

生物膜及相關感染性疾病

李育霖^{1,2} 劉尊榮^{1,2} 黃美麗²

彰化基督教醫院 ¹內科部感染科 ²感染控制室

隨著醫學的進步，越來越多的管路及人工植入物被使用於醫療及改善人類的生活，當獲得這些醫療輔助的益處時，一個不能避免且麻煩的問題便是感染。一但這些醫材被細菌所感染，在這些無機物質的表面細菌會形成生物膜，而伴隨而來的是困難的治療以及高併發症或嚴重的後遺症。甚者必須將管路或人工植入物移除，使原本的醫療前功盡棄。而另外一些臨床困難治療的感染症，如：感染性心內膜炎、慢性骨髓炎、慢性攝護腺炎、甚至肺結核…等，近年來也發現生物膜的形成也在致病機轉及治療難度扮演著重要的角色。生物膜是近十年來對細菌感染研究的一個新的觀念，我們的敵人不是一隻一隻的細菌，而是一整群細菌社群，在群體中每個細菌的個體會有基因的交換傳遞，會有整體基因的調控，甚是有分工合作的情形來對抗外在加予的生存壓力。雖然每一個細胞的個體都是單細胞生物，然而以社群方式的感染卻有著類似多細胞生物的協同合作。本文從生物膜生成的機轉到臨床相關疾病，到最後治療的應用作一說明。希望未來針對這樣的感染機轉能有更進一步的了解與研究，以其克服臨床上生物膜所帶來的困難。（感控雜誌 2011:21:44-51）

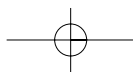
前 言

生物膜 (biofilm) 廣泛的存在在自然界中，是微生物存在環境裡的自然狀態。一開始是在環境或工業科學中被廣泛的研究，如輸送管線或管路的沾黏及阻塞所傳送效率降低或環境

清潔的困難等。19 世紀以來，Robert Koch 在顯微鏡下發現微生物的存在並將其與臨床感染性疾病的關係串連起來。後來發展出要確定感染成立所需符合的柯霍氏假說 (Koch's postulates)，其中必須從被感染個體培養出致病菌而建立出微生物培養系統，而這套系統一直沿用至今且成為

民國 99 年 11 月 8 日受理
民國 99 年 11 月 17 日修正
民國 99 年 12 月 17 日接受刊載

通訊作者：黃美麗
通訊地址：彰化市南校街135號
連絡電話：(04) 723-8595 轉 5989



感染症醫學發展的重要基礎。然而為了要增加培養出來致病菌的機會，所以我們在培養基中提供最有利於細菌生長的环境，但是在現實的環境中資源是有限的，微生物也必須面對各種不同壓力的挑戰，如營養來源、溫度、濕度甚至放射線…等。因此在資源充裕且生長壓力小的環境下所培養出來的細菌和在資源緊縮且生長壓力大的環境下生長的相同細菌是否仍有一致的型態？體外培養的結果是否能代表或預測為生物在人體內的狀態？1970 年代科學家 Chen 及 Costerton 使用穿透式電子顯微鏡觀察細菌在不同條件下的生長，發現細菌從剛培養出來時和在增值幾百倍後的菌落完全不同，而造成這樣差異的正是生物膜的形成。之後數十年來隨著分子醫學知識的蓬勃發展，我們對生物膜有更多不同層次的了解，也發現其在許多人類的感染性疾病中所扮演的角色 [1,2]。除了外觀的不同外，同一種微生物在兩種截然不同的形態下表現出不同的生活模式，尤其是對外在環境壓力的調節與適應。這樣子的轉變不只發生在環境中，臨床的感染是病原與人體的互動，而病原菌在人體中必須面臨到多方面的生長壓力，如免疫力的攻擊，抗生素的使用或甚至養分來源的缺乏，促使著微生物必須改變及調整生長的形態或甚至分工合作來取得更好的生存機會。

