DOI:10.16016/j.1000-5404.201808141

亚抑菌浓度亚胺培南通过影响Ⅳ型菌毛增强耐药鲍曼不动杆菌的生物膜形成

樊 莉[1],李聃丹[1],田 竞[2],孙凤军[3],冯 伟[3],周世文[1] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院药学部[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):教学保障处[2],第一附属医院药学部[3]

[摘要] **目的** 探讨在亚抑菌浓度(sub-minimal inhibitory concentration, sub-MIC)亚胺培南(imipenem, IMP)的作用下,IMP 耐药和敏感鲍曼不动杆菌生物膜形成能力的变化。**方法** 采用琼脂平板倍比稀释法检测 IMP 耐药和敏感鲍曼不动杆菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC);采用 PCR 扩增鉴定碳青霉烯酶耐药基因;在给予 sub-MIC IMP 干预后,以微孔法检测细菌生物膜的形成,菌落平板计数法检测细菌粘附能力的改变,泳动实验观察细菌的运动性,定量 RT-PCR 检测细菌Ⅳ型菌毛基因的表达。**结果** 10 株 IMP 耐药鲍曼不动杆菌基因扩增结果显示所有菌株含有 OXA-51 基因,9 株含有 OXA-23 基因,只有 3 株携带 IMP-4 基因。sub-MIC IMP 对 IMP 耐药鲍曼不动杆菌的生物膜形成、粘附性和运动性均有显著的诱导作用,而对 IMP 敏感菌株的生物膜形成、粘附性和运动性未发现一致性的作用(5 株抑制,3 株无作用,2 株诱导)。sub-MIC IMP 诱导鲍曼不动杆菌生物膜形成的菌株中均出现了Ⅳ型菌毛基因表达的增加。**结论** sub-MIC IMP 可能通过影响Ⅳ型菌毛介导的粘附运动能力,使耐药菌株的生物膜形成显著增强。

[关键词] 亚抑菌浓度;亚胺培南;鲍曼不动杆菌;生物膜;耐药性

[中图法分类号] R378.7; R915; R978.1 [文献标志码] A

Sub-minimal inhibitory concentration of imipenem enhances biofilm formation of resistant *Acinetobacter baumannii* isolates by affecting type Ⅳ pili

FAN Li[1], LI Dandan[1], TIAN Jing[2], SUN Fengjun[3], FENG Wei[3], ZHOU Shiwen[1] [1]Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [2]Department Teaching Support, [3]Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Objective To investigate the changes in the biofilm formation of imipenem-resistant and sensitive *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) isolates under the sub-minimal inhibitory concentration of imipenem (sub-MIC IMP). Methods MIC values were detected by agar plate dilution in both imipenem-resistant and sensitive *A. baumannii* isolates. The carbapenemase resistance genes were amplified by PCR. After the intervention of sub-MIC IMP, the biofilm formation was detected by micro-well method, the bacterial adhesion was detected by colony plate counting, and the bacterial motility was observed by swimming, and the expression of the bacterial type Ⅳ pili gene was detected by quantitative RT-PCR. Results The results of carbapenemase resistance genes showed there were 10 strains of IMP-resistant *A. baumannii* carrying OXA-51 gene, 9 carrying OXA-23 gene and only 3 IMP-4 gene. Sub-MIC IMP significantly induced the biofilm formation, adhesion and motility of IMP-resistant *A. baumannii*, but no such changes were found in above aspects in the IMP-sensitive strains (5 strains exhibited inhibitory effects, 3 showed no effect, and 2 presented induction). Enhanced expression level of type Ⅳ pili gene was found in all the strains with sub-MIC IMP

[通信作者] 周世文,E-mail:swzhou56@163.com

[网络首发] http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1126.R.20181010.1344.002.html

induced biofilm formation. **Conclusion** Sub-MIC IMP may significantly enhance the biofilm formation of *A. baumannii* by affecting the Ⅳ pili related adherence and motility.

