

鲍曼不动杆菌生物膜形成抑制剂实验室初步研究

聂大平, 马 荣, 刘永娥, 李 飞

(大连医科大学附属二院, 辽宁 大连 116027)

[摘要] **目的** 了解鲍曼不动杆菌(Ab)耐药性及乙二胺四乙酸(EDTA)、米诺环素和水杨酸对其生物膜形成的影响。**方法** 采用纸片扩散法测定 72 株 Ab 对抗菌药物的敏感性;微量肉汤法测定 EDTA、米诺环素和水杨酸对 Ab 的最低抑菌浓度(MIC);黏附半定量法测定不同耐药性 Ab 生物膜生成率及不同浓度 EDTA、米诺环素和水杨酸对生物膜形成和成熟生物膜的影响。**结果** EDTA、米诺环素和水杨酸对 Ab 的 MIC₉₀ 分别为 200 mg/L、4 mg/L 和 600 mg/L。Ab 敏感株、多重耐药株和泛耐药株生物膜形成阳性率分别为 22.22%、83.33% 和 76.67%。250 mg/L 和 500 mg/L EDTA、4 mg/L 和 8 mg/L 米诺环素以及 1 000 mg/L 水杨酸可抑制成熟生物膜。**结论** 生物膜在多重耐药和泛耐药的 Ab 中生成较高,EDTA、米诺环素和水杨酸均有抑制生物膜形成的作用。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;生物膜;乙二胺四乙酸;米诺环素;水杨酸;抗药性;微生物

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)05-0344-04

Biofilm formation and inhibition in *Acinetobacter baumannii*

NIE Da-ping, MA Rong, LIU Yong-e, LI Fei (The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

[Abstract] **Objective** To realize the antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* (Ab), and effect of ethylenediaminetetra-5 acetic acid (EDTA), minocycline and salicylic acid on its biofilm formation. **Methods** Antimicrobial susceptibilities of 72 strains of Ab were detected with Kirby-Bauer method; Minimal inhibitory concentrations of EDTA, minocycline and salicylic acid on Ab were determined by broth microdilution method; The biofilm formation rates of different drug-resistant Ab and the effect of different concentrations of EDTA, minocycline and salicylic acid on biofilm formation and mature biofilm were determined by adhesion test. **Results** The MIC₉₀ of EDTA, minocycline and salicylic acid for Ab was 200 mg/L, 4 mg/L and 600 mg/L, respectively. The biofilm-positive rates in sensitive Ab (SAb) strains, multi-drug resistant (MDRab) strains and pan-drug resistant (PDRab) strains was 22.22%, 83.33% and 76.67%, respectively. EDTA with concentration of 250 mg/L and 500 mg/L, minocycline 4 mg/L and 8 mg/L, and salicylic acid 1 000 mg/L can inhibit the mature biofilm. **Conclusion** There are a high biofilm-positive rate in multi-drug and pan-drug resistant Ab. EDTA, minocycline and salicylic acid can inhibit the formation of biofilm.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; biofilm; ethylenediaminetetra-5 acetic acid; minocycline; salicylic acid; drug resistance; microbial

[Chin Infect Control, 2011, 10(5):344-347]

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)近年在医院感染中所占比例急剧上升,主要感染严重免疫力低下、过度使用广谱抗菌药物治疗、各种插管及长时间机械通气的患者,常引起呼吸机相关性肺炎、泌尿系统感染和败血症等。特别是在重症监护室(ICU),其多重耐药株(MDRab)和泛耐药株

(PDRab)经常流行。这可能与 Ab 广泛分布于人体皮肤和呼吸道表面,并可在物体和呼吸道表面形成生物被膜有关。细菌生物膜具有极强的耐药性及免疫逃避性,有利于细菌在环境中分布和在生物体内定植^[1];其是细菌抵御外界不利因素的重要屏障,如医院感染的重要病原菌铜绿假单胞菌,很多研究

