

increase long-term biochemical recurrence, metastases, or mortality[J]. *Transfusion*, 2012, 52(12): 2590-2593.

[23] Engle DB, Connor JP, Morris PC, et al. Intraoperative autologous blood transfusion use during radical hysterectomy for cervical cancer: long-term follow-up of a prospective trial[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286(3): 717-721.

[24] Esper SA, Waters JH. Intra-operative cell salvage: a fresh look at the indications and contraindications[J]. *Blood Transfus*, 2011, 9(2): 139-147.

[25] Trudeau JD, Waters T, Chipperfield K. Should intraoperative cell-salvaged blood be used in patients with suspected or known malignancy[J]. *Can J Anaesth*, 2012, 59(11): 1058-1070.

[26] Waters JH, Donnenberg AD. Blood salvage and cancer surgery: should we do it[J]. *Transfusion*, 2009, 49(10): 2016-2018.

[27] Poli M, Camargo A, Villa L, et al. Intraoperative autologous blood recovery in prostate cancer surgery: in vivo validation using a tumour marker[J]. *Vox Sang*, 2008, 95(4): 308-312.

[28] Hansen E, Knuechel R, Altmeyen J, et al. Blood irradiation for intraoperative autotransfusion in cancer surgery: demonstration of efficient elimination of contaminating tumor cells[J]. *Transfusion*, 1999, 39(6): 608-615.

[29] 林武存. 应用输血新技术 提高输血安全性[J]. *重庆医学*, 2007, 36(24): 2471-2472.

[30] Schneider SO, Rensing H, Hartmann L, et al. Impact of intraoperatively salvaged and washed blood on stimulated cytokine release in vitro [J]. *Transfusion*, 2014, 54(10 Pt 2): 2782-2790.

(收稿日期: 2015-04-25 修回日期: 2015-07-20)

• 综述 •

生物被膜的抗菌药物耐药机制及研究进展

张 健 综述, 林一民[△] 审校(重庆市肿瘤医院临床检验科 400030)

【关键词】 生物被膜; 感染; 耐药机制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 24. 068 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)24-3771-03

细菌生物被膜(BBF)常形成于导尿管、静脉插管、腹膜透析插管、整形外科装置、假肢、人工心脏瓣膜等植入性医用器械表面和牙齿、坏死骨片、囊性纤维化的肺叶等场所。因为 BBF 其细菌对抗菌药物及其他化学杀菌剂有比离散的细菌更强大的抵抗能力,故 BBF 的形成被认为是医院院内感染的重要原因^[1]。临床上对 BBF 形成的本质原因及耐药机制现还处在研究之中,越来越多的新技术,如分子生物学技术、电镜扫描技术、激光显微镜及流式细胞技术的广泛应用,这些新技术的发展应用使 BBF 的研究技术逐渐深入并变得更加成熟,对怎样阻止 BBF 的形成及找到更合理应用的抗菌药物是医学面临的重要课题。今对目前 BBF 的结构特点和对抗菌药物耐药机制的形成特征及机制研究综述如下,为相关研究提供参考。

1 BBF 的概念及结构特点

1.1 BBF 的概念 BBF 又称为菌膜,是一些微小细菌为了适应外在生成环境,形成于其固体表面并不可逆地黏附于固相物质表面形成的一种特殊存在方式^[2]。是细菌之间相互协调极其复杂的构成形式,是微生物聚集物,蛋白质及多糖组成的复合物是其主要构成,是多细菌组成的膜状结构,广泛存在于自然环境中,无论哪种细菌在成熟条件下都可形成 BBF。细菌在一些惰性物质表面吸附,如辅助的医学材料,当细菌在表面黏附后,被细胞分泌的基质成分包被,其细胞分泌的物质,如糖、蛋白、脂肪等多糖成分组成的复合物逐渐将细菌粘连起来,并形成膜状物质。

1.2 BBF 的结构特点 BBF 是细菌在自然环境中出于本能而采取的一种存在方式,是一种功能特异生物群落,表多糖分子聚合物支持、保护 BBF 表面,内含水成分高达 97%。有研究表明,BBF 存在于各种主要的生物大分子,如糖、蛋白质、脂肪、