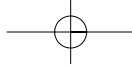
以下我們一一的介紹包括生物膜形成的機轉及操控的機制，為什麼微

生物選擇以生物膜的方式存活在自然界中，微生物如何藉由生物膜的形成進行彼此的分工合作，和我們如何利用生物膜的概念設計及發展新的治療微生物方法。

生物膜形成的機轉

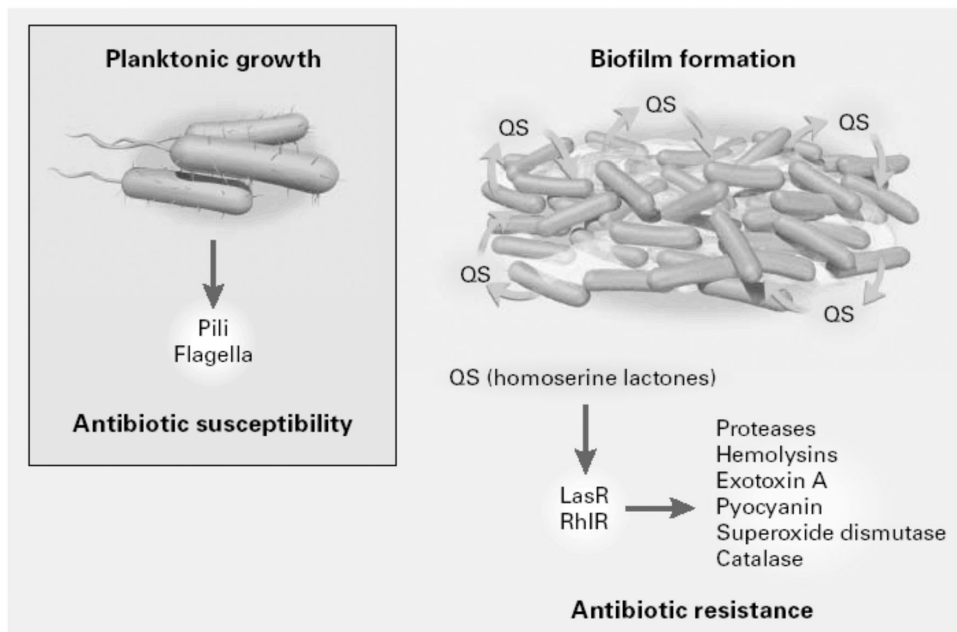
形成生物膜是微生物生存的策略，而迫使微生物形成生物膜的因素簡單來說還是離不開達爾文的演化論，在生存受到威脅時所發展出來的一套適應方法，所有的演化目的均是為了延續生命，將基因傳遞下去。生物膜是一堆微生物形成的社群 [3]，而成群的生長第一個最主要的目的便是為了抵禦外在環境來的壓力，譬如營養的缺乏、酸鹼值、極端溫度、或甚至是去污劑或抗生素所帶來的威脅。

形成生物膜可以區分為幾個步驟 [4,5]，第一步是附著，指的是微生物在無機或有機物表面上的黏附，成為接下來增殖的基礎 (niche)。尤其處在固體-液體介面的交接處 (例如水或血) 更是適當的附著處。通常比較粗糙的表面、厭水的材質、增加流速 (剪力上升)、適宜的溫度及附近營養來源充足會促使附著機會增加。除了環境裡的物理和化學因素，微生物本身的特性也參予附著的機制，例如 *Pseudomonas* spp 的鞭毛、細菌的運動能力、分泌於外在的 DNA 及膜蛋白 (如 *Staphylococcus aureus*、capsular polysaccharide adhesin、staphylococcal

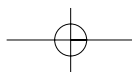


surface protein、autolysin)···等，對附著產生也扮演重要角色[6]。而一旦附著之後便會有不同的基因調控表現，如 *Pseudomonas aeruginosa* 的 algC 基因在水流系統中產生附著幾分鐘後便會有加強表現的情形[7]，而這樣的基因調控促使膜外多醣體 (exopolysaccharide) 的合成以利接下來生物膜形成[8,9]。附著之後第二步便是建立微生物社群 (microcolony)，此時重要的是個體間的黏著和累積 (accumulation)，而這一個步驟和細菌本身的特性有關，比如 *Staphylococcus aureus* 的 polysaccharide intercellular adhesion (PIA)，poly-b(1,6)-N-Acetylglucosamine (PNAG) 是兩個主要決定微生物個體

間黏著的重要蛋白，而這些蛋白則受到 intercellular adhesion regulator (icaR) 這段基因的調控。在附著與增殖累積後生物膜則會發展生 3D 的立體結構，外表則會包覆著多醣體，形成一穩定的結構。微生物在其中可以藉由數量感應等機制進行基因的交換或整體調控，而最後因應環境改變或特定原因下微生物群體破體而出 (dispersal) [10,11]，再度成為單一自由營生的個體尋找下一個附著的目標，如此周而復始為生物膜的一個週期。而一般我們稱自由營生的個體為浮游狀態 (planktonic form)，而群聚生長的狀態為生物膜或固著狀態 (sessile form) (圖一)。



