meta-analysis [J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 8(6): 8848-8853

[11] Krall EM, Arlt EM, Hohensinn M. Vector analysis of astigmatism correction after toric intraocular lens implantation [J]. J Cataract Refract Surg, 2015, 41(4): 790-799

[12] Lam DKT, Chow VWS, Ye C. Comparative evaluation of aspheric toric intraocular lens implantation and limbal relaxing incisions in eyes with cataracts and ≤ 3 dioptres of astigmatism [J]. Br J Ophthalmol, 2016, 100(2): 258-262

[13] Mursch-Edlmayr AS, Bolz M, Luft N, et al. Intraindividual comparison between femtosecond laser-assisted and conventional cataract surgery[J]. J Cataract Refract Surg, 2017, 43: 215-222

[14] Nejima R, Terada Y, Mori Y, et al. Clinical utility of femtosecond laser-assisted astigmatic keratotomy after cataract surgery [J]. Jpn J Ophthalmol, 2015, 59(4): 209-215

[15] Schultz T, Joachim SC, Stellbogen M, et al. Prostaglandin release during femtosecond laser-assisted cataract surgery: main inducer[J]. J Refract Surg, 2015, 31: 78-81

[16] Toto L, Calienno R, Curcio C, Induced inflammation and apoptosis in femtosecond laser-assisted capsulotomies and manual capsulorhexes: an mmunohistochemical study [J]. J Refract Surg, 2015, 31: 209-214

[17] Aramberri J. Intraocular lens power calculation after corneal reffactive surgery: double-K method[J]. J Cataract Refract Surg, 2013, 29(11): 2063-2068

[18] Chen C, Zhu M, Sun Y, et al. Bimanual microincision versus standard coaxial small-incision cataract surgery: meat-analysis of randomized controlled trials [J]. Eur J Ophthalmol, 2015, 25 (2): 119-127

[19] Nagy ZZ, Dunai A, Kranitz K, et al. Evaluation of femtosecond laser-assisted and manual clear corneal incisions and their effect on surgically induced astigmatism and higher-order aberrations [J]. J Refract Surg, 2014, 30(8): 522-525

[20] Nemeth G, Berta A, Szalai E, et al. Analysis of surgically induced astigmatism on the posterior surface of the cornea [J]. J Refract Surg, 2014, 30(9): 604-608

[21] Kawahara A, Kurosaka D, Yoshida A. Comparison of surgically induced astigmatism between one-handed and two-handed cataract surgery techniques[J]. Clin Ophthalmol, 2013, 7: 1967-1972

[22] Yoon JH, Kim KH, Lee JY, et al. Surgically induced astigmatism after 3.0 mm temporal and nasal clear corneal incisions in bilateral cataract surgery[J]. Indian J Ophthalmol, 2013, 61(11): 645-648

[23] Denoyer A, Ricaud X, Van Went C, et al. Influence of corneal biomechanical properties on surgically induced astigmatism in cataract surgery[J]. J Cataract Refract Surg, 2013, 39(8): 1204-1210

[24] Wang J, Zhang EK, Fan W Y, et al. The effect of Micro-incision and small-incision coaxial phacoemulsification on corneal astigmatism[J]. Clinical and Experimental Ophthalmology, 2009, 37(7): 664-669

[25] Park Y. Torsional and flattening effect on corneal astigmatism after cataract surgery : a retrospective analysis [J]. BMC ophthalmology, 2017, 17(1): 10

[26] Chan TC,Cheng GP, Wang Z, et al. Vector Analysis of Corneal Astigmatism After Combined Femtosecond-Assisted Phacoemulsification and Arcuate Keratotomy [J]. Am J Ophthalmol, 2015, 160(2): 250-255

[27] Tang M, Wang L. Intraocular lens power calculation after myopicand hyperopic laser vision correction using optical cohelence tomography [J]. Saudi J Ophthalmol, 2012, 26(1): 19-24

[28] Joshi RS. Sub-conjunctival dislocation of posterior chamber intraocular lens: five years after manual, small-incision cataract surgery[J]. Nepal J Ophthalmol, 2014, 6(11): 91-94

[29] Gavallini GM, Liuli A, Longanesi L. Surgically induced astigmatism manual extracapsular cataract extraction or after phacoemulsification procedure[J]. Eur J Ophthalmol, 1996, 6(3): 257-263

