

对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌外膜蛋白表达及其分子流行病学研究

李茜 李智 曲彦 李海玲 邢金燕 胡丹

【摘要】 目的 分析鲍曼不动杆菌耐药情况、分布特征,以及院内、院间主要克隆株的流行情况;探讨外膜蛋白介导对碳青霉烯类耐药的可能机制。**方法** 收集青岛大学附属医院黄岛院区及解放军第四〇一医院 2013 年 7 月至 2014 年 7 月鲍曼不动杆菌临床分离株 145 株,采用纸片扩散法对其进行药敏试验;应用肠杆菌科基因间一致重复序列聚合酶链反应 (ERIC-PCR) 对菌株进行 DNA 分型及同源性分析,并采用 PCR 扩增外膜蛋白 carO 基因。随机抽取碳青霉烯耐药组 30 株鲍曼不动杆菌和敏感组 17 株鲍曼不动杆菌,用超声破碎及高速离心法提取外膜蛋白,并用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析外膜蛋白的表达情况。**结果** 145 株鲍曼不动杆菌对临床常用 16 种抗菌药物普遍耐药,其中耐碳青霉烯类 128 株 (耐药率 88.3%),多重耐药 (MDR) 137 株,泛耐药 (XDR) 126 株;对米诺环素敏感率最高 (79.3%),其次是阿米卡星 (40.7%)。碳青霉烯耐药组 carO 基因阳性率达 97.7% (125/128),碳青霉烯敏感组 carO 基因阳性率达 17.6% (3/17)。SDS-PAGE 显示,碳青霉烯敏感组 17 株鲍曼不动杆菌约在相对分子质量 47 000 (16 株)、37 000 (13 株) 和 29 000 (13 株) 处有相应条带表达;而耐药组 30 株在这 3 处分别有 20 株、25 株、23 株呈不同程度的缺失或减弱。聚类分析显示,145 株鲍曼不动杆菌共分为 8 个 ERIC 基因型,其中 A 型 71 株和 E 型 37 株,为主要流行株。**结论** 两家医院临床分离鲍曼不动杆菌耐药情况严重且存在院内、院间流行。外膜蛋白 carO 基因在耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌中广泛存在,外膜蛋白表达的缺失或减弱是鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类的重要机制之一。

【关键词】 鲍曼不动杆菌; 外膜蛋白; carO 基因; 肠杆菌科基因间一致重复序列聚合酶链反应

A study of outer membrane protein and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Li Qian*, Li Zhi, Qu Yan, Li Hailing, Xing Jinyan, Hu Dan. *Department of Critical Care Medicine, Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong, China
Corresponding author: Hu Dan, Email: hudanicu@126.com

【Abstract】 Objective To study the characteristics of the distribution and drug resistance of *Acinetobacter baumannii*, and the epidemiology of the main strains among wards and hospitals, and to investigate the role of outer membrane protein in producing resistance against carbapenems. **Methods** 145 *Acinetobacter baumannii* strains were collected from July 2013 to July 2014 from Huangdao Hospital Affiliated to Qingdao University and 401st Army Hospital. Antimicrobial susceptibility test was carried out with K-B disk diffusion method. Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) was used for DNA typing and test of homology. The carO gene of outer membrane protein was amplified by PCR, and the outer membrane proteins were extracted by ultrasonication and ultracentrifuge method from 30 randomly selected carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and 17 carbapenem-sensitive strains. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to analyze the expressions of outer membrane proteins. **Results** 145 *Acinetobacter baumannii* strains were generally resistant to 16 common antimicrobial agents, with the highest susceptibility rate of 79.3% for minocycline, followed by susceptibility rate of 40.7% for amikacin. There were 128 carbapenem-resistant strains (resistance rate of 88.3%), 137 multidrug-resistant strains and 126 extensively drug-resistant strains. The detection rates of carO gene were 97.7% (125/128) and 17.6% (3/17) in carbapenem-resistant and sensitive strains respectively. Around position of relative molecular mass 47 000, 16 of 17 sensitive isolates were expressed this protein, while 20 of 30 resistant ones were detected nothing or fade; 13 of 17 sensitive isolates were expressed around position of relative molecular mass 37 000 and 29 000 while 25 were detected nothing or fade around position of relative molecular mass 37 000 and

