

· 论著 ·

本文亮点:

- (1) 对 177 例糖尿病足患者创面中检测出的 233 株鲍曼不动杆菌分析显示,耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)的阳性检出率>80%,多重耐药鲍曼不动杆菌的阳性检出率>90%。
- (2) 分析显示糖尿病足创面中的 CRAB 有完善的生物膜基因和群体感应基因,进一步增加了其对抗生素耐药的程度。

Highlights:

- (1) The analysis of 233 strains of *Acinetobacter baumannii* detected in 177 patients with diabetic foot wounds showed that the positive detection rate of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) was more than 80%, and the positive detection rate of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* was more than 90%.
- (2) The analysis showed that CRAB in the wound of diabetic foot had perfect biofilm genes and quorum sensing genes, which further increased the degree of antibiotic resistance.



糖尿病足创面中耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的生物膜基因和群体感应基因分析

徐俊¹ 韩晓翠² 何璐³ 冯书红¹ 孙东建¹ 曹晨¹ 刘熙姣² 张艳燕² 丁百兴⁴
常柏¹

¹天津医科大学朱宪彝纪念医院糖尿病足科,天津市内分泌研究所,国家卫生健康委激素与发育重点实验室,天津市代谢性疾病重点实验室,天津 300134;²新疆生产建设兵团第六师医院内分泌科,五家渠 831300;³天津医科大学朱宪彝纪念医院检验科,天津市内分泌研究所,国家卫生健康委激素与发育重点实验室,天津市代谢性疾病重点实验室,天津 300134;⁴复旦大学华山医院抗生素研究所,上海 200040

通信作者:常柏,Email:changbai1972@126.com

【摘要】 目的 探讨糖尿病足创面中耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)生物膜基因和群体感应基因情况,以及 CRAB 对抗生素的耐药情况。方法 该研究为实验研究。2020 年 10 月—2023 年 9 月,天津医科大学朱宪彝纪念医院糖尿病足科收治 177 例符合入院标准的糖尿病足患者,其中男 128 例、女 49 例,年龄(56±10)岁。在糖尿病足创面中培养出 233 株鲍曼不动杆菌,采用肉汤微量稀释法对所有鲍曼不动杆菌进行药物敏感试验,然后采用全自动药敏仪进行鉴定并对其耐药率进行分析。随机选择 10 株 CRAB[来自 10 例患者,男 9 例、女 1 例,年龄(63±12)岁]和 10 株碳青霉烯类敏感鲍曼不动杆菌[CSAB;来自 10 例患者,男 8 例、女 2 例,年龄(63±9)岁],提取 DNA 全基因组并进行测序,使用综合抗生素耐药基因数据库对耐药基因进行注释,绘制系统发育树分析 CRAB 与 CSAB 的同

DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20240715-00269

本文引用格式:徐俊,韩晓翠,何璐,等.糖尿病足创面中耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的生物膜基因和群体感应基因分析[J].中华烧伤与创面修复杂志,2024,40(12):1-9. DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20240715-00269.

Xu Jun, Han Xiaocui, He Lu, et al. Biofilm and quorum sensing genes analysis of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in diabetic foot wound[J]. Chin J Burns Wounds, 2024, 40(12): 1-9. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20240715-00269.



源关系。将鲍曼不动杆菌的 7 个管家基因输入网站 <https://pubmlst.org/>, 分析 CRAB 与 CSAB 的多位点序列分型。将测得的全部基因放入 PubMLST 网站查找每株鲍曼不动杆菌是否携带生物膜基因 *bap*、*csuA*、*csuB*、*csuA/B*、*csuC*、*csuD*、*csuE*、*pagA*、*pagB*、*pagC*、*pagD*、*bfmR*、*bfmS*、*ompA* 和群体感应基因 *abaI*、*abaR* 及鞭毛基因 *pilA*, 并比较 CRAB 与 CSAB 携带这些基因的差异。将 CRAB 与 CSAB 的生物膜基因、群体感应基因分别与苯唑西林酶 (*OXA*) 耐药基因 *blaOXA* 进行相关性分析。大体观察感染 CRAB 与 CSAB 的糖尿病足创面中是否存在胶冻样膜物质, 若存在则采用扫描电子显微镜观察其微观结构。结果 检测到的鲍曼不动杆菌中, CSAB、CRAB、多重耐药鲍曼不动杆菌、泛耐药鲍曼不动杆菌的阳性检出率分别为 16.7% (39/233)、83.3% (194/233)、95.3% (222/233)、34.3% (80/233), 未检测到全耐药鲍曼不动杆菌。233 株鲍曼不动杆菌中, 对碳青霉烯类抗生素的耐药率均 >80%; 对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率较低, 为 37%, 对其他头孢类抗生素 (头孢噻肟、头孢他啶、头孢替坦和头孢呋辛) 的耐药率均 >80%; 对青霉素类抗生素的耐药率 >80%; 对喹诺酮类抗生素的耐药率均 >60%; 对米诺环素的耐药率仅为 12.0%; 对替加环素和粘菌素的耐药率均 <1%。系统发育树显示, 10 株 CRAB 高度同源, 而 10 株 CSAB 的同源性不高。多位点序列分型分析显示, 10 株 CRAB 均为一种分型; 10 株 CSAB 中除 1 株无分型外, 其余 9 株有 7 种分型。10 株 CRAB 中有 8 株均含有完整的生物膜基因和群体感应基因; 10 株 CSAB 的生物膜基因和群体感应基因均不完整, 且均不携带 *bap* 基因。CRAB 与 CSAB 均不携带鞭毛基因 *pilA*。与 CRAB 相比, CSAB 携带的生物膜基因 *bap*、*csuA*、*csuC*、*csuD*, 群体感应基因 *abaI* 和 *abaR* 均显著下降 ($P < 0.05$)。CRAB 携带的主要 *blaOXA* 大类为 *blaOXA-23-like* (具体为 *blaOXA-167*) 和 *blaOXA-51-like* (具体为 *blaOXA-66*), 均有碳青霉烯酶活性。10 株 CRAB 中有 8 株同时携带 *blaOXA-66* 和 *blaOXA-167* 且均有较为完整的群体感应基因和生物膜基因。CSAB 携带的主要 *blaOXA* 大类为 *blaOXA-51-like* 和 *blaOXA-213-like*, 虽然有碳青霉烯酶活性, 但临床药物敏感试验显示其均对碳青霉烯类敏感。10 株 CSAB 携带的生物膜基因均不完整, 仅有 3 株 CSAB 有完备的群体感应基因。感染 CRAB 的创面中可见胶冻样膜物质, 为细菌生物膜; 感染 CSAB 的创面中未找到胶冻样物质。结论 糖尿病足创面中的 CRAB 与 CSAB 在多位点序列分型、携带的生物膜基因和群体感应基因、与 *blaOXA* 基因的相关性方面存在较大差异, 导致两者对抗生素的耐药的情况也存在差异。

