

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.14.004

不同耐药鲍曼不动杆菌毒力效应检测与分析^{*}

林雪霏^{1,2}, 蒋月婷³, 赖斯华¹, 邓颖珊¹, 吴爱武^{1△}

1. 广州医科大学检验学院, 广东广州 510182; 2. 中山大学热带病防治研究教育部重点实验室, 广东广州 510080; 3. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广东广州 510120

摘要:目的 比较不同耐药性鲍曼不动杆菌毒力特点, 探讨鲍曼不动杆菌耐药性与其致病力之间的关系。方法 将来自临床的 110 株鲍曼不动杆菌分成 3 组: 多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)、泛耐药鲍曼不动杆菌(XDRAB)和相对敏感鲍曼不动杆菌(RDSAB)。采用 PCR 检测试验菌株携带的毒力基因(BasD、BauA、Omp33-36、traT); 采用吸光度值法测定试验菌株的体外生长情况; 采用蹭行运动实验检测试验菌株运动能力; 采用明胶酶活性实验检测试验菌株产侵袭性酶类情况; 采用结晶紫染色法测定试验菌株生物被膜形成能力; 采用微量法 D-甘露糖抵抗红细胞凝集实验检测试验菌株对红细胞的凝集能力; 采用小鼠感染试验对比不同耐药菌的致病能力差异。结果 110 株鲍曼不动杆菌中, 除了 2 株 RDSAB 蹭行运动阳性外, 其余菌株均为阴性, MDRAB 和 XDRAB 均未观察到蹭行运动; 110 株鲍曼不动杆菌全部菌株明胶酶活性均为阴性; 25 株 RDSAB 的生物被膜形成能力比 42 株 MDRAB 或 43 株 XDRAB 的生物被膜形成能力强, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中 25 株 RDSAB 生物被膜形成能力以强阳性为主, 而 42 株 MDRAB 和 43 株 XDRAB 以阳性为主; 只有 1 株 RDSAB 在有或者无 D-甘露糖存在的条件下, 均能与 AB 型和 O 型红细胞发生凝集; 毒力基因 BasD 具有较高的检出率, 为 59.1% (65/110), 毒力基因 BauA 和 Omp33-36 检出率较低, 分别为 6.4% (7/110) 和 3.6% (4/110), 未检出毒力基因 traT; MDRAB 的 BasD 毒力基因检出率比 RDSAB 高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), RDSAB 的毒力基因 Omp33-36 检出率比 MDRAB 和 XDRAB 高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), MDRAB 的 BasD 和 BauA 毒力基因检出率比 XDRAB 高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 鲍曼不动杆菌在获得耐药性的同时其毒力并没有相应增加, RDSAB 的环境生存和定植能力比 MDRAB 和 XDRAB 更强。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 多重耐药; 泛耐药; 毒力效应

中图法分类号: R378

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)14-1996-06

Detection and analysis of virulence effects of different drug-resistant *Acinetobacter baumannii*^{*}

LIN Xuefei^{1,2}, JIANG Yueting³, LAI Sihua¹, DENG Yingshan¹, WU Aiwu^{1△}

1. Jinyu College of Laboratory Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China; 2. Key Laboratory of Tropical Disease Control and Research, Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China

Abstract: Objective To compare the virulence characteristics of different drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, and to explore the relationship between the drug resistance of *Acinetobacter baumannii* and its pathogenicity. **Methods** A total of 110 clinical strains of *Acinetobacter baumannii* were divided into 3 groups: multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB), extensively-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (XDRAB) and relatively sensitive *Acinetobacter baumannii* (RDSAB). PCR was used to detect the virulence genes (BasD, BauA, Omp33-36, traT) carried by the test strains. The absorbance method was used to detect the in vitro growth of the test strains. The rubbing movement test was used to detect the motility of the test strains. The gelatinase activity test was used to detect the production of invasive enzymes by the test strains. The crystal violet staining method was used to detect the biofilm formation ability of the test strains. The mi-

