

白色念珠菌生物膜对消毒剂抵抗性的研究

张薇¹, 王丹敏², 董小青², 梁慧¹, 刘丽萍¹

【摘要】 目的 了解白色念珠菌生物膜对常用消毒剂的抵抗性。方法 采用载体定量试验方法观察不同作用时间下75%乙醇、安尔碘、5%“84”消毒液、3%苯扎溴铵和2%戊二醛对生物膜中白色念珠菌的杀灭作用。结果 2%戊二醛和5%“84”消毒液对生物膜念珠菌杀灭作用最强,安尔碘次之,75%乙醇和3%苯扎溴铵杀灭作用较弱。结论 五种消毒剂对念珠菌生物膜的杀灭作用不同,形成生物膜的白色念珠菌对常用消毒剂的抵抗力比游离菌强。

【关键词】 念珠菌;生物膜;消毒剂;抵抗性

【中国图书分类号】 R378

A study on resistance of *Candida albicans* biofilm to disinfectants

ZHANG Wei¹, WANG Danmin², DONG Xiaoqing², LIANG Hui¹, and LIU Liping¹. 1. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 2. Department of Microbiology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

【Abstract】 Objective To study the resistance of biofilm - forming fungi to common disinfectants using *Candida albicans* biofilm as the object of study. **Methods** The carrier quantitative test method was used for experimental observation. **Results** The 2% glutaral solution and 5% 84 disinfection solution had the strongest killing effect on the biofilm of *Candida albicans*, followed by anerdian while 75% ethanol and 3% benzalkonium bromide had a weaker effect. **Conclusion** The five disinfectants have different killing effects on the biofilm of *Candida sp.*

【Key words】 *Candida albicans*; biofilm; disinfectants; resistance

近20年来,随着癌症放、化疗和器官移植患者的增加,免疫抑制药和广谱抗生素的大量使用,以及插管等医学材料使用的增多,白色念珠菌病的发病率增加了近40倍,其中相当一部分与白色念珠菌形成生物膜(biofilm, BF)密切相关^[1]。生物膜是一种附着于非生物或生物表面的、包裹着细胞外多糖的有三维结构的菌细胞群体,是细菌、真菌在生长过程中为适应生存环境而形成的一种与浮游细胞相对应的生存方式。感染部位或置入体内的生物材料表面一旦形成了BF,由于其难以被特异性抗体、大多抗真菌药物等物质所彻底杀灭,白色念珠菌BF引起的感染性疾病,因而大都是慢性和难治性的^[2]。为此,本研究探讨常用消毒剂对念珠菌生物膜的破坏作用,为控制念珠菌BF引起的感染提供防治方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株 白色念珠菌 Ca40 为本室保存的临床

作者简介:张薇,女,1978年出生。本科学历,主管技师,主要从事微生物检验工作。

作者单位:1. 100039 北京,武警总医院检验科;2. 300162 天津,武警医学院微生物学教研室

分离株,经常规鉴定。

1.2 培养液与试剂 酵母蛋白胨葡萄糖培养液,沙氏琼脂培养液,沙氏液体培养液;乙醇、戊二醛、安尔碘(含有效碘0.2%)、“84”消毒液、苯扎溴铵消毒液。

1.3 中和剂 用20 g/L吐温-80 + PBS作乙醇的中和剂;以含2000 mg/L硫代硫酸钠的PBS作为安尔碘和84消毒液的中和剂;以含20 g/L吐温-80 + 10 g/L卵磷脂作为苯扎溴铵的中和剂;以含10 g/L甘氨酸作为戊二醛的中和剂。

1.4 制备菌悬液 将白色念珠菌 Ca40 菌接种于30 ml 酵母蛋白胨葡萄糖(YPD)液体培养液中,30℃摇床振荡培养(60 r/min)12 h,获得的菌液用YPD培养液稀释,白细胞计数板计数,调整菌液浓度至 1×10^7 个菌/ml左右。

1.5 制备生物膜 将高分子除菌滤膜(孔径0.22 μm)用打孔器制成直径7 mm圆片,高压灭菌后平铺在沙氏琼脂平板上。取20 μl念珠菌悬液加在膜片表面,置37℃孵箱培养。每24 h将膜片转移至新的沙氏平板上。