[**Key words**] sub-minimal inhibitory concentration; imipenem; *Acinetobacter baumannii*; biofilm; drug resistance

Corresponding author: ZHOU Shiwen, E-mail: swzhou56@163.com

鲍曼不动杆菌是医院感染最常见的多重耐药菌,在全球引起血流感染的病死率高达43.4%,社区获得性肺炎达60%[1-2]。目前对鲍曼不动杆菌感染的治疗主要是碳青霉烯类单独或联合氨基糖苷类、多粘菌素、替加环素或舒巴坦制剂[3]。2016年全国细菌耐药网数据显示:鲍曼不动杆菌对亚胺培南(imipenem,IMP)的耐药率已高达66.7%,约40%鲍曼不动杆菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration,MIC)大于16 mg/L。而临床常用给药剂量仅能使IMP血药浓度达到4 mg/L左右[4]。因此,临床上IMP在治疗鲍曼不动杆菌感染过程中多处于sub-MIC状态,研究sub-MIC抗菌药物对鲍曼不动杆菌的影响具有重要的临床意义。本课题组发现sub-MIC IMP可以影响鲍曼不动杆菌细菌生物膜的形成,但其调控作用表现为抑制和诱导并存,推测其不同的调控表型与细菌的耐药属性相关。据此,本研究分别以临床分离的耐药和敏感鲍曼不动杆菌为研究对象,研究sub-MIC IMP对鲍曼不动杆菌生物膜的影响,并探索其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 10株IMP耐药鲍曼不动杆菌(A171~A180)和10株IMP敏感鲍曼不动杆菌(A181~A190)分离自陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院住院患者的临床送检标本。质控菌株大肠埃希菌ATCC25922和铜绿假单胞菌ATCC27853保存于陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院药理基地。

1.1.2 试剂及设备 主要有:亚胺培南(中国食品药品检定研究院),血琼脂平板(重庆庞通医疗器械有限公司),MH培养基和LB培养基(北京陆桥生物技术有限公司),结晶紫(美国Sigma公司),冰醋酸(重庆川东化工有限公司),DNA和RNA提取试剂盒、DNA胶回收纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司),琼脂糖(上海生工生物工程有限公司),2×Es *Taq* Master Mix(北京康为世纪生物科技有限公司),逆转录试剂盒和SYBR Green Realtime PCR Master Mix(东洋纺生物科技有限公司);电子天平(日本Sakuma公司),酶标仪(美国Thermo公司),PCR扩增仪、电泳仪和凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)

1.2 方法

1.2.1 琼脂平板倍比稀释法检测IMP对鲍曼不动杆菌的MIC 鲍曼不动杆菌划线接种于血琼脂平板,放置37 ℃孵箱培养过夜。用接种环挑取单菌落至盐水管并将细菌比浊至0.5个麦氏单位(约10^8 CFU/mL)。IMP用生理盐水进行倍比稀释后取1 mL加至培养皿中,然后加入MH培养基摇匀,使IMP药物终浓度分别为0.06~256 mg/L。使用多点接种仪将稀释菌液接种到含不同浓度IMP的MH琼脂平板上,37 ℃孵箱培养18 h。MIC结果判读参照美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute,CLSI)2015年版的药敏实验判断标准进行[5]。大肠埃希菌ATCC25922和铜绿假单胞菌ATCC27853作为药敏质控菌株。

1.2.2 PCR扩增鉴定碳青霉烯酶耐药基因 根据细菌DNA提取纯化试剂盒说明书提取IMP耐药鲍曼不动杆菌DNA。参照文献[6-7]合成碳青霉烯酶耐药基因(IMP、VIM、NDM、SPM、KPC、GES、OXA-23、OXA-51、OXA-24、OXA-48和OXA-58)引物序列。PCR反应体系为2×Es *Taq* Master Mix 10 μL,上下游引物各0.3 μL,DNA 0.4 μL,并补充ddH_2O至20 μL。扩增条件:94 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s;52 ℃或56 ℃退火30 s;72 ℃延伸30 s;共35个循环,最后72 ℃延伸10 min。扩增完毕,取10 μL PCR反应产物进行琼脂糖凝胶电泳。选取阳性产物按照琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书回收纯化目的片段,然后纯化产物送测序(上海英潍捷贸易有限公司),测序结果在NCBI的BLAST数据库(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行比对分析。

1.2.3 微孔法测定sub-MIC IMP对鲍曼不动杆菌生物膜形成能力的影响[8] 将鲍曼不动杆菌过夜培养物用LB肉汤稀释1 000倍。实验分为空白对照组和IMP处理组,空白对照组每孔加入100 μL稀释菌液和100 μL LB培养基,IMP处理组每孔加入100 μL稀释菌液和100 μL IMP,使其药物终浓度为1/4 MIC。