[30] Jiménez R, Valero A, Fernández J, et al. Optical quality and visual performance after cataract surgery with biaxial microincision intraocular lens implantation [J]. Journal of cataract and refractive surgery, 2016, 42(7): 1022-1028

[31] Takmaz T, Yildiz Y, Bayhan H A, et al. Coaxial, microcoaxial, and biaxial microincision cataract surgery[J]. Cataract Refract Surg, 2010, 36(5): 740-746

（上接第 103 页）

[24] Swayne R, Ellington MJ, Curran MD, et al. Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo-β-lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β-lactamases[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(4): 352-356

[25] Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(9): 831-838

[26] Chen Q, Zhou JW, Fan JZ, et al. Simultaneous emergence and rapid spread of three OXA-23 producing Acinetobacter baumannii ST208 strains in intensive care units confirmed by whole genome sequencing [J]. Infect Genet Evol, 2018, 58: 243-250

[27] Jeon H, Kim S, Kim MH, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates from a Korean hospital that carry blaOXA-23 [J]. Infect Genet Evol, 2018, 58: 232-236

[28] Matsui M, Suzuki M, Suzuki M, et al. Distribution and molecular characterization of Acinetobacter baumannii international clone II lineage in Japan [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62 (2): e02190-17

[29] Petrović T, Uzunović S, Barišić I, et al. Arrival of carbapenem-hydrolyzing-oxacillinases in Acinetobacter baumannii in Bosnia and Herzegovina[J]. Infect Genet Evol, 2018, 58: 192-198

[30] Harper TM, June CM, Taracila MA, et al. Multiple substitutions lead to increased loop flexibility and expanded specificity in Acinetobacter baumannii carbapenemase OXA-239 [J]. Biochem J, 2018, 475 (1): 273-288

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.01.021

分离自老年病房的鲍曼不动杆菌耐药机制初步研究 *

周 玉 龚美亮 闫中强 丛玉隆 邓新立△

（解放军总医院南楼检验科 北京 100853）

摘要 目的：检测老年住院患者分离的鲍曼不动杆菌的主要耐药基因，并研究不同耐药基因型与耐药表型之间的对应关系。**方法：**用 PCR 方法检测分离自老年住院患者的不同标本来源的 170 例非重复鲍曼不动杆菌的耐药基因。检测的耐药基因包括 D 类碳青霉烯酶：bla_{OXA-51}，bla_{OXA-23}，bla_{OXA-24}，bla_{OXA-58}，B 类金属碳青霉烯酶：bla_{VIM}，bla_{IMP}，bla_{SIM}，bla_{GIM}，bla_{DIM}，bla_{NDM-1}，以及 A 类超广谱 β- 内酰胺酶：blaKPC，共计 11 种。根据检测结果对菌株进行基因分型，并研究不同基因型与 CRAB 和 CSAB 这两种耐药表型之间的对应关系。**结果：**170 株鲍曼不动杆菌的固有基因 bla_{OXA-51} 均为阳性，此外，主要检出基因为 bla_{OXA-23}，共 124 株。另外检测出 bla_{KPC} 12 株，bla_{OXA-58} 6 株，bla_{NDM-1} 3 株，bla_{SIM} 2 株，bla_{OXA-24}、bla_{VIM} 和 bla_{DIM} 各 1 株，IMP 和 GIM 未检出。根据检出耐药基因的不同组合，分为 bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} 阳性为基础的 A 型（124 株）及 bla_{OXA-23} 阴性为基础的 B 型（bla_{OXA-51}，39 株）、C 型（bla_{OXA-51} + bla_{OXA-58}，6 株）、D 型（bla_{OXA-51} + bla_{OXA-24}，1 株）共计四类基因型。从耐药表型来看，128 株碳青霉烯耐药菌中有 122 株 bla_{OXA-23} 为阳性，在 CRAB 中占 95.3%（122/128），42 株碳青霉烯敏感株中，有 40 株 bla_{OXA-23} 为阴性，在 CSAB 中占 95.2%（40/42）。**结论：**老年病房流行的耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的耐药基因型以 bla_{OXA-23} 阳性为主。其与鲍曼不动杆菌 CRAB 耐药表型、bla_{OXA-23} 阴性与 CSAB 耐药表型之间有良好的对应关系。

关键词：鲍曼不动杆菌；老年患者；耐药基因

中图分类号：R446.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2019)01-99-05

The Preliminary Research on Resistance Mechanism of *Acinetobacter baumannii* Prevalent in Geriatric Wards*

