

·短篇论著·

鲍曼不动杆菌生物膜相关基因研究

蔺飞¹ 袁明勇¹ 凌保东²

【摘要】目的 探讨临床分离鲍曼不动杆菌生物膜相关基因的不同生物膜形成能力。**方法** 收集成都医学院第一附属医院2014年1月至2015年1月住院患者临床分离的鲍曼不动杆菌47株,采用结晶紫染色法测定鲍曼不动杆菌的生物膜形成能力。PCR检测 *abaI*、*bap*、*pgaA*、*pgaB*、*pgaC*、*pgaD*、*csuA/B*、*csuA*、*csuB*、*csuC*、*csuD*、*csuE*、*bfmR*、*bfmS*、*pglC*、*pglL*、*gacS*、*H-NS* 和 *ompA* 等19个生物膜相关基因。采用Pearson卡方检验或连续校正卡方检验分析生物被膜形成能力相关基因检出率。**结果** 47株菌株中生物膜形成菌株13株;共检测到17个生物膜相关基因。基因 *ompA*、*pgaC*、*pgaD* 和 *bfmR* 检出率均为100% (47/47), *pglL* 和 *H-NS* 检出率均为0 (0/47), *bap* 检出率为17.02% (8/47), *csuD* 检出率为53.19% (25/47), 其余基因检出率>85% (40/47)。基因 *bap*、*pgaB*、*csuA/B*、*csuA*、*csuB* 和 *csuD* 在生物膜阳性菌株中的检出率分别为53.85%、92.31%、100%、100%、92.31%和53.85%, 于阴性菌株中检出率分别为2.94%、85.29%、91.18%、97.06%、88.24%和52.94%; *csuA/B* 和 *csuA* 在生物膜阳性菌株检出率均为100%, 在阴性菌株中检出率分别为91.18%和97.06%。基因 *bap* 在生物膜阳性菌株 (53.85%、7/13) 和阴性菌株的检出率 (2.94%、1/34) 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.838$, $P < 0.001$), 而其他基因在阳性和阴性菌株中检出率差异无统计学意义 (P 均>0.05)。**结论** 鲍曼不动杆菌生物被膜相关基因 *bap* 可能促进生物膜的形成。

【关键词】 鲍曼不动杆菌, 生物被膜, 基因

Biofilm formation related genes of *Acinetobacter baumannii* Lin Fei¹, Yuan Mingyong¹, Ling Baodong².

¹Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, China;

²Sichuan Province College Key Laboratory of Structure-Specific Small Molecule Drugs, School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu, China

Corresponding author: Ling Baodong, Email: lingbaodong@cmc.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the different biofilm formation ability of clinical isolation of *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) biofilm related genes. **Methods** A total of 47 *A. baumannii* clinical isolates from January 2014 to January 2015 in the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College were collected to analyze the biofilm formation by crystal violet staining assay. The biofilm genes *abaI*, *bap*, *pgaA*, *pgaB*, *pgaC*, *pgaD*, *csuA/B*, *csuA*, *csuB*, *csuC*, *csuD*, *csuE*, *bfmR*, *bfmS*, *pglC*, *pglL*, *gacS*, *H-NS* and *ompA* were detected by polymerase chain reaction. The clinical isolates biofilm formation ability related genes were analyzed by Pearson Chi-square to analysis or Chi-square test with continuous correction. **Results** Thirteen isolates exhibited biofilm formation ability among 47 clinical isolates, and seventeen genes were detected. The detection rates of gene *ompA*, *pgaC*, *pgaD* and *bfmR* were all 100% (47/47), respectively. The detection rates of *pglL* and *H-NS* were both 0 (0/47), the ratios of *bap* and *csuD* were 17.02% (8/47) and 53.19% (25/47), respectively. The detection rate of other gene was >85% (40/47). The detection rates of gene *bap*, *pgaB*, *csuA/B*, *csuA*, *csuB* and *csuD* were 53.85%, 92.31%, 100%, 100%, 92.31% and 53.85% in positive strains, respectively, which were 2.94%, 85.29%, 91.18%, 97.06%, 88.24% and 52.94%, respectively in negative strains. The detection rate of *csuA/B* and *csuB* were both 100% in positive strains and were 91.18% and 97.06% in negative isolates, respectively. The detection rates of *bap* gene were significantly different between positive (53.85%, 7/13) and negative (2.94%, 1/34) strains, with significant difference ($\chi^2 = 13.838$, $P < 0.001$), but there was no significant difference in the detection rates of other genes between positive and negative strains (all $P > 0.05$). **Conclusion** *A. baumannii* biofilm related gene *bap* may promote the ability of biofilm formation.