每组设置3个复孔,37 ℃孵育24 h后轻柔吸取上层培养液,然后以PBS缓冲液轻柔冲洗2次,置于超净工作台中风干固定。固定后每孔加入200 μL 1%结晶紫溶液染色10 min,弃去染色液并以流水冲洗3次,再次倒置风干。最后每孔加入100 μL 30%冰醋酸进行溶解,于酶标仪590 nm处测定各孔光密度值$D(590)$。

1.2.4 菌落平板计数法测定sub-MIC IMP对鲍曼不动杆菌粘附能力的影响[9] 将鲍曼不动杆菌过夜培养物用LB肉汤稀释1 000倍。实验分为空白对照组和IMP处理组,空白对照组在CLSM培养皿中分别加入1 mL稀释菌液和1 mL LB培养基,IMP处理组加入1 mL稀释菌液和1 mL IMP,使其药物终浓度为1/4 MIC。37 ℃孵箱培养4 h后,用适量PBS轻柔冲洗2次。然后将PBS加入培养皿中超声10 min,以使粘附在培养皿上的细菌脱落下来。粘附细菌按10倍稀释法稀释到合适浓度后,取100 μL稀释菌液涂布于LB平板上,37 ℃培养24 h后进行计数。

1.2.5 泳动实验考察sub-MIC IMP对鲍曼不动杆菌运动能力的影响[10] 鲍曼不动杆菌划线接种于血琼脂平板,37 ℃孵箱培养过夜。空白对照组在空培养皿中加入1 mL生理盐水,IMP处理组加入1 mL IMP溶液(终浓度为1/4 MIC),然后加入14 mL泳动培养基振荡混匀。用灭菌牙签挑取细菌单菌落垂直接种到培养基表面,37 ℃孵箱培养24 h后测量菌落直径。

1.2.6 定量RT-PCR检测细菌Ⅳ型菌毛基因的表达 参照GenBank鲍曼不动杆菌ATCC17978基因全序列(CP000521),采用Primer Premier 6.0软件针对Ⅳ型菌毛基因和16S rRNA序列设计引物。Ⅳ型菌毛基因引物序列为:正向5′-TGCGGTCATGGCTATTATTGC-3′,反向5′-GCGTACCATCAGCGGCTAT-3′,251 bp。16S rRNA引物序列为:正向5′-GCCTTCCTCCAGTTTGTC-3′,反向5′-TGTCGTGAGATGTTGGGT-3′,111 bp。采用细菌RNA提取试剂盒提取鲍曼不动杆菌总RNA并测定其浓度。根据逆转录试剂盒说明书合成第1链cDNA,然后行PCR扩增;使用Bio-Rad实时PCR系统(CFX96,Bio-Rad公司)进行SYBR Green测定,PCR反应体系:2×SYBR Green 10 μL,上下游引物各0.3 μL,cDNA 2 μL,ddH_2O 7.4 μL。扩增条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s;57 ℃ 30 s;72 ℃ 30 s;共40个循环;使用相对定量方法评估基因表达的定量变化;采用稳定表达的16S rRNA基因的扩增子作为内部对照以及归一化数据。实验均重复3次。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件。计量资料均以$\bar{x} \pm s$表示,IMP处理组和空白对照组两样本间均数比较采用独立样本t检验。检验水准:$\alpha = 0.05$。

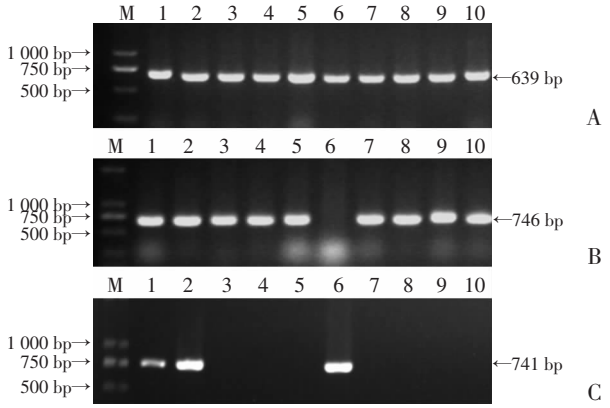
2 结果

2.1 鲍曼不动杆菌MIC测定

IMP对IMP耐药鲍曼不动杆菌A171~A180的MIC分别是64、16、8、32、8、64、32、16、8 mg/L和64 mg/L。IMP对IMP敏感菌株A181~A190的MIC分别为1.000、0.500、0.250、1.000、0.125、0.250、0.500、2.000、1.000 mg/L和0.250 mg/L。由于采用各自菌株的1/2 MIC值作为其实验浓度会对细菌的生长有影响,因此后续实验均采用各自的1/4 MIC值作为其药物浓度。