ZHOU Yu, GONG Mei-liang, YAN Zhong-qiang, CONG Yu-long, DENG Xin-li△

(Department of Nanlou Clinical Laboratory, PLA general hospital, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To detect the major resistance genes of *A. baumannii* isolated from elderly hospitalized inpatients, and to research the relationship between the resistance genotype and the drug resistant phenotype. **Methods:** PCR was used to detect the resistance genes of 170 non repetitive AB isolated from different specimens of elderly inpatients, and the resistant genes included the class D carbapenem enzyme: bla_{OXA-51}, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-58}, class B carbapenem enzyme: bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{SIM}, bla_{GIM}, bla_{DIM}, bla_{NDM-1}, and type A extended spectrum beta lactamases: bla_{KPC}. Genotyping was applied according to the test results, and the corresponding relationships between different genotypes and phenotypes (including CRAB and CSAB)were investigated. **Results:** bla_{OXA-51} was detected in all 170 isolates and bla_{OXA-23} was detected in 124 isolates. The other test results were as follows: bla_{KPC} (12 strains), bla_{OXA-58} (6 strains), bla_{NDM-1} (3 strains), bla_{SIM} (2 strains), bla_{OXA-24} (1 strains), bla_{VIM} (1 strains) and bla_{DIM} (1 strains), and bla_{IMP} and blaGIM genes were not detected any more. According to the different combination of drug resistance genes, 170 strains were divided into four genotypes: type A was based on bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} (124 strains), and others were based on negative of bla_{OXA-23}: type B (bla_{OXA-51}, 39 strains), type C (bla_{OXA-51} + bla_{OXA-58}, 6 strains), type D (bla_{OXA-51} + bla_{OXA-24}, 1 strain). In the resistant phenotype, 122 of the 128 carbapenems resistant strains were positive for bla_{OXA-23}, bla_{OXA-23} positive strains in CRAB accounted for 95.3% (122/128), 40 of 42 carbapenems susceptible strains were negative for bla_{OXA-23}, bla_{OXA-23} negative strains in CSAB accounted for 95.2% (40/42). **Conclusion:** The resistant genotypes of carbapenem resistant AB prevalent in geriatric wards were mainly bla_{OXA-23} positive. There was a good correspondence between bla_{OXA-23} positive and CRAB phenotype, and correspondingly between bla_{OXA-23} negative and CSAB phenotype.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; Senile Patients; Resistance gene

Chinese Library Classification(CLC): R446.5 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)01-99-05

前言

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)广泛分布于自然界，在医院内环境、空气及皮肤表面均能发现[1]，是医院获得

* 基金项目：全军医学科技“十二五”科研项目重点课题（BWS11-C073）

作者简介：周玉(1982-)，主治医师，主要研究方向：临床检验诊断学，E-mail: zhouy427@163.com

△通讯作者：邓新立(1969-)，副主任医师，主要研究方向：临床检验诊断学，E-mail: bjdxl@163.com

(收稿日期：2018-03-08 接受日期：2018-03-28)

性感染的常见条件致病菌之一，常引起医院获得性肺炎、泌尿系统感染、血流感染等，尤其在免疫力低下的 ICU 患者中分离率较高[2-5]。近年来 AB 耐药性呈大幅上升趋势，多重耐药 AB 的快速传播归因于其基因组在面对逆境和压力时可以迅速突变的能力[6-8]。多重耐药 AB 感染患者由于治疗选择严重受限预后很差，国内研究显示 ICU 中多重耐药 AB 感染患者死亡率达 47%，美国研究表明这一数据可高达 52%-66%，而多重耐药 AB 引起的新生儿菌血症亦可导致 58%的死亡率[9-12]。AB 耐药机制很复杂，主要分为生物学和物理学作用两大类，前者包括产耐药酶、对不同效应酶进行修饰或降解、青霉素结合蛋白改变等，后者包括膜孔蛋白缺失造成抗菌药物难以进入菌体、外排泵表达造成抗菌药物的加速外排等。诸多机制中，β 内酰胺类耐药基因尤其是碳青霉烯酶的产生在 AB 的多重耐药方面发挥重要作用[13-15]。

