

# 鲍曼不动杆菌碳青霉烯耐药性与生物膜形成及 O-甘露糖蛋白相关性研究

邓国英<sup>1</sup>, 杨淑凤<sup>1</sup>, 任峰<sup>2</sup>, 崔明<sup>3</sup>, 隋韶光<sup>3\*</sup>

(1. 大连医科大学 微生物学教研室, 辽宁 大连 116044; 2. 大连医科大学附属第二医院 检验科, 辽宁 大连 116023;

3. 大连医科大学附属第二医院 急诊医学科, 辽宁 大连 116023)

**摘要** 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是引起医院感染的常见致病菌,该细菌不仅容易产生耐药性,而且在人体及无生命物质表面易形成生物膜,临床治疗较为棘手。从临床分离 24 株鲍曼不动杆菌,药物敏感试验观察这些分离株对常用抗菌药物的敏感性,针对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌,检测是否含有耐药基因碳青霉烯酶基因 *OXA-23*,采用结晶紫染色法观察耐药性与生物膜形成的相关性,并用刀豆蛋白凝集素结合试验及质谱分析耐药性与 O-甘露糖蛋白的相关性。结果显示鲍曼不动杆菌耐药性与生物膜形成呈正相关,某些 O-甘露糖蛋白表达有利于细菌获得耐药性。

**关键词** 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*); 耐药性; 生物膜; O-甘露糖蛋白

**中图分类号** Q939.93 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2020)02-0044-05

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.02.005

## Reciprocity in Drug Resistance and Biofilm Formation as well as O-Mannoprotein in Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii*

DENG Guo-ying<sup>1</sup>, YANG Shu-feng<sup>1</sup>, REN Feng<sup>2</sup>, CUI Ming<sup>3</sup>, SUI Shao-guang<sup>3</sup>

(1. Teach. & Res. Div. of Microbiol., Dalian Med. Uni., Dalian 116044; 2. Dept. of Clin. Lab.,

3. Dept. of Emergency Med., The 2nd Affil. Hosp., Dalian Med. Uni., Dalian 116023)

**Abstract** *Acinetobacter baumannii* is a common pathogen in hospital infection. It is not only easily to produce drug resistance but also easily to form biofilm in human body as well as on non-biotic surfaces, it is comparatively troublesome in clinical treatment. In this experiment, 24 *A. baumannii* strains were isolated from clinic. The antibacterial drug susceptibility test was observed to detect the bacterial resistance to common antibiotics if they had carbapenemase gene *OXA-23*. The reciprocity in drug resistance and biofilm formation was observed adopting crystal violet staining, and mass spectrometrically analyzed the reciprocity in drug resistance and O-mannoprotein adopting sword bean (*Canavalia gladiata*) agglutinin (ConA) for combining experiment. The results showed that the drug resistance had positive correlation with biofilm formation, and certain O-mannoprotein expression conducive to the bacteria to gain drug resistance.

**Keywords** *Acinetobacter baumannii*; drug resistance; biofilm; O-mannoprotein

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)广泛分布于土壤和水等环境中,也存在于健康人的皮肤粘膜及腔道中,目前是引起医院感染的常见的

机会性致病菌<sup>[1]</sup>,该细菌易通过基因组变异获得耐药性并通过遗传物质的转移和重组进行传播<sup>[2]</sup>。在美国,临床分离到的鲍曼不动杆菌约

基金项目:辽宁省自然科学基金项目(20180550594)

作者简介:邓国英 女,讲师,博士。主要从事病原微生物研究。E-mail: dhgxy2000@163.com

\* 通讯作者。男,主任医师,博士,硕士研究生导师。研究方向为病原菌耐药机制。Tel:0411-84671291, E-mail: 332915929@qq.com

收稿日期:2019-11-30

45% 为多重耐药菌,在拉丁美洲和中东地区,则高达 70%<sup>[3]</sup>。碳青霉烯类如亚胺培南曾经是治疗该菌感染的首选抗菌药物,但是临床分离株对此类药物已经失去敏感性,多个耐药基因参与耐药性的形成<sup>[4]</sup>。鲍曼不动杆菌临床分离株对外界抵抗力强,容易在机体或无生命材料表面形成生物膜<sup>[5]</sup>,生物膜作为细菌重要的致病机制之一,可以帮助细菌抵抗外界压力如抗菌药物,并有利于耐药性的传递。此外,在链球菌<sup>[6]</sup>、结核分枝杆菌<sup>[7]</sup>等致病菌的研究中,O-甘露糖蛋白在细菌耐药中发挥重要作用,是重要的毒力因子。为了探讨鲍曼不动杆菌耐药性与生物膜形成及 O-甘露糖的关系,从大连医科大学附属第二医院收集 24 株鲍曼不动杆菌,用药物敏感试验观察这些菌株对常用抗菌药物的敏感性,针对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌,采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测耐药基因碳青霉烯酶基因 *OXA-23* 的有无,分析细菌耐药性与生物膜形成的相关性,并探讨耐药性与 O-甘露糖蛋白表达的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 临床分离株均来自大连医科大学附属第二医院住院病人的痰标本。