【关键词】糖尿病足; 生物膜; 群体感应; 鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯; 抗生素耐药

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (819724); 天津市医学重点学科 (专科) 建设项目 (TJYXZDXK-032A)

Biofilm and quorum sensing genes analysis of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in diabetic foot wound

Xu Jun¹, Han Xiaocui², He Lu³, Feng Shuhong¹, Sun Dongjian¹, Cao Chen¹, Liu Xijiao², Zhang Yanyan², Ding Baixing⁴, Chang Bai¹

¹National Health Commission Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Department of Diabetic Foot, Chu HsienI Memorial Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China; ²Department of Endocrinology, the Sixth Division Hospital, Xinjiang Production and Construction Corps, Wujiaqu 831300, China; ³National Health Commission Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Clinical Laboratory, Chu HsienI Memorial Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China; ⁴Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: Chang Bai, Email: changbai1972@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the biofilm genes and quorum sensing genes of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in the wounds of diabetic foot and their effects on antibiotic resistance. **Methods** This study was an experimental study. The 233 strains of *Acinetobacter baumannii* cultured from 177 inpatients (128 males and 49 females, aged (56±10) years) with diabetic foot admitted to the Department of Diabetic Foot of Chu HsienI Memorial Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology of Tianjin Medical University from October 2020 to September 2023. All *Acinetobacter baumannii* were subjected to antibiotic sensitivity testing using broth microdilution method, followed by identification and analysis of their resistance rate using a fully automated antibiotic sensitivity analyzer. Randomly select 10 strains of CRAB (from 10 patients, 9 males and 1 females, aged (63±13) years) and 10 strains of carbapenem sensitive

Acinetobacter baumannii (CSAB; from 10 patients, 8 males and 2 females, aged (63±9) years) for whole genome sequencing. The antibiotic resistance genes were annotated using a comprehensive antibiotic resistance gene database, and a phylogenetic tree was drawn to analyze the homologous relationship between CRAB and CSAB. The 7 housekeeping genes of *Acinetobacter baumannii* were entered into the website <https://pubmlst.org> to analyze the multilocus sequence typing between CRAB and CSAB. All the measured genes were put into the PubMLST website to search for the biofilm genes *bap*, *csuA*, *csuB*, *csuA/B*, *csuC*, *csuD*, *csuE*, *pagA*, *pagB*, *pagC*, *pagD*, *bfmR*, *bfmS*, *ompA* carried by each *Acinetobacter baumannii*, as well as the quorum sensing genes *abaI*, *abaR*, and flagellar gene *pilA*. The differences in carrying these genes between CRAB and CSAB were compared. The correlation between biofilm genes, quorum sensing genes and Oxacillinase (OXA) resistance gene *blaOXA* from CRAB and CSAB was analyzed. Whether there was gel-like membrane-like substance in the wound of diabetic foot infected with CRAB and CSAB was observed by gross observation, and if there was, the microstructure was observed by scanning electron microscope.

Results Among the detected *Acinetobacter baumannii*, the positive detection rates of CSAB, CRAB, multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, and extensively-drug resistant *Acinetobacter baumannii* were 16.7% (39/233), 83.3% (194/233), 95.3% (222/233), and 34.3% (80/233), respectively, and no pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* was detected. Among 233 strains of *Acinetobacter baumannii*, the resistance rate of carbapenem antibiotics exceeded 80%; the resistance rates of cefoperazone/sulbactam was relatively low, at 37%; the resistance rates to other cephalosporin antibiotics (cefotaxime, ceftazidime, cefotetan, and cefuroxime) were more than 80%; the resistance rates to all penicillin antibiotics were greater than 80%; the resistance rates to quinolone antibiotics were all over 60%; the resistance rate to minocycline was only 12.0%; the resistance rates to tigecycline and colistin did not exceed 1%. The phylogenetic tree showed that 10 strains of CRAB were highly homologous, while 10 strains of CSAB had low homology. The analysis of multilocus sequence typing showed that 10 strains of CRAB strains were all the same type; except 1 strain without typing, the remaining 9 strains in 10 strains of CSAB had 7 types. Eight strains in 10 strains of CRAB contained complete biofilm genes and quorum sensing genes. The biofilm genes and quorum sensing genes from the strains of CSAB were incomplete and none carried the *bap* gene. Neither CRAB nor CSAB carried the flagellar gene *pilA*. Compared with that carried by CRAB, biofilm genes *bap*, *csuA*, *csuC*, and *csuD* and quorum sensing genes *abaI* and *abaR* carried by CSAB were significantly decreased (all *P* values <0.05). The main *blaOXA* categories carried by CRAB were *BlaOXA-23*-like (specifically *BlaOXA-167*) and *BlaOXA-51*-like (specifically *BlaOXA-66*), both of which had carbapenemase activity. Eight of ten CRAB strains carried both *blaOXA-66* and *bla-OXA167*, and all of them had relatively complete quorum sensing genes and biofilm genes. The main *blaOXA* categories carried by CSAB were *BlaOXA-51*-like and *BlaOXA-213*-like. Although they had carbapenemase activity, they were all sensitive to carbapenems in clinical drug sensitivity test. The biofilm genes carried by 10 strains of CSAB were incomplete, and only 3 strains of CSAB had complete quorum sensing genes. Gel-like and membrane-like substance could be seen in wounds infected with CRAB, which were biofilm; No gel-like and membrane-like substance was found in the wound infected with CSAB.