现已报道的 AB 碳青霉烯酶，涉及到 Ambler 分类的 A、B、D 类酶。AB 常见的是 D 类酶中 bla_{OXA-23}，bla_{OXA-24}，bla_{OXA-51} 和 bla_{OXA-58} 基因谱系编码的 OXA 类产物，这些基因可能位于质粒或者染色体，克拉维酸不能抑制酶的活性，在世界的很多地方都被发现[16,17]。AB 中普遍存在的 bla_{OXA-51} 基因使其成为 AB 鉴定的重要遗传标记，其编码产物可以水解青霉素类和碳青霉烯类，但作用非常弱，亦不能有效对抗广谱的头孢菌素类抗菌药物 [18]。bla_{OXA-51} 对 β- 内酰胺的耐药性需要基因上游插入序列 ISAba1，后者作为一个强转录启动子而存在。此外，AB 中还发现了 B 类金属碳青霉烯酶中的 bla_{VIM}，bla_{IMP} 和 bla_{SIM} 型，尤其在亚洲太平洋地区和拉丁美洲多见。这些酶使菌株对碳青霉烯类和除氨曲南之外的其他 β- 内酰胺类抗生素高水平耐药，且发现与复杂的Ⅰ类整合子有关[19]。此外，大范围的 A 类超广谱 β- 内酰胺酶，包括 bla_{CTX-M}，bla_{TEM}，bla_{SHV}，bla_{GES}，bla_{SCO}，bla_{PER}，bla_{KPC} 和 bla_{VEB} 家族，都在 AB 的研究中发现过[20]。以上这些针对 AB 耐药基因的研究多集中在普通调研或 ICU、新生儿等群体，老年患者由于免疫力低下和长期住院也是 AB 感染的易感人群，其研究资料却相对少见[21]。

本研究以分离自老年住院患者的 AB 为实验对象，检测以下耐药基因：D 类碳青霉烯酶 bla_{OXA-51}、bla_{OXA-23}、bla_{OXA-24}、bla_{OXA-58}（其中 bla_{OXA-51} 为 AB 固有基因）；B 类金属碳青霉烯酶中的 bla_{VIM}，bla_{IMP}，bla_{SIM}，bla_{GIM}，bla_{DIM}，bla_{NDM-1}；A 类超广谱 β- 内酰胺酶 bla_{KPC}，分析老年病房 AB 耐药基因的分子分型。以期明确老年住院患者多重耐药 AB 的分子耐药机制，及耐药基因与耐药表型之间的关系，为进一步的诊疗防治提供理论基础和依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

从 2014 到 2015 年共收集到 170 例非重复 AB 菌株，源自 170 位住院超过 48 小时的有感染指征的老年患者，年龄 61-99 岁，平均 86.8 岁。90%菌株分离自呼吸道标本，其余来源于尿，导管，胆汁和胸腹水。其中包括作为试验组的 128 株多重耐药的碳青霉烯耐药株（CRAB）及作为对照组的 42 株对各类抗菌药物较敏感的碳青霉烯敏感菌株（CSAB）。

1.2 主要试剂与仪器

MH 琼脂平板（OXOID）；VITEK2 全自动鉴定和药敏分析仪（法国生物梅里埃）；PCR 仪（PE 公司）；稳压稳流电泳仪（北京六一仪器厂）；数码凝胶图像处理系统（上海小源科技有限公司）；PCR 反应试剂盒 (Invitrogen)；GeneRuler 100 bp Ladder（Fermentas 公司）；K10CD 干式恒温器（杭州蓝焰科技公司）。

1.3 方法

1.3.1 引物设计和合成 引物序列参照文献[22-25]，具体见表 1，均由上海生工生物公司合成。

1.3.2 模板制备 采用煮沸法，将 MH 平板上过夜培养的新鲜菌落均匀溶于 2 mL 灭菌纯水中，调成 1 麦氏浓度，取 1-1.5 mL 于灭菌 EP 管中，置于 KIOCD 干式恒温器 10 min 后，高速（13000 r/min）离心 10 min，分离出的上清液作为模板备用。

1.3.3 PCR 反应体系和反应条件 反应总体积 25 μL，包括 Taq 酶 1 μL，10× buffer 2.5 μL，模板 1 μL（10 μM），引物各 1 μL，纯水补足至 25 μL（需 18.5 μL）。反应条件：94 ℃ 预变性 4 min 后，进行 30 个扩增过程的循环（变性、退火、延伸）：94 ℃ 30 s，52~56℃ 60 s，72℃ 70 s。最终 72℃ 5 min。反应产物置于 4 ℃ 备用。