圖一：浮游狀態利用鞭毛或纖毛附著累積後形成生物膜狀態 (biofilm) 的綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 會利用 QS (quorum sensing, 數量感應) 來調控基因表現進而影響如外毒素···等，使細菌毒性和抗藥性發生改變。(Prince A: N Engl J Med, 2002, 347:1110-1111)



數量感應 (quorum sensing)

數量感應是是一個十分有趣的現象，有些人稱數量感應為細菌溝通的語言，是微生物協調彼此基因表現所使用的工具[12-14]。一開始發現數量感應的現象是在 1970 年代對於 *Vibrio fischeri* 這種海中的微生物的發光特性與細菌的密度成正相關的觀察，簡言之是微生物因應菌體數量密度的改變會產生基因表現調控的一種現象。整個數量感應的步驟分成四部分：(1) 由每一個個體微生物製造小分子傳遞物質 (2) 將此小分子釋放至細胞周圍環境 (3) 經由受器辨識這些在細胞周圍的小分子物質，當超過一定濃度的閾值後 (4) 經由訊息的傳導改變基因表現的操作(如操作子)。

其中革蘭氏陰性細菌是利用 N-acylhomoserine lactone (AHL)，而革蘭氏陽性菌則是使用 autoinducing peptides (AIPs) 來作為傳遞的小分子，另外還有一些共通的小分子如 autoinducer-2。而經由數量感應來調控的基因包羅萬象，比如像 *P. aeruginosa* 用兩套 lux type 系統來調控本身的毒力因子，分別是 *las* 和 *rhl* (分別以所製造的蛋白 elastase 和 rhamnolipid 命名)，其中 *las* 會影響 *rhl* 系統促使許多毒力相關因子的調控增加，進而引起臨床疾病。這樣子的調控可以藉由將這兩的基因利用分子生物技術突變掉後使毒力下降來證實，這樣的 *las* 和 *rhl* 於 *P. aeruginosa* 感染

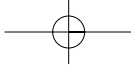
肺部囊腫性纖維化 (cystic fibrosis) 的病患時，在痰液裡面的菌體常可見這樣的調控，所以在造成臨床的相關疾病扮演重要的角色。另外革蘭氏陽性菌的 *S. aureus* 則使用 *agr* locus 調控 RNAII (負責編碼 *agrB*, *agrD*, *agrC*，和 *agrA*) 及 RNAIII 來抑制細胞壁相關的蛋白產生及使分泌性的毒力相關蛋白產出增加，以因應較擁擠的群體密度，協調往外擴展空間爭取養分而非在原地不斷增生後耗竭。藉由細胞壁的黏著因子產生的生物膜在人體先產生移生現象，而黏著後的增生及數量調控後所產生的毒力因子進一步地造成侵入與散佈，而最終成為臨床感染性疾病。

臨床影響及相關的感染症

美國 CDC 曾估計，超過 65% 以上的感染症疾病和生物膜有關，而生物膜的形成為的是在不同的壓力下創造適合生長的环境，跟臨床感染症的發生有極大關係，也對臨床治療也會造成影響，增加對抗生素的抗藥性及規避免疫系統所帶來的挑戰。

(一) 生物膜相關的臨床感染症

許多的臨床感染症都和生物膜的產生有相關，而其中最為典型且有代表性的不外乎是感染性心內膜炎、導管相關的血流或泌尿道感染、人工植入物的感染、牙周病、尿路結石感染及攝護腺炎[15,16]。這一些疾病的共



同特徵是治療不易，常需要比一般感染症更長的抗生素治療時間，或是必須借助手術的方式移除病灶。舉例來說在導管相關的血流感染中，*Staphylococcus epidermidis* 是一個麻煩的菌種，因為臨床上是否為致病源的判讀不易，有可能是培養產生的污染，但也有可能是致病菌[17,18]，而控制 *S. epidermidis* 形成生物膜的操作子是 *icaADBC*，其中有 *icaA*、*icaB*、*icaC*、*icaD* 和 *icaR* 等基因群，所負責控制的則是在前文提到 PIA 和 PNAG 的形成，和細菌的聚集增殖有關。有人把是否含有 *ica* 基因群和是否為臨床有意義菌株做比對，發現 85% 從血瓶培養出來有臨床意義的菌株帶有 *ica* 基因群，而只有 6% 從皮膚取得的移生菌株含有 *ica* 基因群。因此可見生物膜的形成和細菌侵入人體有關，而且這樣的特性可以反過來當作侵入性疾病的指標。