^{*} 基金项目: 中山大学热带病防治研究教育部重点实验室开放课题(2019kfkt08)。

作者简介: 林雪霏, 女, 研究生在读, 主要从事临床微生物相关研究。△ 通信作者, E-mail: aiwwu66@163.com。

本文引用格式: 林雪霏, 蒋月婷, 赖斯华, 等. 不同耐药鲍曼不动杆菌毒力效应检测与分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(14): 1996-2001.

cro-method D-mannose resistance to erythrocyte agglutination test was used to detect the ability of the test strains to agglutinate erythrocytes. The mouse infection test was used to compare the pathogenicity of different drug-resistant bacteria. **Results** Among 110 strains of *Acinetobacter baumannii*, except for 2 strains of RDSAB that were positive for rubbing movement, the other strains were all negative. No rubbing movement was observed in MDRAB and XDRAB. All 110 strains of *Acinetobacter baumannii* had negative gelatinase activity. 25 strains of RDSAB had stronger biofilm forming ability than 42 strains of MDRAB or 43 strains of XDRAB, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$), among them, 25 strains of RDSAB had strong positive biofilm formation ability, while 42 strains of MDRAB and 43 strains of XDRAB were mainly positive. Only one RDSAB could agglutinate with AB and O red blood cells in the presence or absence of D-mannose. The virulence gene BasD had a high detection rate of 59.1% (65/110), the detection rates of virulence genes BauA and Omp33-36 were low, 6.4% (7/110) and 3.6% (4/110) respectively, and no virulence gene traT was detected. The detection rate of basd virulence gene in MDRAB was higher than that in RDSAB ($P < 0.05$). The detection rate of Omp33-36 virulence gene in RDSAB was higher than that in MDRAB and XDRAB ($P < 0.05$). The detection rate of BasD and BauA virulence gene in MDRAB was higher than that in XDRAB ($P < 0.05$). **Conclusion** *Acinetobacter baumannii* acquires drug resistance while its virulence does not increase correspondingly. The environmental survival and colonization ability of RDSAB is stronger than that of MDRAB and XDRAB.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; multi-drug resistance; extensively-drug resistance; virulence effect

鲍曼不动杆菌是一种医院内感染病原体,可在人类中引起多种感染,包括心内膜炎、脑膜炎、肺炎(在机械通气患者中)、败血症和尿路感染^[1]。由于鲍曼不动杆菌可以在医院环境和设备上持续存在并以多药耐药病原体的形式出现^[2],因此该菌也成为临床的研究热点,但以往临床研究更多关注的是其耐药性和耐药机制,对该菌的生理机制及毒力研究关注度相对较低。细菌毒力的物质基础主要包括侵袭力和毒素,其中侵袭力主要包括黏附素、外膜蛋白 A、荚膜、侵袭性酶类和生物被膜。目前鲍曼不动杆菌中发现的毒力因子主要包括外膜蛋白 A、脂多糖、外膜囊泡、铁载体、生物被膜等^[3]。在细菌耐药性日益增强的大背景下,如果细菌在获得耐药性的同时,其毒力也相应增加,将严重影响临床救治。本研究通过蹭行运动测定、明胶酶活性试验、生物被膜形成试验、红细胞凝集及抑制试验、常见毒力基因的检测和小鼠体内毒力效应试验对不同耐药性鲍曼不动杆菌的毒力因子和毒力效应进行检测,了解不同耐药鲍曼不动杆菌在获得耐药性的同时其毒力改变情况,为临床相应菌株的抗感染治疗和毒力效应研究提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源和鉴定 在广州医科大学附属第一医院微生物室菌种库收集 2016—2018 年临床分离的鲍曼不动杆菌共 110 株。随后再用 PCR 方法检测鲍曼不动杆菌特有的分子标记基因 blaOXA-51-like,进一步确认 110 株菌株均为鲍曼不动杆菌。110 株鲍曼不动杆菌中多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB) 42 株,泛耐药鲍曼不动杆菌(XDRAB) 43 株,相对敏感鲍曼不

