

鸡源大肠杆菌生物被膜的耐药性分析

贾艳华, 李凤娟, 刘建华, 胡功政, 莫娟, 余建军

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为探讨鸡源大肠杆菌生物被膜的耐药机制, 采用改进的平板培养法建立鸡大肠杆菌生物被膜体外模型, 用液体二倍稀释法分别测定了鸡源大肠杆菌生物被膜菌、浮游菌和脱膜菌对克拉霉素、环丙沙星、磷霉素等 13 种抗菌药的敏感性, 并检测了细菌生物被膜中超广谱 β -内酰胺酶的产生情况。结果表明: 浮游菌和脱膜菌对同种药物的敏感性几乎相同, 而生物被膜菌对同种药物的耐药性比后两者显著增强, 并且 2 株不产超广谱 β -内酰胺酶的浮游菌在形成生物被膜后产生了超广谱 β -内酰胺酶。由此说明, 生物被膜菌的耐药性主要是由于生物被膜这种特殊结构造成的, 同时, 由于生物被膜的存在, 促使了超广谱 β -内酰胺酶的产生。生物被膜的形成和超广谱 β -内酰胺酶的产生是鸡大肠杆菌生物被膜耐药的两个主要原因。

关键词: 鸡源大肠杆菌; 生物被膜; 耐药性; 超广谱 β -内酰胺酶

中图分类号: S859 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)02-0191-07

Analysis of Drug Resistance of Fowl *E. coli* Biofilm

JIA Yan-hua, LI Feng-juan, LIU Jian-hua, HU Gong-zheng, MO Juan, YU Jun-jun

(Technological College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,

Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To investigate the mechanism of drug resistance of fowl *E. coli* biofilm, the in vitro model of fowl *E. coli* biofilm was established with the improved flat-board method, and the sensitivity of biofilm, the planktonic and the defilming to thirteen antibacterial agents (including clarithromycin, ciprofloxacin, fosfomycin, etc.) were determined by broth double dilution. Meanwhile, ESBLs production was also detected. The result revealed that the planktonic and the defilming had the similar antibiotic susceptibilities, while the biofilm was significantly higher than those above two. Two planktonic non-ESBLs strains could produce ESBLs after becoming biofilm. All these proved that the special structure of biofilm is the fundamental factor of drug resistance of bacterial biofilm, and the existence of biofilm enhances the production of ESBLs. It was concluded that the formation of biofilm and the production of ESBLs are the two key reasons for drug resistance of the fowl *E. coli* biofilm.

Key words: Fowl *E. coli*; Biofilm; Drug resistance; ESBLs

随着养禽业的发展和长期药物的不合理应用, 鸡大肠杆菌耐药菌株逐年增多, 且呈交叉耐药和多重耐药之趋势^[1,2]。产生超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs) 是大肠杆菌耐药的主要机制之一, 细菌生物被膜(Bacterial biofilm, BBF) 的形成也是大肠杆菌重要的耐药机制之一。细菌生物被膜^[3] 又称菌膜, 是指附着于惰性或者活性固体表面的细菌和包裹着细菌的由细菌自身所分泌的含水聚合性基质所组成的结构性细菌群落。生物被膜菌具有与浮游细菌不同的

结构和生长、代谢特点, 常造成临床上细菌生物被膜相关性感染的慢性、难治性特点^[3,4]。生物被膜菌一旦造成感染, 由于其不易为抗菌药物所清除, 从而导致生物被膜相关性感染的难治性^[5]。据有关资料报道^[6], BBF 比普通浮游菌更容易产生 ESBLs, 说明 BBF 和 ESBLs 有协同作用。鉴于大肠杆菌的严重耐药性和生物被膜感染的难治性, 很有必要对生物被膜的耐药机制进行分析, 但国外研究的重点在医源性感染和工业用水方面, 而国内研究的重点在医源

收稿日期: 2007-10-12

基金项目: 河南省自然科学基金项目(0411031300)