DNA 及 RNA 等。其突出的是具有特性的细胞功能,对营养物质废物的运输,可使遗传上一致的细菌个体表现不同的特征。其复杂的空间构成,如起伏的群山一样隆起的单体形成,单个独立构成单位被划分为 3 个部分,包括体、底和尾^[3]。主要构建成分是由密度极高的表多糖组成,水氧分子及营养物质从最底层的管路通道进入 BBF,细菌就位于其空间结构内部^[4]。高密度表多糖分子起到了骨架和表面保护层的作用,能有效抵抗外界物质的压力,帮助细菌群落进一步整合,在营养物质和氧集中的区域,有较多细菌存在^[5-6]。除了表多糖,BBF 中还存在着极大数量的人血清中蛋白质和细菌的代谢产物等,当遇上较强的外部压力干扰,BBF 形同蝌蚪样的尾部形状,这时从该处就会释放出细菌,逐渐进入血液循环散布开来,导致菌血症^[3]。

2 BBF 的形成和临床鉴定方法

2.1 BBF 的形成 BBF 的形成全过程是一系列包括物理、生物及化学演变的进程过程,各个阶段的形成因素与外界环境及流体力学等条件是紧密相连的。

2.1.1 细菌的黏附 细菌黏附是其独特的黏附素蛋白能够识别宿主的受体,它具有很强的特异性、选择性。这种过程循环往复持续进行,呈动态变化。由蛋白质及糖类形成的膜状结构形成于生物材料上,这里有很多蛋白定植于哺乳动物或细菌细胞受体所结合形成配体,当表面化学分子结构发生变化时,一些高分子材料就立即吸附在其表面^[7];随后,经过特异受体所结合的配体黏附机制,细菌的细胞就在这些培养基表面进行黏附。

2.1.2 BBF 的发展 细菌黏附后不久,调节其基因,分泌大量胞外多糖,通过正向调节,贴壁细胞的活动,在密度感应系统

[△] 通讯作者, E-mail: 2602214857@qq.com.

里,通过特定细胞的信号传感作用,这些细胞分子与其他可感应的周围细菌或细菌群落相结合^[8]。这种正向调节的反应是由有毒力的因子引起,也包括细胞外一些聚合形成的物质进行分泌调节作用^[9-10]。细胞外多糖分子的存在对 BBF 的构成起非常关键的作用,此时细菌对抗菌药物及紫外线的抵抗力增强。

2.1.3 BBF 的成熟 BBF 通过消耗可溶性养分,吸收其他营养物质而成熟,这些营养物质来源包括一些细菌或哺乳动物的小血小板等细胞,成熟 BBF 上的细菌可从黏附的血小板上脱落下来,这些脱落下来的细菌可分泌形成薄膜的糖蛋白类物质^[11-13]。对不同环境和不同的菌种,在细菌进行增殖时,可逐步形成松紧不一和厚薄程度不一致的 BBF 构建体系。

2.2 BBF 的鉴定 因为微小细菌菌落逐渐形成的 BBF 用肉眼不易直接观察,需要经过特殊的染色及放大过程处理才可以对 BBF 进行鉴定。从国内外的研究可以看出,银染法成为目前最常用的染色方法。银染法是将待测标本用硝酸银溶液经过浸泡处理,在普通光学显微镜下观察和鉴定已经着色的 BBF 的一种方法,它是一种快速染色法,能够证明多糖蛋白类物质和 BBF 的存在^[14]。相比电子显微镜和其他激光显微镜的鉴定方法更实用、方便、价廉,已经得到广泛的临床应用^[15]。

2.3 BBF 的调控 BBF 的形成过程受多种因素控制,BBF 中的细胞相连密切,胞外信号浓度逐渐增高,使基因得到进一步调控,使 BBF 中形成了不同的多细胞克隆,并构成了具有结构性独特的群体集合。其中革兰阴性菌和阳性菌落群体感应系统的信号分子不同,这些有利于细菌适应环境压力,是细菌基因调节的组成部分。

