株,分别取自痰、血液、尿液、脓液、前列腺液标本。生物膜形成阴性对照菌株为表皮葡萄球菌质控菌株 ATCC 12228,购自全国临床检验中心。

1.1.2 菌株鉴定 按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)常规分离培养获纯菌株后,选择菌落形态典型、革兰染色阳性、触酶试验阳性和凝固酶试验阴性者,应用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 全自动微生物分析仪进行各项检测,最终确定为 CNS 菌株。将 CNS 菌株于菌种保存液中-80℃冻存,备用。

1.1.3 培养基和药敏纸片 M-H 培养基及头孢西丁、青霉素 G、复方新诺明、红霉素、克林霉素、万古霉素、氯霉素、环丙沙星、庆大霉素、四环素、替考拉宁、利福平 12 种药敏纸片,均购自天津金章医用新技术研究所。

1.1.4 主要仪器及试剂 采用法国生物梅里埃公司比浊仪和 VITEK-2 全自动微生物分析仪; BIO-RAD Model 680 酶标仪和 BIO-RAD Model 1575 洗板机为北京志科微生物科技有限公司产品;美国碧迪生产的 BIO BASE 生物安全柜;天津天宇公司生产的 HH-BII-500 电热孵育箱;营养肉汤、菌种保存液和结晶紫试剂均购自天津金章医用新技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 生物膜制备 采用微孔板法制备生物膜:(1)复溶菌种,转种血平板,同时种上表皮葡萄球菌 ATCC 12228,35℃培养 24 h;(2)挑取典型菌落,调制成 0.5 麦氏单位的菌悬液,加入 96 孔板,每株平行加三孔,每孔 0.2 ml,35℃培养 24 h;(3)用移液器小心吸干每孔菌液,换肉汤继续在 35℃条件下培养 48 h;(4)再次用移液器小心吸干每孔菌液,生物膜即黏附在微孔中。

1.2.2 半定量检测生物膜形成 (1)用无菌水洗板 3 次;(2)用甲醇固定液固定;(3)结晶紫染色;(4)洗去未黏附细菌,晾干;(5)每孔加入 0.2 ml 乙醇溶液,溶解生物膜上的染料后,将有色溶液在波长为 570 nm 处比色,读取吸光度值($A=570\text{ nm}$)。

生物膜形成阳性株筛选标准:菌株吸光度值($A=570\text{ nm}$)均值与阴性对照菌株吸光度值均值比值 ≥ 2 ,判定为生物膜形成株(生物膜阳性菌株)。比值的高低代表生物膜形成的多少。

1.2.3 药敏试验 按照 2010 年美国临床实验室标准化协会抗微生物药物敏感性试验执行标准,采用纸片扩散法(Kirby-Bauer 法)进行药敏试验与结果判读。

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析。生物膜阳性和阴性菌株对常用抗生素耐药率比较采用校正卡方检验;生物膜形成多少与多重耐药情况的关系采用直线回归相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 42 株 CNS 的耐药情况分析 经检测,生物膜阳性 CNS 32 株,生物膜阴性 CNS 10 株,生物膜形成率达 76.19%。生物膜阳性 CNS 对青霉素 G、红霉素的耐药情况最为严重,耐药率分别为 96.88% 和 78.13%,且对 12 种抗菌药物整体呈现多重耐药;生物膜阴性 CNS 仅对青霉素 G 和红霉素的耐药情况较严重,耐药率分别为 60.00% 和 40.00%,对其他抗菌药物的耐药情况较轻或完全敏感。未发现对万古霉素耐药的 CNS 菌株。见表 1。

2.2 生物膜阳性与阴性 CNS 菌株对抗菌药物耐药情况的比较 生物膜阳性 CNS 菌株对青霉素 G、红霉素、克林霉素和复方新诺明的耐药率均显著高于生物膜阴性 CNS 菌株,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05);而对于四环素和环丙沙星,生物膜阳性 CNS 菌株的耐药率虽然高于生物膜阴性 CNS 菌株,但差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 2。

2.3 生物膜形成与多重耐药情况的关系 为方便

表 1 42 株 CNS 对 12 种抗菌药物的耐药情况[n(%)]

抗菌药物	生物膜阳性 CNS(32 株)	生物膜阴性 CNS(10 株)	合计(42 株)
头孢西丁	4(12.50)	0(0.00)	4(9.52)
青霉素 G	31(96.88)	6(60.00)	37(88.10)
复方新诺明	18(56.25)	1(10.00)	19(45.24)
红霉素	25(78.13)	4(40.00)	29(69.05)
克林霉素	22(68.75)	1(10.00)	23(54.76)
万古霉素	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
氯霉素	10(31.25)	0(0.00)	10(23.81)
环丙沙星	19(59.38)	2(20.00)	21(50.00)
庆大霉素	11(34.38)	0(0.00)	11(26.19)
四环素	19(59.38)	2(20.00)	21(50.00)
替考拉宁	1(3.13)	0(0.00)	1(2.38)
利福平	7(21.88)	0(0.00)	7(16.67)

