

尿路致病性大肠埃希菌生物膜形成与耐药性的关系

吴玉秀¹, 葛新², 靳颖¹, 董小青²

(1 武警医学院附属医院, 天津 300162; 2 武警医学院微生物学教研室, 天津 300162)

[摘要] **目的** 研究 50 株临床分离的尿路致病性大肠埃希菌(UPEC)形成生物膜情况及其对抗菌药物敏感性的影响。**方法** 采用结晶紫染色法检测生物膜阳性菌株, K-B 纸片扩散法分析 UPEC 对 8 种抗菌药物的敏感性, 再通过统计学方法分析细菌耐药性与生物膜形成之间的关系。**结果** 50 株 UPEC 中, 生物膜阳性 34 株, 占 68.00%。UPEC 对 8 种抗菌药物均有不同程度耐药性; 经统计学分析, 生物膜阳性菌株对氨苄西林和庆大霉素耐药率(76.47%和 55.88%)明显高于生物膜阴性菌株(43.75%和 18.75%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** UPEC 产生物膜现象较普遍, 生物膜形成与其对氨苄西林和庆大霉素的耐药性具有相关性。

[关键词] 大肠埃希菌; 尿路致病性大肠埃希菌; 泌尿道感染; 生物膜; 抗药性; 微生物; 抗菌药物

[中图分类号] R378.2⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)06-0405-04

Correlation between biofilm forming ability and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli*

WU Yu-xiu¹, GE Xin², JIN Ying¹, DONG Xiao-qing² (1 The Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; 2 Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

[Abstract] **Objective** To study the biofilm forming ability and effect on antimicrobial resistance of 50 uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains isolated from clinic. **Methods** Screening of biofilm formation was performed by crystal violet staining, the susceptibility of 50 UPEC isolates to 8 kinds of antimicrobial agents was determined by Kirby-Bauer method, the correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation was analyzed statistically. **Results** Among 50 UPEC isolates, 34(68.00%) were biofilm-positive strains. All UPEC strains showed different resistance to 8 kinds of antimicrobial agents; the resistant rates of biofilm-positive strains to ampicillin (76.47%) and gentamicin (55.88%) were significantly higher than those of biofilm-negative strains (43.75%, 18.75% respectively) ($P < 0.05$). **Conclusion** The formation of biofilm in UPEC is common, the formation of biofilm correlates with its resistance to ampicillin and gentamicin.

[Key words] *Escherichia coli*; uropathogenic *Escherichia coli*; urinary tract infection; biofilm; drug resistance, microbial; antimicrobial agents

[Chin Infect Control, 2011, 10(6): 405-408]

尿路感染是临床常见病, 80% 以上的尿路感染由尿路致病性大肠埃希菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)引起^[1]。与引起腹泻的大肠埃希菌不同, UPEC 具有与尿路感染相关的毒力因子(如黏附结构 P 菌毛和 1 型菌毛)、细胞毒性物质(如溶血素、细胞坏死因子以及载铁体等), 这些毒力因子在细胞黏附、杀伤宿主细胞及细菌在泌尿道环

境中生存等方面发挥作用。在致病过程中, 细菌黏附素能够促使 UPEC 黏附于导尿管表面或泌尿道上皮细胞形成细菌生物膜, 与尿路感染的发生密切相关, 特别是导尿管相关尿路感染(catheter-associated urinary tract infection, CAUTI)。据美国统计^[2], CAUTI 已成为最常见的医院感染, 占有医院感染的 40% 和尿路感染的 80%。由于细菌生物