3 BBF 的感染特征和耐药机制

对疫苗及抗菌药物的广泛应用,加上各级干预措施的进行,由单一细菌引起的绝大多数具有感染性的疾病已能够快速得到控制(除多重耐药细菌),现今人类由条件致病菌所致的感染日渐增多,特别是在抵抗力低下的情况下加上各种插入性医用器械装置的不断应用。使各种感染频繁出现并常与 BBF 的形成相关。病原微生物,如球菌、杆菌和念珠菌等最为常见。一旦形成 BBF,就对抗菌药物的抵抗力增强,使用常用抗菌药物将很难彻底消灭,只能杀灭 BBF 表面或血液中引起感染产生的游离病原细菌。在环境改变和人体自身抵抗力降低时,BBF 中还活着的细菌趁机得到释放,引起新一轮感染发生。

3.1 BBF 引起感染的特征 (1) 相对静止和发作阶段的相互转化过程,使病情反复,转为慢性;(2) 由于耐药出现,抗菌药物刚开始用时治疗效果显著,随后其疗效明显下降;(3) 导致疾病的微生物主要来自皮肤表面和所处环境,主要病原微生物包括葡萄球菌、肠道菌、假单胞菌属等^[16]。

3.2 BBF 的耐药机制

3.2.1 BBF 的渗透屏障保护作用 BBF 是阻止抗菌药物进入细菌内部的天然屏障。其细胞外的糖蛋白分子形成屏障作用,能够很好地阻碍酶、补体等大分子和抗菌药物肽类等小分子物质的侵入^[17]。渗透作用不仅可以降低 BBF 内抗菌药物的浓度,也能帮助内酰胺酶使抗菌药物作用失去活性。这种屏障作用和酶的降解效应共同发挥效应,使 BBF 耐药性得到增强。不同的 BBF 对药物的渗透阻止作用不尽相同,如铜绿假单胞菌形成的 BBF 对环丙沙星类药物和对过氧化氢有屏障阻止作用,某些药物能透过肺炎克雷伯菌形成 BBF,如氨基苄西林和环丙沙星。细胞外的多糖分子带有正电离子,氨基糖苷类抗菌药物也带有正电离子,这种同种电荷效应加强了电荷屏障作用的强度,使抗菌药物的渗透作用难以进行。

3.2.2 BBF 内环境的影响 BBF 突出特点是呈阶梯梯度增加的营养物浓度,此种特征同药物的抗药性能力紧密相关。有研究表明,BBF 内营养物质缺乏或供应受限是细菌耐药产生的重要因素之一^[18]。由于细菌膜内部营养物质缺乏,致细菌缓慢生长;氧气在 BBF 内很快被耗尽,使被膜内部形成厌氧环境,氨基糖苷类抗菌药物,如氨基糖苷类药物在厌氧情况下对细菌的抗菌作用不如有氧环境强;在局部积聚的细菌酸性代谢产物可致膜内外 pH 值形成显著差异;致细菌渗透压的变化,由于抗菌药物对生长停滞细菌作用不显著,一旦停用抗菌药物,细菌繁殖力增强,造成感染复发,使 BBF 对抗菌药物的渗透能力降低,综合作用使 BBF 的生长情况受阻,进而产生耐药^[19-20]。

3.2.3 BBF 表达的基因 已经知道许多与 BBF 耐药性相关的基因,如 *hipA*、*mar*、*vlcS*、*relA* 及 *sulA* 等基因。铜绿假单胞菌被 Drenkard 发现有一种能调节细菌变异的蛋白质(PvrR),PvrR 能调控铜绿假单胞菌对抗菌药物的敏感度,其对应基因 PvrR 在有生物膜的细菌里转录积极,它能抑制或激活 PvrR 对铜绿假单胞菌形成的 BBF 耐药^[21]。Whiteley 等学者也发现,铜绿假单胞菌的 BBF 中 *tolA* 基因有高表达效果,脂多糖的构造受 *tolA* 基因产物的影响,降低了氨基糖苷类抗菌药物结合细菌细胞外膜的能力。进一步研究表明,这些调控基因的研究,有助于人们更深入认识 BBF 的耐药机制,对预防生物被膜引起的疾病具有很重要的临床价值^[22-23]。