[收稿日期] 2011-03-15

[作者简介] 聂大平(1956-),女(汉族),辽宁省大连市人,主任技师,主要从事细菌耐药性研究。

[通讯作者] 聂大平 E-mail: wsw2703@163.com

表明其感染的顽固性和耐药性与其生物膜的形成密切相关。相比之下,对 Ab 生物膜的研究较少,故我们对 Ab 生物膜形成与其耐药的关系以及乙二胺四乙酸(EDTA)、米诺环素和水杨酸对其的作用进行了初步研究,为减少和防止生物膜的形成提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 菌株分离自大连医科大学附属二院 2009 年 1—10 月的临床送检标本(多为呼吸道标本),常规鉴定为 Ab。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922,铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.1.2 试剂与仪器 LB 培养基(胰蛋白胨、酵母提取物)为杭州天和微生物试剂公司产品;EDTA 为北京化工厂产品(分析纯);米诺环素和水杨酸为中国药品检定所标准品;96 孔板;0.1%结晶紫;95%乙醇;药敏纸片:环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、妥布霉素、美罗培南、亚胺培南、头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、复方磺胺甲噁唑,为 OXIOD 产品。美国宝特 ELX-800 酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 采用纸片扩散法,结果按美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2008 年标准判别。分为敏感株、多重耐药株和泛耐药株,其中对 3 类以上抗菌药物耐药为 MDRAb,对临床所有抗菌药物耐药为 PDRAb。

1.2.2 测定 EDTA、米诺环素和水杨酸对 Ab 的最低抑菌浓度(MIC) 采用微量肉汤稀释法,EDTA 浓度为 125 mg/L、150 mg/L、200 mg/L、250 mg/L 和 500 mg/L,水杨酸为 200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L、800 mg/L 和 1 000 mg/L。EDTA、水杨酸和米诺环素的 LB 培养液 + 细菌 → 96 孔板 → 培养 24 h → 观察培养液浊度。

1.2.3 黏附半定量法测定生物膜形成水平 按文献[2-4]将菌株在 M-H 培养基中 37℃,24 h 震荡过夜;在 96 孔板中,每孔加入 LB 培养基 200 μL,将菌株制成 0.5 麦氏单位浓度,再稀释 10 倍,每孔加 5 μL,细菌总量为 5×10^4 。每株菌作 6 个平行孔,37℃,24 h 过夜;将每孔加入 PBS 200 μL,洗 3 次,倒置晾干;每孔加入 0.1%结晶紫染色 15 min;再洗板;每孔加入 95%乙醇 200 μL;在 570 nm 处测定 OD 值。大肠埃希菌 ATCC 25922 为阴性对照。以 OD 值 ≥ 阴性对照 OD + 3SD 判为产生生物膜。具体流程如下:



1.2.4 EDTA 对生物膜形成的影响 加含 150 mg/L、200 mg/L 和 250 mg/L EDTA 的 LB 200 μL

于 96 孔板中,每个浓度设 6 个复孔,每孔加 5×10^4 菌液^[2],37℃,24 h 过夜,染色同上。流程如下:



1.2.5 EDTA 对成熟生物膜的影响 将培养 48 h 的生物膜用生理盐水洗 3 次,除去游离菌,加含 0 mg/L、150 mg/L、200 mg/L 和 250 mg/L EDTA 的 LB 200 μL;加含 4 mg/L、8 mg/L 和 16 mg/L

米诺环素的 LB 0.2 mL;加含 600 mg/L、800 mg/L 和 1 000 mg/L 水杨酸的 LB 200 μL 于 96 孔板,每个浓度设 6 个复孔,37℃,24 h 过夜,染色同上。流程如下:



1.3 数据处理 所有数据均应用 SPSS 11.5 软件中的方差检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 Ab 对抗菌药物的耐药性 敏感组(SAb, 18 株)对头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星、妥布霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、亚胺培南、美罗培南和复方磺胺甲噁唑耐药率为 0.00%; 多重耐药组(24 株)除对亚胺培南和美罗培南敏感, 对其他抗菌药物耐药率 > 67%; 泛耐药组(30 株)对上述抗菌药物均耐药。

2.2 EDTA、米诺环素和水杨酸对 Ab 的 MIC 对 72 株 Ab 的 MIC 范围, EDTA 为 150~250 mg/L, MIC₉₀ 为 200 mg/L; 米诺环素 MIC 范围为 1~8 mg/L, MIC₉₀ 为 4 mg/L; 水杨酸 MIC 范围为 500~800 mg/L, MIC₉₀ 为 600 mg/L。

2.3 耐药性不同 Ab 黏附 OD 值和生物膜阳性率 大肠埃希菌(ATCC 25922) OD 为 0.061, 加 3SD 0.0528, 即 OD 值为 0.1138, 判为生物膜阳性。多重耐药和泛耐药株黏附 OD 值及生物膜阳性率明显高于敏感株, 见表 1、2。