【Key words】 *Acinetobacter baumannii*; Biofilm; Gene

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2021.02.010

基金项目: 国家自然科学基金委项目 (No. 81373454)

作者单位: 610500 成都市, 成都医学院第一附属医院药学部¹; 610500 成都市, 成都医学院结构特异性小分子药物研究四川省高校重点实验室²

通信作者: 凌保东, Email: lingbaodong@cmc.edu.cn

临床中80%以上细菌感染发生与生物被膜形成有关^[1-2]；鲍曼不动杆菌生物被膜是一种重要毒力因子，一旦形成可增强细菌耐药性和致病性，可以保护鲍曼不动杆菌在干燥物体表面存活长达100 d之久^[3-4]；鲍曼不动杆菌生物被膜形成是一个包括黏附期、聚集期、成熟期和脱落期等阶段的复杂过程。这个动态变化过程受群体感应、细菌附属物（纤毛和鞭毛）、膜表面蛋白（生物被膜相关蛋白、外膜蛋白）、细胞外基质（多糖蛋白、核酸）、营养（离子、碳源、氮源）、耐药基因等影响和调控^[5-7]。本研究拟检测生物膜形成及调控相关基因，探讨生物被膜形成能力与相关基因间的关系，报道如下。

材料与方法

一、菌株来源

收集2014年1月至2015年1月成都医学院第一附属医院住院患者临床样本中分离的鲍曼不动杆菌47株。质控菌株为鲍曼不动杆菌ATCC 19606，购自美国ATCC菌种库。47株临床菌株来自3个不同类型标本，痰标本占89.36%（42/47），血液标本占2.13%（1/47），灌洗液标本占8.51%（4/47）。其中重症监护病房患者22例（46.81%），呼吸科9例（19.15%），神经科6例（12.77%），感染科1例（2.13%），其他科室9例（19.15%）。

二、生物膜形成的测定

采用结晶紫染色法测定鲍曼不动杆菌生物膜形成能力。96孔板中加入180 μ l胰酪大豆胨液体培养基（tryptic soy broth, TSB）和吸光度 A_{600} 为0.1的鲍曼不动杆菌重悬液20 μ l，37 $^{\circ}$ C孵育24 h，移除培养基并200 μ l磷酸缓冲液洗涤3遍，空气中干燥后0.1%结晶紫染色15 min，磷酸缓冲液洗涤3遍，空气中干燥30 min，95%酒精溶解15 min，测吸光度 A_{570} ，以ATCC19606作为阳性对照。比较临床菌株与阳性对照株的吸光度，大于阳性对照判定形成生物被膜，小于

阳性对照判断为未形成生物被膜^[8]。

三、生物膜相关基因检测

复苏后的菌株重悬液采用煮沸法95 $^{\circ}$ C加热15 min提取临床菌株DNA。PCR检测生物被膜相关基因：abaI、bap、pgaA、pgaB、pgaC、pgaD、csuA/B、csuA、csuB、csuC、csuD、csuE、bfmR、bfmS、pglC、pglL、gacS、H-NS及ompA。通过blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 查找对应基因并设计引物（表1）。扩增体系：2 \times Taq Master Mix 13 μ l，上、下游引物各1 μ l，DNA模板1 μ l，ddH₂O 10 μ l，共25 μ l。扩增参数：95 $^{\circ}$ C预变性5 min，95 $^{\circ}$ C变性30 s，55 $^{\circ}$ C退火30 s，72 $^{\circ}$ C延伸1 min，共30次循环，72 $^{\circ}$ C延伸10 min，并设空白对照。

四、统计学处理

应用SPSS 21.0软件进行统计学分析，生物被膜形成阳性和阴性菌株数、相关基因检出阳性菌株和阴性菌株数量为计数资料，采用Pearson卡方检验或连续校正卡方检验分析生物膜相关基因检出率，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、生物膜相关基因检出率