[收稿日期] 2011-05-10

[作者简介] 吴玉秀(1978-), 女(汉族), 天津市人, 技师, 主要从事临床微生物检验研究。

[通讯作者] 葛新 E-mail: bigxer@163.com

膜的形成,增加了病原菌对抗菌药物和宿主免疫应答的抵抗力,往往导致感染慢性化。本研究从细菌耐药性的角度对临床分离的 UPEC 中生物膜阳性与阴性菌株分别进行药物敏感性试验,旨在分析细菌生物膜形成能力与耐药性之间的关系,对进一步了解生物膜耐药机制以及对尿路感染的合理用药具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 大肠埃希菌分离自武警医学院附属医院 2009 年 9 月—2010 年 3 月尿路感染患者尿标本,共 72 株。上述菌株经法国生物梅里埃 VITEK2 细菌鉴定仪鉴定,进一步经聚合酶链反应(PCR)扩增编码 P 菌毛的 *papC* 基因^[3],选择 *papC* 阳性者为 UPEC 菌株。扩增 *papC* 基因的 PCR 反应条件:94℃ 变性 5 min;94℃ 50 s,65℃ 50 s,72℃ 50 s,共 28 个循环;72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。药敏质控菌为大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.2 培养基 细菌生物膜培养采用 M63 基础培养基,每升包含(NH₄)₂SO₄ 2.0 g,KH₂PO₄ 13.6 g,FeSO₄·7H₂O 0.25 mg,用 KOH 调 pH 值为 7.0,高压灭菌后加入 1 mol/L MgSO₄·7H₂O 1 mL 和 20% 葡萄糖 10 mL。药敏试验采用 M-H 琼脂培养基,购自北京陆桥公司。

1.3 药敏纸片 氨苄西林(AMP)、头孢唑林(CFZ)、头孢噻肟(CTX)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、呋喃妥因(NIT),购自杭州微生物试剂公司。

1.4 其他试剂与器材 结晶紫染色液,购自北京陆桥公司;96 孔细胞培养板,购自美国 Corning 公司;酶标仪,型号为 BIO-RAD Model 550。

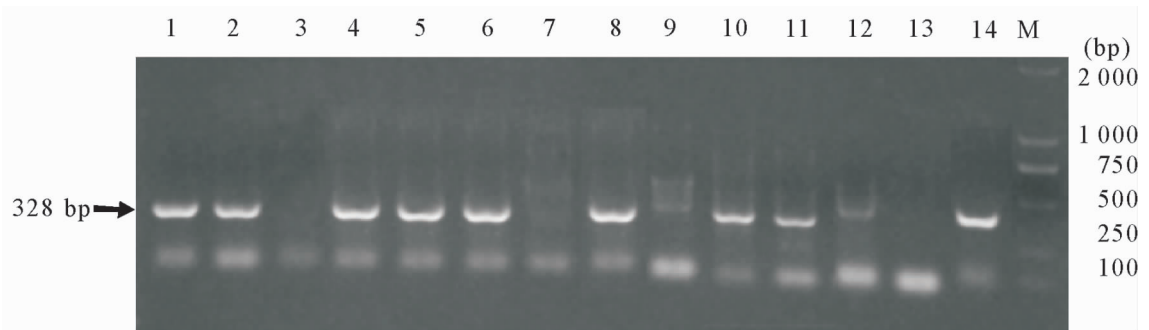
1.5 细菌生物膜阳性菌株检测 采用结晶紫染色法^[4]。M63 基础培养基过夜培养待测菌株,菌液稀释为 2.0×10^7 CFU/mL,取 1.25 μL 菌液加入至 96 孔板中的 125 μL M63 培养基中,37℃ 静置培养 24 h。按 1:100 取菌液转移至新孔的 125 μL M63 培养基中,37℃ 静置培养 24 h。每株菌设 4 个复孔。培养完成后,吸去菌液,用生理盐水清洗游离细菌,每孔加入结晶紫染色液 175 μL,染色 1 min 后吸去染液,用生理盐水冲洗多余染液,室温放置 1 h,待完全干燥后每孔加入二甲基亚砷 200 μL,使与生物膜结合的结晶紫完全溶解,用酶标仪检测 A₅₅₀ 吸光度值,结果取平均值。以只含培养基不含细菌的孔为对照孔,实验组吸光度值大于对照孔 4 倍以上为生物膜阳性菌株。

1.6 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法检测 50 株 UPEC 对 8 种抗菌药物的敏感性,结果判断依据 2007 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准。

1.7 统计方法 采用 χ^2 检验对生物膜阳性与阴性菌株耐药性差异进行分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P 菌毛基因 *papC* 检测结果 本研究共收集尿路感染患者尿标本分离的大肠埃希菌 72 株,经 PCR 扩增后产生 328 bp 电泳条带即为 *papC* 阳性(图 1),共检出 *papC* 阳性菌株 50 株。