1.3.4 电泳 用 TAE 缓冲液配置 1.5 %的琼脂糖凝胶，加热融化后加入 3 μL 的 EB，倒入电泳槽凝固。拔出梳子，每孔加入与 Loading buffer 充分混匀后的 PCR 产物 10 μL，Marker 加 5 μL。电压 120 V，电泳 40 min，在凝胶成像仪上打开紫外灯进行观察，记录结果。

1.3.5 扩增产物的验证 将每种产物的阳性结果随机挑选一个送上海生工测序，其结果在网上进行 Blast 比对分析，以确定是否为目的基因。

1.4 统计分析

应用 SPSS19.0 统计软件对实验结果进行数据分析，采用卡方检验进行两组率的比较，*P<0.05* 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药基因扩增结果

170 株菌共扩增出 bla_{OXA-51} 170 株，bla_{OXA-23} 124 株，bla_{OXA-58} 6 株，bla_{OXA-24} 1 株，bla_{IMP} 0 株，bla_{GIM} 0 株，bla_{VIM} 和 bla_{DIM} 各 1 株，bla_{SIM} 2 株，bla_{NDM-1} 3 株，bla_{KPC}12 株（阳性结果见图 1）。

2.2 AB 耐药基因的分子分型

根据检测结果中的优势耐药基因存在与否，将 170 株 AB 人为分成四类基因型的组合，分别是以 bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} 阳性为基础的 A 型（124 株）及 bla_{OXA-51} 阳性，bla_{OXA-23} 阴性为基础的 B 型（bla_{OXA-51}，39 株）、C 型（bla_{OXA-51} + bla_{OXA-58}，6 株）、D 型（bla_{OXA-51} + bla_{OXA-24}，1 株）。其中 A 型在 bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} 基础上，与其它碳青霉烯酶基因有不同组合，故又分为 A1~A8 八种亚型：A1 是单纯 bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} 的组合，A2~A8 是以 bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} 为基础，与其他不同酶的组合（详见表 2）。

2.3 AB 耐药基因型与耐药表型的关系

将 170 株菌按照对碳青霉烯药物敏感性不同分为耐药的 CRAB 组和敏感的 CSAB 组，分别统计耐药基因型在各组的比例，发现 CRAB 组以耐药基因 A 型为主，为 122 株（95.3%），即以 bla_{OXA-23} 为主；CSAB 组以 B 型为主，即 95.2%的菌株除固有基因外，不含其他碳青霉烯酶基因（详见表 3）。CRAB 和 CSAB 两组间 bla_{OXA-23} 阳性率的差异有统计学意义（*P<0.01*）。

表 1 耐药基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of drug-resistant genes

Primers	Sequence	Target gene
OXA-23F	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3'	bla_{OXA-23}
OXA -23R	5'- ATTTCTGACCGCATTTCCAT -3'	
OXA -24F	5'- GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA -3'	bla_{OXA-24}
OXA -24R	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'	
OXA -51F	5'- TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'	bla_{OXA-51}
OXA -51R	5'- TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	
OXA -58F	5'- AAGTATTGGGGCTTGTGCTG -3'	bla_{OXA-58}
OXA -58R	5'- CCCCTCTGCGCTCTACATAC -3'	
VIM-F	5'- GATGGTGTTTGGTCGCATA -3'	bla_{VIM}
VIM-R	5'- CGAATGCGCAGCACCAG -3'	
IMP-F5	5'- GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC -3'	bla_{IMP}
IMP-R	5'- GGTTTAAYAAAACAACCACC -3'	
SIM-F	5'- TACAAGGGATTCGGCATCG-3'	bla_{SIM}
SIM-R	5'- TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG-3'	
GIM-F	5'- TCGACACACCTTGGTCTGAA -3'	bla_{GIM}
GIM-R	5'- AACTTCCAACTTTGCCATGC -3'	
NDM-F	5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTC -3'	bla_{NDM}
NDM-R	5'-CGGAATGGCTCATCACGATC -3'	
DIM-F	5'-GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG -3'	bla_{DIM}
DIM-R	5'- CGTTCGGCTGGATTGATTTG-3'	
KPC-F	5'- CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC -3'	bla_{KPC}
KPC-R	5'- ACGACGGCATAGTCATTTGC -3'	