Conclusions CRAB and CSAB in diabetic foot wounds are significantly different in multilocus sequence typing, carrying biofilm genes and quorum sensing genes, and the correlation with *blaOXA* gene, leading to differences in antibiotic resistance between the two.

[Key words] Diabetic foot; Biofilms; Quorum sensing; *Acinetobacter baumannii*; Carbapenem; Drug resistance

Fund program: General Program of National Natural Science Foundation of China (819724); Tianjin Key Medical Discipline (Specialty) Construction Project (TJYXZDXK-032A)

首部《中国糖尿病地图》显示,2015—2019年我国2型糖尿病患病率的估算值就已达14.92%^[1]。50%的糖尿病足创面合并感染,而感染是糖尿病足患者住院的主要原因之一,也是导致糖尿病足患者医疗费用和病死率增加的重要原因^[2]。在糖尿病足创面治疗后期,革兰阳性菌已被抗生素

杀灭,但仍存在一些革兰阴性菌,且后者对抗生素产生耐药。在糖尿病足创面中的主要革兰阴性菌是肠杆菌属细菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌,且多为耐碳青霉烯类的多重耐药菌,给糖尿病足感染创面的治疗带来了很大的困难和挑战。耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem resistant

Acinetobacter baumannii, CRAB)多见于病程较长的糖尿病足创面。这些患者绝大多数无发热现象,且白细胞计数及中性粒细胞分类正常,但C反应蛋白和红细胞沉降率升高,创面中可能有胶冻样膜样结构存在,这些结构多为细菌生物膜。细菌从浮游态转变为生物膜态,会进一步增加其耐药性。目前,对糖尿病足创面中CRAB生物膜基因和群体感应基因的研究较少,但这与抗生素耐药关系密切,进行该研究可以为有效的治疗提供依据。

1 对象与方法

本研究经天津医科大学朱宪彝纪念医院(以下简称本院)伦理委员会批准,批号:ZXYJNYsMEC2024-18。

1.1 入选标准

纳入标准:(1)符合中国糖尿病诊断标准和国际糖尿病足工作组定义^[3-4]的糖尿病足患者,且患者Texas分级为1~3级B~D期^[5];(2)>18岁,性别不限;(3)糖尿病足创面中培养出的细菌为鲍曼不动杆菌。排除标准:(1)严重心功能不全者(美国纽约心脏病学会分级4级);(2)孕产妇;(3)不愿意参加本研究者。

1.2 患者临床资料及鲍曼不动杆菌分析

2020年10月—2023年9月,本院糖尿病足科收治177例符合入院标准的糖尿病足患者,其中男128例、女49例,年龄(56±10)岁。在糖尿病足创面中培养出233株鲍曼不动杆菌,采用肉汤微量稀释法对所有鲍曼不动杆菌进行药物敏感试验,然后采用全自动药敏仪(法国梅里埃Vitek® 2 Compact,)进行鉴定并对其耐药率进行分析。

若鲍曼不动杆菌对美罗培南或亚胺培南中的任意一种耐药则定义为CRAB,对三类抗生素耐药则定义为多重耐药鲍曼不动杆菌(multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, MDRAB),对除了粘菌素或替加环素以外的所有抗生素耐药则定义为泛耐药鲍曼不动杆菌(extensively-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, XDRAB),对所有抗生素耐药则称为全耐药鲍曼不动杆菌^[6]。

1.3 鲍曼不动杆菌的全基因组测序

随机选择10株CRAB[来自10例患者,男9例、女1例,年龄(63±13)岁]和10株碳青霉烯类敏感鲍曼不动杆菌[carbapenem sensitive *Acinetobacter baumannii*, CSAB;来自10例患者,男8例、女2例,

年龄(63±9)岁],常规在琼脂平板上进行培养。使用E. Z. N. A. ®Bacteria DNA试剂盒(美国Omega公司)提取鲍曼不动杆菌基因组。用NanoDrop ND-1000型分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific)检测DNA的数量和质量。采用TruSeq™ Nano DNA Sample Prep试剂盒(中国illumina)建立基因组DNA文库,采用TBS380微型荧光剂(美国Turner BioSystems Inc.)进行DNA定量(美国invitrogen),使用Illumina NovaSeq 6000型测序仪(150 bp×2,上海凌恩生物技术有限公司)进行基因测序。使用基因组数据库(<http://www.htslib.org/doc/samtools.html>、<https://github.com/rwick/Unicycler>)对基因组进行组装,使用综合抗生素耐药基因数据库对耐药基因进行注释。

1.4 鲍曼不动杆菌的系统发育树绘制

使用OrthoMCL v. 2.0.3软件并与其他几个密切相关的物种(这些物种具有较高的16S核糖体RNA基因相似性)进行比较生成鲍曼不动杆菌基因组的直系同源基因。基于1345个单拷贝核心基因的矩阵,使用MEGA 6.0软件的Tamura-Nei模型进行 γ 校正($\alpha=0.5$),使用1500个拷贝计算系统发育树的Bootstrap值,绘制系统发育树,分析CRAB与CSAB的同源关系。

1.5 鲍曼不动杆菌的多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析

将鲍曼不动杆菌的7个管家基因:*cpn60*、*fusA*、*gltA*、*pyrG*、*recA*、*rplB*、*rpoB*输入网站<https://pubmlst.org/>,分析CRAB与CSAB的MLST,并比较CRAB与CSAB的差别。