动杆菌(RDSAB) 25 株。各耐药菌株的定义如下^[4], (1)MDRAB:对下述 5 类抗菌药物中 3 类或者 3 类以上药物不敏感的鲍曼不动杆菌,5 类抗菌药物包括氨基糖苷类、碳青霉烯类、头孢菌素类、氟喹诺酮类和含有 β -内酰胺酶抑制剂的复合制剂(包括哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、氨苄西林/舒巴坦); (2) XDRAB:仅对 1~2 种抗菌药物[主要指替加环素和(或)多黏菌素]敏感的鲍曼不动杆菌; (3)其余菌株都归为 RDSAB。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 由广州医科大学附属第一医院检验科微生物室馈赠。

1.2 仪器与试剂 LB 肉汤、营养琼脂、明胶酶、D-甘露糖、结晶紫、甲醇、无水乙醇、1 mL 注射器、细菌一次性培养皿、96 孔聚苯乙烯板、96 孔 U 型聚苯乙烯板均购自广州捷倍斯生物科技有限公司,有效期内使用。6 周龄的 Balb/c 雌性小鼠、鼠粮和垫料购自广州晴乐生命科学有限公司;O 型、AB 型人红细胞由广州医科大学附属第二医院检验科提供。PCR 试验中所有的引物合成和基因测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 生长曲线的测定^[5] 将从-80℃冰箱中复苏的菌液用新鲜的 LB 肉汤通过比浊仪调成 0.5 麦氏浊度;吸取 50 μ L 上述菌液用 LB 肉汤按 1:20 稀释成 1 mL;在 96 孔聚苯乙烯板中加入 200 μ L 稀释的菌液,每株均设置 3 个复孔,其中空白对照只加 LB 肉汤;在摇床上以 100 r/min 进行培养,保持温度在 37℃,每隔 2 h 取出用酶标仪读取吸光度值(A_{600})并记录,监

测至 12 h 结束。

1.3.2 蹭行运动的测定^[6] 将在-80℃冰箱中保存的不同耐药性的菌株在营养琼脂平板上复苏后,用无菌枪头取单个菌落穿刺 LB 固体培养基接种于培养皿的接触面;在 37℃培养箱中孵育 24 h 后,测量其菌晕的长径。若菌晕长径>10 mm,则为蹭行运动阳性。本实验需独立重复 3 次,结果为 3 次试验的平均值。以铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为阳性对照。

1.3.3 明胶酶活性检测^[7] 将从-80℃复苏的菌液用新鲜的 LB 肉汤通过比浊仪调成 0.5 麦氏浊度,取 50 μL 上述菌液接种于含 30 g/L 的明胶酶固体培养基上,放入 37℃培养箱中培养 24 h;取出后放置 4℃冰箱 4 h 后观察结果。若菌落周围出现浑浊环,则为阳性,以铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为阳性对照。

1.3.4 结晶紫染色测定生物被膜的形成能力^[8] 将从-80℃冰箱中复苏的菌液用新鲜的 LB 肉汤通过比浊仪调成 0.5 麦氏浊度;在 96 孔聚苯乙烯板中加入 200 μL 稀释的菌液,每株菌株设置 3 个复孔,空白对照只加 LB 肉汤,在 37℃细菌培养箱中静置培养 48 h;培养后吸出孔中上清液,用 200 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗以去除浮游菌;加入 200 μL 10%甲醇固定 30 min,用 200 μL PBS 清洗随后弃去;加入 200 μL 1%结晶紫染液染色 20 min,用 200 μL PBS 清洗随后弃去;待孔中液体干燥后,每孔加入 200 μL 95%乙醇,待孔中与生物被膜结合的结晶紫被乙醇完全溶解后,用酶标仪读取各孔 A₅₇₀。3 个复孔取均值 A,未加菌液的空白 LB 肉汤均值为 AC,将均值 A 与 AC 比较。细菌生物被膜形成能力分为 4 类:A≤AC 为阴性;AC<A≤2AC 为弱阳性;2AC<A≤4AC 为阳性;A>4AC 为强阳性。