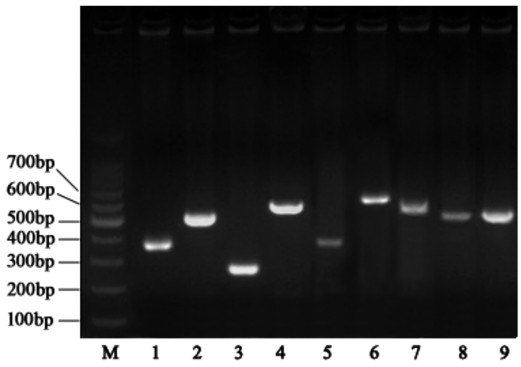

图 1 鲍曼不动杆菌耐药基因扩增电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of resistance gene of A. baumannii

From left to right: Marker, bla_{OXA-51}(353bp), bla_{OXA-23}(501bp), bla_{OXA-24}(246bp), bla_{OXA-58}(599bp), bla_{VIM}(390bp), bla_{DIM}(699bp), bla_{NDM-1}(621bp), bla_{SIM}(570bp), bla_{KPC}(538bp).

3 讨论

CRAB 的研究以往多集中在 ICU 或新生儿,但针对老年病房 CRAB 的感染特点、耐药性和耐药机制的研究资料相对较少。老年患者作为特殊群体,由于免疫力低、基础疾病多、住院时间长、病情较危重等特点,也应该作为多重耐药 AB 感染和爆发的重点监测对象。本研究针对分离自老年患者的 CRAB 和 CSAB, 选择具有代表性的 D 类碳青霉烯酶:bla_{OXA-51},bla_{OXA-23},bla_{OXA-24},bla_{OXA-58},B 类金属碳青霉烯酶 bla_{VIM},bla_{IMP},bla_{SIM},bla_{GIM},bla_{DIM},bla_{NDM-1}, 以及 A 类超广谱 β- 内酰胺酶 bla_{KPC} 的耐药基因进行检测。根据检测结果中优势耐药基因存在与否,将菌株分为以优势基因 bla_{OXA-23} 阳性为基础的 A 型及 bla_{OXA-23} 阴性为基础的 B、C、D 基因型。在十一种常见碳青霉烯酶基因中,所有菌株都能检出 AB 固有基因 bla_{OXA-51},与以往报道一致。

碳青霉烯耐药的 CRAB 中,bla_{OXA-23} 的检出率最高,阳性率达 95.3%,这与既往报道中亚洲地区多重耐药 AB 以 bla_{OXA-23} 流行株为主是一致的。多项分子流行病学调查研究显示,亚洲地区 CRAB 以产 bla_{OXA-23} 碳青霉烯酶为主,中国、韩国、日本及一些东南亚国家均报道过携带 bla_{OXA-23} 的多重耐药 AB 的爆发流行[26-28],欧洲地区也偶有 bla_{OXA-23} AB 流行株的报道[29]。本研究证实了在老年患者这个特殊群体中,CRAB 分子流行特点仍以 bla_{OXA-23} 为主,与亚洲地区整体流行趋势一致。另外,bla_{OXA-23} 的突变体 $bla_{OXA-239}$ 已被发现于临床分离株,其在水解头孢菌素和氨曲南方面具有更高的效率[30]。但本研究中的 bla_{OXA-23} 经过测序,未发现 $bla_{OXA-239}$ 突变体。此外,CRAB 中同一耐药基因检出

表 2 170 株 AB 碳青霉烯酶耐药基因型的不同组合

Table 2 Different combinations of carbapenem resistant genotypes of 170 *A. baumannii*

bla_{OXA-51}	bla_{OXA-23}	bla_{OXA-24}	bla_{OXA-58}	bla_{VIM}	bla_{SIM}	bla_{DIM}	bla_{NDM-1}	bla_{KPC}	Drug-resistant genotypes	Quantity of strains
+	+	-	-	-	-	-	-	-	A1	108
+	+	-	-	-	-	-	-	+	A2	10
+	+	-	-	-	-	+	-	-	A3	1
+	+	-	-	-	-	-	+	+	A4	1
+	+	-	-	+	-	-	+	-	A5	1
+	+	-	-			+		-	A6	1
+	+	-	-	-	+	-	-	-	A7	1
+	+	-	-	-	+	-	-	+	A8	1
+	-	-	-	-	-	-	-	-	B	39
+	-	-	+	-	-	-	-	-	C	6
+	-	+	-	-	-	-	-	-	D	1