1.6 鲍曼不动杆菌的生物膜基因及群体感应基因与耐药基因的相关性分析

将测得的全部基因(fna文件)放入PubMLST网站中鲍曼不动杆菌目录下的Batch sequence query模块,精确匹配所有的基因后查找每株鲍曼不动杆菌是否携带生物膜基因*bap*、*csuA*、*csuB*、*csuA/B*、*csuC*、*csuD*、*csuE*、*pagA*、*pagB*、*pagC*、*pagD*、*bfmR*、*bfmS*、*ompA*和群体感应基因*abaI*、*abaR*及鞭毛基因*pilA*,比较CRAB与CSAB的差异。将CRAB与CSAB的生物膜基因、群体感应基因与综合抗生素耐药基因数据库中碳青霉烯类抗生素的苯唑西林酶(Oxacillinase, OXA)耐药基因*blaOXA*进行相关性分析。

1.7 鲍曼不动杆菌生物膜的鉴定

大体观察感染 CRAB 与 CSAB 的糖尿病足创面中是否存在胶冻样膜样结构,若存在则将其浸泡于电镜液中,按照常规操作流程在 SU8100 型扫描电子显微镜(日本日立仪器有限公司)5 000 倍放大倍数下观察微观结构,进行鉴定。

1.8 统计学方法

本研究采用 SPSS 28.0 统计软件包进行数据分析。计数资料数据采用例数(百分比)表示。CRAB 与 CSAB 数据间的比较,采用 Fisher 确切概率法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鲍曼不动杆菌耐药特点分析

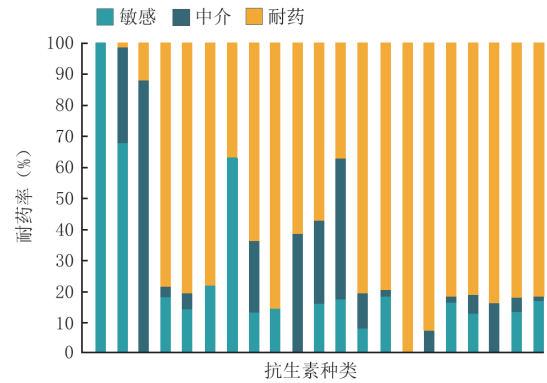
检测到的鲍曼不动杆菌中,CSAB、CRAB、MDRAB、XDRAB 的阳性检出率分别为 16.7%(39/233)、83.3%(194/233)、95.3%(222/233)、34.3%(80/233),未检测到全耐药鲍曼不动杆菌。39 株 CSAB 中有 32 株为 MDRAB。

2.2 鲍曼不动杆菌对不同抗生素耐药率的分析

233 株鲍曼不动杆菌中,对碳青霉烯类抗生素(美罗培南和亚胺培南)的耐药率均 $> 80%$;对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率较低,为 37%,对其他头孢类抗生素(头孢噻肟、头孢他啶、头孢替坦和头孢唑辛)的耐药率均 $> 80%$;对青霉素类抗生素(阿莫西林克拉维酸、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦)的耐药率 $> 80%$;对喹诺酮类抗生素(环丙沙星、左氧氟沙星)的耐药率均 $> 60%$;对复方新诺明的耐药率较低,为 37.3%;对米诺环素的耐药率很低,仅为 12.0%;对替加环素和粘菌素的耐药率 $< 1%$,见图 1。各抗生素的最低抑菌浓度折点,见表 1。

2.3 鲍曼不动杆菌的系统发育树和 MLST

10 株 CRAB 均为 ST2^{pas} 分型;10 株 CSAB 中除 1 株(无 cpn60 管家基因)无分型外,其余 9 株有 7 种



注:横坐标上从左到右的抗生素依次为粘菌素、替加环素、米诺环素、多西环素、四环素、妥布霉素、复方新诺明、左氧氟沙星、环丙沙星、氨曲南、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、头孢噻肟、头孢他啶、头孢替坦、头孢唑辛、哌拉西林/他唑巴坦、哌拉西林、阿莫西林/克拉维酸、美罗培南、亚胺培南

图 1 糖尿病足创面中鲍曼不动杆菌对不同抗生素的耐药率分析

Figure 1 Analysis of resistance rate of *Acinetobacter baumannii* to different antibiotics in diabetic foot wound

分型:ST10^{pas}(2 株)、ST372^{pas}(2 株)、ST1014^{pas}、ST374^{pas}、ST1131^{pas}、ST239^{pas}、ST119^{pas},即鲍曼不动杆菌的系统发育树显示,CRAB 菌株高度同源,而 CSAB 菌株的同源性不高。见图 2。

2.4 CRAB 与 CSAB 携带的生物膜基因与群体感应基因及鞭毛基因对比

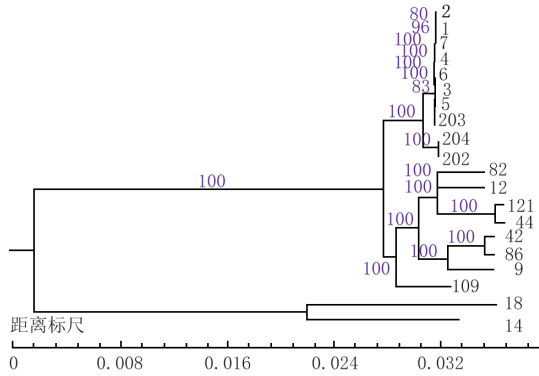
除编号 4 和 203 菌株外,8 株 CRAB 均携带完整的生物膜基因和群体感应基因;10 株 CSAB 携带的生物膜基因和群体感应基因均不完整,且均不携带 *bap* 基因。与 CRAB 相比,CSAB 携带的生物膜基因 *bap*、*csuA*、*csuC*、*csuD*,群体感应基因 *abaI* 和 *abaR* 均显著下降($P < 0.05$)。CRAB 与 CSAB 均不携带鞭毛基因 *pilA*。见图 3、表 2。