1.3.5 微量法进行 D-甘露糖抵抗红细胞凝集试验^[9] 将复苏的菌液用新鲜的 LB 肉汤通过比浊仪调至 4 麦氏浊度约为 1.2×10⁹ CFU/mL,再稀释成浓度为 1.0×10⁹ CFU/mL 的菌液,以 4 000 r/min 离心 15 min,去除上清液;取离心沉淀的菌液用无菌 PBS 重悬制备新鲜的菌悬液(起始浓度为 1×10⁹ CFU/mL)及用无菌 PBS 配制 1%新鲜的 AB 型和 O 型的红细胞悬液(其中加含或不含 1%的 D-甘露糖,各 1 份);在 96 孔 U 型聚苯乙烯板中加入制备好的菌悬液 50 μL 进行倍比稀释;每个系列的孔中加入各 50 μL 含或不含 1%甘露糖的 AB 型或 O 型的 1%红细胞悬液,于振荡器上振荡混匀;放入 4℃冰箱静置孵育 2 h,观察孔中是否有红细胞凝集现象。若红细胞在孔底聚集成小圆点,则为阴性;若红细胞遍布整个孔底,则为阳性。以 50 μL PBS 中加入 50 μL 红细胞悬液作为阴性对照,以大肠埃希菌 ATCC25922 作为阳性对照。

1.3.6 毒力基因的检测 用煮沸法提取细菌 DNA。

选取毒力基因 BasD、BauA、Omp33-36、traT。25 μL 反应体系:预混液 12.5 μL,模板 2 μL,10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL,灭菌双蒸水补足体积。引物序列合成及扩增条件参考文献[10],引物序列见表 1。每种基因阳性条带挑取 1 株菌株,将 PCR 扩增产物进行纯化并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果提交到 GenBank 在线数据库应用比对工具进行比对。

表 1 毒力基因 PCR 扩增引物		
毒力基因	引物序列 (5'-3')	引物长度 (bp)
BasD	F:CTCTTGCATGGCAACACCAC	868
	R:CCAACGAGACCGCTTATGGT	
BauA	F:TGGCAAGGTGAAAATGCACG	224
	R:GCCGCATATGCCATCAACTG	
Omp33-36	F:ATTAGCCATGACCGGTGCTC	726
	R:CCACCCCAAACATGGTCGTA	
traT	F:GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290
	R:CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	

注:F 为上游引物;R 为下游引物。

1.3.7 小鼠体内毒力实验^[6] 随机选取不同耐药鲍曼不动杆菌各一株进行复苏,将复苏的菌液用新鲜的 LB 肉汤通过比浊仪调至 4 麦氏浊度约为 1.2×10⁹ CFU/mL,再稀释成浓度为 1.0×10⁹ CFU/mL 的菌液;稀释后的菌液以 1.0×10⁹ CFU/mL 作为初始浓度进行 10 倍递增的稀释至菌液浓度为 1.0×10⁴ CFU/mL,其中包括 1.0×10⁹、1.0×10⁸、1.0×10⁷、1.0×10⁶、1.0×10⁵、1.0×10⁴ CFU/mL 6 个浓度;将 57 只小鼠随机分成 19 组,每组 3 只,其中 1~18 组为感染组,19 组为对照组;感染组每只小鼠注射 200 μL 菌液,对照组注射等量的生理盐水;1~6 组分别接种菌液浓度为 1.0×10⁹、1.0×10⁸、1.0×10⁷、1.0×10⁶、1.0×10⁵、1.0×10⁴ CFU/mL 的 RDSAB,7~12 组接种上述浓度的 MDRAB,13~18 组接种上述浓度的 XDRAB。接种后每天观察小鼠的死亡情况,连续观察 10 d。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,试验菌株间体外生长能力的比较采用重复测量设计的方差分析,试验菌株间生物被膜形成能力的比较采用 *t* 检验;计数资料以例数和百分率表示,试验菌株间基因检出率、蹭行运动能力、明胶酶活性、血凝结果阳性率和小鼠死亡率等的比较采用 χ^2 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生长曲线的测定 随机选取不同耐药性的菌株各 10 株检测其生长能力。在培养的 12 h 里,随着时

间的增加其测定的 *A* 值也增加。RDSAB 比 MDRAB 或者 XDRAB 生长得快,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。

