

# 尿路感染分离金黄色葡萄球菌生物膜形成能力及相关基因的分析\*

孙凤军<sup>1</sup>, 洪海<sup>2</sup>, 冯伟<sup>1</sup>, 孙艺璇<sup>1</sup>, 夏培元<sup>1△</sup>

(1. 第三军医大学西南医院药剂科, 重庆 400038; 2. 北京总后勤部郑常庄千休所卫生所, 北京 100141)

**[摘要]** **目的** 探讨尿路感染分离金黄色葡萄球菌的生物膜形成能力及相关基因分布, 为预防和治疗临床感染提供理论基础。**方法** 采用标准琼脂平板倍比稀释法检测最小抑菌浓度, 菌落计数法检测细菌黏附能力, 96 孔板结晶紫染色法检测细菌生物膜形成能力, 生物膜相关基因检测采用 PCR 扩增法。**结果** 11 株金黄色葡萄球菌临床株对青霉素和红霉素耐药率较高, 而对万古霉素和呋喃妥因全部敏感。所有菌株都有较强的黏附能力, 而生物膜形成能力一般。其中 10 株菌株扩增出 *icaAD* 和 *icaBC* 基因。**结论** 尿路感染金黄色葡萄球菌的黏附能力和生物膜形成能力具有菌株差异性, *ica* 是金黄色葡萄球菌生物膜形成的重要基因。

**[关键词]** 金黄色葡萄球菌; 尿路感染; 生物膜; 黏附; *ica* 基因

**[中图分类号]** R378

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)19-2617-03

## Analysis of biofilm formation ability and related genes of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections\*

Sun Fengjun<sup>1</sup>, Hong Hai<sup>2</sup>, Feng Wei<sup>1</sup>, Sun Yixuan<sup>1</sup>, Xia Peiyuan<sup>1△</sup>

(1. Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Clinic of Zhengchangzhuang Sanatorium for Retired Cadres, Logistics Department of PLA, Beijing 100141, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the biofilm formation ability and related gene distribution of *Staphylococcus* (S.) *aureus* isolated from urinary tract infections to provide the theoretical basis for the prevention and treatment of clinical infection. **Methods** The minimal inhibitory concentration was detected using the agar double dilution method. The bacterial adhesion ability was determined by flat colony counting method. The biofilm formation ability was analyzed by the 96-well crystal violet staining method. The biofilm-associated genes were detected by PCR amplification. **Results** Eleven clinical strains of *S. aureus* were high resistant to penicillin and erythromycin, whereas were all sensitive to vancomycin and nitrofurantoin. All the isolates had a strong ability of adhesion, but the biofilm formation ability was weak. Among them, the *icaAD* and *icaBC* genes were amplified in 10 *S. aureus* isolates. **Conclusion** The adhesion ability and biofilm formation ability of *S. aureus* isolated from urinary tract infections have the strain differences, and *ica* is an important gene of *S. aureus* biofilm formation.

**[Key words]** *Staphylococcus aureus*; urinary tract infections; biofilm; adhesion; *ica* gene

金黄色葡萄球菌是尿路感染的主要致病菌之一<sup>[1-2]</sup>, 又因其具有较强的生物膜形成能力, 是导管相关感染的常见病原菌。95% 的医院尿路感染与尿管使用相关, 随着尿管使用的增加, 尿路感染的金黄色葡萄球菌比例也随着增加<sup>[3]</sup>。细菌形成生物膜后将高度耐药, 其临床治疗也更加困难<sup>[4-5]</sup>。而尿路分离金黄色葡萄球菌的研究却少有报道, 因此本研究拟以临床尿路分离的金黄色葡萄球菌为研究对象, 分析其耐药和生物膜形成能力等特征, 以期临床感染的诊断及治疗提供理论依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 菌株来源** 11 株金黄色葡萄球菌临床株(S1301-S1311) 分离自 2013 年 1 月至 2013 年 6 月第三军医大学西南医院临床送检的尿液标本, 剔除同一患者的重复菌株。金黄色葡萄球菌生物膜形成标准菌株 N315 和质控菌株 ATCC29213 由第三军医大学西南医院药学部保存。

**1.2 仪器与试剂** MH 培养基(北京陆桥生物技术有限公司)、胰蛋白胨和酵母提取物(英国 Oxoid 公司)、DNA 提取纯化试剂盒(北京 Promega 公司)、2×Es Taq MasterMix(北京康为世纪生物科技有限公司)、引物(美国 Invitrogen 公司)、琼脂糖(北京天根生化科技有限公司)。多点接种仪(日本佐久间公