作者简介: 贾艳华(1981-), 女, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事抗生素药效学研究。

通讯作者: 胡功政(1964-), 男, 河南光山人, 教授, 博士, 主要从事兽用抗菌药药效学研究。

性感染和食品污染方面,国内外在兽医界的研究尚未见报道。本试验首次采用改良的卡尔加里生物被膜装置(Calgary Biofilm Device, CBD),测定了临床分离鸡大肠杆菌的最小生物被膜抑菌浓度(the Minimum Biofilm Inhibitory Concentration, MBIC)和最低生物被膜清除浓度(the Minimal Biofilm Eradicating Concentration, MBEC),并进一步检测了BBF和ESBLs的关系,以期为大肠杆菌生物被膜临床感染的治疗提供一定的理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 15株临床分离鸡大肠杆菌,均经VITEK-32全自动微生物鉴定系统鉴定;对照菌为大肠埃希氏菌25922和肺炎克雷伯ATCC700603(购自中国药品生物制品鉴定所)。

1.1.2 药品 氟喹诺酮类药物(恩诺沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、司帕沙星、帕珠沙星、加替沙星),大环内酯类药物(红霉素、泰乐菌素、吉他霉素、替米考星、阿奇霉素、克拉霉素),磷霉素。

1.1.3 仪器 VITEK-32全自动微生物鉴定系统、SW-CJ-JC超净工作台、AB204-N型电子分析天平、微量进样器(0.5~1 000 μ L)、PHS-2C精密酸度计、LEICA显微照相系统、比浊仪。

1.1.4 试剂及培养基 麦康凯营养琼脂、M-H肉汤(MHB)、普通血琼脂平板、胰酶大豆肉汤(TSB)、分析纯NaCl、2.5%戊二醛PBS溶液、PBS缓冲液(pH 7.4)、饱和CaCl₂液、5% AgNO₃、1%对苯二酚、5%硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)。

1.1.5 载体 医用硅胶膜(1.5 mm厚,北京医用硅胶研究所)。

1.2 方法

1.2.1 BBF体外模型的建立 15株菌均用改良的平板培养法^[7]建立BBF体外模型,操作步骤为硅胶片(1 cm×1 cm)经灭菌后分别放入每孔含有1.0 mL TSB的20孔板中,然后在各孔中加入0.5麦氏浓度的各菌液100 μ L,放入培养箱37℃恒温培养,隔天换液,连续培养7 d即可形成稳定的BBF。

1.2.2 BBF快速银染法鉴定 参照文献[4, 8]进行,先取出硅胶片,经生理盐水多次充分漂洗,去除浮游菌;在2.5%戊二醛PBS溶液中固定1 h,蒸馏水清洗1 min;再经过饱和CaCl₂液结合15 min、蒸馏水清洗1 min、5% AgNO₃染色15 min、1%对苯二酚显色2 min、蒸馏水清洗1 min、5% Na₂S₂O₃固定2 min、蒸馏水清洗1 min,最后观察是否有黑染物存在,同

时用显微照相系统确认生物被膜的形成,并用空白硅胶片作空白对照。

1.2.3 ESBLs的检测^① BBF中ESBLs的检测:每株菌均用硅胶片培养3份,把附有生物被膜的硅胶片经生理盐水充分冲洗后放入加有1 mL MH培养液的小试管内,用150 W超声水浴震荡15 min使生物被膜上的细菌剥脱至培养液内。4℃、6 000 r/min离心30 min,弃去上清液后,用0.05 mol/L、pH 7.0的磷酸盐PBS调整菌液浓度至 5×10^8 cfu/mL,然后用双纸片协同法^[9, 10]检测ESBLs的产生情况。④浮游菌中ESBLs的检测:按参考文献[10]进行。

1.2.4 药液的配制 用电子分析天平精确称取适量的药物,无菌操作溶于适宜的溶剂,使各种药液初浓度为2 048 μ g/mL(BBF菌使用)和512 μ g/mL(浮游菌和脱膜菌使用),使用前配制,置冰箱中4℃保存,7 d内用完。