2.4 EDTA 对生物膜形成的影响 150 mg/L ED-

TA 对 SAb 黏附率无明显影响, 200 mg/L 和 250 mg/L EDTA 对 MDRAb、PDRAb 黏附有明显影响。见表 3。

表 1 耐药性不同 Ab 黏附 OD 值($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The adherences in different drug-resistant Ab ($\bar{x} \pm s$)

Samples	No. of strains	OD value
SAb	14	0.08 ± 0.01 ¹⁾
MDRAb	20	0.13 ± 0.03 ²⁾
PDRAb	23	0.14 ± 0.04 ³⁾

1) vs 2), $F = 20.20, P < 0.001$; 1) vs 3), $F = 56.12, P < 0.001$; 2) vs 3), $F = 3.67, P > 0.05$

表 2 耐药性不同 Ab 生物膜形成阳性率

Table 2 The biofilm-positive rates in different drug-resistant Ab

Samples	Positive (strain)	Negative (strain)	Positive rate(%)
SAb	4	14	22.22 ¹⁾
MDRAb	20	4	83.33 ²⁾
PDRAb	23	7	76.67 ³⁾
Total	47	25	65.28

1) vs 2), $\chi^2 = 24.94, P < 0.001$; 1) vs 3), $\chi^2 = 13.47, P < 0.001$; 2) vs 3), $\chi^2 = 0.01, P > 0.05$

表 3 EDTA 对耐药性不同 Ab 黏附的影响(黏附 OD 值, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 The effect of EDTA on adherence in different drug-resistant Ab (OD value, $\bar{x} \pm s$)

Bacteria groups	SAb(n=14)	MDRAb(n=20)	PDRAb(n=23)
Control	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.03 ¹⁾	0.14 ± 0.03 ^a
EDTA 150 mg/L	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.02 ²⁾	0.13 ± 0.03 ^b
EDTA 200 mg/L	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.02 ³⁾	0.10 ± 0.01 ^c
EDTA 250 mg/L	0.06 ± 0.00	0.09 ± 0.01 ⁴⁾	0.08 ± 0.01 ^d

2) vs 1), $F = 3.62, P > 0.05$; 3) vs 1), $F = 8.56, P < 0.01$; 4) vs 1), $F = 46.53, P < 0.001$
b vs a, $F = 3.26, P > 0.05$; c vs a, $F = 26.18, P < 0.001$; d vs a, $F = 56.12, P < 0.001$

2.5 EDTA、米诺环素和水杨酸对 Ab 成熟生物膜的影响 200 mg/L EDTA、2 mg/L 米诺环素、600 mg/L 和 800 mg/L 水杨酸对成熟生物膜无明显抑

制; 250 mg/L 及 500 mg/L EDTA、4 mg/L 及 8 mg/L 米诺环素、1 000 mg/L 水杨酸能明显抑制成熟生物膜。见表 4。

表 4 EDTA、米诺环素和水杨酸对 47 株 Ab 成熟生物膜的影响(黏附 OD 值, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 The effects of EDTA, minocycline and salicylic acid on mature biofilm of 47 Ab strains (OD value, $\bar{x} \pm s$)

EDTA		Minocycline		Salicylic acid	
Concentration	OD value	Concentration	OD value	Concentration	OD value
0 mg/L ^a	0.14 ± 0.03	0 mg/L	0.14 ± 0.03	0 mg/L	0.14 ± 0.03
200 mg/L ^b	0.13 ± 0.02	2 mg/L ^c	0.13 ± 0.02	600 mg/L ^h	0.13 ± 0.03
250 mg/L ^c	0.11 ± 0.02	4 mg/L ^f	0.10 ± 0.01	800 mg/L ⁱ	0.13 ± 0.02
500 mg/L ^d	0.10 ± 0.01	8 mg/L ^g	0.09 ± 0.10	1 000 mg/L ^j	0.12 ± 0.01

a vs b, e, h, i, $F = 3.42, 3.97, 3.05, \text{ and } 3.87, P > 0.05$, respectively; a vs j, $F = 13.74, P < 0.05$; a vs c, d, f, and g, $F = 19.89, 24.21, 21.82, \text{ and } 36.47, P < 0.001$, respectively