司), 酶标仪(美国 MD 公司), PCR 扩增仪、电泳仪和凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 方 法

**1.3.1 最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC) 的检测** 金黄色葡萄球菌划线接种于血琼脂平板, 37℃ 恒温培养 24 h。挑取单菌落于 10 mL 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB), 37℃、180 r/min 培养过夜。用无菌生理盐水稀释菌液至 0.5 麦氏单位(约 10<sup>8</sup> CFU/mL), 再按 1:10 的比例稀释。用多点接种仪将 1~2 μL 菌液接种到含不同浓度抗菌药物的 MH 琼脂平板上, 37℃ 培养 24 h。细菌 MIC 值为能抑制细菌生长的最低药物浓度, 结果参照美国临床和实验室标准协会(CLSI) 2012 年标准<sup>[6]</sup>进行。

**1.3.2 金黄色葡萄球菌黏附能力的检测** 金黄色葡萄球菌过夜培养物用 TSB 肉汤以 1:1 000 比例稀释, 然后在激光共聚焦显微镜(CLSM)专用细胞培养皿中加入 1 mL 菌液和 1 mL TSB 培养基。每个样品设置 3 个复孔, 37℃ 培养 3 h 后, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗去除浮游菌。然后加入 PBS 缓冲液超声 10 min, 以使黏附的细胞脱落。最后以不同比例稀释细胞悬液, 并涂布于 TSB 固体培养基上, 37℃ 培养 24 h 后计数。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373451)。 作者简介: 孙凤军(1979—), 主管药师, 博士, 主要从事细菌耐药及致病机制研究。

△ 通讯作者, E-mail: peiyuan\_xia2013@163.com。

表 1 抗菌药物对金黄色葡萄球菌的 MIC 值( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

抗菌药物	S1301	S1302	S1303	S1304	S1305	S1306	S1307	S1308	S1309	S1310	S1311
青霉素	4	1	1	8	2	16	2	64	4	8	32
万古霉素	<0.25	1	1	0.25	<0.25	1	0.5	1	2	1	1
庆大霉素	<0.25	<0.25	<0.25	64	<0.25	32	<0.25	32	4	<0.25	128
苯唑西林	64	<0.25	<0.25	32	<0.25	64	<0.25	8	0.5	<0.25	32
环丙沙星	<0.25	<0.25	1	64	<0.25	32	0.25	8	0.5	0.25	64
红霉素	128	32	16	>256	64	256	0.25	>256	0.5	128	<0.25
克林霉素	16	<0.25	<0.25	32	64	64	0.5	32	1	<0.25	<0.25
四环素	64	0.25	0.5	0.5	0.5	128	2	32	2	0.5	128
利福平	<0.25	<0.25	<0.25	16	<0.25	2	0.5	32	0.25	<0.25	16
呋喃妥因	8	2	8	32	8	16	16	16	32	8	32

**1.3.3 金黄色葡萄球菌生物膜形成能力的检测** 生物膜形成能力分析采用 96 孔板结晶紫染色法<sup>[7]</sup>。金黄色葡萄球菌过夜培养物用 TSB 肉汤稀释 1 000 倍,然后在 96 孔板中每孔加 100  $\mu\text{L}$  稀释菌液和 100  $\mu\text{L}$  TSB 肉汤。每个样品设置 3 个复孔,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。用 PBS 轻柔冲洗两次,放置通风阴凉处干燥。然后加入 200  $\mu\text{L}$  1% 结晶紫溶液进行染色,并以自来水冲洗至空白对照孔无明显颜色,再次倒置晾干。最后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  30% 乙酸,并测定 590 nm 处的吸光度( $A_{590}$ )值。

**1.3.4 金黄色葡萄球菌生物膜多糖编码基因的检测** 金黄色葡萄球菌 DNA 提取按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。生物膜形成相关基因引物 *icaAD-F*: 5'-CCT AAC TAA CGA AAG GTA GG-3'; *icaAD-R*: 5'-TTA GCG TTG GGT ATT CCC TC-3'。 *icaBC-F*: 5'-ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG-3'; *icaBC-R*: 5'-GCA CGT AAA TAT ACG AGT TC-3'。PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): 2  $\times$  Es Taq MasterMix 10.0  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 0.3  $\mu\text{L}$ , DNA 0.4  $\mu\text{L}$ , 双蒸水( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) 9.0  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。反应完毕,PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,凝胶成像系统观察结果。