1.2.5 BBF的MBIC及MBEC的测定 从浮游菌中随机选取产酶菌4株(编号为1~4)、非产酶菌4株(编号A~D)。参照文献[11, 12]的方法操作:①BBF菌的培养采用改良的CBD装置(CBD装置原理是利用液体间的剪切力促进BBF的形成,CBD是由上下2个反应器构成的密闭装置),过夜培养的菌液用比浊仪调整至0.5麦氏浓度,然后取200 μ L加入到装有8 mL无菌TSB的小试管(规格10 cm×1.2 cm)中,再往试管中加入8片灭菌的硅胶片(1 cm×1 cm),加盖后倾斜放在振荡培养箱中,37℃、150 r/min培养28 h备用;④MBIC及MBEC的测定采用试管二倍稀释法,用MH肉汤在试管中把药物稀释成梯度为1~2 048 μ g/mL的不同浓度。再分别加入用灭菌生理盐水充分漂洗后的附有BBF的硅胶片,于37℃在恒温培养箱培养24 h,用肉眼观察以无菌生长的最低药物浓度作为其MBIC值,再把无菌生长的各硅胶片用生理盐水充分漂洗,以除去上面残留的抗生素和浮游菌,然后放入加有1 mL MH肉汤的灭菌试管中,在37℃恒温培养箱培养24 h,以无菌生长管所对应的最低药物浓度作为MBEC值,同时用浮游菌和脱膜菌的MIC值和MBC值作为对照。

1.2.6 浮游菌和脱膜菌的MIC值和MBC值的测定 浮游菌的MIC值测定采用标准液体微量稀释法^[13],菌液浓度为 5×10^5 cfu/mL,在37℃恒温培养箱培养24 h后,用肉眼观察以无菌生长的最低药物浓度作为其MIC值;MBC的确定即依次将未见细菌生长的各管培养物各吸取0.1 mL涂布于MH琼脂培养基平板上,37℃培养18~24 h,平板上的菌落数小于5个的最小稀释度的药物浓度即为MBC。脱膜

菌的 MIC 及 MBC 的测定方法同浮游菌,脱膜菌的制备方法如下: 把用改良的 CBD 装置培养好的 BBF, 在无菌操作台上弃其菌液于废液缸中, 再用灭菌镊子小心地夹起一片硅胶片, 在无菌生理盐水中充分洗涤, 以去除上面的浮游菌, 其他硅胶片也同样处理。然后加入适量的 MH 肉汤, 用 150 W 超声水浴震荡 15 min 使生物被膜上的细菌剥脱至培养液内, 再用 MH 肉汤调整菌液浓度至 1×10^6 cfu/mL, 为 MIC 的测定做准备。

2 结果与分析

2.1 BBF 的制备

经平板培养法培养 7 d 后, 15 株鸡大肠杆菌均形成了生物被膜, 用银染法处理过的生物被膜菌用肉眼可以看到硅胶片上有黑色膜样物质形成, 而空白对照没有。在显微照相系统下可清楚地看到 BBF 的具体结构, 其中膜样絮状物为生物被膜, 空白处为“孔隙”, 即被膜菌输送营养物质、排出代谢废物以及传递信息的通道。经革兰氏染色的 BBF 在镜下可见高度密集的大肠杆菌, 呈三维立体结构的不同的片状分布, 中间也有和经银染法处理后的 BBF 一样的“孔隙”(图 1~ 3)。

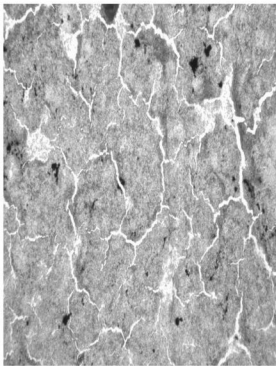


图 1 BBF 菌(× 200)