(二) 增加抗生素的抗藥性

過去我們總是希望能用體外的實驗結果預測體內的治療效果，但是我們也觀察到提高細菌培養數量時，其最低抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 也會相對的提高，我們稱之為數量效應 (inoculum size effect)。除了數量的不同外，我們把培養在 planktonic 狀態和 sessile 狀態的同一隻細菌作比較，也能發現 MIC 的不同，所以除了量外，在大量細菌存在的情形下透過生物膜的形成，數

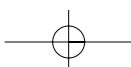
量感應的基因調控後也會發生的質的改變，而這樣子的變化對抗生素的治療效果是不利的。因為生物膜形成而對抗生素產生抗藥性有幾種機制，包括 (1) 降低或減少抗生素的穿透 (2) 因生物膜所造成的抗生素濃度差使部分細胞生長數度減換或停止繼續分裂 (3) 對外在的壓力所產生的調適 (基因表現改變) (4) 小部分細胞變成高度保護的靜止子 (persister)[19]。

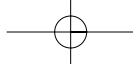
(三) 規避體內免疫系統的攻擊

除了對抗生素所產生的抗藥性外，被生物膜保護的菌體也能有效的規避免疫系統的攻擊。可能透過的機轉如下：(1) 限制白血球侵入菌體，(2) 透過數量感應使基因調控改變來適應免疫挑戰，(3) 降低白血球的吞噬能力，(4) 減輕白血球產物的作用力如自由基等。在一較早的動物實驗模型中也證實將不同型態的同種細菌加上淋巴球做刺激，可以發現到生物膜型態的細菌比浮游型態的細菌產生較少的 interferon-gamma，甚至生物膜型態產生的量跟沒加細菌的差別不大，成功的躲過對免疫系統的刺激與反應 [20]。

治療策略

隨著我們對於生物膜的機轉及臨床重要性與影響的了解越來越多，許多針對生物膜所發展出來的療法應運而生，以下分成化學性治療及物理性





治療來介紹：

(一) 化學性治療

化學性的治療指的是藥物的治療，第一個要考慮的還是我們一直在使用的抗生素，因為我們將細菌培養在生物膜的固著狀態，因此在測試細菌的抗藥性時，除了原本的最低抑菌濃度之外，有一相對應的名詞為最低生物膜清除濃度 (minimum biofilm eradication concentration; MBEC)，等同是要能清除生物膜狀態細菌的最低抑菌濃度。最低生物膜清除濃度的數值常常遠高於最低抑菌濃度，甚至是臨床達不到的數字，然而測量這樣的一個臨床似乎沒用的數字還是能給我們在選擇藥物時參考。在生物膜狀態下一樣都是升高的 MIC，若我們知道哪些藥物升高的比例較低，或許用來治療的成功率會提高。另外也可以用來測試兩種或以上抗生素聯合使用時的評估工具，看是否能藉由協同作用增進對生物膜感染症的治療。

除了傳統的藥物之外，針對生物膜形成機制或因應而生的抵抗力所設計的藥物或許是將來我們能寄望的目標。在動物實驗上發現透過抑制數量感應的胜肽 (RNAIII-inhibiting peptide; RIP) 注射可以有效抑制細菌在體內生物膜的形成，進一步增加抗生素的治療效果，改善臨床病情[21]。

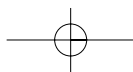
(二) 物理性治療

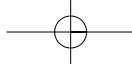
物理性的治療是非藥物的，第一

能做的當然還是直接移除感染的病灶，然而通常生物膜相關的感染都是比較深部或人工植入物相關的感染，要第一時間移除感染源或清創往往會囿於臨床條件的阻礙，而近年來隨著材料科學的日新月異，藉由改善材料材質或製程來避免細菌的沾附的進展一日千里。比如說鍍銀的氣管內管，藉由釋放出的銀離子阻礙生物膜形成，被證實能部分下降插管後院內感染肺炎的機率。另外一些奈米科技製成的金屬表面也能有效的減低細菌的沾黏且不影響正常細胞的親和性。在一個以兔子腿骨設計的骨髓炎動物模型中，對患部通以微量的電流也能有效的下降感染部位的細菌數量[22]。低頻且低功率的超音波也在診斷與治療生物膜疾病上有所助益，經過超音波處理過的檢體可使細菌的檢出率上升，且在治療上超音波能使處理過的生物膜對於抗生素的感受性提高[23]。