1—14:Clinically isolated strains;M:DNA marker(DL2000)

图 1 尿路感染患者尿标本分离的大肠埃希菌 *papC* 基因 PCR 电泳图

Figure 1 PCR results of *papC* gene from clinically isolated *Escherichia coli* strains

2.2 生物膜阳性菌株筛选结果 50 株临床分离的

UPEC 菌株经结晶紫染色法检测,有 34 株 A₅₅₀ 值位

于 0.49~1.40 之间,大于对照孔(0.11)4 倍以上 (表 1),为生物膜阳性菌株,阳性率为 68.00%。

表 1 UPEC 生物膜阳性菌株检测结果(A_{550} 平均值)

Table 1 The screening results of biofilm-positive strains of UPEC (average values of A_{550})

Control well	Strain	A_{550}	Strain	A_{550}	Strain	A_{550}	Strain	A_{550}	Strain	A_{550}
0.11	1	0.63*	11	0.24	21	0.24	31	1.02*	41	0.37
	2	0.33	12	0.73*	22	0.70*	32	0.29	42	0.55*
	3	0.65*	13	0.49*	23	0.40	33	0.54*	43	0.50*
	4	0.74*	14	0.92*	24	0.50*	34	0.88*	44	0.37
	5	0.80*	15	0.35	25	0.55*	35	0.34	45	0.39
	6	0.40	16	0.66*	26	0.38	36	1.40*	46	0.80*
	7	0.78*	17	0.31	27	0.69*	37	0.41	47	0.66*
	8	0.27	18	0.51*	28	0.97*	38	0.85*	48	0.59*
	9	0.66*	19	0.66*	29	1.30*	39	0.75*	49	0.63*
	10	0.78*	20	0.76*	30	0.29	40	0.70*	50	0.74*

* A_{550} exceeded 4 fold of control well were biofilm-positive strains

2.3 药敏试验结果 50 株 UPEC 菌株对 8 种抗菌药物表现出不同程度耐药(表 2)。其中对 NIT 耐药率(4.00%)最低,只有 2 株耐药菌;对青霉素和头孢类药物耐药率较高(>30%),其中对 AMP 耐药率最高,达到 66.00%;对 GEN 也有较高的耐药率,为 44.00%。

2.4 UPEC 形成生物膜与耐药性的关系 将 50 株受试菌株按能否形成生物膜分为阳性(34 株)与阴性(16 株)2 类,发现生物膜阳性菌株对 AMP 和 GEN 的耐药率(76.47%和 55.88%)明显高于生物膜阴性菌株(43.75%和 18.75%),差异有统计学意

义($P<0.05$)。见表 3。

表 2 50 株 UPEC 菌株药敏试验结果

Table 2 Results of drug sensitive test of 50 UPEC strains

Antimicrobial agent	Sensitive (strain)	Intermediate (strain)	Resistant (strain)	Drug-resistant rate(%)
AMP	14	3	33	66.00
CFZ	31	0	19	38.00
CTX	30	4	16	32.00
CIP	32	1	17	34.00
LVX	33	0	17	34.00
AMK	47	0	3	6.00
GEN	27	1	22	44.00
NIT	46	2	2	4.00

表 3 生物膜阳性与阴性菌株对 8 种抗菌药物的耐药率(耐药株,%)

Table 3 Drug-resistant rates of biofilm-positive and biofilm-negative UPEC to different antimicrobial agents (resistant strain, %)

Antimicrobial agent	Biofilm positive strain($n=34$)	Biofilm negative strain($n=16$)	χ^2	P
AMP	26(76.47)	7(43.75)	5.19	0.02*
CFZ	14(41.18)	5(31.25)	0.46	0.50
CTX	11(32.35)	5(31.25)	0.01	0.94
CIP	10(29.41)	7(43.75)	1.00	0.32
LVX	11(32.35)	6(37.50)	0.13	0.72
AMK	1(2.94)	2(12.50)	1.76	0.18
GEN	19(55.88)	3(18.75)	6.09	0.01*
NIT	0(0.00)	2(12.50)	-	1.00