Fig.1 Bacterium biofilm

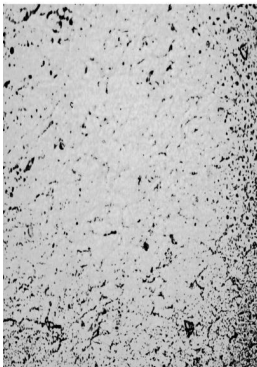


图 2 空白对照(× 200)

Fig.2 Blank contrasting

2.2 BBF 中 ESBLs 的检测结果

15 株鸡大肠杆菌 BBF 中产 ESBLs 的菌有 10

株, 产 ESBLs 率为 66. 7% (10/ 15); 而相应的浮游菌中产 ESBLs 的菌有 8 株, 产 ESBLs 率为 53. 3% (8/ 15)。说明 7 株不产 ESBLs 的浮游菌中在形成 BBF 后, 有 2 株(标记为 A, B)产生了 ESBLs, 说明生物被膜的形成可提高 ESBLs 的产生率。检测结果见图 4, 5。

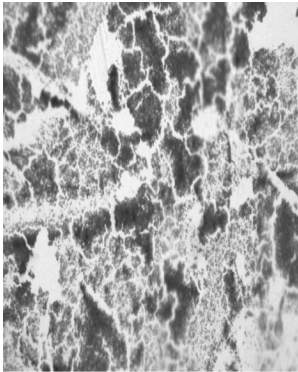


图 3 经革兰氏染色的 BBF(× 200)

Fig. 3 Bacterium biofilm treated by gram staining



图 4 BBF 菌 ESBLs 检测结果

Fig.4 ESBLs detection result of biofilm strain

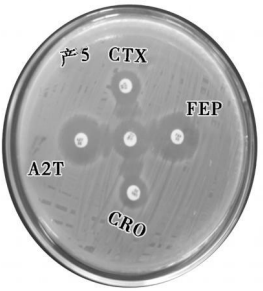


图 5 浮游菌 ESBLs 检测结果

Fig.5 ESBLs detection result of the planktonic strain

2.3 BBF 的 MBIC 及 MBEC 的测定结果

随机挑选的 8 株鸡大肠杆菌生物被膜的 MBIC 及 MBEC 的测定结果见表 1, 相应的浮游菌和脱膜菌的 MIC 及 MBC 的测定结果见表 2、表 3。

从表 1, 2 可以看出, 对于同一株菌, 无论是产酶菌还是不产酶菌, 产生 BBF 后的 MBIC 较之未形成 BBF 的浮游菌的 MIC, 前者是后者的 4~ 1 024 倍, 如产酶菌 1, 克拉霉素、环丙沙星、加替沙星、左氧氟沙星、磷霉素的 MBIC 分别为浮游菌 MIC 的 64, 4, 8, 4 和 32 倍; 从表 1, 2 还可看出, A, B 2 株菌在形成 BBF

后,MBIC 和 MBEC 比 C、D 的增多的幅度要大,如菌株 A,克拉霉素、环丙沙星、加替沙星、左氧氟沙星、磷霉素的 MBIC 分别为其 MIC 的 64, 8, 16, 16 和 64;又如菌株 C,克拉霉素、环丙沙星、加替沙星、左氧氟沙星和磷霉素的 MBIC 分别为 MIC 的 32, 4, 4, 8 和 32 倍。比较菌株 A、C 的 MBIC/MIC 可以知道: A 的

MBIC/ MIC 要比 C 的 MBIC/ MIC 大 2 倍以上。这和 ESBLs 的检测结果相符合,因为 A 菌的 BBF 产生了 ESBLs, BBF 的形成和 ESBLs 的产生使它的耐药性较单纯的 C 的 BBF 要强。