2.5 生物膜基因、群体感应基因分别与耐药基因 *blaOXA* 的相关性分析

表 1 糖尿病足创面中鲍曼不动杆菌对不同抗生素的最低抑菌浓度折点(mg/L)

敏感性	粘菌素	替加环素	米诺环素	多西环素	四环素	妥布霉素	复方新诺明	左氧氟沙星	环丙沙星	氨曲南	头孢吡肟
敏感	≤2	≤2	≤4	≤4	≤4	≤4	≤40	≤2	≤1	≤8	≤8
中介	—	4	8	8	8	8	—	4	2	16	16
耐药	≥4	≥8	≥16	≥16	≥16	≥16	≥80	≥8	≥4	≥32	≥32

敏感性	头孢哌酮/舒巴坦	头孢噻肟	头孢他啶	头孢替坦	头孢唑辛	哌拉西林/他唑巴坦	哌拉西林	阿莫西林/克拉维酸	美罗培南	亚胺培南
敏感	≤16	≤8	≤8	≤4	≤8	≤4	≤4	≤8	≤2	≤2
中介	—	16	16	8	16	8	8	16	4	4
耐药	≥32	≥32	≥32	≥16	≥32	≥16	≥16	≥32	≥8	≥8



注:CRAB为耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,CSAB为碳青霉烯类敏感鲍曼不动杆菌;图中最右侧1列数字的1~7、202~204为CRAB菌株号,82、12、121、44、42、86、9、109、18、14为CSAB菌株号;紫色数字为自展值的百分数,代表系统发育树的可信度,>59%即视为可信

图2 糖尿病足创面中10株CRAB与10株CSAB的系统发育树描绘图

Figure 2 Phylogenetic tree of ten strains of CRAB and ten strains of CSAB in diabetic foot wound

CRAB 携带的主要 *blaOXA* 大类为 *blaOXA-23-like* (具体为 *blaOXA-167*) 和 *blaOXA-51-like*(具体为 *blaOXA-66*), 均有碳青霉烯酶活性。10 株 CRAB 中有 8 株同时携带 *blaOXA-66* 和 *bla-OXA167* 且均有较为完整的群体感应基因和生物膜基因。CSAB 携带的主要 *blaOXA* 大类为 *blaOXA-51-like*(具体为 *blaOXA-68*、*blaOXA-117*、*blaOXA-259*、*blaOXA-424*、*blaOXA-532*、*blaOXA-530*) 和 *blaOXA-213-like* (具体为 *blaOXA-421*、*blaOXA-842*), 虽然有碳青霉烯酶活性, 但临床药物敏感试验显示其均对碳青霉烯类抗生素敏感。10 株 CSAB 携带的生物膜基因均不完整, 仅有 3 株 CSAB 有完备的群体感应基因。

表2 糖尿病足创面中CRAB与CSAB携带的生物膜基因与群体感应基因及鞭毛基因情况比较

Table 2 Comparison of biofilm genes, quorum sensing genes and flagellum gene carried by CRAB and CSAB in diabetic foot wound

类别	<i>bap</i>	<i>ompA</i>	<i>csuA</i>	<i>csuB</i>	<i>csuA/B</i>	<i>csuC</i>	<i>csuD</i>	<i>csuE</i>
CRAB	9	10	10	10	10	10	10	9
CSAB	0	8	4	7	7	6	6	6
P值	<0.001	0.237	0.005	0.105	0.105	0.043	0.043	0.152

类别	<i>pgaA</i>	<i>pgaB</i>	<i>pgaC</i>	<i>pgaD</i>	<i>bfmR</i>	<i>bfmS</i>	<i>abaI</i>	<i>abaR</i>	<i>pilA</i>
CRAB	10	10	10	10	10	10	10	10	0
CSAB	8	8	8	8	10	9	6	3	0
P值	0.237	0.237	0.237	0.105	1	0.5	0.043	0.002	1

注:CRAB为耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,CSAB为碳青霉烯类敏感鲍曼不动杆菌

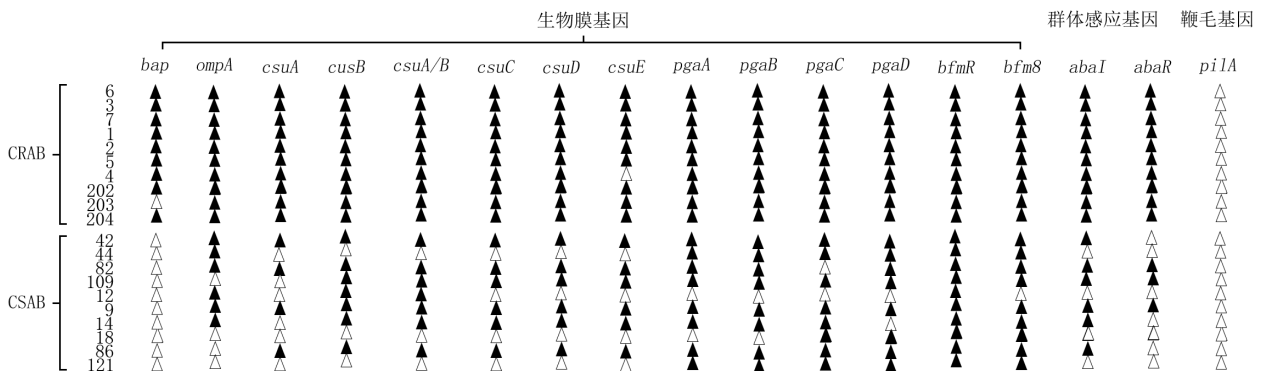
2.6 生物膜的鉴定

感染 CRAB 的创面中可见胶冻样膜样结构, 用镊子可以轻轻刮起, 其下面为鲜红的肉芽组织; 电镜下可观察到胶冻样膜样结构为细菌生物膜, 见图 4。感染 CSAB 的创面中未找到胶冻样结构。