3 讨论

国外研究^[2-3]表明,临床 Ab 分离株生物膜阳性率为 62%~74%,产生物膜菌多为多重耐药菌,且含超广谱 β -内酰胺酶 *PRE-1* 基因的细菌产生物膜量明显高于不含此基因的细菌。我们的研究结果也证实多重耐药株和泛耐药株生物膜的阳性率远高于敏感株,分别为 83.33%和 76.67%;敏感株产膜率仅为 22.22%。有学者认为^[3-4]耐药株多形成生物膜的原因可能是细菌对抗菌药物的压力选择,同样它也可以在生物膜的环境下获得对多种抗菌药物的耐药性;较高的定植能力与其对抗菌药物的耐药性有助于细菌本身生存。但也有生物膜生成与细菌耐药无关的报道^[5]。EDTA 和水杨酸都有一定的杀菌作用,它们和米诺环素对葡萄球菌属、铜绿假单胞菌和假丝酵母菌属的生物膜有一定抑制作用^[6-7]。我们用 3 种不同浓度 EDTA 作用于 Ab, 150 mg/L 时对生物膜的形成没有明显抑制作用,在 200~250 mg/L 时有抑制作用,但也可能是 EDTA 杀菌作用所致。200 mg/L EDTA 对成熟的生物膜无抑制作用,250 mg/L 和 500 mg/L 则对其有抑制作用;较 Lee 等^[2]报道在 125 mg/L EDTA 的浓度下,能减少 55%~65%生物膜形成的浓度要高得多。水杨酸对 Ab 的 MIC 为 600 mg/L,但 600 mg/L 和 800 mg/L 浓度对成熟生物膜无抑制作用,只有 1 000 mg/L 水杨酸对其有抑制作用。米诺环素在 4 mg/L 和 8 mg/L 时,对成熟生物膜有明显抑制作用,这也高于 Raad 等^[8] 1 mg/L 米诺环素能抑制生物膜的报道。有文献报道^[9] EDTA 对生物膜形成的抑制作用与细菌膜表面镁离子水平有关。生物膜的形成需要细胞间多糖黏附素(PIA)的作用,细胞表面适当的 PIA 抗原的存在依赖于镁离子水平。另外,在培养基中增加硫酸亚铁可以促进生物膜生长,铁络合剂能抑制生物膜形成^[10-11]。EDTA 是金属螯合剂,它可以螯合镁离子和铁离子,抑制生物膜的形成;米诺环素抑制生物膜可能是由于抑制生物膜多糖中的蛋白质合成,从而减少生物膜生成;而水杨酸则减少铜绿假单胞菌和表皮葡萄球菌生物膜中细胞外多糖的合成^[12]。另外,生物膜形成的黏附半定量法不是每次都会获得理想的结果,我们是进行了 3 次实验才得到上述结果。

综上所述,Ab 生物膜在 MDRAb 和 PDRAb 中形成率高,其生物膜对米诺环素、EDTA 和水杨酸

的抗性远高于游离菌;米诺环素对成熟生物膜的作用最好,EDTA 次之,水杨酸最差。因此,我们认为用米诺环素和 EDTA 对呼吸道感染 Ab 患者进行雾化或冲洗其静脉导管、气管插管和留置尿管管道可能有助于防止生物膜形成。

[参考文献]

- [1] Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* [J]. *Microbios*, 1996, 86(346): 49-58.
- [2] Lee H W, Koh Y M, Kim J, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(1): 49-54.
- [3] Cevahir N, Demir M, Kaleli H, et al. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2008, 41(6): 513-518.
- [4] Rao R S, Karthika R U, Singh S P, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2008, 26(4): 333-337.
- [5] King L B, Swiatlo E, Swiatlo A, et al. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2009, 55(2): 414-421.
- [6] Banin E, Brady K M, Greenberg E P. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3): 2064-2069.
- [7] Raad I, Hachem R, Tcholakian R K, et al. Efficacy of minocycline and EDTA lock solution in preventing catheter-related bacteremia, septic phlebitis, and endocarditis in rabbits[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(2): 327-333.
- [8] Raad I, Reitzel R, Jiang Y, et al. Anti-adherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(4): 746-750.
- [9] Percival S L, Kite P, Eastwood K, et al. Tetrasodium EDTA as a novel central venous catheter lock solution against biofilm [J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005, 26(6): 515-519.
- [10] Nucleo E, Steffanoni L, Fugazza G, et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* [J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9(2): 270-283.
- [11] O' May C Y, Sanderson K. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions[J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(6): 765-773.
- [12] Farber B F, Hsieh H C, Donnenfeld E D, et al. A novel antibiofilm technology for contact lens solution[J]. *Ophthalmology*, 1995, 102(5): 831-836.