2.2 蹭行运动的测定 在 110 株鲍曼不动杆菌中,除了 2 株 RDSAB 蹭行运动阳性外,其余菌株均为阴性。MDRAB 和 XDRAB 均未观察到蹭行运动,蹭行运动能力在组间分布差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 明胶酶活性的检测 在 110 株鲍曼不动杆菌中,全部菌株明胶酶活性均为阴性,不同耐药表型的鲍曼不动杆菌产生以明胶酶为代表的侵袭性酶类的能力无差异。

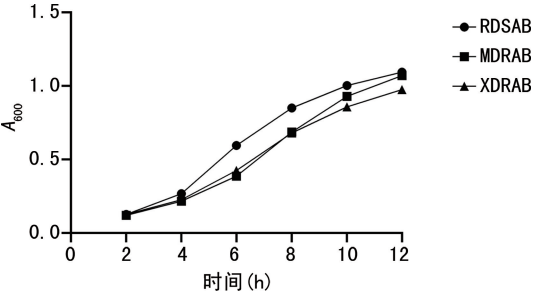


图 1 不同耐药性的鲍曼不动杆菌生长曲线

2.4 不同耐药性鲍曼不动杆菌生物被膜形成能力测定 110 株试验株均能形成生物被膜。RDSAB 的生物被膜形成能力比 MDRAB 或 XDRAB 的生物被膜形成能力强,差异有统计学意义($P<0.05$)。25 株 RDSAB 生物被膜形成能力以强阳性(56.00%, 14/25)为主,其次为阳性(36.00%, 9/25)。而 42 株 MDRAB 和 43 株 XDRAB 表现为以阳性为主,分别占 59.52%(25/42)和 69.77%(30/43);其次为弱阳性,分别占 35.71%(15/42)和 18.60%(8/43)。见表 2。

表 2 不同耐药性的鲍曼不动杆菌生物被膜形成能力的比较[n(%)]

耐药菌株	<i>n</i>	生物被膜形成能力		
		弱阳性	阳性	强阳性
RDSAB	25	2(8.00)	9(36.00)	14(56.00)
MDRAB	42	15(35.71)	25(59.52)	2(4.76)
XDRAB	43	8(18.60)	30(69.77)	5(11.63)

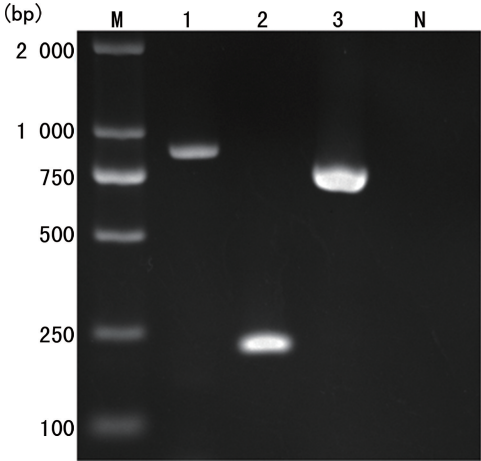
2.5 红细胞凝集试验结果 在 110 株鲍曼不动杆菌中,只有 1 株 RDSAB 在有或者无 D-甘露糖存在的条件下,均能与 AB 型和 O 型红细胞发生凝集,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.6 毒力基因的检测 常见毒力基因 BasD、BauA、Omp33-36 和 traT 中,除了基因 traT 无阳性扩增外,其他基因均可检出,部分阳性扩增结果见图 2。

在 110 株鲍曼不动杆菌中,毒力基因 BasD 具有较高的检出率,为 59.1%(65/110);毒力基因 BauA 和 Omp33-36 检出率较低,分别为 6.4%(7/110)和

3.6%(4/110);毒力基因 traT 无检出。见表 3。

对比不同耐药性的鲍曼不动杆菌毒力基因的检出情况,MDRAB 的 BasD 毒力基因检出率比 RDSAB 高,差异有统计学意义($P<0.05$);而 RDSAB 的毒力基因 Omp33-36 检出率比 MDRAB 和 XDRAB 高,差异均有统计学意义($P<0.05$);MDRAB 的 BauA 和 BasD 毒力基因检出率比 XDRAB 高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4、5、6。



注:M为 DNA marker 2000;1 为 BasD 基因(868 bp);2 为 BauA 基因(224 bp);3 为 Omp33-36 基因(726 bp);N 为阴性对照。