結 論

生物膜是近十幾年來發展出來，對細菌的行為研究的新興理論。而隨著我們對整個機轉的逐漸了解，也有越來越多的證據證實其和臨床感染症的相關。一些臨床不容易處理的臨床感染症，或我們不願意見到的醫療併發症常帶給臨床醫師極大的困擾。而運用生物膜觀念所設計的治療或預防是未來我們應持續關心及注意

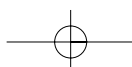


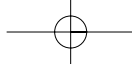


的領域，冀望能有突破性的發展來改善病人的預後。

參考文獻

- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95-108.
- Lindsay D, von Holy A: Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 2006;64:313-25.
- Jefferson KK: What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004;236:163-73.
- Donlan RM: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881-90.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, et al: Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005;13:34-40.
- Butler MT, Wang Q, Harshey RM: Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:3776-81.
- Davies DG, Geesey GG: Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:860-7.
- Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG: Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1181-6.
- Davies DG, Geesey GG: Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:860-7.
- Boles BR, Horswill AR: Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathol* 2008;4:e1000052.
- Kaplan JB: Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 2010;89:205-18.
- Sifri CD: Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clin Infect Dis* 2008;47:1070-6.
- Atkinson S, Williams P: Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* 2009;6:959-78.
- Williams P, Camara M: Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:182-91.
- Parsek MR, Singh PK: Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:677-701.
- Lindsay D, von HA: Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 2006;64:313-25.
- O'Gara JP, Humphreys H: *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001;50:582-7.
- Mack D, Rohde H, Harris LG, et al: Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* 2006;29:343-59.
- Stewart PS: Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002;292:107-13.
- Dasgupta MK: Biofilm causes decreased production of interferon-gamma. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:877-82.
- Giacometti A, Cirioni O, Gov Y, et al: RNA III inhibiting peptide inhibits in vivo biofilm formation by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1979-83.
- Del Pozo JL, Rouse MS, Euba G, et al: The electricidal effect is active in an experimental model of *Staphylococcus epidermidis* chronic foreign body osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4064-8.
- Rediske AM, Roeder BL, Brown MK, et al: Ultrasonic enhancement of antibiotic action on *Escherichia coli* biofilms: an in vivo model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1211-4.





Biofilms: Clinical Implications and Applications

Yu-lin Li^{1,2}, Chun-eng Liu^{1,2}, Mei-li Hung²

¹Department of Internal Medicine, ²Center of Infection Control
Changhua Christian Hospital, Changhua, Taiwan

The concept of biofilms, which was proposed over the past decades, provides a novel approach to understand the default state of bacteria in nature and even in certain types of human infection. A biofilm is a bacterial community that shows gene expression different from that of planktonic bacteria; bacteria show these expression differences to adapt or respond to environmental stress. The mechanism of biofilm development includes 4 steps: attachment, accumulation, architecture formation, and dispersal. Once the biofilm is formed, the bacterial community integrates and coordinates its gene expression through quorum sensing. As stated by the US CDC, more than 60% of the clinically infectious diseases are associated with biofilm formation; biofilm formation is especially prominent in deep-site infections such as infective endocarditis, chronic osteomyelitis, chronic prostatitis, infections caused by stones in the urinary tract, and even pulmonary tuberculosis, catheter-related bloodstream infections, endotracheal tube-related nosocomial pneumonia, and many implant-related infections. Biofilm-associated infectious diseases often require a longer treatment course, have higher failure rates, and show poorer outcome because of increased medicine consumption. Some novel strategies were investigated to manage biofilm-associated infectious diseases. Some newly developed antibiotics or combinations of antimicrobial agents showed better effects on biofilm eradication. Small peptides that interfere with the quorum-sensing system were effective in disturbing gene adjustments in biofilms and eliminating the complications in animal models. Surface coatings of materials applied on catheters or medical implants were studied to reduce the attachment of bacteria, the first step of biofilm formation. Low-frequency, low-power ultrasonography is helpful in improving diagnosis and in the treatment of biofilm-associated diseases, and bioelectricidal effect was also seen in a chronic osteomyelitis rabbit model[Author5]. Further investigations on the applications of biofilms are needed to improve human health and facilitate infection control.