表 3 170 株 AB 碳青霉烯酶耐药基因型的不同组合与耐药表型的关系

Table 3 The relationship between different combinations of carbapenem resistant genotypes and drug resistant phenotype of 170 A. baumannii

Drug-resistant phenotype(n)	Drug-resistant genotypes	Different combinations of drug-resistant genes	Quantity of strains(n, %)
CRAB (128)	A1	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23}	106(82.8%)
	A2	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} + bla_{KPC}	10(7.8%)
	A3	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} + bla_{DIM}	1(0.8%)
	A4	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} + bla_{KPC} + bla_{NDM-1}	1(0.8%)
	A5	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} + bla_{NDM-1} + bla_{VIM}	1(0.8%)
	A6	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} + bla_{NDM-1}	1(0.8%)
	A7	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} + bla_{SIM}	1(0.8%)
	A8	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23} + bla_{KPC} + bla_{SIM}	1(0.8%)
	B	bla_{OXA-51}	3(2.3%)
	C	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-58}	2(1.6%)
	D	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-24}	1(0.8%)
CSAB (42)	B	bla_{OXA-51}	36(85.7%)
	C	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-58}	4(9.5%)
	A1	bla_{OXA-51} + bla_{OXA-23}	2(4.8%)

率超过 95%，提示病房内发生了克隆传播的可能性，这一点可通过 PFGE 实验加以证实。

在 CSAB 敏感株中，bla_{OXA-23} 的阳性率只有 4.8%，也即是阴性率为 95.2%。这个结果难以与其他研究进行比较，因为既往研究多集中在检测耐药 AB 的耐药基因，较少关于 AB 耐药株和敏感株之间耐药基因的比对，也缺少耐药基因与耐药表型之间对应关系和对应程度的资料。本研究证实了在 CSAB 中同样有 bla_{OXA-23} 的存在，但比例极低，敏感株中偶发耐药株的优势基因，进一步说明了 AB 耐药机制的复杂性，在表达调控及一些协同或制约作用的影响下，耐药基因与耐药表型并不能绝对对应，但对大多数菌株来说具有一定代表性。

在所有检测的碳青霉烯酶基因中，bla_{OXA-23} 的阳性率和阴性率与 CRAB 及 CSAB 的对应程度是最高的，具有统计学意义，提示了利用此基因从分子水平对 CRAB 进行快速检测和筛查的可能性。虽然在 CRAB 中也有其他几种耐药基因的检出：bla_{KPC}、bla_{OXA-58}、bla_{NDM-1}、bla_{SIM}、bla_{OXA-24}、bla_{VIM} 和 bla_{DIM}，但这几种耐药基因在 CRAB 中的百分比都比较低（0.8~7.8%），可除外对 CRAB 的代表性。对照耐药表型后可发现，这些菌株在 bla_{OXA-23} 的基础上，即使多了其他金属酶或超广谱 β- 内酰胺酶，在对各类药物的耐药程度上跟只有 bla_{OXA-23} 阳性的菌株相比并没有明显区别，说明在 bla_{OXA-23} 的基础上，其余金属酶或超广谱 β- 内酰胺酶对菌株耐药表型的改变作用不大，bla_{OXA-23} 的存在

与否才是决定 AB 对碳青霉烯类抗菌药物是否耐药的关键因素。分析结果显示有几株菌的耐药基因型与耐药表型之间的对应关系比较少见，提示除了耐药基因的存在与否外，耐药基因本身的表达调控及与其他耐药机制之间的协作或制约作用也对耐药表型的改变至关重要。

4 结论

本研究通过对分离自老年患者的 AB 十一种耐药基因的检测及对 AB 碳青霉烯敏感株和耐药株之间耐药基因的比对，明确了其中一种碳青霉烯酶基因 bla_{OXA-23} 与碳青霉烯耐药表型的良好对应关系，并通过本次分离菌株中 bla_{OXA-23} 对 CRAB 高达 95%的阳性预测值和对 CSAB 的 95%阴性预测值，提示了利用 $bla_{OXA-51}+bla_{OXA-23}$ 的组合形式对 CRAB 进行快速分子诊断和筛查的可能性。对 AB 耐药基因型的分析及其与耐药表型之间对应关系的研究，有利于加深对 AB 产生多重耐药性的分子机制的了解，通过明确耐药基因对耐药表型的作用，为抗生素新药的作用靶点和研发提供新策略，并为建立耐药 AB 的分子水平的快速诊断提供理论基础和依据。