共有生物膜形成阳性菌株有13株；阴性菌株34株。47株临床菌株共检测出17个基因生物被膜相关基因，其中ompA、pgaC、pgaD和bfmR检出率为100%，pglL和H-NS检出率为0，bap检出率为17.02%（8/47），csuD检出率为53.19%（25/47），其余基因检出率均 $> 85\%$ （40/47），详见表2。其中基因bap、pgaB、csuA/B、csuA、csuB和csuD在生物被膜阳性菌株中的检出率高于生物被膜阴性菌株，但仅基因bap在生物被膜阳性菌株和阴性菌株中的检出率[分别为53.85%（7/13）和2.94%（1/34）]差异有统计学意义（ $\chi^2 = 13.838$ 、 $P < 0.001$ ），基因abaI、pgaA、csuC、csuE、bfmS、pglC和gacS在生物被膜阴性菌株的检出率高于阳性菌株，但差异均无统计学意义（ P 均 > 0.05 ）。

表1 基因引物序列及目的产物长度

基因	引物	核酸序列（5'→3'）	长度（bp）
opmA	F	GTAAAGCGACGTAGACG	578
	R	CCAGTGTATCTGTGTGACC	
abaI	F	GCCAGACTACTACCCACCAC	159
	R	CACAGCCTGACTGCTAGAGG	
bap	F	CAGCAACGGTTGTAGGGGTA	224
	R	AGCATCTGCCGAAGGATCTG	
pgaA	F	AGTGCTGGAGCAAGGACAAA	358
	R	AAGCCGATCAACTTCAGCGA	
pgaB	F	CATACTGCCCCATCGCCATCT	856
	R	TCTGATTGGAAGCCCATTCGC	
pgaC	F	GCTCACAACGGCTAATGCAG	892
	R	AGCTCCGCCTTATGATCAGC	
pgaD	F	AGCGTACCTTTGGCCGTTTA	413
	R	GCTCACAACGGCTAATGCAG	
csuA/B	F	CAGCAGCAACAGGTGGCAATA	167
	R	AAGGTTTGTACGTGCAGCATCA	

续表 1

csuA	F	TCATGGGCTGCTTGACCAAA	431
	R	AATGCGGGTGAAATTGGTGC	
csuB	F	ATGCAGCAGATCCTCAGCTC	365
	R	TGCCAGACGGTTTGTAGGTG	
csuC	F	CAACTGCGGTTTGGCTTCAA	469
	R	CGCGCAAACCTTCTGACCATT	
csuD	F	TGGCCTATCCGGTTCCCTAA	215
	R	AATCGATTGGGTCGACGCTG	
csuE	F	TCTATTCTGTGCCCCGAGTC	205
	R	TCAAGCTTGGAAGCAAACGC	
bfmR	F	ATGTTGCCGGGTGCAGAT	540
	R	TTACAATCCATTGGTTTCTTTAACAA	
bfmS	F	TCGGCGGGTATTACCTTATTAGCT	221
	R	GCCTCAATCAAACGCTGAATATGGT	
PglL	F	GACGGTAGCTGTTGGGACAA	533
	R	ACCCTAACCAAGGATGCTGC	
GacS	F	CGTGTGTTGGGGCTTTTCTG	552
	R	TGTCTGCATTGAGACGCTGT	
H-NS	F	TTCTCTACGCTATCAGCGGC	236
	R	ACACCGCAGGATTCCATGTC	
PglC	F	AGCAACCGACTTTTAGCCCC	773
	R	CATGCTGGTGTAAATGGCAGC	

表 2 鲍曼不动杆菌生物膜相关基因检出率 [株 (%)]