1.1.2 培养基 哥伦比亚血平板及肉汤培养基,分别用于细菌的分离培养及增菌培养。

1.1.3 材料与仪器 细菌鉴定及药敏分析仪为梅里埃 VITEK 2 Compact,抗菌药物的 E-test 试纸条来自法国梅里埃生物公司,基因扩增仪购自美国 Bio-RAD 公司,DNA 提取试剂盒、DNA Marker DL2000 及 PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品,琼脂糖凝胶电泳仪来自大连捷迈科贸公司,结晶紫、刀豆蛋白凝集素 A (Concanavalin A, Con A)、ProteoSilver™ Plus 银染试剂盒及 ConA 琼脂糖层析柱购自 Sigma 公司,高速冷冻离心机为日本日立公司生产。使用的质谱仪器为基质辅助激光飞行时间质谱仪 5800 MALDI-TOF/TOF,为 AB SCIEX 生产。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株分离培养、鉴定及药物敏感试验 细

菌培养严格按照无菌操作进行,VITEK2 Compact 分析仪作细菌种属鉴定,质控菌株为霍氏肠杆菌 (ATCC700323)。VITEK 2 Compact 分析仪也用于氨苄西林/舒巴坦等 12 种抗菌药物敏感试验,测定最小抑菌浓度值 (minimal inhibitory concentration, MIC)。头孢哌酮、米诺环素及替加环素药物敏感试验则采用纸片扩散法。药敏试验质控菌株为大肠埃希菌 (ATCC25922) 和铜绿假单胞菌 (ATCC27853)。

1.2.2 碳青霉烯酶 *OXA-23* 基因检测 鲍曼不动杆菌 DNA 提取按照试剂盒说明进行,*OXA-23* 基因扩增所使用引物为 F: 5'-AAGCATGATGACG-CAAAG-3', R: 5'-AAAAGGCCCATTTATCTCAAA-3', *OXA-58* 基因引物为 F: 5'-GGTTAGTTGGC-CCCCTTAAAPCR-3', R: 5'-AGTTGAGCGAAAAGG-GGATT-3',反应体系 50  $\mu$ L,包括 10  $\times$  Pfu PCR Buffer 5  $\mu$ L,10 mmol/L dNTP mixture 5  $\mu$ L,Pfu DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L,上游引物 1  $\mu$ L,下游引物 1  $\mu$ L,DNA 模板 1  $\mu$ L,灭菌 ddH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,1 个循环;95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 100 s,共 30 个循环;延伸温度为 72  $^{\circ}$ C,1 个循环,时间 15 min。PCR 反应结束后,用含 0.5  $\mu$ L/mL 溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

1.2.3 生物膜形成试验 培养鲍曼不动杆菌至 OD 值为 0.5,取 200  $\mu$ L 培养物加入微孔板,培养 8 h,PBS 清洗 3 次,1% 结晶紫染色 30 min,双蒸水清洗去除多余染液,乙醇洗脱,570 nm 测定 OD 值,每组设 3 复孔,仅含有培养基孔为对照组。

1.2.4 O-甘露糖蛋白的获得及确证 ①膜蛋白的提取及定量:离心收获耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌及非耐药菌,超声碎菌后,再次离心,取上清,4  $^{\circ}$ C 100 000  $\times$  g 超速离心 1 h,沉淀膜蛋白,Bradford 法定量蛋白。②ConA 琼脂糖亲和层析获得 O-甘露糖基化蛋白:用缓冲液 (1 mol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L MnCl<sub>2</sub> 和 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>) 冲洗 ConA 琼脂糖层析柱,然后进行层析柱的平衡。膜蛋白配成浓度为 1 mg/mL,流经层析柱。应用平衡缓冲液冲洗。最后用 200 mmol/L 甘露糖苷洗脱目的蛋白,收获洗脱液并浓缩。③ O-甘露糖蛋白的确证和解析:将蛋白进行 12% SDS-PAGE,然后转移至 PVDF 膜,封闭后,用 1:

5 000 的辣根过氧化物酶标记的 ConA (Sigma) 室温孵育 16 h 后,洗膜后化学发光显色。同时电泳后的蛋白条带银染,切下质谱分析,并使用在线甘露糖基化位点预测软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) NetOGlyc 4.0 Server 进行蛋白质的糖基化位点预测。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲍曼不动杆菌的样本来源及临床分布

本研究收集的 24 株鲍曼不动杆菌均来自痰液的分离培养,其中 21 株来自重症医学科,其余 3 株分别来自神经外科、儿科和肾内科。标本来源以重症肺炎患者居多(16 株)。

### 2.2 标本分离株的药物敏感试验结果

24 株临床分离的鲍曼不动杆菌对 15 种抗菌药物耐药情况见表 1。

表 1 分离菌株对抗菌药物的耐药率

Table 1 The ratio of strains resistant to antibacterial drugs

抗菌药物	敏感/株	中介/株	耐药/株	耐药率/%
氨苄西林/舒巴坦	1	0	23	95.83
哌拉西林/他唑巴坦	0	1	23	95.83
头孢他啶	0	0	24	100.00
头孢曲松	0	0	24	100.00
头孢吡肟	0	1	23	95.83
亚胺培南	4	0	20	83.33
庆大霉素	0	0	24	100.00
妥布霉素	1	0	23	95.83
环丙沙星	1	0	23	95.83
左氧氟沙星	1	0	23	95.83
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑	10	0	14	58.33
头孢哌酮/舒巴坦	0	1	23	95.83
米诺环素	7		17	70.83
替加环素	21		3	12.50
哌拉西林	0	0	24	100.00

从表 1 可以看出,24 株鲍曼不动杆菌对头孢他啶、头孢曲松、庆大霉素及哌拉西林均耐药,对亚胺培南的耐药率为 83.33%,替加环素耐药率最低,为 12.50%。

### 2.3 碳青霉烯酶基因 OXA-23 的检测

针对 20 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌,检测了碳青霉烯酶基因 OXA-23。PCR 结果显示,13 株检测到 OXA-23 基因片段,基因片段长度为 1 066 bp (图 1),检出率为 65%。

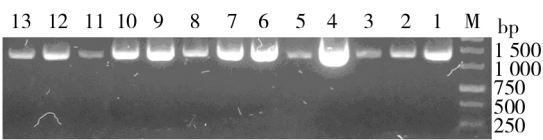


图 1 鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因 OXA-23 PCR 结果

Fig. 1 PCR products of *A. baumannii* carbapenemase gene OXA-23

M: DNA 分子标记;1~13:PCR 产物  
20 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌中,13 株检测到碳青霉烯酶基因 OXA-23

M: DNA Marker;1-13: PCR products  
OXA-23 gene was detected in 13 of 20 carbapenem resistant *A. baumannii* strains

### 2.4 鲍曼不动杆菌耐药性与生物膜相关性

结晶紫染色法显示,耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌生物膜形成能力比非耐药菌更强(图 2),这可能是因为细菌形成生物膜后耐药基因更容易传递,因而形成生物膜的菌株更易获得耐药性。

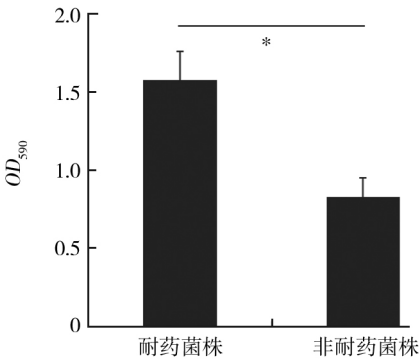


图 2 鲍曼不动杆菌碳青霉烯耐药性与生物膜形成的相关性

Fig. 2 The correlation between carbapenem resistance and biofilm formation in *A. baumannii*  
\*  $P < 0.05$

### 2.5 鲍曼不动杆菌碳青霉烯耐药性与 O-甘露糖蛋白表达的关系及糖基化位点预测

亲和层析获得的蛋白经 SDS-PAGE、转膜及 ConA 识别,耐药菌株为 5 个条带,非耐药菌为 4 个条带(图 3A),电泳及银染后,将蛋白条带(图 3B)切除作质谱分析,结果显示,5 个蛋白分别为 OmpA/MotB、A1S\_2371、A1S\_0556、A1S\_3744 和 A1S\_3626,其中非耐药菌株缺少 A1S\_3626。糖基化位点位于 Ser 和 Thr 上,位点总数从 7 个到 28 个不等(表 2)。