参 考 文 献(References)

[1] Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(2): 91-102

[2] Gu Z, Han Y, Meng T, et al. Risk factors and clinical outcomes for patients with Acinetobacter baumannii bacteremia [J]. Medicine, 2016, 95(9): e2943

[3] Zarrilli R. Acinetobacter baumannii virulence determinants involved in biofilm growth and adherence to host epithelial cells[J]. Virulence, 2016, 7(4): 367-368

[4] López M, Rueda A, Florido JP, et al. Evolution of the Quorum network and the mobilome (plasmids and bacteriophages) in clinical strains of Acinetobacter baumannii during a decade [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2523

[5] Ju MH, Yao YL, Du CL, et al. Subsequent multidrug-resistant bacteremia is a risk factor for short-term mortality of patients with ventilator-associated pneumonia caused by Acinetobacter baumannii in intensive care unit: a multicenter experience[J]. Chin Med J (Engl), 2018, 131(3): 361-363

[6] Chen CH, Lin LC, Chang YJ, et al. Infection control programs and antibiotic control programs to limit transmission of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii infections: evolution of old problems and new challenges for institutes [J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12(8): 8871-8882

[7] Apisarnthanarak A, Buppajarntham A, Mundy LM. National survey of infectious diseases physicians on prevention practices for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in Thailand[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2016, 37(4): 489-491

[8] Kim YA, Park YS, Youk T, et al. Abrupt increase in rate of imipenem resistance in Acinetobacter baumannii complex strains isolated from general hospitals in Korea and correlation with carbapenem administration during 2002-2013 [J]. Ann Lab Med, 2018, 38 (2): 179-181

[9] Wieland K, Chhatwal P, Vonberg RP. Nosocomial outbreaks caused by Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa: Results of a systematic review [J]. Am J Infect Control, 2018, 2 [Epub ahead of print]

[10] Chen L, Yuan J, Xu Y, et al. Comparison of clinical manifestations and antibiotic resistances among three genospecies of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0191748

[11] Kanafani ZA, Zahreddine N, Tayyar R, et al. Multi-drug resistant Acinetobacter species: a seven-year experience from a tertiary care center in Lebanon[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2018, 7: 9

[12] Ulu-Kilic A, Gundogdu A, Cevahir F, et al. An outbreak of bloodstream infection due to extensively resistant Acinetobacter baumannii among neonates[J]. Am J Infect Control, 2018, 46(2): 154-158

[13] Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, et al. Molecular epidemiology of carbapenem- resistant Acinetobacter baumannii in Greece: an extended review (2000-2015) [J]. Future Microbiol, 2017, 12(9): 801-815

[14] Kröger C, Kary SC, Schauer K, et al. Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii [J]. Genes, 2016, 8(1): 12

[15] Nowak P, Paluchowska P. Acinetobacter baumannii: biology and drug resistance - role of carbapenemases [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2016, 54(2): 61-74

[16] Al Atrouni A, Hamze M, Jisr T, et al. Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon [J]. Int J Infect Dis, 2016, 52: 29-36

[17] Biglari S, Hanafiah A, Mohd Puzi S. et al. Antimicrobial resistance mechanisms and genetic diversity of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated from a teaching hospital in Malaysia[J]. Microb Drug Resist, 2017, 23(5): 545-555

[18] June CM, Muckenthaler TJ, Schroder EC, et al. The structure of a doripenem-bound OXA-51 class D β-lactamase variant with enhanced carbapenemase activity[J]. Protein Sci, 2016, 25(12): 2152-2163

[19] Liu CC, Tang CY, Chang KC, et al. A comparative study of class 1 integrons in Acinetobacter baumannii[J]. Gene, 2014, 544(1): 75-82

[20] Lee CR, Lee JH, Park M, et al. Biology of Acinetobacter baumannii: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 55

[21] Yu Z, Yulong C, Yaping X, et al. Cross-sectional and longitudinal studies on antimicrobial susceptibility profiles and the genomic diversity of Acinetobacter baumannii isolates from senile patients [J]. Int J Clin Exp Med, 2016, 9(6): 11137-11146

[22] Kamolvit W, Higgins PG, Paterson DL, et al. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in Acinetobacter spp[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(4): 959-963

[23] Pasanen T, Koskela S, Mero S, et al. Rapid molecular characterization of Acinetobacter baumannii clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in hospital district of Helsinki and Uusimaa[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85854

(下转第 98 页)