

鮑氏不動桿菌在乾燥表面 形成生物膜後的存活率

鮑氏不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*) 是能夠引起包括肺炎、傷口、尿路感染、菌血症及腦膜炎等醫療照護相關感染的重要病原菌之一，尤其是在重症加護病房的病人。此細菌可以存活在土壤、水、人類皮膚、食品和醫療器材等任何無生命或乾燥的環境中，藉由形成類似聚合物的生物膜來保護細菌本身對抗惡劣環境，像是殺菌劑、清潔劑和抗生素等藥劑的毒殺作用，因此生物膜產生是細菌重要的毒力因子的表現，西班牙巴塞隆納醫學院的微生物學實驗室針對鮑氏不動桿菌進行生物膜與非生物膜於乾燥環境的存活率分析，並進一步了解生物膜結構上的差異。

巴塞隆納醫學院的實驗室從 221 株臨床分離的鮑氏不動桿菌中，隨機選擇 4 株不相關的菌，採用微量稀釋法 (microdilution method) 且根據 2006 年臨床和實驗室標準協會 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 指引，進行抗生素敏感性測試，另外將已培養 24 小時的鮑氏不動桿菌回溶在 Mueller-Hinton broth 中，測試菌液

600 nm 吸光值 (OD₆₀₀) 最終稀釋為 0.01，將調整好的菌液注入 96 well 無菌孔盤中，於 37°C 靜置培養 48 小時後，加入 0.5% 的結晶紫染劑染 well 上的生物膜，最後加入 95% 的酒精回溶結晶紫溶液，再為每個 well 測量 OD₅₅₀，且需減掉只含 Mueller-Hinton broth 的測定值，每個 well 皆須進行 2 重覆 (duplicate) 試驗。

依照結晶紫染色的 OD 值來解釋是否形成生物膜：無形成生物膜 (OD 值 < 0.4)，弱的生物膜形成 (OD 值 0.4~1) 及強的生物膜形成 (OD 值 > 1.5)，依照此標準，菌株 Ab033 (OD 值 1.814) 及 Ab053 (OD 值 2.174) 皆有形成生物膜的能力，菌株 Ab001 (OD 值 0.24) 及 Ab143 (OD 值 0.109) 則不會形成生物膜。

在最低抑菌濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 測試中發現，能形成生物膜的菌株 Ab033 及 Ab053，幾乎對所有測試的抗生素皆為感受性，反之，無法形成生物膜的菌株 Ab001 及 Ab143，則對 piperacillin, ceftazidime, cefepime,

ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin 呈抗藥性，當中 Ab001 甚至對 imipenem 和 meropenem 也呈抗藥性。觀察生物膜形成與否的兩組間之細菌存活率測試，發現形成生物膜的菌株能存活高達 36 天，另一組則只能存活 15 天，且具有統計學上的顯著差異 ($P < 0.001$)，而組內兩株菌株間的存活天數比較則無統計學上差異。

利用掃描式電子顯微鏡 (Scanning electron microscopy, SEM) 觀察液體培養基，發現生物膜組多數細胞聚集成一群，非生物膜組則只有零星細胞聚在一起，但兩組細胞構造仍保持不變，另外在乾燥表面，生物膜組細胞緊密的靠在一起，又因為鮑氏不動桿菌產生細胞外聚多醣 (exopolysaccharide, EPS)，而有類似薄膜的多層構造，另一組則沒有薄膜及緊密的構造，且細胞有脫水的現象。透過 SEM 觀察可以發現，不管是在液體培養基或乾燥物體表面，生物膜上細胞外聚多醣的聚合物，都有類似線毛 (pili) 的構造，可以加強菌體間的黏附能力。在生物膜形成的過程中，菌體早期黏附及內部細菌開始彼此堆疊增生，再透過分泌許多細胞外聚多醣包裹整個菌落，以抵抗外在環境的攻擊，但成熟的生物膜也會自行分化出通道，藉以提供細菌養份或是代謝廢物的流動。利用穿透式電子顯微鏡 (Transmission electron microscopy, TEM) 觀察生物膜不管是在液體培養基及乾燥物體表面，都會分泌細胞外聚多

醣，藉以防止細胞乾燥，而細胞型態改變 (例如被壓縮) 則只出現在乾燥物體表面。另外一個重大發現，無生物膜組在細菌存活率測試的第 3 天菌株數已經開始減少，這與 SEM 和 TEM 觀察到無生物膜組在 48 小時後，細胞型態開始改變且脫水可能是有相關的。

鮑氏不動桿菌是醫院重要的伺機性感染細菌，能在醫院及醫療器材上移生及持續存活，一般認為與菌株形成生物膜有關，之前也有研究發現鮑氏不動桿菌比其他的不動桿菌能存活在乾燥物體表面更久的時間，這次的研究發現，鮑氏不動桿菌在蓋玻片上也能形成生物膜，使得存活時間更長於非生物膜的菌株。Espinal 此次研究與之前 Rodriguez-Bano 等人的研究一致，能形成生物膜的菌株比未能形成生物膜的菌株更具有藥物感受性。此次研究發現鮑氏不動桿菌在使用 SEM 和 TEM 觀察，皆發現形成生物膜的細菌有胞外多醣基質 (exopolysaccharide matrix)，能夠提供高度含水性，穩定細胞結構以維持更長的存活率。另外跟 Tomaras 等人之研究結果一樣，細菌附著在非生物體表面跟線毛產生有關，這也影響到後續繼續形成生物膜的過程。

綜合整個研究結論，鮑氏不動桿菌生物膜形成與細菌存活天數長短有關，因為存活天數長，也因此增加細菌在醫院環境移生與產生群突發的機率。

【譯者評】此篇研究發現，抗生素高感受性的鮑氏不動桿菌反而比較容易形成生物膜，又因為細菌分泌細胞外聚多醣，而增加在乾燥物品上存活的時間，且細菌黏附在物品表面與線毛產生有關，雖不能證明存在醫院的生物膜菌株與造成群突發有關，但能確定鮑氏不動桿菌如果不經由每日環境清潔消毒，是能透過生物膜形成而存活在醫院環境中高達 36 天，因此醫院環境清潔最好能以每日清潔擦拭為佳，以減少細菌產生生物膜的機會。另外近年來有很多研究利用介面活性分子或酵素以及光動力治療破壞生物膜結構，日後也許有機會應用在植入型醫療器材或醫院環境清潔。

【台北榮總 郭富美 / 王復德 摘評】

參考文獻

1. Espinal P, Marti S, Vila J: Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J hosp infect* 2012;80:56-60.
2. Lee H, Koh Y, Kim J, et al: Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:49-54.
3. Khardori N, Yassien M: Biofilms in device-related infections. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1995;15:141-7.
4. Rodriguez-Banõ J, Marti S, Soto S, et al: Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:276-8.
5. Jawad A, Heritage J, Snelling A, et al: Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996;34:2881-7.