3 讨论

3.1 研究CRAB的必要性

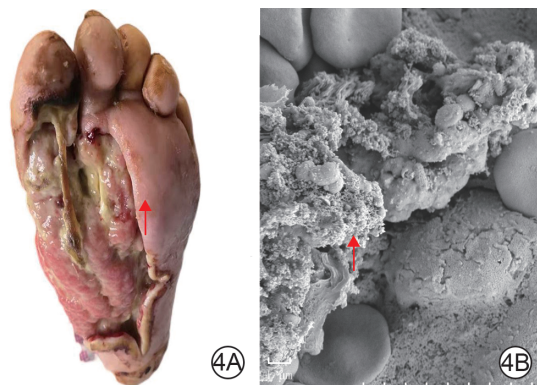
研究显示, 我国糖尿病足创面中革兰阳性菌占 43. 3%, 革兰阴性菌占 52. 4%^[7]。2022 年我国 CRAB 的耐药率为 53. 4%^[8], 是导致创面不易愈合的重要原因之一^[9]。糖尿病足创面上的细菌多以生物膜的形式存在^[10], 其中绝大多数的鲍曼不动杆菌可不入血而引起全身感染。大部分抗生素不能透过生物膜, 这进一步增加了清除细菌的难



注:CRAB为耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,CSAB为碳青霉烯类敏感鲍曼不动杆菌;黑色实心三角表示携带该基因,空心三角表示不携带该基因

图3 糖尿病足创面中10株CRAB与10株CSAB携带的生物膜基因与群体感应基因及鞭毛基因情况

Figure 3 Biofilm genes, quorum sensing genes and flagellum gene carried by ten strains of CRAB and ten strains of CSAB in diabetic foot wounds



注:CRAB为耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌

图4 感染CRAB的糖尿病足创面上形成的生物膜外观及其微观结构。4A.感染CRAB糖尿病足创面外观,箭头指示胶冻样膜样结构;4B.胶冻样膜样结构的微观结构,箭头所示为细菌生物膜 扫描电子显微镜×5 000

Figure 4 Appearance and microstructure of biofilm formed on the diabetic foot wound infected with CRAB

度^[11-12]。综上,对鲍曼不动杆菌的生物膜进行研究十分必要。

2020年10月—2023年9月本院糖尿病足科从患者的糖尿病足创面中收集到233株鲍曼不动杆菌,分析显示多数菌株为CRAB,占比>80%;MDRAB的阳性检出率高达95.6%(222/233),且在MDRAB中存在80株XDRAB,而后者仅对多粘菌素和/或替加环素敏感,可见糖尿病足创面中CRAB的耐药率高,应引起临床重视。在所有头孢类抗生素中,本组鲍曼不动杆菌对头孢哌酮/舒巴坦耐药率最低,可能原因是舒巴坦不仅是酶抑制剂也具有杀灭鲍曼不动杆菌的作用。这也是临床最新指南将以舒巴坦为基础的抗生素(如阿莫西林/舒巴坦)作为治疗CRAB的依据^[13]。本组鲍曼不动杆菌对四环素类抗生素中米诺环素(12.0%)及相应的衍生抗生素替加环素(0.9%)耐药率也很低,但是替加环素为限制类抗生素,且为抑菌剂,有较严重的胃肠道副作用,故不作首选。最新研究报道显示,CRAB对新型抗生素,如舒巴坦/杜洛巴坦、头孢地尔也产生抵抗^[14-16]。因此,对CRAB的耐药机制进行深入研究十分必要。

3.2 生物膜形成与菌株携带生物膜基因及群体感应基因和鞭毛基因的相关性

对CRAB和CSAB的MLST比较显示,CRAB的MLST高度一致,均为ST^{pas},这与国内外的报道相一致^[17-20],但CSAB的MLST呈现多样化。CRAB均有较为完整的生物膜基因组,也是其形成生物膜的遗传基础。有关呼吸道感染CRAB的研究显示,

Csu pili结构是生物膜形成所必需的组分,由6个生物膜基因*csuA*、*csuB*、*csuC*、*csuD*、*csuA/B*、*csuE*编码,可促进细菌黏附^[21-22],其中*csuE*为非必要基因,其缺乏对生物膜形成影响不大^[23-24]。本研究显示,虽有1株CRAB不含*csuE*,但不影响其生物膜形成(另文发表)。本研究中部分CSAB菌株未携带生物膜基因*csuA*、*csuC*、*csuD*,不能有效地形成Csu pili结构,进而影响生物膜的形成。生物膜基因*pagA*、*pagB*、*pagC*、*pagD*的作用为合成生物膜成分中的细胞外多糖——聚β-1,6-N-乙酰葡萄糖胺^[25],该多糖可促进生物膜的形成,前述基因均存在于10株CRAB中;仅1株CSAB不携带前述任何1个基因,其他9株都携带至少3个前述基因。*bap*基因是生物膜相关蛋白基因,对细菌的黏附、生物膜的形成及成熟均起作用^[26-28],本组9株CRAB均携带前述基因;而CSAB均不携带*bap*基因,这也是导致CSAB菌株不能形成生物膜的重要原因。生物膜基因*bfmR*、*bfmS*属于双组分调节系统^[29-30],但本研究中CRAB和CSAB均携带这一对基因,说明均这一对基因不是形成生物膜的必要条件,而是充分条件,即没有结构基础而仅有调节系统,不能形成生物膜。

生物膜是大量鲍曼不动杆菌之间相互协作形成的具有多种成分的细胞外结构。为了便于不同的鲍曼不动杆菌之间的“协同工作”,群体感应系统在细菌进化过程中形成^[27,31-32]。本组的10株CRAB均携带群体感应基因*abaI*和*abaR*;10株CSAB中有7株无*abaI*和/或*abaR*,因而不能协调鲍曼不动杆菌之间生物膜的形成,这是CSAB不易形成生物膜的重要基因缺陷之一。