3.2.4 传感效应的表达 细菌的传感调控效应(QS)是相同或不同种类细菌对细菌目前所处环境、对群体感知、信息相互交流及发生各种反应的表现形式。不同种类的细菌及所用抗菌药物的种类不同,QS 在抗菌药物耐药性中的表现机制不尽相同。Davies 等发现铜绿假单胞菌中的突变株 *lasR*、*lasIQS* 无法形成正常的 BBF 结构。有研究结果表明,铜绿假单胞菌的突变株如 QS 对抗菌药物和清洁剂无明确影响;新近报道对利福平敏感的金黄色葡萄球菌 QS 突变株,对苯唑西林却不敏感,该突变株对利福平的敏感特性与之亲代相比并无明显差异^[24-25]。所以,密度感应系统的耐药机制还需更深入的研究。

3.2.5 BBF 的独特表型 在与医用辅料接触产生黏附和聚集时,细菌可能被诱导而形成一种膜的独特表型结构,能够识别膜内不同表达的基因,以阻止抗菌药物的杀伤效果^[26]。有研究发现,在低氧氟沙星浓度下,外排泵缺失株的 BBF 对氧氟沙星的敏感性明显强于超表达株^[27]。在抗菌药物选择压力作用下,细菌可改变外膜蛋白(OmpS),特别是膜上微孔蛋白的数量和组成,降低细菌体外膜的通透性,可有效阻止抗菌药物进入菌体发挥作用而产生耐药性。比如,肠道菌如大肠埃希菌的微孔蛋白主要有 OmpF 和 OmpC 等,与抗菌药物通透性相关的是 OmpF,假如因为表达水平的变化或缺失,可降低其通透性,使抗菌药物无法进入细菌细胞内,进而可致细菌耐药性产生。

4 BBF 的防治和控制

4.1 生物被膜前控制 在 BBF 生成前需要选取足量和敏感的抗菌药物,为了不因病进入慢性而形成 BBF;在用医用材料上选用低表面能和黏附力低的用品,最好不将这些医疗器械留于机体内而形成 BBF。

4.2 生物被膜形成过程中控制 BBF 的形成中浮游菌的调控→阻断定植过程,从而抑制 BBF 黏附。可诱导 BBF 附着在它所需要的鞭毛、菌毛等连接性结构上,能致其细胞突变而不能与 BBF 黏附聚集。抗细菌黏附和聚集生物材料的使用,可抑制细菌菌落形成,防止细菌黏附。对临床常用的医用导管器材不断改进能够极好地防止细菌黏附、复制和定植。亚抑菌药物

浓度的抗菌药物可抑制最初时段黏附于医用器材上的细菌及形成 BBF。降解 BBF 的细胞外基质或通过噬菌体来达到抑制 BBF 形成。

4.3 阻断 BBF 的屏障 比如多黏菌素这样的抗菌药物能够通过破坏 BBF 的完整性及增大被膜的通透性能来实现抗菌效果。本研究已经知晓很多种可增强膜通透性的物质,这些包括常用的抗菌药物,如大环内酯类和氨基糖苷类等抗菌药物。

4.4 其他控制 BBF 的方案 对抗菌药物的联合使用,如联合使用小剂量的大环内酯类药物与对 BBF 通透性较强的药物,如氟喹诺酮类能治疗与 BBF 相关的感染性疾病,现已取得了明显效果。有研究表明,氟喹诺酮类加大环内酯类/磷霉素是目前最有效的治疗生物被膜菌感染的方案^[28]。

5 展 望

BBF 的研究使微生物学发展迈出了重要一步,随着抗菌药物的广泛使用,细菌的耐药问题日益严重,如何合理利用抗菌药物、研究 BBF 耐药机制,控制细菌耐药在临床治疗具有重要意义。BBF 的临床研究目前尚处在起步阶段,还有很多方面的最基本问题尚需解决。比如 BBF 内细菌对抗菌药物的耐药机制至今都无一正确清晰的依据,BBF 的形成原因及形成过程、菌落群体如何分工其功能尚待进一步研究。伴随着医学生物技术的不断进步和开发利用,对 BBF 的认识及控制必将进一步深入,最终必然会找到彻底征服生物被膜相关感染的方法。人类将更好地控制细菌感染。

参考文献

[1] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms; a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.