2.2 碳青霉烯酶耐药基因扩增

10株IMP耐药菌株全部含有OXA-51基因,9株含有OXA-23基因,而只有3株携带IMP-4基因(图1),其余碳青霉烯耐药基因的检测均为阴性。



M:标准;1:A171;2:A172;3:A173;4:A174;5:A175;6:A176;7:A177;8:A178;9:A179;10:A180

A:OXA-51;B:OXA-23;C:IMP-4

图1 PCR扩增鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶耐药基因

2.3 sub-MIC IMP对鲍曼不动杆菌生物膜形成能力的影响

sub-MIC IMP对IMP耐药菌株的生物膜形成均有显著诱导作用(图2)。然而sub-MIC IMP对5株IMP敏感菌株的生物膜形成具有抑制作用,3株细菌没有作用,2株菌株具有诱导作用。

2.4 sub-MIC IMP对鲍曼不动杆菌粘附能力的影响

sub-MIC IMP对IMP耐药菌株的粘附性均有显著诱导作用(图3)。然而,sub-MIC IMP对5株IMP敏感

菌株的粘附性表现为抑制,3 株表现为无作用,2 株表现为诱导。

2.5 sub-MIC IMP 对鲍曼不动杆菌运动性的影响

sub-MIC IMP 对 IMP 耐药菌株的运动性均有显著诱导作用(表 1)。然而,sub-MIC IMP 对 5 株 IMP 敏感菌株的运动性具有抑制作用,3 株无作用,2 株具有诱导作用。

2.6 sub-MIC IMP 对鲍曼不动杆菌Ⅳ型菌毛基因表达的影响

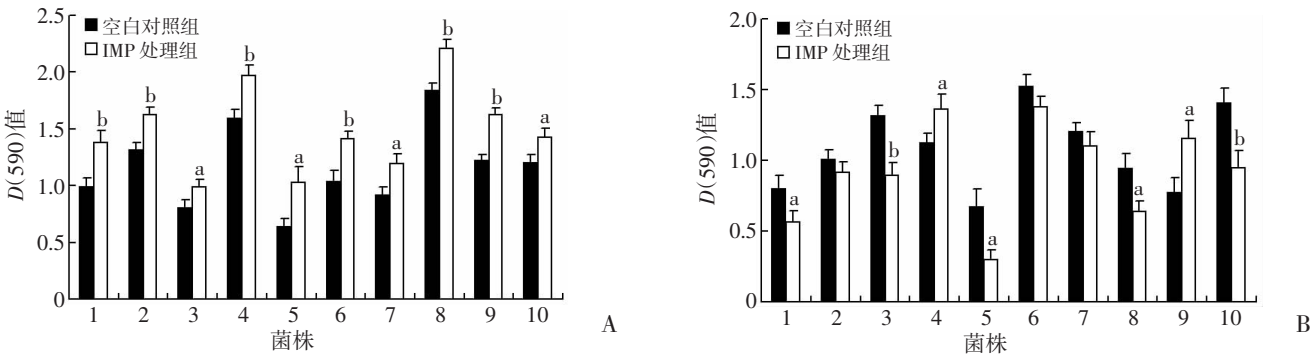
sub-MIC IMP 对 IMP 耐药菌株的Ⅳ型菌毛基因表达均有显著诱导作用(图 4)。然而,除了 sub-MIC IMP 对 A184 和 A189 菌株的Ⅳ型菌毛基因表达具有诱导作用外,对其他 IMP 敏感菌株基因表达没有作用。