从表 2、3 可以看出,同一菌株,浮游菌和脱膜菌的 MIC 值相差很小,基本一样。

表 1 13 种抗菌药对 BBF 的 MBIC 及 MBEC

Tab. 1 MBIC and MBEC of thirteen kinds of antibacterial agents to BBF								μg/mL
药物 Antibacterial agents	产 1 ESBLs- pro- ducing isolate 1	产 2 ESBLs- pro- ducing isolate 2	产 3 ESBLs- pro- ducing isolate 3	产 4 ESBLs- pro- ducing isolate 4	A *	B *	C	D
红霉素 MBIC	2 048	1 024	2 048	2 048	1 024	1 024	512	512
Erythromycin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
泰乐菌素 MBIC	1 024	1 024	2 048	2 048	1 024	512	128	512
Tylosin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
吉他霉素 MBIC	1 024	1 024	2 048	1 024	1 024	512	64	256
Kitasamycin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
替米考星 MBIC	2 048	1 024	2 048	1 024	2 048	2 048	256	512
Tilmicosin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
阿奇霉素 MBIC	2 048	2 048	2 048	1 024	2 048	1 024	512	64
Azithromycin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
克拉霉素 MBIC	2 048	1 024	2 048	2 048	1 024	1 024	512	512
Clarithromycin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
恩诺沙星 MBIC	128	256	256	128	64	128	64	64
Enrofloxacin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
环丙沙星 MBIC	128	32	128	64	64	32	32	32
Ciprofloxacin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
加替沙星 MBIC	32	32	64	32	16	32	8	8
Gatifloxacin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
左氧氟沙星 MBIC	64	64	64	64	64	64	32	32
Levofloxacin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
司帕沙星 MBIC	128	128	64	64	64	32	32	32
Sparfloxacin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
帕珠沙星 MBIC	32	64	64	64	64	64	32	32
Pazifloxacin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048
磷霉素 MBIC	2048	2 048	1 024	1 024	2 048	2 048	1 024	64
Fosfomycin MBEC	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048	> 2 048

注: A* , B* 为浮游菌不产 ESBLs 但形成 BBF 后产生 ESBLs 的菌株。

Note: A* , B* are non- ESBLs- producing strains when planktonic but producing ESBLs when BBF.

表 2 13 种抗菌药对浮游菌的 MIC 及 MBC

Tab. 2 MIC and MBC of thirteen kinds of antibacterial agents to the planktonic strains								μg/mL
药物 Antibacterial agents	产 1 ESBLs- pro- ducing isolate 1	产 2 ESBLs- pro- ducing isolate 2	产 3 ESBLs- pro- ducing isolate 3	产 4 ESBLs- pro- ducing isolate 4	A	B	C	D
红霉素 MIC	32	16	32	64	16	8	8	16
Erythromycin MBC	128	128	> 256	> 256	64	64	64	64
泰乐菌素 MIC	128	128	256	256	64	128	32	64
Tylosin MBC	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	256	> 256
吉他霉素 MIC	32	32	32	64	32	32	16	32
Kitasamycin MBC	128	128	128	> 256	128	128	64	128
替米考星 MIC	64	32	128	64	32	16	16	16
Tilmicosin MBC	> 256	256	> 256	> 256	256	128	128	128
阿奇霉素 MIC	2	4	2	8	2	1	1	0.5
Azithromycin MBC	8	16	8	16	4	4	4	2
克拉霉素 MIC	32	64	32	32	16	32	16	8

