

• 论 著 •

# 鲍曼不动杆菌耐药性快速检测方法的建立与评估

李 珍, 李从荣<sup>△</sup>

(武汉大学人民医院检验科 430060)

**摘要:**目的 评估对实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)快速检测鲍曼不动杆菌耐药性方法的效果。方法 设计鲍曼不动杆菌(ATCC 19606)外膜蛋白 A 特异性探针,采用实时荧光定量 PCR 准确测定 63 株鲍曼不动杆菌经一定浓度庆大霉素、米诺环素、美罗培南、左氧氟沙星和头孢哌酮/舒巴坦孵育后的生长情况,比较抗菌药物孵育 0 和 6 h 后鲍曼不动杆菌基因组 DNA 量,判断鲍曼不动杆菌耐药性,并与微量肉汤稀释法结果进行对比。结果 建立的实时荧光定量 PCR 检测鲍曼不动杆菌耐药性方法与微量肉汤稀释法一致性高,Kappa 值为 0.879,  $P < 0.05$ 。以微量肉汤稀释法为参考方法,实时荧光定量 PCR 的符合率达 93.97%,灵敏度为 92.53%,特异性为 95.74%,阳性预测值为 96.41%,阴性预测值为 91.22%,Youden 指数为 0.88。结论 实时荧光定量 PCR 与微量肉汤稀释法结果有高度一致性,且前者灵敏度高、特异性强、检测速度快,可用于快速检测鲍曼不动杆菌的耐药性。

**关键词:**鲍曼不动杆菌; 快速检测; 耐药性; 生长曲线; 实时荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.12.026 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)12-1661-04

## Establish and evaluation of rapid detecting antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*

LI Zhen, LI Congrong<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

**Abstract:** **Objective** To assess the ability of rapid detection of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* by real-time fluorescent quantitative PCR. **Methods** A real-time fluorescent quantitative PCR assay targeting the conserved region of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 outer membrane protein (ompA) gene was used to measure the growth of 63 *Acinetobacter baumannii* isolates, which were incubated in a certain concentration of gentamicin, minocycline, meropenem, levofloxacin or cefoperazone/sulbactam. The number of genomic DNA copies of the *Acinetobacter baumannii* incubated in different antibiotics for 6 h were compared with those incubated for 0 h. Fold changes were used to determine the resistance in *Acinetobacter baumannii*, and all the results were compared with those obtained using broth microdilution. **Results** The real-time fluorescent quantitative PCR assay showed high consistency with broth microdilution method, in which Kappa value was 0.879,  $P < 0.05$ . Compared with the broth microdilution, the global values for consistency was 93.97%, sensitivity was 92.53%, specificity was 95.74%, positive predictive value was 96.41%, negative predictive value was 91.22%, and Youden index was 0.88. **Conclusion** The results obtained by the real-time fluorescent quantitative PCR were highly concordant with those of broth microdilution. The real-time fluorescent quantitative PCR for antibiotic resistance detection in *Acinetobacter baumannii* was characterized by its sensitivity, specificity and rapidity.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*; rapid detection; resistance; growth curve; real-time fluorescent quantitative PCR

鲍曼不动杆菌可以引起不同类型的感染,尤其是医院获得性肺炎、血流感染等,主要见于重症监护室。有研究表明,近年来鲍曼不动杆菌感染率高,多重耐药菌株逐年增多,甚至出现泛耐药鲍曼不动杆菌<sup>[1]</sup>。缩短经验性用药时间可以减少实验室检查、侵入性操作和住院时间,尽早使用合适的抗菌药物治疗感染可以延缓耐药菌株的出现和传播<sup>[2]</sup>。目前应用最广泛的抗菌药物药敏试验方法有纸片扩散法、稀释法、抗菌药物浓度梯度法(如 E-test 纸条)及药敏自动检测系统等。这些方法虽然灵敏度好,且已高度标准化,但这些方法耗时过长,多在 24~72 h。本研究采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)可准确定量标本中特定核酸拷贝数的特点,准确测定经抗菌药物孵育 0 h 和 6 h 后鲍曼不动杆菌生长量变化,判断鲍曼不动杆菌耐药性,以期缩短筛选耐药菌株的时间,尽快为临床治疗提供可靠依据,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 菌株来源** 收集武汉大学人民医院 2014 年 4 月 1 日至 9 月 30 日住院患者送检标本细菌培养分离的鲍曼不动杆菌菌株,对于同一患者同一部位多次培养分离的菌株只取该患者第 1 次培养分离的菌株,筛选出试验菌株 63 株,其中分离自痰液标本 46 株,尿液标本 4 株,分泌物标本 5 株,胆汁标本 1 株,腹