表 1 1/4 MIC IMP 对鲍曼不动杆菌运动能力的影响

(mm, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

菌株	空白对照组	IMP 处理组	菌株	空白对照组	IMP 处理组
A171	5.23 ± 0.15	8.60 ± 0.20[a]	A181	5.67 ± 0.55	1.67 ± 0.45[a]
A172	8.50 ± 0.60	10.43 ± 0.50[a]	A182	6.80 ± 0.20	6.43 ± 0.25
A173	6.80 ± 0.30	9.07 ± 0.25[a]	A183	8.67 ± 0.45	4.50 ± 0.40[a]
A174	8.53 ± 0.40	11.30 ± 0.20[a]	A184	6.87 ± 0.31	8.80 ± 0.30[a]
A175	4.53 ± 0.55	8.37 ± 0.45[a]	A185	5.40 ± 0.40	2.07 ± 0.45[a]
A176	5.93 ± 0.35	10.07 ± 0.65[a]	A186	9.43 ± 0.55	8.47 ± 0.31
A177	6.40 ± 0.30	8.23 ± 0.25[a]	A187	6.57 ± 0.31	6.00 ± 0.36
A178	9.37 ± 0.25	11.70 ± 0.40[a]	A188	8.53 ± 0.25	3.40 ± 0.50[a]
A179	7.57 ± 0.31	10.63 ± 0.55[a]	A189	4.80 ± 0.66	7.47 ± 0.50[a]
A180	8.37 ± 0.25	10.90 ± 0.30[a]	A190	9.10 ± 0.30	4.33 ± 0.35[a]

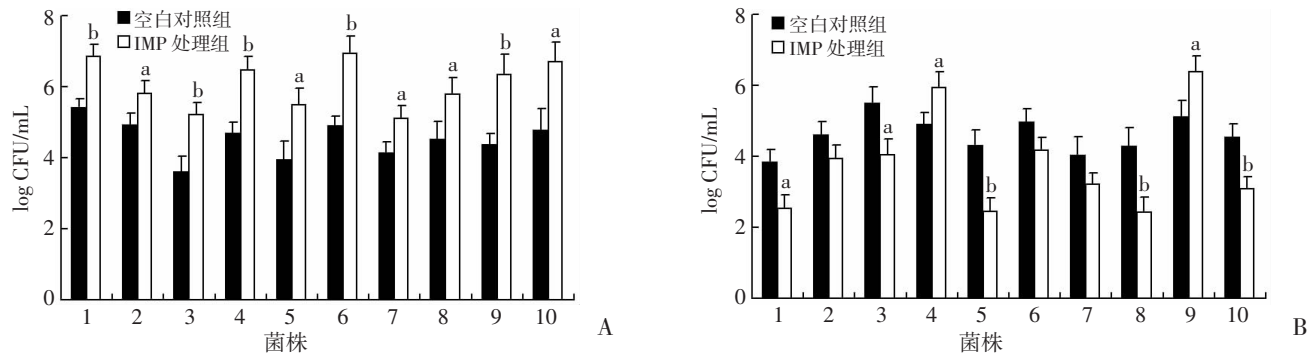
a: $P<0.01$,与空白对照组比较



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与空白对照组比较

A: sub-MIC IMP 对 IMP 耐药鲍曼不动杆菌生物膜形成的影响 1~10 分别为 IMP 耐药菌株 A171~A180; B: sub-MIC IMP 对 IMP 敏感鲍曼不动杆菌生物膜形成的影响 1~10: 分别为 IMP 敏感菌株 A181~A190

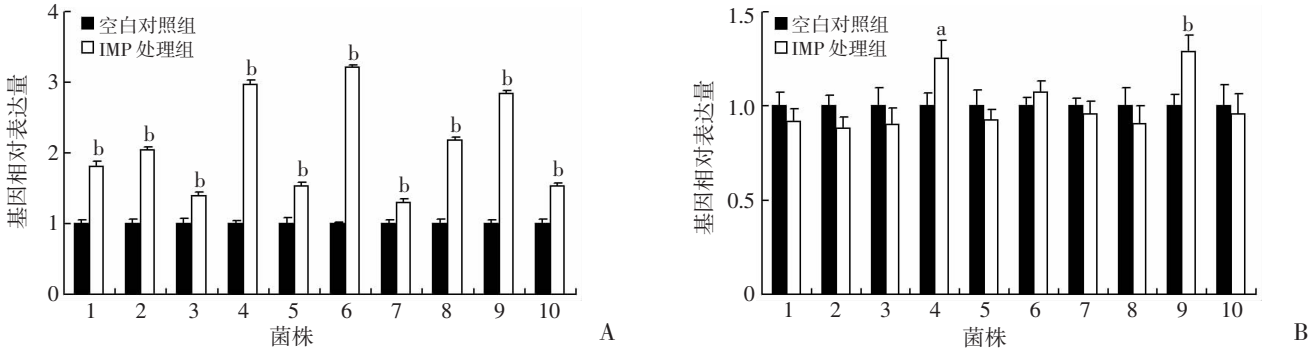
图 2 微孔法测定鲍曼不动杆菌的生物膜形成能力



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与空白对照组比较

A: sub-MIC IMP 对 IMP 耐药鲍曼不动杆菌粘附能力的影响 1~10 分别为 IMP 耐药菌株 A171~A180; B: sub-MIC IMP 对 IMP 敏感鲍曼不动杆菌粘附能力的影响 1~10 分别为 IMP 敏感菌株 A181~A190