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.014

基金项目:山东省青岛市民生计划项目 (13-1-3-8-nsh)

作者单位: 266000 山东青岛, 青岛大学医学院附属青岛市立医院东院重症医学科 (李茜、李智、曲彦、胡丹); 266000 山东青岛, 解放军第四〇一医院 ICU (李海玲); 266000 山东青岛, 青岛大学附属医院黄岛院区 ICU (邢金燕)

通讯作者: 胡丹, Email: hudanicu@126.com

23 were detected nothing or fade around position of relative molecular mass 29 000 in 30 resistant ones. 145 *Acinetobacter baumannii* were classified into 8 types based on ERIC-PCR electrophoresis patterns, and the major prevalence types were type A (71 strains) and type E (37 strains). **Conclusions** Drug resistance of clinically isolated *Acinetobacter baumannii* is a serious problem in two hospitals; drug-resistant strains are spread and epidemic among wards and hospitals. The *carO* gene of outer membrane protein is widespread in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. The loss or fading of outer membrane protein may play an important role in *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems drugs.

【Key words】 *Acinetobacter baumannii*; Outer membrane protein; *carO* gene; Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction

鲍曼不动杆菌(AB)是一种非发酵的革兰阴性条件致病菌,在医院环境中广泛存在于地面、水池、医疗仪器、患者、医务人员的手,甚至空气中^[1-2],可引起各种组织和器官感染,包括肺炎、脑膜炎、菌血症、尿路感染和伤口感染等^[3]。近年来,随着广谱抗菌药物及免疫抑制剂的普遍使用,AB的分离率与耐药率逐年增高^[4-5],对多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)和泛耐药鲍曼不动杆菌(XDR-AB)感染的治疗已成为世界性难题。外膜孔蛋白是一种镶嵌于脂质双层结构上的外膜蛋白(OMP),亲水性药物只有通过其形成的亲水性通道才能进入菌体发挥作用。细菌通过改变 OMP 的结构或调节 OMP 的表达,可减少抗菌药物进入菌体,从而逃逸抗菌药物的杀菌作用。本研究通过分析青岛市两家医院临床分离 AB 的耐药情况,进一步探讨 AB 对碳青霉烯类耐药的分子机制。

1 资料与方法

1.1 菌株来源:收集青岛大学附属医院黄岛院区和解放军第四〇一医院 2013 年 7 月至 2014 年 7 月从住院患者的临床标本中分离出的 145 株 AB (剔除同一患者相同部位重复分离的菌株),质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2 药敏试验:采用纸片扩散法测定细菌对抗菌药物的敏感性,试验结果判断参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2012 年标准。

1.3 细菌 DNA 模板制备:取菌环挑取单一菌落置于溶菌肉汤(LB)培养液在摇箱中过夜培养,取浑浊菌液于小离心管(EP 管)内离心后弃上清,向沉淀内加入 200 μ L 高压超纯水,吹打混匀后 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,随后 4 $^{\circ}$ C 冷却 5 min,然后于 4 $^{\circ}$ C 离心 3 min。吸取上清液移入 EP 管中作为聚合酶链反应(PCR)检测模板,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.4 基因检测及同源性分析:PCR 反应体系 25 μ L,含 DNA 模板 3 μ L、Taq 酶 0.2 μ L,10 $\times$ Taq 缓冲液 2.5 μ L (15 mmol/L $MgCl_2$),2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,

10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L 及 PCR 水 15.3 μ L。OMP 相关基因 *carO* 基因 PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。肠杆菌科基因间一致重复序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,45 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统观察结果。*carO* 和 ERIC 基因引物序列按文献^[6-7]。