续表								
药物 Antibacterial agents	产 1 ESBLs- pro- ducing isolate 1	产 2 ESBLs- pro- ducing isolate 2	产 3 ESBLs- pro- ducing isolat e 3	产 4 ESBLs- pro- ducing isolate 4	A	B	C	D
Clarithromycin MBC	256	256	128	256	64	128	128	64
恩诺沙星 MIC	16	16	32	32	16	16	16	8
Enrofloxacin MBC	32	32	64	64	32	32	64	16
环丙沙星 MIC	32	8	16	16	8	2	8	4
Ciprofloxacin MBC	32	16	16	32	8	4	8	8
加替沙星 MIC	4	4	8	4	1	2	2	1
Gatifloxacin MBC	4	4	8	4	2	2	2	1
左氧氟沙星 MIC	16	16	16	32	4	4	4	8
Levofloxacin MBC	32	16	16	32	8	4	4	8
司帕沙星 MIC	16	8	32	8	4	4	2	2
Sparfloxacin MBC	16	8	32	16	4	8	2	2
帕珠沙星 MIC	4	8	16	4	2	0.5	2	1
Pazufloxacin MBC	4	8	16	8	4	1	2	1
磷霉素 MIC	64	256	128	64	32	64	32	16
Fosfomycin MBC	> 256	> 256	> 256	> 256	64	256	64	32

表 3 13 种抗菌药对脱膜菌的 MIC 及 MBC								
Tab. 3 MIC and MBC of thirteen kinds of antibacterial agents to the defilming strains								µg/mL
药物 Antibacterial agents	产 1 ESBLs- pro- ducing isolate 1	产 2 ESBLs- pro- ducing isolate 2	产 3 ESBLs- pro- ducing isolat e 3	产 4 ESBLs- pro- ducing isolate 4	A	B	C	D
红霉素 MIC	32	32	64	64	32	32	16	32
Erythromycin MBC	128	128	> 256	256	128	256	128	128
泰乐菌素 MIC	128	256	> 256	> 256	128	64	32	64
Tylosin MBC	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	256	128	256
吉他霉素 MIC	64	32	32	128	64	64	64	32
Kit asamycin MBC	> 256	128	128	> 256	> 256	> 256	> 256	128
替米考星 MIC	64	32	256	64	64	32	32	32
Tilmicosin MBC	256	128	> 256	> 256	256	256	128	256
阿奇霉素 MIC	2	2	2	16	2	1	2	0.5
Azithromycin MBC	8	8	4	32	8	4	4	2
克拉霉素 MIC	32	16	32	32	64	32	32	32
Clarithromycin MBC	256	64	128	256	> 256	256	128	128
恩诺沙星 MIC	32	32	32	32	32	32	16	16
Enrofloxacin MBC	64	64	32	64	128	128	32	32
环丙沙星 MIC	32	8	16	16	16	4	8	2
Ciprofloxacin MBC	64	16	32	32	64	8	16	4
加替沙星 MIC	4	4	8	4	2	4	2	1
Gatifloxacin MBC	8	8	32	16	4	8	4	2
左氧氟沙星 MIC	32	16	16	32	8	8	8	8
Levofloxacin MBC	64	32	32	64	32	32	16	16
司帕沙星 MIC	16	16	32	16	8	4	2	2
Sparfloxacin MBC	16	32	64	16	16	8	4	4
帕珠沙星 MIC	4	8	16	4	4	2	2	2
Pazufloxacin MBC	16	16	32	8	16	8	4	4
磷霉素 MIC	128	256	256	64	32	64	32	16
Fosfomycin MBC	> 256	> 256	> 256	256	64	> 256	64	64

3 讨论

生物被膜不仅是细菌存在于自然界的一种重要的生存形式,而且生物被膜的形成是细菌的重要耐药机制之一。生物被膜细菌无论在形态结构、生理生化特性及致病特点等方面都与浮游菌有显著的不

同, 表现为^[14]: 细菌的毒力下降, 因为各种毒素被包裹在 BBF 的下面难以释放, 并且处于恶劣的环境下细菌的代谢低下; 对抗生素的防护能力增强, 因为一般的抗生素都无法进入 BBF; 能避免细菌与巨噬细胞及免疫球蛋白的相互作用, 激活补体的能力也降低, 与生物体可呈“共生状态”。本试验表明: 产酶的

和不产酶的鸡大肠杆菌形成生物被膜后,对喹诺酮类、大环内酯类和磷霉素的敏感性均比相应浮游菌降低至少 4 倍以上(4~1 024 倍),说明生物被膜的形成可使鸡大肠杆菌对多种抗菌药的敏感性显著下降,是细菌耐药尤其是多重耐药的重要机制之一。