图 3 菌落平板计数法测定鲍曼不动杆菌的粘附能力



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较

A:sub-MIC IMP 对 IMP 耐药鲍曼不动杆菌毛基因表达的影响 1~10 分别为 IMP 耐药菌株 A171~A180;B:sub-MIC IMP 对 IMP 敏感鲍曼不动杆菌基因表达的影响 1~10 分别为 IMP 敏感菌株 A181~A190

图 4 定量 RT-PCR 测定鲍曼不动杆菌Ⅳ型菌毛基因的表达

3 讨论

临床上 80% 的细菌感染与生物膜相关,由于生物膜的物理屏障和生物膜内细菌较低的生长速度和代谢水平,使细菌可以逃避抗菌药物和宿主免疫系统的攻击[11]。在条件适宜时,可以导致新的感染,使感染趋于慢性化且难于控制[12]。鲍曼不动杆菌是临床上生物膜感染常见的菌株之一,且具有较高的耐药性,如耐药鲍曼不动杆菌形成生物膜感染将给临床治疗带来更大的困难[13-14]。本研究发现 sub-MIC IMP 可以诱导耐药鲍曼不动杆菌细菌生物膜的形成,促进细菌的粘附性和增加细菌的运动能力,可使耐药细菌更加难于清除,不利于临床治疗,因而针对耐药鲍曼不动杆菌的感染应慎重选择 IMP 进行治疗。而对于 IMP 敏感鲍曼不动杆菌,sub-MIC IMP 则多表现为抑制,但也有诱导的菌株存在。目前关于 sub-MIC 抗菌药物对于生物膜的研究较多,在临床中出现抑制和诱导这种相反结果的也较为普遍,如红霉素对铜绿假单胞菌虽对大部分临床分离菌具有生物膜抑制作用,但是仍有诱导作用的报道[15]。这种差异可能是由于菌株的差异性导致的。本研究发现耐药是 sub-MIC IMP 影响鲍曼不动杆菌生物膜形成的重要因素,其原因可能为耐药株实验中外界高浓度的 IMP 虽然不能杀灭细菌,但是诱导了压力调节的相关基因表达,而压力相关调节基因是生物膜形成的促进因素,其原因仍需进一步证实。

sub-MIC IMP 对鲍曼不动杆菌粘附和运动的影响均与细菌生物膜形成的实验结果趋势一致,提示细菌生物膜的形成与细菌粘附和运动密切相关,是细菌生物膜形成能力的重要条件。鲍曼不动杆菌生物膜的形成和运动粘附能力均和Ⅳ型菌毛相关[16],而本研究发现在 sub-MIC IMP 作用下,仅在Ⅳ型菌毛相关基因表达增加的菌株才有生物膜形成的增强。已有研究表明妥布霉素等抗菌药物可能通过增加菌毛基因的表达而促进细菌生物膜的形成[17-18]。此外,有研究表明环境压力能诱导细菌菌毛基因的表达[19],且有诱导情况出现的菌株具有较高的 MIC,据此推测 sub-MIC IMP 可能通过压力因素诱导细菌菌毛基因的表达,继而影响生物膜的形成,但其机制仍需进一步研究。研究提示菌毛可能是生物膜形成和细菌运动的关键因素,也可能成为生物膜治疗的靶点。

随着抗菌药物的广泛及不合理的使用,细菌的耐药率不断增高,在临床治疗过程中处于 sub-MIC 的时间也随之延长。本研究发现 sub-MIC IMP 对耐药和敏感鲍曼不动杆菌具有不同的作用,为临床抗菌药物的合理使用提供了理论依据。

参考文献:

[1] SHIN B, PARK W. Antibiotic resistance of pathogenic Acinetobacter species and emerging combination therapy[J]. J Microbiol, 2017, 55(11): 837-849. DOI: 10.1007/s12275-017-7288-4.

[2] ZHANG Y, YAO Z, ZHAN S, *et al*. Disease burden of intensive care unit-acquired pneumonia in China: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Infect Dis, 2014, 29: 84-90. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.05.030.