鲍曼不动杆菌的鞭毛系统具有促进其运动和侵袭能力,是重要的毒力因子^[21,23]。但本组CRAB和CSAB均不携带鞭毛基因,这也是糖尿病足创面中鲍曼不动杆菌较少引起全身感染的原因之一。

3.3 CRAB的耐药机制分析

CRAB耐药的1个重要机制是其产生的碳青霉烯酶可分解碳青霉烯类抗生素^[33-35]。本组CRAB和CSAB都能产生分解碳青霉烯的一类酶即blaOXA,CRAB携带的耐药基因为blaOXA-23-like(具体为*blaOXA-167*)和blaOXA-51-like(具体为*blaOXA-66*),CSAB携带的耐药基因为blaOXA-51-like和blaOXA-213-like。大部分CRAB同时携带*blaOXA-167*和*blaOXA-66*,可以充

分分解碳青霉烯类抗生素。而 CSAB blaOXA-51-like 虽然有碳青霉烯酶,但药物敏感结果显示该类菌株对美罗培南和/或亚胺培南敏感,提示这些基因可能没有表达蛋白,或其产生的 blaOXA 酶类量不足,不足以形成抵抗碳青霉烯类抗生素。除携带 blaOXA 酶外,鲍曼不动杆菌中还存在外排泵、青霉素结合蛋白和膜通道蛋白,这些因素均可导致其耐药。CSAB 携带的生物膜基因不全,不能形成生物膜,以浮游态存在,当碳青霉烯类抗生素与其充分接触时,可起到杀菌作用。CRAB 以生物膜形式存在,较高程度上阻止了包含碳青霉烯类在内的大量抗生素与鲍曼不动杆菌的接触,从而进一步增加该类菌株对抗生素的耐药率。本研究显示,CRAB 不仅携带耐药基因而且携带较完整的生物膜基因和群体感应基因,这些基因可起协同抵抗各种抗生素的作用,但具体机制尚不清楚。推测 CRAB 的耐药机制可能与糖尿病足创面中的鲍曼不动杆菌多为感染后期出现有关。在糖尿病足早期创面中主要存在金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌等,随着清创和抗生素治疗,这些细菌被消灭,在治疗后期才出现了鲍曼不动杆菌,此时出现的鲍曼不动杆菌对前期的抗生素也产生了耐药,形成了 MDARB;CRAB 携带的生物膜基因和群体感应基因促进了生物膜的形成,进一步增强了其对抗生素的耐药性。由于肉眼观察不到生物膜结构,故本研究将糖尿病足创面中的 CRAB 产生的胶冻样膜样结构置于扫描电子显微镜下观察并进行验证。而糖尿病足创面中的 CSAB 无胶冻样膜样结构。

3.4 小结

综上,本研究对糖尿病足创面中的鲍曼不动杆菌的耐药性进行了分析,并对 CRAB 与 CSAB 的生物膜相关基因及群体感应基因进行了比较,结果显示 CRAB 携带较完整生物膜基因和群体感应基因,ST 分型及 OXA 酶相对一致,可协同促进其耐药性。本研究也存在不足:(1)为一项单中心研究,后期可能需要收集全国多中心的数据来探讨 CRAB 的生物膜基因和群体感应基因是否存在地区差异;(2)针对 CRAB 与 CSAB 的 blaOXA 酶的具体功能,还需要进一步开展研究;(3)生物膜基因和群体感应基因与其他耐药基因是如何相互作用的,需要进一步研究,这些机制的研究,有利于为后期抗生物膜治疗提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 徐俊: 酝酿和设计实验、实施实验、整理数据、统计

分析、撰写论文、修改论文;韩晓翠、张艳燕:分析/解释数据、论文修改;何璐、冯书红、孙东建、曹晨:采集数据、修改论文;刘熙姣:修改论文;丁百兴:研究指导;常柏:研究指导、论文修改、经费支持

参考文献

- [1] 吴静,郭立新.中国糖尿病地图[M].北京:人民卫生出版社,2022.
- [2] Chen L, Sun S, Gao Y, et al. Global mortality of diabetic foot ulcer: a systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2023,25(1):36-45. DOI: 10.1111/dom.14840.
- [3] 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J].*中华糖尿病杂志*,2021,13(4):315-409. DOI: 10.3760/cma.j.cn115791-20210221-00095.
- [4] Bus SA, Lavery LA, Monteiro-Soares M, et al. Guidelines on the prevention of foot ulcers in persons with diabetes (IWGDF 2019 update)[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2020,36 Suppl 1:e3269. DOI: 10.1002/dmrr.3269.
- [5] Wang A, Lv G, Cheng X, et al. Guidelines on multidisciplinary approaches for the prevention and management of diabetic foot disease (2020 edition)[J/OL]. *Burns Trauma*, 2020, 8: tkaa017[2024-07-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32685563/>. DOI: 10.1093/burnst/tkaa017.
- [6] Nelson RE, Hyun D, Jezek A, et al. Mortality, length of stay, and healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among elderly hospitalized patients in the United States[J]. *Clin Infect Dis*, 2022,74(6):1070-1080. DOI: 10.1093/cid/ciab696.
- [7] Du F, Ma J, Gong H, et al. Microbial infection and antibiotic susceptibility of diabetic foot ulcer in China: literature review[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022,13:881659. DOI: 10.3389/fendo.2022.881659.
- [8] 中国两网监测云-全国细菌耐药监测网[EB/OL]. [2024-07-15]. <https://carss.cn/sys/Htmls/dist/index.html>.
- [9] Xu J, Chen W, He L, et al. Most postoperative reserved "normal" metatarsal stumps of diabetic foot osteomyelitis are infected but have healing potential[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1165305. DOI: 10.3389/fendo.2023.1165305.
- [10] Senneville E, Gachet B, Blondiaux N, et al. Do anti-biofilm antibiotics have a place in the treatment of diabetic foot osteomyelitis? [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12(2)DOI: 10.3390/antibiotics12020317.
- [11] Mea HJ, Yong P, Wong EH. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: motility, adherence and biofilm formation[J]. *Microbiol Res*, 2021, 247: 126722. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126722.
- [12] Yamabe K, Arakawa Y, Shoji M, et al. Enhancement of *Acinetobacter baumannii* biofilm growth by cephem antibiotics via enrichment of protein and extracellular DNA in the biofilm matrices[J]. *J Appl Microbiol*, 2022, 133(3):2002-2013. DOI: 10.1111/jam.15712.
- [13] Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, et al. Infectious diseases society of america guidance on the treatment of ampC β -lactamase-producing enterobacterales, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia* infections[J]. *Clin Infect Dis*, 2022,74(12):2089-2114. DOI: 10.1093/cid/ciab1013.
- [14] Iovleva A, McElheny CL, Fowler EL, et al. In vitro activity of