水标本 2 株,组织标本 2 株,血标本 2 株和导管尖端标本 1 株。

**1.2 质控菌株、标准菌株及培养基** 大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 12593)、肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)及鲍曼不动杆菌标准菌株(ATCC 19606)均购自原卫生部临床检验中心。

**1.3 主要耗材、培养基及抗菌药物** 96 孔板购自美国康宁公司;哥伦比亚血平板购自杭州天和微生物试剂有限公司;MH 肉汤干粉购自青岛海博生物技术有限公司;头孢哌酮/舒巴坦(SCF)干粉购自辉瑞制药有限公司;米诺环素(MINO)标准品购自中国食品药品鉴定研究院;庆大霉素(GEN)购自安阳九州药业有限公司;左氧氟沙星(LEV)购自白求恩医科大学制药厂,美罗培南(MEM)购自住友制药(苏州)有限公司。

**1.4 试剂及主要仪器** DNA 提取试剂盒及实时荧光定量 PCR 反应试剂盒购自 Takara 公司;PCR 反应引物与探针参考鲍曼不动杆菌(ATCC 19606)外膜蛋白 A(OmpA)基因序列设计,由上海基康生物技术有限公司合成,其序列为:TaqMan 探针 5'-AAG TTG CTC CAG TTG AAC CAA CTC CA-3';上游引物 5'-TCT TGG TGG TCA CTT GAA GC-3';下游引物 5'-ACT CTT GTG GTT GTG GAG CA-3';实时荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司的 ViiATM 7 实时荧光定量 PCR 系统。

1.5 方法

1.5.1 复苏菌株 取保存于-80℃冰箱的鲍曼不动杆菌,接种于血平板中,置于含5%CO<sub>2</sub>孵育箱35℃孵育24h。

1.5.2 微量肉汤稀释法确定的试验菌株最低抑菌浓度(MIC)值 (1)制备微量稀释盘。按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)相关文件 M07-A9 和 M100-S23 制备一系列倍比稀释的抗菌药物溶液,将制备好的抗菌药物溶液分别加入无菌的96孔板中,每孔100μL,从第1孔加至第11孔,第12孔加100μL 无菌MH肉汤作为生长对照,制备成MIC微量稀释盘。(2)制备菌悬液。挑取血琼脂平板上复苏的单个菌落于无菌生理盐水中,制备0.5麦氏浓度菌悬液,用MH肉汤1:100稀释,得到1.5×10<sup>6</sup> cfu/mL的菌悬液。(3)微量肉汤稀释法检测试验菌株MIC值。将制备好的菌悬液接种至微量稀释盘,每孔加入100μL,第1列第1孔加100μL 无菌MH肉汤作为阴性对照,盖上盖子,置于CO<sub>2</sub>孵育箱(35±2)℃孵育16~18h,肉眼观察每孔的浊度,并用酶标仪检测每孔的浊度,判断各菌株对不同抗菌药物的MIC值。(4)药敏试验结果判定标准。GEN、MINO、MEM、LEV和SCF耐药、中介和敏感的判定采用2014年CLSI文件M100-S24标准进行,SCF的折点参照肠杆菌科细菌对头孢哌酮的折点,即SCF的MIC≥64μg/mL为耐药,32μg/mL为中介,≤16μg/mL为敏感<sup>[3]</sup>。耐药株的MIC大于或等于耐药折点,非耐药菌株的MIC小于耐药折点,即非耐药株包括药敏试验结果为敏感和中介的两类菌株。

1.5.3 探针及引物的特异性验证 以鲍曼不动杆菌标准菌株(ATCC 19606)为模板,以大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)及金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)基因组DNA作为阴性对照,以双蒸水作为空白对照,用TaqMan探针实时荧光定量PCR扩增,试验重复3次。

1.5.4 TaqMan探针实时荧光定量PCR标准曲线的制作 取9个10倍梯度稀释(1.2×10<sup>2</sup>~1.2×10<sup>10</sup> copy/μL)的标准品作为模板,经探针荧光定量PCR扩增,以梯度稀释标准品的拷贝数的对数为横坐标,以PCR反应过程中出现荧光信号的初始循环数初始阈值(Ct)为纵坐标绘制标准曲线,重复3次,建立反映Ct值与标准品拷贝数浓度对应关系的标准曲线。