1.5 OMP 的分析:随机选取 30 株碳青霉烯类耐药菌株分析 OMP 表达,并与 17 株敏感菌株进行比较。

1.5.1 超声物理法提取 OMP:参照文献^[8-9]方法,取经两次传代的单菌落加入 15 mL LB 培养液中孵育 16 h,至对数生长期,取 1 mL 菌液转种到 20 mL LB 培养液中孵育 20 h,离心弃上清,沉淀用 10 mmol/L、pH 值 7.0 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次后重悬。于 -80 $^{\circ}$ C 和室温间反复冻融后置冰浴超声破菌,离心弃细胞沉淀,取上清液离心 1 h,将沉淀颗粒悬浮于 10 mmol/L 含 2% 十二烷基肌氨酸钠(SLS)、pH 值 7.0 的 PBS 中,室温下作用 30 min,离心弃上清,用 1% SLS 洗涤沉淀 2 次。提纯后的 OMP 悬浮于 10 mmol/L、pH 值 7.0 PBS 100 μ L 中。用紫外吸收法获取 280 nm 和 260 nm 处吸光度(A)值,测定蛋白质浓度,将蛋白调至均一浓度,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

$$\text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$$

1.5.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):取 20 μ L 蛋白样品加入 5 μ L 缓冲液混匀后 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,加样于 SDS-PAGE 凝胶中(10% 分离胶,5% 浓缩胶),浓缩胶用 80 V 电压,样品进入分离胶后改为 100 V。电泳结束后,切下分离胶用考马斯亮蓝 R250 染色 4 h,再用脱色液脱色至蛋白条带清晰。用法国 Vilber Lourmat 公司的 FUSION FX 成像系统拍摄电泳图谱。采用 Bio-1D 软件将电泳图谱与标准条带的相对迁移率进行对比,计算出标本所有条带所对应的相对分子质量。

1.6 统计学分析:采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计数资料采用百分比表示,基于 ERIC-PCR 谱型对 AB 进行聚类分析。

2 结果

2.1 标本来源及类型(表 1):145 株 AB 标本主要来自重症加强治疗病房(ICU)、高压氧病区和干部病房;标本类型主要是痰标本。

表 1 2013 年 7 月至 2014 年 7 月青岛市两家医院分离出 145 株鲍曼不动杆菌的标本来源及类型构成比

标本来源	菌株(株)	构成比(%)	标本类型	菌株(株)	构成比(%)
ICU	82	56.6	痰液	116	80.0
高压氧病区	12	8.3	分泌物	11	7.6
干部病房	10	6.9	尿液	6	4.1
呼吸内科	11	7.6	静脉血	5	3.4
手外科	7	4.8	组织	1	0.7
内科综合	8	5.5	口腔	1	0.7
骨科	3	2.1	鼻拭子	1	0.7
脑外科	3	2.1	胆汁	1	0.7
普外科	3	2.1	引流物	1	0.7
急诊科	2	1.4	胸腔积液	1	0.7
口腔科	2	1.4	导管末端	1	0.7
肾移植	1	0.7			
外院	1	0.7			

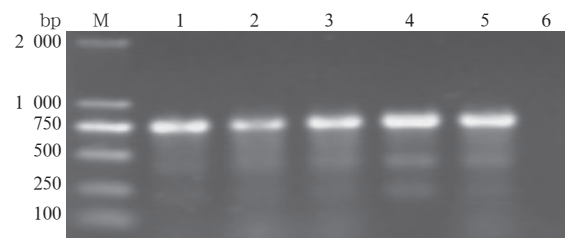
注:ICU 为重症加强治疗病房

2.2 药敏试验结果(表 2):145 株 AB 对临床常用 16 种抗菌药物普遍耐药,其中 137 株属于多重耐药(MDR)菌株,126 株属于泛耐药(XDR)菌株。AB 对米诺环素敏感率最高(79.3%),其次是阿米卡星(40.7%);对米诺环素耐药率最低(9.0%),其次是头孢哌酮舒巴坦(31.7%),而对其他类抗菌药物(除阿米卡星和左氧氟沙星外)耐药率均高于 85%,对碳青霉烯类耐药率达 88.3%(128 株)。