1.6 消毒剂对生物膜的作用 取培养2 d、5 d的

膜片,用无菌生理盐水冲洗表面游离菌,将膜片浸泡入75%乙醇、5%“84”消毒液、3%苯扎溴铵消毒液、2%戊二醛和安尔碘中。消毒剂分别作用15、30、60、90、120 min后取出膜片,冲洗掉残余消毒液,置于5 ml相应中和剂中,中和作用10 min后用匀浆器将膜片研磨粉碎,以稀释涂布法进行菌落计数,每个时间组测试3次,菌量取平均值。同时按常规方法培养游离念珠菌,按照与生物膜相近的菌量将游离念珠菌菌液滴加在高分滤膜上,浸泡入上述消毒剂分别作用15、30 min后取出膜片作为对照。

2 结 果

两组对照含游离念珠菌膜片的初始菌量分别为

2.8×10^8 cfu/片和 3.6×10^8 cfu/片,经5种消毒剂处理后,游离白色念珠菌在30 min内全部被杀灭,未检出残余菌。五种消毒剂对念珠菌生物膜的杀菌作用表现不同(表1、表2)。2%戊二醛和5%“84”消毒液对生物膜念珠菌杀灭作用最强,对培养2 d的生物膜分别在15 min、30 min内即可全部杀灭。3%苯扎溴铵作用较弱,对新、老生物膜分别需作用90 min、120 min才能完全杀灭生物膜真菌。除戊二醛外其余4种消毒剂对培养5 d生物膜作用30 min后检出的残余菌明显比培养2 d生物膜作用相同时间后的残余菌多。试验结果表明形成生物膜的念珠菌对常用消毒剂的抵抗力比游离菌强,且随生物膜形成时间的延长对大多消毒剂的抵抗力明显增强。

表1 培养2 d念珠菌生物膜和游离菌对不同消毒剂的抵抗力测定结果 (cfu /片)

浸泡时间(min)	75%乙醇	安尔碘	5%“84”消毒液	2%戊二醛	3%苯扎溴铵
生物膜	0	2.7×10^8	2.8×10^8	2.8×10^8	2.7×10^8
	15	9.9×10^7	1.2×10^6	3.1×10^5	0
	30	7.0×10^5	3.0×10^4	0	0
	60	5.5×10^3	0	0	0
	90	0	0	0	0
	120	0	0	0	0
游离菌	0	2.8×10^8	2.8×10^8	2.8×10^8	2.8×10^8
	15	4.5×10^4	3.8×10^3	0	6.9×10^4
	30	0	0	0	0

表2 培养5 d念珠菌生物膜和游离菌对不同消毒剂的抵抗力测定结果 (cfu /片)

浸泡时间(min)	75%乙醇	安尔碘	5%“84”消毒液	2%戊二醛	3%苯扎溴铵
生物膜	0	3.8×10^8	4.1×10^8	3.9×10^8	3.8×10^8
	15	1.1×10^8	3.6×10^6	3.2×10^6	0
	30	9.6×10^5	5.1×10^4	3.3×10^5	0
	60	2.8×10^4	3.4×10^3	0	0
	90	0	0	0	0
	120	0	0	0	0
游离菌	0	3.6×10^8	3.6×10^8	3.6×10^8	3.6×10^8
	15	3.2×10^4	2.4×10^3	0	9.5×10^4
	30	0	0	0	0

3 讨 论

生物膜是一种黏附于非生物或生物表面的微生物菌落,它们包裹于自身产生的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中,是微生物在生长过程中为了适应生存环境而形成的一种与浮游细胞相对应的存在形式^[3]。成熟的白念珠菌生物膜是一个在细胞外基质包裹下的由孢子、酵母细胞、真菌丝和假菌

丝组成的致密网状系统,呈一个有机的三维结构。本研究用高分子除菌滤膜来制备生物膜,在沙氏平板培养2 d后可见膜片表面形成一层致密的灰白色菌膜,不能用无菌生理盐水冲洗掉。

生物膜中菌的生物学特性与浮游菌显著不同,环境适应能力增强,可抵抗吞噬细胞的吞噬作用,可逃避宿主免疫系统的清除作用,对外界环境存在的抗菌药物、消毒剂等杀菌物质有很强的抵抗力。生物膜中

菌抵抗力增强的机制主要有两个方面:(1)细菌、真菌分泌的以多糖为主的细胞外基质可以在白色念珠菌生物膜中形成具有高度迂曲孔道的水凝胶样结构,可阻碍或延迟杀菌物质的渗入。有研究显示,白色念珠菌完整的生物膜对两性霉素 B 的敏感性比丧失了大部分 ECM 结构的生物膜细胞对该药物的敏感性有所降低,这表明 ECM 在生物膜对两性霉素 B 的耐药中起作用^[4]。(2)生物膜中菌代谢水平低,菌生长缓慢,从而导致生物膜菌细胞对抗菌物质敏感性降低,而且代谢产物的积聚对许多药物有抵抗作用^[5]。