**1.4 统计学处理** 采用 Excel2003 进行数据处理,采用 WHONET5.3 软件对药敏结果进行分析。

## 2 结果

**2.1 金黄色葡萄球菌的 MIC 值** 常见抗菌药物对金黄色葡萄球菌的 MIC 结果,见表 1。金黄色葡萄球菌对青霉素和红霉素耐药率较高,对庆大霉素、环丙沙星、四环素和利福平具有较高的敏感性。所有菌株均对万古霉素和呋喃妥因敏感。

**2.2 金黄色葡萄球菌的黏附能力** 金黄色葡萄球菌的黏附能力检测结果,见图 1。11 株临床菌株都具有较强的黏附能力,除 S1303 和 S1307 之外,其他 9 株的黏附能力都高于标准株 N315。

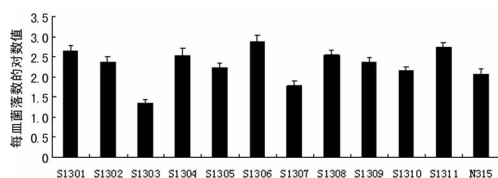


图 1 金黄色葡萄球菌黏附细胞数检测结果

**2.3 金黄色葡萄球菌的生物膜形成能力** 金黄色葡萄球菌的生物膜形成能力,见图 2。金黄色葡萄球菌临床株的生物膜形

成能力一般,其中 4 株菌株(S1302、S1306、S1308、S1311)的生物膜形成能力高于标准株 N315。

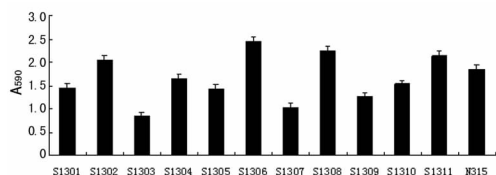


图 2 金黄色葡萄球菌生物膜形成能力检测结果

**2.4 金黄色葡萄球菌生物膜形成相关基因的 PCR 扩增** 金黄色葡萄球菌生物膜形成相关基因的 PCR 扩增结果显示,有 10 株临床菌株携带 *ica* 基因,仅有 1 株扩增阴性。

## 3 讨论

临床分离的金黄色葡萄球菌对青霉素和红霉素高度耐药,对庆大霉素、环丙沙星、四环素和利福平具有较高的敏感性,这与相关报道一致<sup>[8-9]</sup>。本研究未发现对万古霉素和呋喃妥因耐药的菌株,表明这类药物可以用于治疗金黄色葡萄球菌引起的尿路感染。万古霉素是抗金黄色葡萄球菌尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的有效抗菌药物,但异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的存在给临床治疗带来新的挑战<sup>[10]</sup>,因此应慎重使用该类抗菌药物,以延缓和减少耐药菌株的产生。呋喃妥因有稳定的抗菌活性,但有 30%~50% 以原形从尿中排出,肠道吸收量少,因此目前仅用于下尿路感染性疾病的预防和治疗。

金黄色葡萄球菌是生物膜感染的常见致病菌<sup>[11]</sup>,形成生物膜后细菌具有高度的耐药性,并在合适的条件释放游离细菌,使感染迁延反复<sup>[12]</sup>。研究显示,尿路分离的金黄色葡萄球菌具有较强的黏附能力,只有 2 株菌株的黏附能力弱于 N315,但是只有 4 株金黄色葡萄球菌的生物膜形成能力强于 N315。结果提示,尿路感染的金黄色葡萄球菌具有较强的黏附能力,而生物膜形成能力一般。由于尿路感染金黄色葡萄球菌需要黏附于管腔壁抵抗外力作用才能造成感染,所以必须有较强的黏附能力才能定植。虽然细菌黏附和生物膜形成是细菌生物膜形成的两个阶段,但是结果显示细菌的黏附能力和生物膜形成能力并无必然联系,提示细菌生物膜形成调控过程复杂。

生物膜的最主要成分是多糖,细菌的聚集及生物膜成熟阶段主要是依靠促进细菌相互聚集的多糖黏附素(PIA),PIA 主要由 *ica* 基因编码的酶合成,在生物膜形成过程中具有重要作用<sup>[13]</sup>。本研究仅 1 株金黄色葡萄球菌的 *ica* 阴性,且其生物膜