表 2 生物膜阳性和阴性的 CNS 对常见抗生素耐药情况的比较[n(%)]

抗菌药物	生物膜阳性 CNS(32 株)	生物膜阴性 CNS(10 株)	χ^2 值	P 值
青霉素 G	31(96.88)	6(60.00)	6.68	<0.01
复方新诺明	18(56.25)	1(10.00)	6.80	<0.01
红霉素	25(78.13)	4(40.00)	4.98	<0.05
克林霉素	22(68.75)	1(10.00)	13.12	<0.01
环丙沙星	19(59.38)	2(20.00)	3.28	>0.05
四环素	19(59.38)	2(20.00)	3.28	>0.05

注:本表仅示可进行卡方检验的药物组别

分析,人为将 CNS 菌株吸光度值均值与阴性对照菌株吸光度值均值的比值按 0~、2~、4~、6~、8~12 分为 5 个组。将比值与耐药种数进行相关性分析,二者呈正相关关系($r=0.975, P<0.01$)。见表 3 及图 1。

3 讨论

目前认为,CNS 的感染率上升,与近十多年来侵入性诊疗设备的操作,如留置导管,以及植入性医用材料的应用,如人工瓣膜、人工关节等有关,而 CNS 在这些材料表面形成生物膜,则是其耐药与难治性的重要原因。此外,由于免疫抑制剂、细胞毒药物的应用,导致机体细胞或免疫功能降低,也是 CNS 成为医院感染主要机会致病菌的原因^[1]。

生物膜的形成是多因素作用的共同结果,如生物材料植入感染,多涉及到生物材料、细菌、宿主三者之间的关系^[2]。其形成过程大致可分两个阶段:黏附阶段和聚集阶段。黏附阶段又可分为早期黏附和后期黏附阶段。细菌的早期黏附是细菌直接或间接附着在生物材料表面的非特异性、可逆性的过程,主要借助于电荷力和疏水作用等理化作用力;后期黏

表 3 生物膜形成情况与多重耐药程度情况

比值	耐药种数(种)									合计
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0~	1	3	5	1	0	0	0	0	0	10
2~	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7
4~	0	0	0	0	7	3	0	0	0	10
6~	0	0	0	0	0	4	5	0	0	9
8~12	0	0	0	0	0	0	0	4	2	6
合计	1	3	5	8	7	7	5	4	2	42

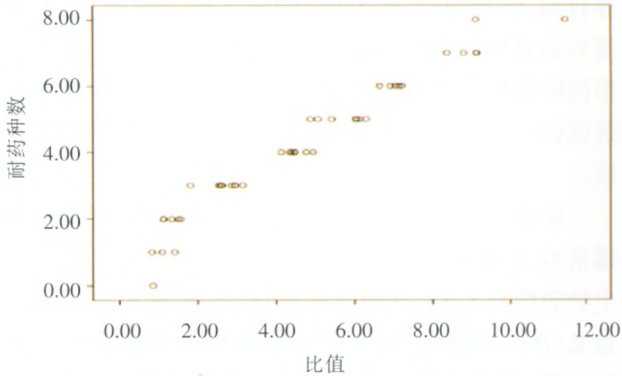


图 1 耐药种数与比值关系的散点图

注:比值指各菌株吸光度均值/阴性对照菌株吸光度均值;耐药种数反映多重耐药情况,比值反映生物膜形成情况

附是早期黏附后,在各种黏附因子的作用下发生特异性结合的不可逆黏附。

细菌聚集是细菌在生物材料表面增殖、相互黏附形成多层细胞团块的过程,最终外层被黏液样物质包裹,形成成熟的细菌生物膜。

与 CNS 生物膜生成有关的因子,有自溶素、纤维蛋白原结合蛋白、葡萄球菌表面蛋白、细菌间多糖黏附素、血凝素、聚集相关蛋白 A 等^[3,4]。

有生物膜的细菌不仅抵抗抗菌药物,还可抵抗

机体的杀菌作用,表现为细菌耐药率提高,出现多重耐药,久治不愈,危害性严重。产生此现象的原因,对于 CNS 来说,除了普通细菌的渗透限制学说、营养限制学说、细菌传感效应学说、程序化细胞死亡学说等,还与 CNS 生物膜的主要成分是脂多糖(细胞外多糖)有关。细胞外多糖有抗吞噬作用,生物膜形成后,宿主游走的淋巴细胞将无法黏附于生物材料表面^[5]。且在葡萄球菌聚集阶段,除观察到细胞外多糖合成增加外,生物膜内细菌的抗药性也在提高^[6]。