我们以前的研究表明^[15],产 ESBLs 鸡肠杆菌科细菌不仅对 β 内酰胺环类的敏感性明显低于非产 ESBLs 菌,而且对喹诺酮类、氨基苷类和四环素类亦严重耐药,即产 ESBLs 鸡肠杆菌科细菌具有多重耐药的特性。从表 2 可看出,13 种抗菌药物对 4 株产酶菌的 MIC 和 MBC 比 4 株不产酶菌相应值大,多数前者为后者的 2~32 倍,再次说明产生 ESBLs 是细菌耐药及多重耐药的又一重要原因。

MIC 作为抗生素体外敏感试验的标准,是评价抗生素对浮游细菌抗菌活性的指标,长期以来为急性感染临床合理选择抗生素提供参考^[16]。然而对于由生物被膜引起的慢性感染和生物材料相关性感染,以 MIC 来指导抗感染治疗并不适用。原因之一:细菌一旦形成生物被膜,其结构和生长代谢特点均发生了巨大改变,生物被膜细菌分泌胞外多糖包裹自身,形成生物屏障,保护细菌不被免疫大分子及补体等清除;并能同时降低抗菌药物的通透性,使之具有较浮游细菌更强的耐药特性。更重要的原因是:测定 MIC 所用菌浓度为 5×10^5 cfu/mL,而 BBF 作为高密度群体,其浓度已经达到 10^{11} cfu/mL,所以用如此高浓度菌液测定的结果肯定是无法和 MIC 比较的,否则会夸大细菌的耐药性。本试验测定了克拉霉素等 13 种抗生素对 BBF 的 MBIC,显示 BBF 的 MBIC 远远高于浮游细菌的 MIC,因此,针对生物被膜相关性感染,MBIC 是较 MIC 更为直接可靠的体外药敏试验参考指标,对合理选择抗菌药物和评价新型抗生物被膜药物具有重要价值。然而 MBIC 测定也存在不足之处,MBIC 测定仅适用于生物被膜相关性感染,而目前尚未明确生物被膜相关性感染的临床诊断标准,使 MBIC 测定临床应用受到一定的限制。

CBD 装置是国外测定 BBF 对抗生素的敏感性所采用的装置,本试验用改良的 CBD 装置,BBF 经过培养 28 h 测定 MBIC。经传统的平板计数法得知,此时 BBF 的密度已达到了 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL,所以这时测出的 MBIC 和传统的 MIC 比较接近;但这种仅培养了 28 h 的 BBF,和经 7 d 培养的成熟的 BBF 相比,由于没有充分的时间开启各种耐药机制,所以测定出的 MBIC 比实际要小;从表 1 看出,无论 BBF 的 MBIC 是多少,其 MBEC 都大于 2 048 μ g/mL,故单

独以 MBIC 来指导临床用药是不合适的,应以 MBEC 来指导临床用药。

由表 1,2,3 可以看出,无论产酶菌或非产酶菌,其脱膜菌的 MIC 和浮游菌的 MIC 很接近,二者都要比 BBF 的 MBIC 小的多。这说明 BBF 这种特殊结构的形成是生物被膜菌耐药的最重要机制,一旦 BBF 被破坏,细菌又重新恢复到游离状态,其又会恢复对药物的敏感性^[17,18]。但是从表 2,3 可以看出,脱膜菌的 MIC 有的比浮游菌的 MIC 大,分析其原因可能有以下几个:①脱膜时 BBF 没有完全被破坏;④细菌从 BBF 中出来后没有完全恢复到浮游菌的状态,其生长速度还是很慢;④产酶菌株分泌的 ESBLs 在试验操作中被稀释掉了。试验时脱膜菌的制备采用的是超声波脱膜,这也是现在 BBF 菌研究中常用的方法,但是超声波在脱膜的同时也能杀死一部分细菌,所以超声脱膜的时间是很重要的,时间过长过短都会造成很大的试验误差。根据资料报道,结合试验过程中的平板菌落计数,确定脱膜的最佳时间是 15 min。