形成能力弱于 N315,说明虽然细菌有不依赖于 ica 的生物膜形成路径<sup>[14]</sup>,但是 ica 对生物膜形成能力的影响可能还是最重要的。本研究说明尿路感染的金黄色葡萄球菌具有较强的黏附能力,提示黏附能力是尿路感染细菌致病能力的一个重要影响因素。

#### 参考文献

- [1] Ma KL, Wang CX. Analysis of the spectrum and antibiotic resistance of uropathogens in vitro: results based on a retrospective study from a tertiary hospital[J]. *Am J Infect Control*, 2013, 41(7): 601-606.
- [2] Karlowsky JA, Lagacé-Wiens PR, Simner PJ, et al. Antimicrobial resistance in urinary tract pathogens in Canada from 2007 to 2009: CANWARD surveillance study[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(7): 3169-3175.
- [3] Baraboutis IG, Tsagalou EP, Lepinski JL, et al. Primary staphylococcus aureus urinary tract infection: the role of undetected hematogenous seeding of the urinary tract[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010, 29(9): 1095-1101.
- [4] Wolcott RD, Ehrlich GD. Biofilms and chronic infections [J]. *JAMA*, 2008, 299(22): 2682-2684.
- [5] Sun F, Qu F, Ling Y, et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies[J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(7): 877-886.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.
- [7] Wang Q, Sun FJ, Liu Y, et al. Enhancement of biofilm for-

mation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaADBC-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(6): 2707-2711.

- [8] 许晶晶,张丽,邓丽华. 319 株金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. *中外医学研究*, 2014, 12(32): 44-46.
- [9] 朱玉龙,严燕燕,顾蓓青,等. 653 株金黄色葡萄球菌临床分布及耐药性分析[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(21): 4026-4028.
- [10] 汪滢,李家斌. 安徽地区 109 株金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药性分析[J]. *安徽医学*, 2012, 33(10): 1269-1271.
- [11] Tang J, Chen J, Li H, et al. Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different sources[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10(9): 757-763.
- [12] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [13] Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, et al. Correlation of staphylococcus aureus icaADBC genotype and biofilm expression phenotype[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(12): 4595-4596.
- [14] Fitzpatrick F, Humphreys H, O'gara JP. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(4): 1973-1976.

(收稿日期:2016-01-20 修回日期:2016-03-28)

(上接第 2616 页)

- [5] Chou YP, Kuo LC, Soo KM, et al. The role of repairing lung lacerations during video-assisted thoracoscopic surgery evacuations for retained haemothorax caused by blunt chest trauma[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 46(1): 107-111.
- [6] 崔建国,许志华,孙春媛,等. 电视胸腔镜辅助下钛镍合金接骨板内固定治疗多发肋骨骨折的临床研究[J]. *临床肺科杂志*, 2011, 16(12): 1859-1860.
- [7] Sellers EL, Fearon PV, Ripley C, et al. The introduction of rib fracture fixation for traumatic flail chest injury: a single centre experience[J]. *Trauma*, 2013, 15(3): 245-251.
- [8] 任守阳,黄健,张晓飞,等. 电视胸腔镜手术及常规手术治疗多发肋骨骨折的对比分析[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2014, 21(1): 33-35.
- [9] Chen J, Yan J, Wang S, et al. Intrathoracic dislocation of the humeral head accompanied by polytrauma: how to treat it[J]. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2015, 21(2): 149-151.
- [10] Kim JJ, Kim YH, Moon SW, et al. Nuss procedure for severe flail chest after blunt trauma[J]. *Ann Thorac Surg*,

2015, 99(2): e25-27.

- [11] 李强,李晓斌,乔庆,等. 胸腔镜辅助可吸收肋骨钉与爪形接骨板联合应用治疗多发肋骨骨折的临床研究[J]. *创伤外科杂志*, 2014, 16(2): 109-112.
- [12] 王立,张森,袁晓松,等. 对多发肋骨骨折行经胸腔镜检查+内固定手术的探讨[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(10): 1714-1715.
- [13] Wait SD, Fox DJ, Kenny KJ, et al. Thoracoscopic resection of symptomatic herniated thoracic discs: clinical results in 121 patients[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2012, 37(1): 35-40.
- [14] 任明明,孔繁义,宋翔,等. 胸腔镜辅助爪形接骨板内固定手术治疗多发肋骨骨折 24 例[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2012, 19(5): 574-575.
- [15] Park HS, Ryu SM, Cho SJ, et al. A treatment case of delayed aortic injury: the patient with posterior rib fracture [J]. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 47(4): 406-408.

(收稿日期:2016-01-20 修回日期:2016-04-03)