1.5.5 用TaqMan探针实时荧光定量PCR制作鲍曼不动杆菌生长曲线 分别制备鲍曼不动杆菌标准菌株(ATCC 19606)、GEN敏感和GEN耐药3株菌株的1.5×10<sup>5</sup>/mL菌悬液,分别取100μL于含有100μL 无菌肉汤或16μg/mL GEN的EP管内,振荡混匀,置于35℃孵育箱分别孵育0、1、2、4、6、8h,13 000 r/min离心5min,弃上清,4℃储存备用,再用DNA提取试剂盒提取基因组DNA,最后用TaqMan探针实时荧光定量PCR分析,取平均值做生长曲线,选择最佳孵育时间。

1.5.6 建立快速检测鲍曼不动杆菌对抗菌药物耐药性的方法 取血琼脂平板上鲍曼不动杆菌单菌落,用生理盐水制备0.5麦氏浓度菌悬液(相当于1.5×10<sup>8</sup>/mL);用MH肉汤稀释(1:100)重悬液,取100μL加入已含100μL 抗菌药物单药(如GEN、MEM、MINO等药物中的一种)的EP管中,使EP管中抗菌药物最终浓度为CLSI推荐的中介折点浓度,每种药物重复2管,分别编号1和2号,将1号EP管内细菌/抗菌药物混合溶液(0h)置于离心机13 000 r/min离心5min,将2号EP管置于35℃孵育6h后13 000 r/min离心5min,弃上清;分别提取0和6h的细菌基因组DNA置于4℃储存备用;所有菌株每种抗菌药物重复一次;最后用TaqMan探针实时荧光定量PCR进行分析。

1.6 统计学处理 采用SPSS20.0和Excel等分析软件分析试验结果,用GraphPad Prism 5.0软件作图。用Youden指数设定实时荧光定量PCR检测鲍曼不动杆菌6h和0h基因组DNA差异倍数的界值,即耐药性界值,并评价应用实时荧光定量PCR快速检测鲍曼不动杆菌耐药性的效果。实时荧光定量PCR和微量肉汤稀释法检测鲍曼不动杆菌耐药性的结果比较采用Kappa一致性检验,P<0.05,两种检测方法结果有一致性;Kappa≤0.40,一致性差;0.40<Kappa≤0.60,一致性一般;0.60<Kappa≤0.80,一致性强;0.80<Kappa≤1.00,一致性极强。

2 结果

2.1 微量肉汤稀释法药敏试验结果 见表1。63株试验菌株中,GEN耐药菌株45株,非耐药株(敏感与中介)共18株;MINO耐药株18株,非耐药株45株;SCF耐药株30株,非耐药株33株;MEM耐药株40株,非耐药株23株;LEV耐药株41株,非耐药株22株。

表1 63株试验菌株对5种不同抗菌药物的MIC分布情况(n)

| 抗菌药物 | MIC(μg/mL) |      |     |    |   |    |    |    |    |     |      |
|------|------------|------|-----|----|---|----|----|----|----|-----|------|
|      | ≤0.125     | 0.25 | 0.5 | 1  | 2 | 4  | 8  | 16 | 32 | ≥64 | ≥128 |
| GEN  | 0          | 4    | 2   | 3  | 6 | 3  | 0  | 5  | 3  | 37  | —    |
| MEM  | 3          | 5    | 6   | 8  | 0 | 0  | 1  | 5  | 14 | 21  | —    |
| LEV  | 2          | 2    | 7   | 11 | 0 | 0  | 0  | 6  | 5  | 30  | —    |
| MINO | 8          | 3    | 0   | 7  | 4 | 12 | 11 | 14 | 4  | 0   | —    |
| SCF  | —          | 0    | 0   | 2  | 3 | 11 | 0  | 5  | 12 | 18  | 12   |