* $P<0.05$

3 讨论

细菌形成生物膜是许多感染性疾病迁延不愈的重要原因。据美国疾病预防控制中心的统计,65% 的人类细菌性感染与生物膜形成有关^[5]。UPEC 的 P 菌毛由其染色体的 *pap* 操纵子编码,其中 *papC*

编码分子伴侣引导途径的前导蛋白,属于最为保守的基因,用于 UPEC 菌株的鉴定。本研究对 50 株临床分离的 UPEC 菌株生物膜形成能力进行检测,发现其阳性率为 68.00%,表明 UPEC 形成生物膜是一种普遍现象,在防治尿路感染中应对此予以关注。

在 UPEC 形成生物膜过程中,细菌首先通过表

面的黏附结构与物体或宿主结合^[6],然后分泌大量细胞外多糖使多个细菌黏合形成微菌落,最后微菌落内部出现复杂的结构(如营养物质通道)和特殊的密度感应系统(quorum sensing system),标志生物膜成熟^[7]。有研究^[8]表明,10%~50%体内短期留置导尿管的患者会出现尿路感染,而留置导尿管>30 d 的患者出现尿路感染的概率可达 100%。生物膜内的细菌会不断脱落,转变为游离菌,成为感染的“发源地”,导致尿路感染反复发作。在长期治疗中使用抗菌药物造成的选择压力使耐药菌成为优势,进一步加重了感染的慢性化^[9]。本研究药敏试验结果表明 UPEC 耐药问题比较普遍,对常见的 8 种抗菌药物均有不同程度耐药,而且对某些药物耐药率较高。相关文献报道^[3]也指出 UPEC 耐药性给临床治疗带来一定困难,尤其是多重耐药菌株的检出率超过 80%。

细菌生物膜受到关注的主要原因是其对抗菌药物的耐药程度大大增加,有文献报道^[10]生物膜对抗菌药物的抵抗性可提高 10~1 000 倍。这一方面取决于生物膜中胞外多糖的屏障作用和内部细菌生长缓慢、敏感性降低等因素;另外,也有研究^[11]发现生物膜内细菌遗传物质的交换频率高于游离细菌,促进了抗菌药物耐药基因和其他遗传特性的播散。本研究检测发现 UPEC 对 AMP 和 GEN 的耐药性在一定程度上与生物膜形成具有相关性,这提示我们在分析生物膜耐药机制时要考虑到细菌本身的耐药问题。正是因为生物膜耐药机制的复杂性和清除的困难,传统的抗菌药物治疗在导尿管相关尿路感染中的应用面临严峻挑战。尽管一些新材料技术的应用有助于生物膜清除,如银涂层可为植入物提供一层抗菌表面,或者将植入物与缓释抗菌药物结合以避免全身使用高浓度抗菌药物造成的副作用,但现阶段仍面临许多困难需要进一步完善。因此,根据生物膜自身特点探索更好的抗菌药物和清除方法,

对控制细菌感染性疾病具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang L, Foxman B, Manning S D, *et al.* Molecular epidemiologic approaches to urinary tract infection gene discovery in uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Infect Immun*, 2000, 68 (4): 2009-2015.
- [2] Jacobsen S M, Stickler D J, Mobley H L, *et al.* Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21 (1): 26-59.
- [3] 侯敏, 贺靖冬, 陈锦英, 等. 致肾盂肾炎大肠杆菌毒力因子的分布及其与耐药性的关系 [J]. *天津医药*, 2008, 36(5): 321-323.
- [4] Danese P N, Pratt L A, Dove S L, *et al.* The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 37(2): 424-432.
- [5] Cvitkovitch D G, Li Y H, Ellen R P. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(11): 1626-1632.
- [6] Stickler D J, Morris N S, McLean R J, *et al.* Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(9): 3486-3490.
- [7] Atkinson S, Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world [J]. *J R Soc Interface*, 2009, 6 (40): 959-978.
- [8] Warren J W. Catheter-associated urinary tract infections [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 17(4): 299-303.
- [9] 谢景超. 尿路感染抗菌药物治疗的进展 [J]. *中国感染控制杂志*, 2010, 9(3): 219-223.
- [10] Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, 437(8): 41-47.
- [11] Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3710-3713.