图 2 部分菌株 PCR 扩增结果

表 3 不同耐药性鲍曼不动杆菌常见毒力基因的检出结果[n(%)]

菌株	<i>n</i>	BasD	BauA	Omp33-36	traT
全部菌株	110	65(59.1)	7(6.4)	4(3.6)	0(0.0)
RDSAB	25	14(56.0)	0(0.0)	4(16.0)	0(0.0)
MDRAB	42	35(83.3)	7(16.7)	0(0.0)	0(0.0)
XDRAB	43	16(37.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

表 4 RDSAB 和 MDRAB 检出的毒力基因结果比较(*n*)

菌株	<i>n</i>	BasD	BauA	Omp33-36	traT
RDSAB	25	14	0	4	0
MDRAB	42	35	7	0	0
χ^2		5.959	3.042	4.581	—
<i>P</i>		0.015	0.081	0.032	—

注:—为该项无数据。

表 5 RDSAB 和 XDRAB 检出的毒力基因结果比较(*n*)

	<i>n</i>	BasD	BauA	Omp33-36	traT
RDSAB	25	14	0	4	0
XDRAB	43	16	0	0	0
χ^2		2.264	—	4.706	—
<i>P</i>		0.132	—	0.030	—

注:—为该项无数据。

2.7 小鼠体内毒力实验 对 3 种不同耐药性的鲍曼不动杆菌进行小鼠体内毒力实验,经过 10 d 的观察,实验组和对照组无 1 例小鼠发生死亡。

表 6 MDRAB 和 XDRAB 的毒力基因的比较(n)					
菌株	n	BasD	BauA	Omp33-36	traT
MDRAB	42	35	7	0	0
XDRAB	43	16	0	0	0
χ^2		18.834	5.760	—	—
P		<0.001	0.016	—	—

注:—为该项无数据。

3 讨 论

近些年来对于鲍曼不动杆菌的研究主要集中在流行特征和耐药机制方面,而对鲍曼不动杆菌的毒力机制研究比较少。目前鲍曼不动杆菌中发现的毒力因子主要包括外膜蛋白 A、脂多糖、磷脂酶 D、外膜囊泡、生物被膜、铁载体、运动能力等^[3]。

鲍曼不动杆菌是机会致病菌,广泛存在于医院环境中并长期存活,可通过医疗器械或者医务人员进行克隆性传播^[2],体外存活能力是病原菌重要的致病条件。本研究中对不同耐药性的鲍曼不动杆菌进行生长能力的测定,结果表明在体外不同耐药性的鲍曼不动杆菌生长能力比较,差异无统计学意义($P>0.05$),表明耐药性的获得并未导致菌株体外生存能力减弱。

细菌的运动性与其引起疾病的能力密切相关。鲍曼不动杆菌无鞭毛不能主动运动,但其具备Ⅳ型菌毛可以介导细菌产生不依赖鞭毛的独特运动,此运动叫做蹭行运动^[11]。在许多革兰阴性菌中,Ⅳ型菌毛通过介导蹭行运动,参与细菌在宿主体内黏附和定植并引起免疫应答,同时还在生物被膜形成早期发挥作用^[12]。本研究中,MDRAB 和 XDRAB 均未检测到蹭行运动,而 RDSAB 虽然有 2 株菌株蹭行运动阳性,但与 MDRAB、XDRAB 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明不同耐药表型鲍曼不动杆菌在蹭行运动能力方面无明显差异,提示感染时这些菌株的黏附能力可能也无差异。

明胶酶是细菌产生的一种侵袭性酶类,是具有水解明胶、血红蛋白、胶原蛋白及其他生物活性肽功能的金属蛋白酶,可增强细菌感染性炎症发生时的致病力^[7]。本研究中,110 株菌株均未检测出明胶酶活性,说明不同耐药表型的鲍曼不动杆菌产生以明胶酶为代表的侵袭性酶类的能力无明显差异。

鲍曼不动杆菌生物被膜的形成与其耐药性和致病力之间的相关性报道较多,但研究结果差异较大。BARDBARI 等^[13]研究显示 MDRAB 生物被膜形成能力比非 MDRAB 生物被膜形成能力强。而 QI 等^[14]研究认为随着生物膜形成能力的增强其耐药性相应降低。本研究结果显示,RDSAB 的生物被膜形