注:—表示无数据。

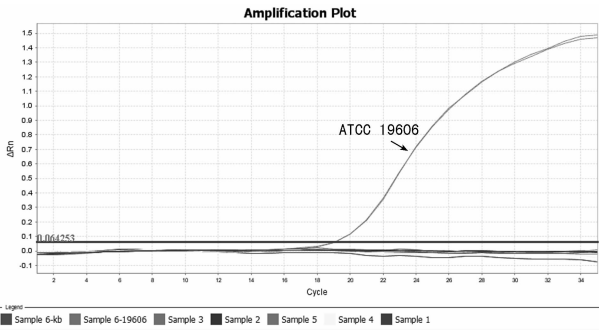


图1 探针及引物的特异性验证

2.2 探针及引物的特异性验证结果 利用已经建立的PCR反应体系和条件进行定量检测,经过35个循环反应后,阳性对照呈“S”型扩增曲线。大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌及空白对照均是阴性,未见扩增,表明此引物和探针的特异性良好,见图1。

2.3 标准曲线的建立 见图2。以PCR反应过程中出现荧光信号的初始循环数Ct值作为纵坐标,标准品拷贝数的对数值作为横坐标,绘制标准曲线,r<sup>2</sup>为0.999,相关性良好。

2.4 实时荧光定量PCR制作鲍曼不动杆菌生长曲线 见图3。鲍曼不动杆菌在培养基中培养不同时间段基因组DNA水平不断变化,随着时间推移,GEN耐药的鲍曼不动杆菌与生长

对照组鲍曼不动杆菌基因组 DNA 水平变化情况大体一致,即 DNA 水平逐渐增多,而 GEN 敏感组鲍曼不动杆菌基因组 DNA 水平变化不大。由图 3 可见,3 种不同类型生长曲线变化情况判断:区分鲍曼不动杆菌基因组 DNA 水平变化的最佳孵育时间为 6 h。生长对照组 MH 肉汤中不含抗菌药物,GEN 敏感组和耐药组 MH 肉汤中 GEN 浓度为 8  $\mu\text{g/mL}$ 。

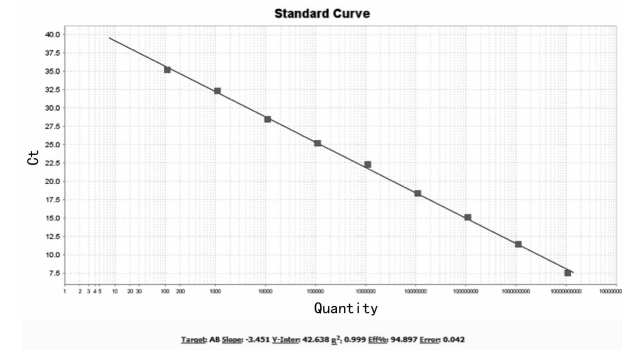


图 2 实时荧光定量 PCR 标准曲线

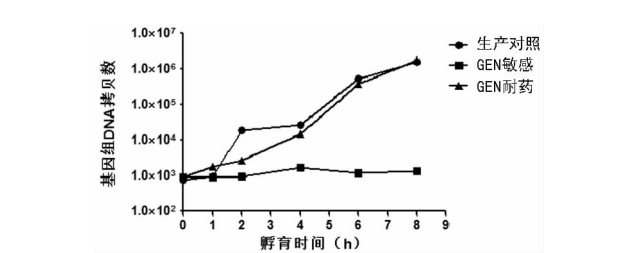


图 3 实时荧光定量 PCR 测定鲍曼不动杆菌生长曲线

**2.5 建立实时荧光定量 PCR 检测鲍曼不动杆菌耐药性** 通过测定经含中介折点浓度抗菌药物 (GEN、MINO、MEM、LEV 或 SCF) 的 MH 肉汤培养基培养 0 或 6 h 鲍曼不动杆菌基因组 DNA 的水平变化,结果以基因组 DNA 拷贝数的差异倍数 (6 h/0 h 比值) 表示,根据最大 Youden 指数确定荧光定量 PCR 检测鲍曼不动杆菌耐药性临界诊断值。结果显示,荧光定量 PCR 检测鲍曼不动杆菌对 GEN、MEM、LEV 和 MINO 的耐药性界值为 4, >4 为耐药,  $\leq 4$  为非耐药;对 SCF 耐药性界值为 110, >110 为耐药,  $\leq 110$  为非耐药。在检测鲍曼不动杆菌对 5 种临床常用抗菌药物耐药性方面,实时荧光定量 PCR 与微量肉汤稀释法检测结果有高度一致性,两种方法一致性差异有统计学意义 (Kappa=0.879,  $P<0.05$ ),见表 2。以微量肉汤稀释法为参考方法,实时荧光定量 PCR 检测鲍曼不动杆菌耐药性总符合率为 93.97% (296/315),总灵敏度为 92.53% (161/174),总特异性为 95.74% (135/141),见表 3。图 4 和表 2 显示,经 GEN 孵育的鲍曼不动杆菌中,仅有 2 株耐药菌株基因组 DNA 拷贝数差异倍数小于 4,与微量肉汤稀释法的符合率为 96.83% (61/63);经 MEM 孵育的鲍曼不动杆菌中,有 1 株非耐药菌株基因组 DNA 拷贝数的差异倍数大于 4,1 株耐药菌株基因组 DNA 拷贝数差异倍数小于 4,与微量肉汤稀释法的