从上面的分析可知,一旦 BBF 被破坏,细菌恢复到游离状态,其又会恢复对药物的敏感性。所以,BBF 相关感染治疗的最有效方法是在破坏 BBF 的同时使用穿透力强的抗生素。可以考虑联合使用 14,15 元环的大环内酯类药物/磷霉素+氟喹诺酮类药物^[19,20],因为 14,15 元环的大环内酯类抗菌药物可以通过干扰甘露糖脱氢酶合成等方式,减少藻酸盐的合成,破坏藻酸盐多糖蛋白复合物的结构,磷霉素可以破坏细菌细胞壁的完整性,抑制和破坏多糖蛋白复合物,二者均可使氟喹诺酮类药物更易接触到细菌,从而发挥其杀菌作用。

参考文献:

- [1] 胡功政,张春辉,梁 军,等.猪鸡致病菌 β -内酰胺酶、超广谱 β -内酰胺酶检测与药敏试验[J].中国农业科学,2005,38(2):399-404.
- [2] 杨汉春,吴清明,查振林,等.鸡源大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的多重耐药性[J].畜牧兽医学报,2003,34(4):398-404.
- [3] 宋志军,吴 红,Michael givskov,等.细菌生物被膜与抗生素耐药[J].自然科学进展,2003,13(10):1015-1020.
- [4] 陈 迁.细菌生物被膜实验方法的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学杂志,1997,2(4):295-297.
- [5] Xu K D, McFeters G A, Stewart P S. Biofilm resistance to antimicrobial agents[J]. Microbiology, 2000, 146: 547-549.
- [6] 李乃静,何 平,李胜歧,等.生物被膜产生超广谱 β -内酰胺酶的检测[J].中华医院感染学杂志,2006,16(10):1096-1098.

- [7] 王 睿, 裴 斐, 柴 栋, 等. 克拉霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(5): 293 – 296.
- [8] 李乃静, 李胜岐, 何 平, 等. 银染法鉴定细菌生物被膜[J]. 辽宁药物与临床, 2003, 6(1): 37– 38.
- [9] Jiang Xiaofei, Zhang Zhe, Li Min, *et al.* Detection of extended – spectrum β – lactamases in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(9): 2990– 2995.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Sixteenth Information. Standard M100– S16. CLSI, 2006: 13– 64.
- [11] Ceri H, Olson M E, Stremick C, *et al.* The calgary biofilm device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(6): 1771 – 1776.
- [12] Nuno C, Silvia M, Filipe C, *et al.* Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase– negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(2): 331– 336.
- [13] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2001: 210– 214.
- [14] 祝敏芳. 克拉霉素对细菌生物被膜作用的研究进展[J]. 中国临床医学, 2003, 10(2): 260– 262.
- [15] 胡功政, 匡秀华, 苑 丽, 等. 产 ESBLs 鸡肠杆菌科细菌对 21 种抗菌药的敏感性检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(9): 884– 887.
- [16] Joslyn Conley, Merle E Olson, Linda S Cook, *et al.* Biofilm formation by group A streptococci: Is there a relationship with treatment failure? [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(9): 4043– 4048.
- [17] 李鸿雁, 夏前明. 细菌生物被膜与难治性呼吸道感染[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2004, 4(3): 190– 192.
- [18] 刘晓琰, 施安国. 细菌生物被膜的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 18(4): 302– 305.
- [19] 王 杰. 生物被膜菌耐药机制及治疗进展[J]. 国外医学• 流行病学传染病学分册, 2003, 30(6): 358– 361.
- [20] 白 静, 王 宇. 河南省鸡致病性大肠杆菌血清型、耐药性的研究[J]. 河南农业科学, 2007(10): 105– 107.