[2] Cerca N, Martins S, Pier GB. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by subMICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm[J]. Res Microbiol, 2005, 156(5/6): 650-655.

[3] Rodney MD. Biofilms survive almednansims of chinically relevantm croogan[J]. Clin Microbioly Rev, 2008, 15(2): 167-193.

[4] 祝剑虹, 任建安. 生物膜与血管内导管相关感染的机制[J]. 肠外与肠内营养, 2010, 17(5): 297-301.

[5] Cotter JJ, O'Gara JP, Mack D, et al. Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor sigma(B) in Staphylococcus epidermidis. [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(1): 261-264.

[6] Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofms[J]. FEMS Microbiol Rev, 2008, 33(1): 206-224.

[7] Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons; Twenty-five years of doin MATH[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 262(2): 129-134.

[8] Bjarnsholt T, Givskov M. Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007, 362(1483): 1213-1222.

[9] Otto M. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 306(2): 251-258.

[10] Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens[J]. Trends Mi-

crobiol, 2005, 13(7): 7-10.

[11] Brunstedt MR, Sapatnekar S, Rubin KR, et al. Bacteria/blood/material interactions. I. Injected and preseeded slime-forming Staphylococcus epidermid is inflosing blood with biomaterials[J]. J Biomed Mater Res, 2008, 29(4): 455-466.

[12] Xavier Jde B, Picioreanu C, van Loosdrecht MC. A general description of detachment for multidimensional modelling of biofilms[J]. Biotechnol Bioeng 2005, 91(6): 651-669.

[13] Wenzel RP. Health care-associated infections: Major issues in the early years of the 21st century[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(1): 85-88.

[14] 王燕, 佟金平, 范琳, 等. 银染法鉴定表皮葡萄球菌生物被膜[J]. 实用预防医学, 2009, 16(2): 548-549.

[15] 佟金平, 王镇山, 王燕, 等. 银染法观察葡萄球菌生物被膜[J]. 大连医科大学学报, 2009, 31(5): 613-615.

[16] 屈常林, 高洪, 赵宝洪, 等. 细菌生物被膜与抗生素耐药机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(3): 251-254.

[17] Kuchma SL, O'Toole GA. Surface induced and biofilm induced changes in gene expression[J]. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(5): 429-433.

[18] Donalan RM. Biofilms, microbial life on surfaces [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 881-890.

[19] Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in Staphylococcus epidermidis biofilms: insights into the pathophysiology epidermidis biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilm[J]. J Infect Dis, 2005, 191(2): 289-298.

[20] Moons P, Michiels CW, Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms[J]. Crit Rev Microbiol, 2009, 35(3): 157-168.

[21] Estrela AB, Heck MG, Abraham WR. Novel approaches to control biofilm infections[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(12): 1512-1530.

[22] Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease[J]. Braz J Infect Dis, 2008, 12(6): 526-530.

[23] Pitts B, Hamilton MA, Zelter N. A microtiter plate-screening method for biofilm disinfection and removal [J]. J Microbiol Methods, 2003, 54(2): 269-276.

[24] McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview[J]. Adv Appl Microbiol, 2009, 69(4): 99-132.

[25] Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review [J]. Trends Microbiol, 2009, 17(2): 73-87.

[26] Jakubovics NS. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms[J]. Mol Oral Microbiol, 2010, 25(1): 4-14.

[27] Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, et al. Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas; more than surfactants and antibiotics [J]. FEMS Microbiol Rev, 2010, 23(2): 280-287.

[28] Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential the rapeutic uses [J]. J Dent Res, 2010, 89(3): 205-218.