本研究中各种消毒剂均按说明书的推荐浓度配制,除 2% 戊二醛可在 15 min 内完全杀灭生物膜念珠菌和游离菌,其他消毒剂完全杀灭生物膜念珠菌均比完全杀灭游离念珠菌所需时间长,说明真菌一旦形成生物膜,其对杀菌物质的抵抗力明显增强。由此可见,处理念珠菌生物膜导致的真菌污染不能完全采用针对游离菌的消毒方法,应尽量使用戊二醛、“84”消毒液等高效消毒剂或延长消毒剂作用时间。此外,本研究结果表明,随着生物膜形成时间的延长,由于其成熟度增加导致生物膜念珠菌对大多数消毒剂的抵抗力明显增强,此与生物膜耐药性的研究结果基本一致^[5]。

(上接 13 页)

待进一步探讨。P-LCR 表示大血小板占血小板总数的百分比,大血小板是血液中较年轻的血小板。在血小板破坏增多或生成不足的疾病中,P-LCR 的比率变化更能反映血小板再生情况。两组术前 P-LCR 无差异,术后恢复组第 6 天开始增加,两组有明显差异($P < 0.05$),提示恢复组骨髓功能正常。当血小板减少时,骨髓巨核细胞代偿性增生,血小板更新加快,释放出年幼的大血小板使 P-LCR、MPV 增高。P-LCR 的增加可增强机体的止血功能,可补偿血小板的减少,有利于机体的止血。本文未恢复组 MPV、P-LCR 随着 PLT 的减少而减少,提示该组患者可能有骨髓抑制,究其原因可能由于排异、感染、药物不良反应等综合因素所致,随着病情的缓解会恢复。但是当患者出现以白细胞减少,同时伴有发热、皮疹或腹泻为临床特征时应想到移植抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)的可能。在积极抢救患者的同时,应做骨髓细胞学检查以明确诊断。当发生 GVHD 后造血系统严重受抑,以粒细胞首先迅速减少,随后血小板、红细胞减少至全血细胞减少,虽然其发病率极低,但因病情凶险,病死率极

万方数据

【参考文献】

- [1] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 2007, 284(5418):1318-1322.
- [2] Gordon R, Stephen P S, Derek P T, et al. Candida biofilms: an update [J]. *Eukaryot cell*, 2005, 4(4):633-638
- [3] Hazan Z, Zumeris J, Jzcoab H, et al. Effective prevention of microbial biofilm formation on medical devices by low-energy surface acoustic waves [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(12):4144-4152
- [4] Khot P D, Suci P A, Miller R L, et al. A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and β -1,6-glucan pathway genes [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(11):3708-3716
- [5] Tsang C S, Ng H, McMillan A S. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness [J]. *Clin Oral Investig*, 2007, 11(4):361-368

(2010-08-20 收稿 2010-10-30 修回)

(责任编辑 梁秋野)

高^[5],应引起临床医师的高度重视。P-LCR、MPV 的变化反映了血小板减少的原因,可作为肝移植术后判断血小板减少原因的重要指标之一。血小板及其参数的监测对肝移植术后病情变化的判断有一定的参考价值,提示临床医师在综合治疗的同时,应密切观测血小板参数的变化,及早发现严重并发症的发生并予以纠正。

【参考文献】

- [1] 黄洁夫. 中国肝脏移植. 北京:人民卫生出版社,2008:508.
- [2] Chatzipetrou MA, Tsaroucha A K, Weppler D P. Thrombocytopenia after liver transplantation [J]. *Transplantation*, 1999, 67(5):702-6.
- [3] 王雨平, 罗娟, 付春来, 等. 肝移植术后血小板的动态观察 [J]. *云南医药*, 2006, 27(4):361-363.
- [4] 黄雄, 伍晓汀, 李波, 等. 血小板变化在肝移植术后的意义 [J]. *华西医学*, 2005, 20(2):277-278.
- [5] 姚桂玲, 宋丽洁, 丁琪, 等. 肝移植后移植抗宿主病的研究进展 [J]. *武警医学*, 2007, 18(3):219-221.

(2010-09-27 收稿 2010-10-30 修回)

(责任编辑 岳建华)