表 2 2013 年 7 月至 2014 年 7 月青岛市两家医院分离出 145 株鲍曼不动杆菌对 16 种常用抗菌药物的耐药率

抗菌药物	耐药率(%)	抗菌药物	耐药率(%)
米诺环素	9.0	头孢吡肟	91.0
头孢哌酮舒巴坦	31.7	复方新诺明	91.0
阿米卡星	57.9	庆大霉素	93.1
左氧氟沙星	66.2	环丙沙星	93.8
氨苄西林舒巴坦	85.5	头孢噻肟	93.8
哌拉西林他唑巴坦	87.6	哌拉西林	94.5
亚胺培南	88.3	头孢他啶	95.9
美罗培南	88.3	头孢唑辛	99.3

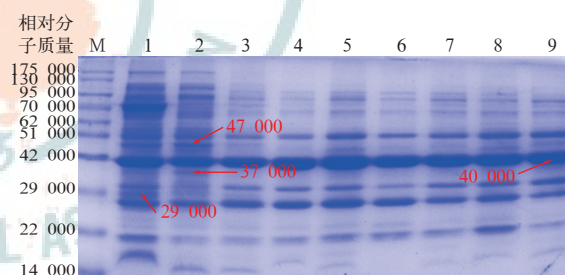
2.3 PCR 扩增结果(图 1):碳青霉烯耐药组 carO 基因阳性率达 97.7%(125/128),碳青霉烯敏感组 carO 基因阳性率为 17.6%(3/17)。



M 为 DNA 标志物 Marker,1~5 为部分 carO 基因阳性株(744 bp),6 为阴性对照

图 1 聚合酶链反应检测部分碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌菌株 carO 基因电泳图

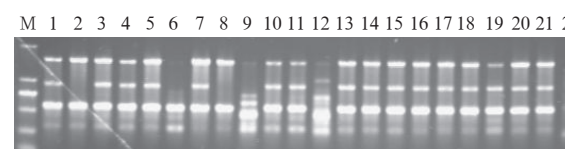
2.4 OMP 的 SDS-PAGE 凝胶结果(图 2):电泳图谱以及 Bio-1D 软件分析均显示,所有菌株在相对分子质量 40 000 处(即参照蛋白^[10])的表达量相当。30 株碳青霉烯耐药菌株中有 20 株约在相对分子质量 47 000 处、25 株约在相对分子质量 37 000 处、23 株约在相对分子质量 29 000 处有不同程度的表达缺失或减弱;17 株敏感株中分别有 16 株、13 株、13 株在上述相对分子质量处有条带。



SDS-PAGE 为十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳;M 为 DNA 标志物 Marker,1~9 依次为菌株 S9、S12、R31、R56、R58、R82、R92、R109、R132;S 代表敏感,R 代表耐药

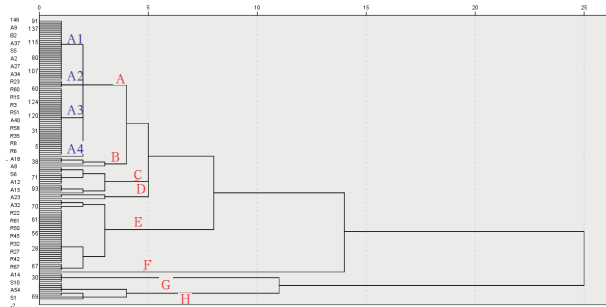
图 2 鲍曼不动杆菌部分菌株 SDS-PAGE 电泳图

2.5 基因同源性分析:根据 ERIC-PCR 扩增产物的电泳带型(图 3),运用 Bio-1D 软件分析各个菌株所有条带的相对分子质量,输入 SPSS 19.0 软件进行聚类分析。145 株 AB 共分为 8 个基因型,其中 A 型(71 株)和 E 型(37 株)为主要流行株,A 型又分为 4 个亚型,E 型分为 3 个亚型;B 型 5 株,C 型 14 株,D 型 3 株,F 型 1 株,G 型 5 株,H 型 9 株。聚类分析见图 4。