[3] MICHALOPOULOS A, FALAGAS M E. Treatment of Acinetobacter infections[J]. Exp Opin Pharmacother, 2010, 11

(5): 779 – 788.

[4] JARURATANASIRIKUL S, SUDSAI T. Comparison of the pharmacodynamics of imipenem in patients with ventilator-associated pneumonia following administration by 2 or 0.5 h infusion[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(3): 560 – 563. DOI:10.1093/jac/dkn543.

[5] PATEL J B, COCKRILL Ⅲ F R, ALDER J, *et al*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[M]. 25th ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2015: 56 – 57.

[6] 杨馥嘉,冯伟,孙凤军.我院呼吸科鲍曼不动杆菌耐药及流行病学特征分析[J].第三军医大学学报, 2018, 40(3): 259 – 263. DOI:10.16016/j.1000-5404.201709112.
YANG F J,FENG W,SUN F J. Drug resistance and epidemiological characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolated from respiratory department of our hospital, Chongqing[J]. J Third Mil Med Univ,2018,40(3):259 – 263. DOI:10.16016/j.1000-5404.201709112.

[7] SUN F, OU Q, WANG Q, *et al*. The resistance and transmission mechanism of *Acinetobacter baumannii* isolates in a tertiary care hospital, China[J]. J Chemother, 2016, 28(6): 476 – 481. DOI:10.1080/1120009X.2016.1139335.

[8] KIM Y H, LEE Y, KIM S, *et al*. The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 in the formation of biofilms[J]. Proteomics, 2006, 6(23): 6181 – 6193. DOI:10.1002/pmic.200600320.

[9] XU Z G, GAO Y, HE J G, *et al*. Effects of azithromycin on pseudomonas aeruginosa isolates from catheter-associated urinary tract infection[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(2): 569 – 572. DOI:10.3892/etm.2014.2120.

[10] ASADISHAD B, HIDALGO G, TUFENKJI N. Pomegranate materials inhibit flagellin gene expression and flagellar-propelled motility of uropathogenic Escherichia coli strain CFT073[J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 334(2): 87 – 94. DOI:10.1111/j.1574-6968.2012.02622.x.

[11] MURAKAMI K, ONO T, NOMA Y, *et al*. Explorative gene analysis of antibiotic tolerance-related genes in adherent and biofilm cells of Pseudomonas aeruginosa[J]. J Infect Chemother, 2017, 23(5): 271 – 277. DOI:10.1016/j.jiac.2017.01.004.

[12] FURUKAWA S. Studies on formation, control and application of biofilm formed by food related microorganisms[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2015, 79(7): 1050 – 1056. DOI:10.1080/09168451.2015.1018126.

[13] KIM H A, RYU S Y, SEO I, *et al*. Biofilm formation and colistin susceptibility of acinetobacter baumannii isolated from korean nosocomial samples[J]. Microb Drug Resist, 2015, 21(4): 452 – 457. DOI:10.1089/mdr.2014.0236.

[14] GREENE C, WU J, RICKARD A H, *et al*. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces[J]. Lett Appl Microbiol, 2016, 63(4): 233 – 239. DOI:10.1111/lam.12627.

[15] BAGGE N, SCHUSTER M, HENTZER M, *et al*. Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(4): 1175 – 1187. DOI:10.1128/aac.48.4.1175-1187.2004.

[16] HARDING C M,TRACY E N,CARRUTHERS M D,*et al*. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type Ⅵ pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility[J]. MBio,2013,4(4): e00360-13. DOI:10.1128/mBio.00360-13.

[17] HACKER J, OTT M, HOF H. Effects of low, subinhibitory concentrations of antibiotics on expression of a virulence gene cluster of pathogenic Escherichia coli by using a wild-type gene fusion[J]. Int J Antimicrob Agents, 1993, 2(4): 263 – 270. DOI:10.1016/0924-8579(93)90060-i.

[18] BRAGA P C, SASSO M D, SALA M T. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence[J]. J Antimicrob Chemother, 2000, 45(1): 15 – 25. DOI:10.1093/jac/45.1.15.

[19] FLORES-KIM J, DARWIN A J. Regulation of bacterial virulence gene expression by cell envelope stress responses[J]. Virulence, 2014, 5(8): 835 – 851. DOI:10.4161/21505594.2014.965580.

(收稿:2018-08-21;修回:2018-09-26)

(编辑 王 红)