- sulbactam-durlobactam against colistin-resistant and/or cefiderocol-non-susceptible, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* collected in U. S. hospitals[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2024,68(3):e0125823. DOI: 10.1128/aac.01258-23.
- [15] Giannella M, Viale P. Treating carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections[J]. *Lancet Infect Dis*, 2023, 23(9): 994-995. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00203-7.
- [16] Miller WR, Arias CA. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2024, 22(10): 598-616. DOI: 10.1038/s41579-024-01054-w.
- [17] Iovleva A, Mustapha MM, Griffith MP, et al. carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in U. S. hospitals: diversification of circulating lineages and antimicrobial resistance[J]. *mBio*, 2022, 13(2): e0275921. DOI: 10.1128/mbio.02759-21.
- [18] Bulach D, Carter GP, Li L, et al. The whole-genome molecular epidemiology of sequential isolates of *Acinetobacter baumannii* colonizing the rectum of patients in an adult intensive care unit of a tertiary hospital[J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(6): e0219123. DOI: 10.1128/spectrum.02191-23.
- [19] Hamidian M, Nigro SJ. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Microb Genom*, 2019, 5(10): e000306. DOI: 10.1099/mgen.0.000306.
- [20] Gu D, Wu Y, Chen K, et al. Recovery and genetic characterization of clinically-relevant ST2 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from untreated hospital sewage in Zhejiang province, China [J]. *Sci Total Environ*, 2024, 916: 170058. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.170058.
- [21] Pakharukova N, Malmi H, Tuittila M, et al. Archaic chaperone-usher pili self-secrete into superelastic zigzag springs[J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 335-340. DOI: 10.1038/s41586-022-05095-0.
- [22] Romero M, Mayer C, Heeb S, et al. Mushroom-shaped structures formed in *Acinetobacter baumannii* biofilms grown in a roller bioreactor are associated with quorum sensing-dependent Csu-pilus assembly[J]. *Environ Microbiol*, 2022, 24(9): 4329-4339. DOI: 10.1111/1462-2920.15985.
- [23] Ahmad I, Nadeem A, Mushtaq F, et al. Csu pili dependent biofilm formation and virulence of *Acinetobacter baumannii*[J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2023, 9(1): 101. DOI: 10.1038/s41522-023-00465-6.
- [24] de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response[J]. *Res Microbiol*, 2009, 160(3): 213-218. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.01.002.
- [25] Choi AH, Slamti L, Avci FY, et al. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation[J]. *J Bacteriol*, 2009,191(19):5953-5963. DOI: 10.1128/JB.00647-09.
- [26] Yang CH, Su PW, Moi SH, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: genotype-phenotype correlation [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1849. DOI: 10.3390/molecules24101849.
- [27] Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(2): 91-102. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.148.
- [28] Mendes SG, Combo SI, Allain T, et al. Co-regulation of biofilm formation and antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from mechanisms to therapeutic strategies[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2023,42(12): 1405-1423. DOI: 10.1007/s10096-023-04677-8.
- [29] Kim SY, Kim MH, Kim SI, et al. The sensor kinase BfmS controls production of outer membrane vesicles in *Acinetobacter baumannii*[J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1): 301. DOI: 10.1186/s12866-019-1679-0.
- [30] Liou ML, Soo PC, Ling SR, et al. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2014, 47(4): 275-281. DOI: 10.1016/j.jmii.2012.12.004.
- [31] Li Y, Wang B, Lu F, et al. Synergistic inhibitory effect of polymyxin B in combination with ceftazidime against robust biofilm formed by *Acinetobacter baumannii* with genetic deficiency in AbaI/AbaR quorum sensing[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(1): e0176821. DOI: 10.1128/spectrum.01768-21.
- [32] Paluch E, Rewak-Soroczyńska J, Jędrusik I, et al. Prevention of biofilm formation by quorum quenching[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(5): 1871-1881. DOI: 10.1007/s00253-020-10349-w.
- [33] Li H, Liu F, Zhang Y, et al. Evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* revealed through whole-genome sequencing and comparative genomic analysis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(2):1168-1176. DOI: 10.1128/AAC.04609-14.
- [34] Hackel MA, Tsuji M, Yamano Y, et al. In vitro activity of the siderophore cephalosporin, cefiderocol, against a recent collection of clinically relevant Gram-negative bacilli from North America and Europe, including carbapenem-nonsusceptible isolates (SIDERO-WT-2014 study) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(9): e00093-17. DOI: 10.1128/AAC.00093-17.
- [35] Lee YL, Ko WC, Hsueh PR. Geographic patterns of *Acinetobacter baumannii* and carbapenem resistance in the Asia-Pacific Region: results from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) program, 2012-2019[J]. *Int J Infect Dis*, 2023, 127: 48-55. DOI: 10.1016/j.ijid.2022.12.010.

(收稿日期:2024-07-15)