ERIC-PCR 为肠杆菌科基因间一致重复序列聚合酶链反应;M 为 DNA 标志物 Marker,1~22 为 AB 部分菌株

图 3 鲍曼不动杆菌(AB)部分菌株 ERIC-PCR 扩增产物电泳图



注: ERIC-PCR 为肠杆菌科基因间一致重复序列聚合酶链反应

图 4 基于 ERIC-PCR 谱型的 145 株鲍曼不动杆菌聚类分析

3 讨论

本研究显示,两家医院分离的 AB 主要来源于痰标本,表明两家医院患者主要为 AB 造成的下呼吸道感染,与国内相关报道一致^[11];其在 ICU 分离率较高,可能与患者自身多有严重疾病,免疫力较差,且长期使用广谱抗菌药物及进行气管插管、气管切开、吸痰、静脉置管等侵入性操作有关。Lee 等^[12]采用多因素分析方法对 MDR-AB 分析发现,入住 ICU 以及亚胺培南和三代头孢菌素的使用是产生亚胺培南耐药的两大重要危险因素。马明远等^[13]对 1 050 例患者的临床资料进行回顾性分析发现,机械通气、ICU 住院时间 ≥ 7 d、昏迷[格拉斯哥昏迷评分(GCS) < 8 分]、使用广谱抗菌药物是 ICU 内 AB 感染的危险因素。另有研究报道,采取碳青霉烯“处方限制策略”不仅可以减少呼吸机相关性肺炎(VAP)患者 MDR-AB 的发生率,同样也保证了对患者重症感染的治疗效果,且病死率无明显变化^[14]。

本研究收集的 145 株 AB 的耐药情况严重,对临床常用抗菌药物普遍耐药,对碳青霉烯类耐药高达 128 株,与二级医院的碳青霉烯低耐药情况^[15]大不相同,可能与碳青霉烯类药物使用模式不同有关。按照文献^[16]中对 MDR 和 XDR 的判定标准:AB 对常用的 9 类抗菌药物中 3 类或以上(每类 1 种或以上)不敏感称之为 MDR;对常用的 9 类抗菌药物中 7 类或以上(每类 1 种或以上)不敏感称之为 XDR;对常用的 9 类抗菌药物均不敏感称之为全耐药(PDR)。本研究 145 株 AB 中有 137 株属于 MDR 菌株,126 株属于 XDR 菌株;由于本实验中未进行多黏菌素类的药敏试验,故无法判定是否有 PDR 菌株。两院分离的 145 株 AB 目前对米诺环素尚有较高的敏感率(79.3%),而对氨基糖苷类、头孢菌素、青霉素类、一代喹诺酮类抗菌药物几乎完全耐药;对舒巴坦复方制剂(除头孢哌酮舒巴坦耐药率

为 31.7% 外)耐药率也达到 85% 以上,可能与舒巴坦复方制剂的临床应用增多有关^[17]。

外膜孔蛋白是存在于革兰阴性菌外膜脂质双层结构上的通道蛋白,它是 OMP 中的一种,其对药物的渗透机制是细菌耐药的重要机制之一。随着 AB 的 OMP 表达下降或丢失,菌株对碳青霉烯类抗菌药物的通透性下降,药物不能顺利进入菌体内发挥作用,便对该药物产生了耐药性。carO 蛋白是目前研究较多的耐碳青霉烯类药物 AB 的通道蛋白^[6,18]。我国 2011 年对西部 10 家医院和北京、上海 2 家医院耐 AB 的研究发现,在 272 株 XDR-AB 中,只有几株菌株中 carO 基因缺失或中间被转移子插入^[19]。本研究显示,carO 基因在碳青霉烯耐药组的阳性携带率也高达 97.7%,与之前的报道一致,但耐药是否与 carO 基因突变有关尚待进一步测序确认。此外,国内其他地区有研究证明,碳青霉烯耐药组与敏感组 carO 基因在 mRNA 表达水平上存在差异^[9,20];还有研究显示 carO 蛋白表达下降与环丙沙星耐药也有一定的相关性^[21];其他的研究报道也都表明 carO 蛋白表达缺失或减弱与 MDR-AB 有关^[22-23]。