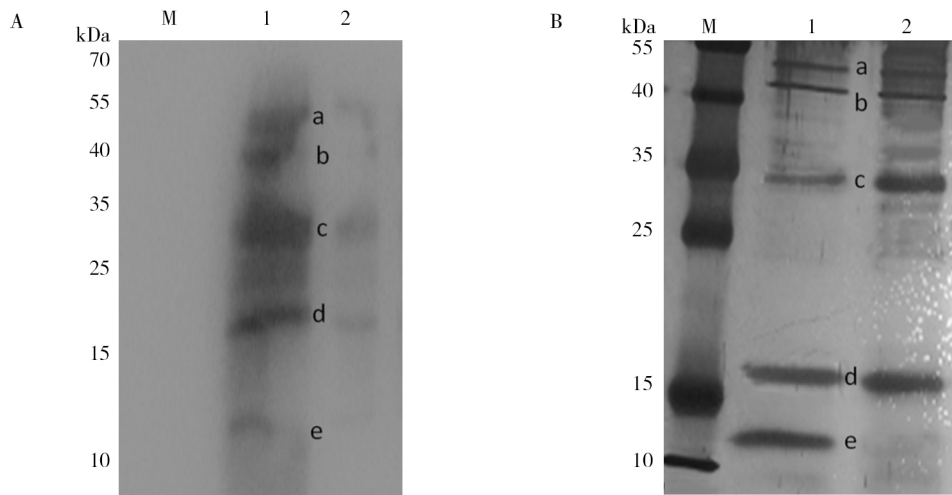


图 3 亲和层析洗脱液 ConA 结合试验 (A) 及银染结果 (B)

Fig. 3 The binding assay of ConA with elutes of affinity chromatography (A) and silver stain (B)

a ~ e:检测到的糖蛋白条带  
a-e:The detected protein bands

表 2 鲍曼不动杆菌 O-甘露糖基化蛋白质谱结果和糖基化位点预测

Table 2 MS analysis of O-mannosylated proteins and prediction of glycosylated sites in *A. baumannii*

条带序号	质谱结果	蛋白名称	甘露糖基化位点	位点总数
a	A1S_ 1193	OmpA/MotB	151Ser/152Ser/153Thr/161Thr/163Thr/320Thr/339Ser	7
b	A1S_ 2371	Putative uncharacterized protein	23Ser/24Thr/25Thr/35Ser/51Ser/52Thr/62Thr/73Ser/74Thr/ 75Thr/89Ser/94Ser/95Thr/99Thr/102Thr/103Thr/104Thr/106Thr/ 108Ser/109Thr/111Thr/112Ser/117Thr/119Thr/122Ser/165Thr/ 188Thr	27
c	A1S_ 0556	Putative uncharacterized protein	4Ser/31Ser/53Thr/56Ser/238Ser/305Ser/306Thr	7
d	A1S_ 3744	Putative uncharacterized protein	26Thr/37Thr/52Ser/55Ser/58Thr/76Thr/79Thr/80Thr/81Thr/87Thr/ 92Ser/95Ser/96Ser/98Thr/106Ser/108Thr/132Ser/139Thr/144Thr/ 157Thr	20
e	A1S_ 3626	Putative uncharacterized protein	43Thr/55Ser/61Thr/65Ser/79Thr/86Thr/89Thr/94Thr/97Thr	9

3 讨 论

近年来,鲍曼不动杆菌成为医院重症患者感染常见的致病菌,一方面是由于细菌对外界因素有较强的抵抗力,易于在医院环境及医疗器械上存活,另一方面,由于该细菌耐药菌株甚至多重耐药菌株的感染迅速增多,给治疗增加了难度<sup>[8]</sup>。

本研究从临床分离 24 株鲍曼不动杆菌,这些患者多为重症肺炎,部分伴有其他慢性疾病。对这些临床株进行抗菌药物敏感试验,发现耐药严重(表 1)。碳青霉烯类抗菌药物属于 β-内酰胺类,但是对细菌产生的 β-内酰胺酶稳定,曾经是

治疗鲍曼不动杆菌感染的重要药物,如今耐药率不断上升,药物敏感试验结果显示耐药率为 83.33%。鉴于此,世界卫生组织已经将耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌列为严重威胁人类健康的细菌,借此提醒医务工作者及患者防范该细菌<sup>[9]</sup>。