基因	合计	生物被膜菌株		χ^2 值	P值
		阳性 (13株)	阴性 (34株)		
abaI	40 (85.11)	10 (76.92)	30 (88.24)	0.949	0.330
bap	8 (17.02)	7 (53.85)	1 (2.94)	13.838	< 0.001 ^a
pgaA	44 (93.62)	12 (92.31)	32 (94.12)	0.052	0.820
pgaB	41 (87.23)	12 (92.31)	29 (85.29)	0.415	0.519
pgaC	47 (100.00)	13 (100.00)	34 (100.00)	—	—
pgaD	47 (100.00)	13 (100.00)	34 (100.00)	—	—
csuA/B	44 (93.62)	13 (100.00)	31 (91.18)	1.225	0.268
csuA	46 (97.87)	13 (100.00)	33 (97.06)	0.391	0.532
csuB	42 (89.36)	12 (92.31)	30 (88.24)	0.164	0.685
csuC	45 (95.74)	12 (92.31)	33 (97.06)	0.521	0.470
csuD	25 (53.19)	7 (53.85)	18 (52.94)	0.003	0.956
csuE	44 (93.62)	12 (92.31)	32 (94.12)	0.052	0.820
bfmR	47 (100.00)	13 (100.00)	34 (100.00)	—	—
bfmS	45 (95.74)	12 (92.31)	33 (97.06)	0.521	0.470
pglC	42 (89.36)	11 (84.62)	31 (91.18)	0.426	0.514
pglL	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	—	—
gacS	45 (95.74)	12 (92.31)	33 (97.06)	0.521	0.470
H-NS	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	—	—
ompA	47 (100.00)	13 (100.00)	34 (100.00)	—	—

注：“—”未行统计学分析；^a：连续校正卡方检验，其他均采用 Pearson 卡方检验

讨 论

生物膜是细菌抵御抗菌药物杀灭作用的第一道防线，可减少抗菌药物的渗透，降低生物被膜内环境内抗菌药物浓度，介导对抗菌药物的抵抗^[9-10]。鲍曼不动杆菌是医院内常见引起生物膜相关感染的条件致病菌^[11-12]。鲍曼不动杆菌生物膜形成是一个复杂的过程；首先，浮游细菌受到细胞内外信号刺激激活BfmR/S与GacA/S等调控机制调节细

菌csuA/BABCDE表达编码合成菌毛，介导细菌黏附物体表面并形成微菌落；其次，菌落激活群体感应系统调控基因abaI/abaR调控自诱导信号分子AHLs分泌，促进细菌之间信息交流和细菌向生物被膜转化^[5]，细菌产生大量细胞外基质包裹细菌不断增厚形成生物被膜；然后，pgaABCD编码多聚β-1, 6-乙酰葡萄糖胺（PNAG）促进生物被膜成熟；最后，在一定条件下细菌产生水解酶破坏细胞外基质，释放细菌分散成为浮游细菌，浮游细菌在一定条件下又再次

形成生物被膜^[13-14]。此外,生物被膜相关蛋白Bap^[15]、外膜蛋白A (OmpA)^[16]、组蛋白类核结构(H-NS)^[17]、pglC和pglL^[18]等在生物被膜形成过程中对促进生物被膜形成和维持生物被膜结构等具有一定作用。

本研究根据文献报道生物膜形成过程中相关基因对生物被膜形成的调节作用,检测了19个生物被膜相关基因,并分析比较了13株生物膜阳性菌株与阴性菌株间的检出率差异。其中ompA、pgaC、pgaD和bfmR检出率为100%,bap检出率为17.02%,csuD检出率为53.19%,pglL和H-NS检出率为0,其余基因检出率均大于85%。bap与csuD检出率低于皇甫昱婵等^[19]研究结果;bap和abaI的检出率低于牛付轩等^[20]研究结果。本研究中部分生物被膜相关基因在生物被膜阳性和阴性菌株中检出率存在差异,阳性菌株中基因bap、pgaB、csuA/B、csuA、csuB和csuD的检出率高于阴性菌株,但仅bap基因在阳性菌株和阴性菌株中的检测率分别为53.85%和2.94%,差异有统计学意义。本研究发现,除bap基因外,携带这些生物膜相关基因的生物被膜形成能力并无差异,这与皇甫昱婵等^[19]研究结果相似。导致以上现象的原因有:①生物膜形成是多个机制共同作用的结果,调节生物膜形成的基因存在表达差异及基因突变等,但基因表达及突变差异并不影响基因检测率的改变^[21-22];Amin等^[23]研究显示bap、ompA、abaI、pgaA和csuE在生物被膜细菌中的表达显著高于无生物被膜细菌。②细菌的耐药机制也对生物被膜的形成具有一定的影响,如Lee等^[24]研究显示blaPER-1基因表达促进鲍曼不动杆菌生物膜形成。③生物膜形成过程中不只受基因调节的影响,而且温度、光照、营养条件、离子浓度等条件也对生物膜形成具有影响^[5, 15, 25]。因此,生物膜形成的过程中基因间如何相互影响,从而调节生物膜仍存在诸多问题待进一步研究。