本研究进一步在蛋白水平表达上进行比较。AB 中相对分子质量 40 000 的 OMP (Omp40) 占细胞总 OMP 含量的 30% ~ 40%,由于其表达不受温度影响,可作为评价其他 OMP 表达量的参照蛋白^[10]。本研究中进行 SDS-PAGE 的所有菌株在参照蛋白相对分子质量 40 000 处的表达量相当,说明所加的上样蛋白量也大致相同,具有可比性,排除了因上样蛋白含量不同造成条带明弱不同而影响结果判断。17 株碳青霉烯敏感组中有 16 株约在相对分子质量 47 000 处、13 株约在相对分子质量 37 000 处、13 株约在相对分子质量 29 000 处有条带;而 30 株耐药组在上述相对分子质量处各有 20 株、25 株和 23 株呈不同程度的表达缺失或减弱。carO 蛋白是一种热修饰性蛋白,加热前其相对分子质量为 25 000,加热后则为 29 000^[24]。本研究中耐药菌株确实存在于 29 000 处表达缺失或减弱的情况,但要证明 29 000 处的蛋白的确是 carO 蛋白,仍需要采用 carO 蛋白抗体进行蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)加以验证。本研究中耐药组 AB 在相对分子质量 29 000、47 000、37 000 处 OMP 表达缺失或减弱的结果与国内外的报道一致^[25-27]。

在重症患者中监测 XDR-AB 的耐药率和流行性十分重要^[28]。目前常用于医院感染细菌克隆相

关性分析的分子生物学方法有多位点酶切电泳分型、核糖体分型、ERIC-PCR 分型、随机扩增多态性 DNA 分型 (RAPD)、扩增片段长度多态性分型 (AFLP)、脉冲场凝胶电泳分型 (PFGE) 和多位点序列分型 (MLST) 等。ERIC-PCR 是目前常用的简便、快速基因分型技术,其分辨率较强、结果可靠,与细菌分子生物学分型技术的“金标准” PFGE 分型有一定相关性^[29]。本研究中 145 株 AB 共分为 8 个 ERIC 基因型,其中 A 型 (71 株) 和 E 型 (37 株) 为主要流行株,占 74.5%,主要分布在 ICU、干部病房、高压氧病区、呼吸内科;A 型又分为 4 个亚型,E 型分为 3 个亚型,其中以 A3 亚型最多 (35 株),并且来源于两家医院,说明克隆株 A3 型存在院间的传播流行,可能与病员流动有关。A、B、C、D、E 5 个克隆型的谱带有较高程度的相似性,它们之间的亲缘关系紧密,这些亲缘关系较近的菌株可能来自于同一传染源,也可能为某些克隆株在外界环境条件影响下分化形成不同的克隆型及亚型,具有追溯传染源的意义。以上结果提示在这一时期内,两家医院存在某种 XDR-AB 克隆株的暴发流行,并可能以克隆株的形式在病房内、病房间甚至医院间进行传播。

综上所述,OMP 在相对分子质量 47 000、37 000、29 000 处表达缺失或减弱是 AB 对碳青霉烯类药物耐药的重要机制之一;临床 AB 泛耐药情况严重且存在院内和院间流行,应加强医务人员在日常工作中的无菌观念,防止交叉感染,避免克隆株流行。