OXA 类碳青霉烯酶分为四个类别,分别是 OXA-23、OXA-24、OXA-51 和 OXA-58,是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物产生耐药性最主要的原因<sup>[10]</sup>。OXA-23 介导的耐药性最为多见,它由质粒编码,耐药性可随质粒在细菌间扩散<sup>[11]</sup>。用 PCR 方法在基因水平检测 OXA-23 基因的有无,结果显示在 20 株耐碳青霉烯菌中 13 株为阳性,

可见产生这一基因位于多数耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的遗传物质上。生物膜形成是细菌致病机制之一,细菌通过这种“群体行为”抵抗外界的压力,引起医院感染的常见细菌如肺炎克雷伯菌等耐药基因与生物膜有关<sup>[12]</sup>。鲍曼不动杆菌临床分离株在病人体内形成生物膜可能更有利于耐药基因在菌株间传递,所以结晶紫染色法显示耐药菌株形成生物膜的能力更强。

蛋白 O-甘露糖修饰研究主要见于真核细胞,近些年,包括分枝杆菌属在内的多个种属细菌蛋白也存在 O-甘露糖修饰<sup>[13]</sup>。O-甘露糖蛋白被认为是细菌重要的毒力因子,将鲍曼不动杆菌 O-甘露糖基转移酶敲除,将大大减弱细菌形成生物膜的能力,提示蛋白连接的甘露糖在生物膜形成中的重要作用<sup>[14]</sup>。OmpA 是目前已知的可增强细菌耐药性的 O-甘露糖蛋白<sup>[15]</sup>,在本研究中,耐药菌株和非耐药菌株 O-甘露糖蛋白的区别主要体现在 AIS\_3626 上,提示这一 O-甘露糖基化蛋白可能在细菌耐药及生物膜形成中有重要作用。O-甘露糖蛋白提高细菌耐药性的机制还不是很清楚,已有的研究提示糖链可能在此功能上很重要<sup>[14]</sup>,通过糖基化位点预测,5 种蛋白的糖基化位点共 7~28 个不等,下一步将对检测到的 5 种糖蛋白的糖链进行解析,进一步探讨包括 AIS\_3626 在内的 O-甘露糖蛋白在耐药性及生物膜形成中的作用。

## 参考文献:

- [1] Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16 (2): 91-102.
- [2] Roca I, Espinal P, Vila-Farres, et al. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace[J]. Front Microbiol, 2012, 3: 148.
- [3] Giammanco A, Cala C, Fasciana T, et al. Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial[J]. mSphere, 2017; e00310-316.
- [4] Uddin F, Mchugh, Roulston K, et al. Detection of carbapenemases, *AmpC* and *ESBL* genes in *Acinetobacter* isolates from ICUs by DNA microarray[J]. J Microbiol Methods, 2018, 155: 19-23.
- [5] Greene C, Wu J, Rickard A, et al. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different bio-medical relevant surfaces[J]. Lett Appl Microbiol, 2016, 63: 233-239.
- [6] Bandara M, Skehel JM, Kadioglu A, et al. The accessory Sec system (SecY2A2) in *Streptococcus pneumoniae* is involved in export of pneumolysin toxin, adhesion and biofilm formation[J]. Microbes Infect, 2017, 19(7-8): 402-412.
- [7] Liu CF, Tonini L, Malaga W, et al. Bacterial protein-O-mannosylating enzyme is crucial for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(16): 6560-6565.
- [8] Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(1): 409-447.
- [9] Organization WH. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. WHO, 2017 [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1).
- [10] Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, et al. High prevalence of OXA-51-type class D Beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centers [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58: 537-542.
- [11] Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, et al. Molecular characterization of carbapenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit of a tertiary care centre at central India[J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(5): 38-40.
- [12] Lee H, Baek JY, Kim SY, et al. Comparison of virulence between matt and mucoid colonies of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 isolated from a single patient[J]. J Microbiol, 2018, 56(9): 665-672.
- [13] Smith GT, Sweredoski MJ, Hess S. O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. [J] J Proteomics, 2014, 97: 296-306.
- [14] Iwashiki JA, Seper A, Weber BS, et al. Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(6): e1002758.
- [15] Kwon HI, Kim S, Oh MH, et al. Outer membrane protein A contributes to antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* through the OmpA-like domain[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(11): 3012-3015.