成能力比 MDRAB 或 XDRAB 的生物被膜形成能力强,差异有统计学意义($P<0.05$)。RDSAB 生物被膜形成能力以强阳性(56.00%)为主,其次为阳性(36.00%);而 MDRAB 和 XDRAB 以阳性为主,分别占 59.52%和 69.77%,其次为弱阳性,分别占 35.71%和 18.60%。耐药菌株生物被膜形成能力较相对敏感菌株弱,表明菌株耐药性的获得使其生物被膜的形成能力相应减弱,导致其在致病能力方面可能也会相应减弱,这可能是菌株为了在人体更好地生存下来而表现出的一种对人体的适应性改变,具体机制有待进一步探究。

细菌的菌毛除了可以使细菌黏附于宿主细胞,对红细胞也有凝集能力。细菌的致病力与细菌的黏附能力、血凝能力相关,血凝能力强的细菌毒力也强。在本研究菌株的红细胞凝集试验中,仅 1 株 RDSAB 在有或者无 D-甘露糖存在的条件下,均能与 AB 型和 O 型红细胞发生凝集,具有红细胞凝集能力,其余菌株红细胞凝集试验均为阴性。试验结果提示鲍曼不动杆菌整体凝集红细胞的能力弱,不同耐药表型的鲍曼不动杆菌对红细胞的凝集能力无明显差异。

鲍曼不动杆菌常见的毒力基因有介导与宿主细胞结合的黏附和侵袭相关毒力基因 Omp33-36,铁载体的合成和运输相关毒力的基因(BasD 和 BauA)及编码 R6-5 质粒特异的外膜蛋白的毒力基因 traT^[10]。本研究结果显示,在鲍曼不动杆菌中,除了毒力基因 BasD 具有较高的检出率(59.1%)外,毒力基因 BauA 和 Omp33-36 检出率较低,未检测到毒力基因 traT,总体上,研究结果显示鲍曼不动杆菌毒力基因检出率不高,说明鲍曼不动杆菌是一种相对低毒力的细菌,与该菌在临床上主要引起免疫功能低下或感染的现状相吻合。对比不同耐药表型的鲍曼不动杆菌毒力基因的检出情况,MDRAB 的 BasD 毒力基因检出率比 RDSAB 高,MDRAB 的 BauA 和 BasD 毒力基因检出率比 XDRAB 高,而 RDSAB 的毒力基因 Omp33-36 检出率比 MDRAB 和 XDRAB 高。这些结果提示,在不同耐药表型鲍曼不动杆菌中均可检出各占优势的毒力基因,说明这些不同耐药表型的鲍曼不动杆菌毒力特征可能类似,差异不明显。

小鼠体内细菌感染毒力实验结果显示,将不同浓度不同耐药表型的鲍曼不动杆菌菌株在小鼠体内进行注射感染,感染 10 d 后所有小鼠均未出现死亡。实验结果提示不同耐药表型的鲍曼不动杆菌均为低毒力的菌株,对动物致病能力不强。

综上所述,不同耐药表型的鲍曼不动杆菌除了在生物被膜形成能力方面敏感菌株比耐药菌株强以外,在其他的细菌毒力检测试验中,不同耐药表型鲍曼不动杆菌之间无明显差异,也就是说菌株在获得耐药性的同时其毒力并没有相应增加。鲍曼不动杆菌作为

重要的院内感染菌,其致病性、耐药性逐渐增强的同时伴随的是治疗难度的增加,因此,临床和实验室应注意监测其毒力变化趋势,为临床治疗提供依据。

参考文献

[1] LEE C R, LEE J H, PARK M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 55.

[2] ALIRAMEZANI A, SOLEIMANI M, FARD R M N, et al. Virulence determinants and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients [J]. *Germs*, 2019, 9(3): 148-153.

[3] KIM S W, OH M H, JUN S H, et al. Outer membrane protein A plays a role in pathogenesis of *Acinetobacter nosocomialis*[J]. *Virulence*, 2016, 7(4): 413-426.