本文研究采用操作简便,基层单位也可以进行的微孔板法制备生物膜和结晶紫染色检测菌株的生物膜形成情况,由于尚无生物膜标准菌株,试验中采用微量成膜的表皮葡萄球菌 ATCC 12228 作为生物膜阴性对照株,得到 76.19%(32/42)的成膜率,比一般文献^[7]报告略高,表明 CNS 有较强的生物膜生成能力,在今后的临床微生物检测时,应引起足够的重视。

从药敏试验来看,CNS 对青霉素 G、红霉素、克林霉素、环丙沙星、四环素等耐药严重,耐药率分别达 88.10%、69.05%、54.76%、50.00%、50.00%,仅对万古霉素、替考拉宁、头孢西丁以及利福平等敏感,耐药率依次为 0.00%、2.38%、9.52%、16.67%。在其他文献^[7]中,表皮葡萄球菌对复方新诺明的耐药率亦较高,耐药率达 78.35%。但本文研究显示,CNS 对复方新诺明的耐药率仅为 45.24%,可能是不同地区不同时期用药不同造成的,也可能是样本抽样误差造成的。但 CNS 的总体耐药情况与以往文献基本一致。

经统计学分析发现,生物膜阳性 CNS 菌株对青霉素 G、红霉素、克林霉素和复方新诺明的耐药率比生物膜阴性 CNS 菌株有所提高,且差异均有统计学意义(P 均 <0.05),证实了生物膜在耐药现象形成中的作用。而二者对四环素和环丙沙星的耐药率,差异均无统计学意义(P 均 >0.05),与沈月芳等^[8]的报道一致。

生物膜的检测目前还没有统一的方法,在本文研究中,生物膜形成后,进行染色比色,以各菌株吸光度值的均值和阴性对照菌株吸光度值均值相比,其比值 ≥ 2 的,认为是生物膜形成株;再以耐药种类多少代表多重耐药情况,做相关性分析,从散点图直观比较,以及在 0.01 水平,计算相关系数 r 为 0.975,接近于 1,均证实生物膜生成与多重耐药程度有显著相关性。至于用吸光度来界定多重耐药严重程度的具体数值,尚待进一步讨论研究。

4 参考文献

- 1 王世恒,邹强,史燕顺,等.凝固酶阴性葡萄球菌耐药性分析.临床医药实践,2009,18:681-682.
- 2 Benedetti P, Pellizzer G, Furlan F, et al. Staphylococcus caprae meningitis following intraspinal device infection. Med Microbiol, 2008,57:904-906.
- 3 Sivadon V, Rottman M, Quincampoix JC, et al. Polymorphism of the cell wall-anchoring domain of the autolysin-adhesin atlE and its relationship to sequence type, as revealed by multilocus sequence typing of invasive and commensal Staphylococcus epidermidis strains. J Clin Microbiol, 2006,44:1839-1843.
- 4 Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, et al. A fibrinogen-binding protein of Staphylococcus epidermidis. Infect Immun, 1998,66:2666-2673.
- 5 Vuong C, Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. Microbes Infect, 2002,4:481-489.
- 6 Montanaro L, Campoccia D, Pirini V, et al. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and ica genes in Staphylococcus epidermidis strains from implant orthopedic infections. J Biomed Mater Res A, 2007,83:813-818.
- 7 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.右江医学,2008,36:252-254.
- 8 沈月芳,陈学军,李建平.儿科凝固酶阴性葡萄球菌体外耐药性和生物膜产物的监测与分析.中国药学杂志,2009,44:1033-1036.

(收稿日期:2012-03-29)

(本文编辑:李霖)

消息

《实用检验医师杂志》广告业务招商

《实用检验医师杂志》于 2009 年 7 月 21 日获得中华人民共和国新闻出版总署批准的中华人民共和国期刊出版许可证,京期出证第 5864 号;2009 年 8 月 19 日获得天津市工商局批准的广告经营许可证,许可证号:1201034000665。广告经营范围:设计、制作印刷品广告,利用自有《实用检验医师杂志》发布广告。本刊国内外公开发行。目前本刊编辑部已开发广告业务,欢迎需要在本刊刊登广告的客户联系我们。联系电话:022-60577728;022-60577729。