参考文献

- [1] Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management [J]. Curr Opin Infect Dis, 2010, 23 (4): 332-339.
- [2] Munoz-Price LS, Fajardo-Aquino Y, Arheart KL, et al. Aerosolization of *Acinetobacter baumannii* in a trauma ICU [J]. Crit Care Med, 2013, 41 (8): 1915-1918.
- [3] Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance [J]. Future Microbiol, 2011, 6 (4): 407-422.
- [4] 孙成栋,李真,刘斯,等. 泛耐药鲍曼不动杆菌医院感染的耐药性分析[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (6): 369-372.
- [5] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, (5): 365-374.
- [6] Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (4): 1432-1440.
- [7] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19 (24): 6823-6831.
- [8] 胡付品. 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的耐药机制及其所致医院感染控制研究[D]. 上海:复旦大学, 2010.
- [9] 刘文静. 在不动杆菌对碳青霉烯类耐药机制中外排泵及外膜蛋白表达作用的研究[D]. 北京:北京协和医院, 2011.
- [10] Mussi MA, Relling VM, Limansky AS, et al. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake [J]. FEBS Lett, 2007, 581 (29): 5573-5578.
- [11] 汪长珍,龚萍,杜勇. 县级医院综合重症监护病房病原菌分布及耐药性分析[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (4): 281-284.
- [12] Lee SO, Kim NJ, Choi SH, et al. Risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: a case-control study [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48 (1): 224-228.
- [13] 马明远,徐杰,于娜,等. 综合 ICU 内鲍曼不动杆菌的耐药性和相关因素分析[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (11): 686-689.
- [14] 薛欣盛,王波,邓丽静,等. 碳青霉烯类抗生素处方限制策略对呼吸机相关性肺炎多药耐药鲍曼不动杆菌发生率的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2009, 21 (4): 234-236.
- [15] 韩欣欣,李庆淑,申丽婷,等. 鲍曼不动杆菌生物膜形成能力与生物膜相关基因及耐药性之间的关系[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (9): 639-643.
- [16] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18 (3): 268-281.
- [17] 马明远,徐杰,于娜,等. 头孢哌酮舒巴坦联合替加环素治疗肺部感染泛耐药鲍曼不动杆菌患者的疗效分析[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (6): 349-352.
- [18] Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, et al. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32 (19): 5766-5779.
- [19] He C, Xie Y, Fan H, et al. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of European clone II in Western China [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38 (3): 257-260.
- [20] 和平,刘原,潘双,等. 耐亚胺培南鲍氏不动杆菌 carO 基因表达的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23 (14): 3301-3304.
- [21] 邓俊,夏忠弟,李一柯,等. CarO 蛋白与鲍曼不动杆菌耐环丙沙星的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21 (31): 3843-3846.
- [22] 李一柯,邓俊. 外膜蛋白与鲍曼不动杆菌多重耐药的相关性研究[J]. 现代医药卫生, 2013, 29 (17): 2595-2596.
- [23] 许亚丰,耿先龙,王春新,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 β -内酰胺酶、膜孔蛋白及 β -内酰胺类靶位编码基因研究[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39 (1): 58-64.
- [24] Siroy A, Molle V, Lemaître-Guillier C, et al. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (12): 4876-4883.
- [25] Quale J, Bratu S, Landman D, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City [J]. Clin Infect Dis, 2003, 37 (2): 214-220.
- [26] Hwa WE, Subramaniam G, Mansor MB, et al. Iron regulated outer membrane proteins (IROMPs) as potential targets against carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated from a Medical Centre in Malaysia [J]. Indian J Med Res, 2010, 131: 578-583.
- [27] 钱洁,宋诗铨,祁伟,等. 3 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌临床株耐药机制的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32 (6): 377-380.
- [28] 中华人民共和国卫生部. 多重耐药菌医院感染预防与控制技术指南 (试行) [J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23 (2): 65.
- [29] 李永丽,应春妹,陈艺升. ERIC-PCR 技术在鲍曼不动杆菌基因分型中的应用评估[J]. 检验医学, 2013, 28 (7): 621-624.

(收稿日期: 2014-12-08)

(本文编辑:李银平)