[4] 周华, 周建英, 俞云松. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识解读[J]. *中国循证医学杂志*, 2016, 16(1): 26-29.

[5] 陆仁飞, 孙嘉瑶, 黄新祥. 伤寒沙门菌 sRNA S2959 增强细菌动力和生物膜形成能力[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(10): 774-778.

[6] 何小庆, 尹珍, 杨均均, 等. 广泛耐药鲍曼不动杆菌 ST238 克隆株毒力及适应性特征[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(6): 779-784.

[7] 赵祝香, 李裕军, 潘楚芝, 等. 耐碳青霉烯类多重耐药鲍曼不动杆菌的毒力特征研究[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2017, 23(3): 199-203.

[8] 黄妙毅, 刘安. 鲍曼不动杆菌生物膜形成能力与耐药性相关性研究[J]. *陕西医学杂志*, 2015, 44(10): 1373-1374.

[9] BADA VE G K, KULKARNI D. Biofilm producing multi-drug resistant *acinetobacter baumannii*: an emerging challenge[J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(1): 8-10.

[10] MALEKZADEGAN Y, KHASHEI R, SEDIGH E H, et al. Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 572.

[11] LEONG C G, BLOOMFIELD R A, BOYD C A, et al. The role of core and accessory type IV pilus genes in natural transformation and twitching motility in the bacterium *Acinetobacter baylyi* [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (8): e182139.

[12] 郭通, 刘雄, 王德慧, 等. pilO 基因对鲍曼不动杆菌运动能力的影响[J]. *生物技术通讯*, 2015, 26(3): 321-324.

[13] BARDBARI A M, ARABESTANI M R, KARAMI M, et al. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates[J]. *Microb Pathog*, 2017, 108: 122-128.

[14] QI L, LI H, ZHANG C, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 483.

(收稿日期: 2020-12-16 修回日期: 2021-04-08)

(上接第 1995 页)

[2] 关晓峰, 邓耀良, 黎承扬, 等. 巨噬细胞在高草酸尿症大鼠肾内结晶晶体形成过程中的作用[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2010, 31(2): 88-91.

[3] OKADA A, YASUI T, FUJII Y, et al. Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice: detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(12): 2701-2711.

[4] 陈康, 蓝创歆, 杨东, 等. 草酸钙结石模型大鼠肾脏 miRNA 差异表达谱的分析研究[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(5): 380-384.

[5] CONG F, WU N, TIAN X, et al. MicroRNA-34c promotes osteoclast differentiation through targeting LGR4 [J]. *Gene*, 2017, 15(8): 6101-6108.

[6] CAI Y, YU X, HU S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2009, 7(4): 147-154.

[7] 陶芝伟, 邓耀良. 巨噬细胞在肾钙化斑介导草酸钙结石形成中的调控作用研究进展[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2015, 36(10): 795-797.

[8] HU Y Y, DONG W D, XU Y F, et al. Elevated levels of

miR-155 in blood and urine from patients with nephrolithiasis[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 20(11): 295-302.

[9] TAGUCHI K, OKADA A, HAMAMOTO S, et al. Proinflammatory and metabolic changes facilitate renal crystal deposition in an obese mouse model of metabolic syndrome[J]. *J Urol*, 2015, 194(6): 1787-1796.

[10] ZUO L, TOZAWA K, OKADA A, et al. A paracrine mechanism involving renal tubular cells, adipocytes and macrophages promotes kidney stone formation in a simulated metabolic syndrome environment [J]. *J Urol*, 2014, 191(6): 1906-1912.

[11] HAMAMOTO S, TAGUCHI K, FUJII Y. Molecular mechanism of renal stone formation [J]. *Clin Calcium*, 2011, 21(10): 1481-1487.

[12] TAGUCHI K, OKADA A, KITAMURA H, et al. Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(8): 1680-1697.

[13] KUSMARTSEV S, DOMINGUEZ-GUTIERREZ P R, CANALES B K, et al. Calcium oxalate stone fragment and crystal phagocytosis by human macrophages [J]. *J Urol*, 2016, 195(4): 1143-1151.

(收稿日期: 2020-10-22 修回日期: 2021-03-28)