生物膜形成是细菌从浮游状态到生物被膜状态再到浮游状态的循环过程,这个过程是细菌状态的改变,也是多种细菌共同作用的结果,在这个过程中基因表达受到细胞内外因素的调节。生物膜菌株中携带不同的基因,本研究检测了鲍曼不动杆菌生物膜形成及相关基因携带,为鲍曼不动杆菌生物膜形成的研究提供一定依据。

参 考 文 献

- [1] 马晓春,代军,徐磊,等.鲍曼不动杆菌生物膜形成机制研究进展[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(1):124-128.
- [2] Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation[J]. J Antimicrob Chemother,2018,73(8):2003-2020.
- [3] Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*[J]. New Microbiol,2014,37(2):119-127.
- [4] Chapartegui-Gonzalez I, Lazaro-Diez M, Bravo Z, et al. *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation[J]. PLoS

One,2018,13(8):e0201961.

- [5] 杨长亮,黄前川.鲍曼不动杆菌生物膜形成的调节[J].中国感染控制杂志,2012,11(3):228-230,235.
- [6] 蔺飞,余彬,袁明勇,等.鲍曼不动杆菌生物被膜形成与调控的研究进展[J].中国感染控制杂志,2019(12):1176-1183.
- [7] Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters[J]. FEMS Immunol Med Microbiol,2011,62(3):328-338.
- [8] 蔺飞,杜冰洁,高灿,等.鲍曼不动杆菌生物被膜对抗菌药物耐药性的影响[J].中国感染控制杂志,2018,17(1):1-5.
- [9] Zhou G, Shi QS, Huang XM, et al. The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents[J]. Int J Mol Sci,2015,16(9):21711-21733.
- [10] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections[J]. J Chin Med Assoc,2018,81(1):7-11.
- [11] Eze EC, Chenia HY, El Zowalaty ME. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments[J]. Infect Drug Resist,2018,11:2277-2299.
- [12] Zhang HZ, Zhang JS, Qiao L. The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review[J]. World J Emerg Med,2013,4(3):169-174.
- [13] Cabral MP, Soares NC, Aranda J, et al. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism[J]. J Proteome Res,2011,10(8):3399-3417.
- [14] Wood CR, Mack LE, Actis LA. An update on the *Acinetobacter baumannii* regulatory circuitry[J]. Trends Microbiol,2018,26(7):560-562.
- [15] 黎皓思,潘频华.鲍曼不动杆菌黏附相关机制研究进展[J].中国感染与化疗杂志,2015,15(5):496-500.
- [16] Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells[J]. Infect Immun,2009,77(8):3150-3160.
- [17] Eijkelkamp BA, Strocher UH, Hassan KA, et al. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features[J]. Infect Immun,2013,81(7):2574-2583.
- [18] Lees-Miller RG, Iwashkiw JA, Scott NE, et al. A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*[J]. Mol Microbiol,2013,89(5):816-830.
- [19] 皇甫昱婵,刁文晶,俞静,等.鲍曼不动杆菌生物被膜形成能力的研究[J].诊断学理论与实践,2019,18(5):532-537.
- [20] 牛付轩,吴亮,王廷廷,等.临床分离鲍氏不动杆菌生物膜形成能力与耐药性关系研究[J].中华医院感染学杂志,2018,28(18):2721-2724,2730.
- [21] Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen[J]. Crit Rev Microbiol,2010,36(4):349-360.
- [22] De Gregorio E, Del Franco M, Martinucci M, et al. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*[J]. BMC Genomics,2015,16:933.
- [23] Amin M, Navidifar T, Shooshtari FS, et al. Association between biofilm formation, structure, and the expression levels of genes related to biofilm formation and biofilm-specific resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burn infection in Ahvaz, Iran[J]. Infect Drug Resist,2019,12:3867-3881.
- [24] Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion[J]. Med Sci Monit,2004,10(6):180-184.
- [25] Fiester SE, Actis LA. Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*[J]. Future Microbiol,2013,8(3):353-365.

(收稿日期:2020-04-29)

(本文编辑:孙荣华)