符合率达 96.83% (61/63);经 LEV 孵育的鲍曼不动杆菌中,有 2 株非耐药菌株基因组 DNA 拷贝数差异倍数大于 4,2 株耐药菌株基因组 DNA 拷贝数差异倍数小于 4,与微量肉汤稀释法的符合率达 93.65% (59/63);经 MINO 孵育的鲍曼不动杆菌中,有 1 株非耐药菌株基因组 DNA 拷贝数差异倍数大于 4,有 4 株耐药菌株差异倍数小于 4,与微量肉汤稀释法的符合率为 92.06% (58/63);经 SCF 孵育 6 h 的鲍曼不动杆菌基因组 DNA 拷贝数变化较大,其中有 2 株非耐药鲍曼不动杆菌基因组 DNA 差异倍数大于 110,4 株耐 SCF 的鲍曼不动杆菌基因组 DNA 拷贝数差异倍数小于 110,与微量肉汤稀释法的符合率为 90.48% (57/63)。图 4A~E 图分别表示经中介折点浓度的 GEN、MEM、LEV、MINO 或 SCF 孵育 6 与 0 h 相比,基因组 DNA 变化情况,其中纵坐标表示孵育 6 h 后鲍曼不动杆菌基因组 DNA 水平与 0 h 相比 (6 h/0 h) 的差异倍数,横坐标“非耐药菌株”与“耐药菌株”分别表示微量肉汤稀释法检测为非耐药 (包括敏感和中介) 和耐药菌株,图中各点表示各菌株在相应抗菌药物孵育情况下基因组 DNA 水平差异倍数。

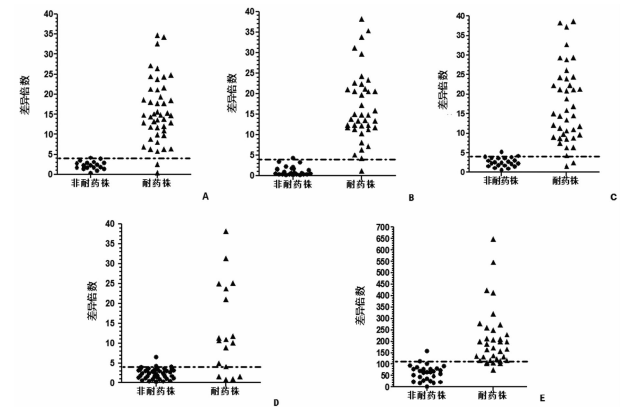


图 4 实时荧光定量 PCR 检测 63 株试验菌株结果

表 2 实时荧光定量 PCR 与微量肉汤稀释法结果一致性比较

| 抗菌药物 | 荧光定量<br>PCR | 微量肉汤稀释法 |     | Kappa 值 | P      |
|------|-------------|---------|-----|---------|--------|
|      |             | R       | NR  |         |        |
| GEN  | R           | 43      | 0   | 0.925   | <0.001 |
|      | NR          | 2       | 18  |         |        |
| MINO | R           | 14      | 1   | 0.795   | <0.001 |
|      | NR          | 4       | 44  |         |        |
| SCF  | R           | 26      | 2   | 0.809   | <0.001 |
|      | NR          | 4       | 31  |         |        |
| MEM  | R           | 39      | 1   | 0.932   | <0.001 |
|      | NR          | 1       | 22  |         |        |
| LEV  | R           | 39      | 2   | 0.860   | <0.001 |
|      | NR          | 2       | 20  |         |        |
| 合计   | R           | 161     | 6   | 0.879   | <0.001 |
|      | NR          | 13      | 135 |         |        |

注:R 为耐药,NR 为非耐药。

表 3 实时荧光定量 PCR 快速检测鲍曼不动杆菌耐药性效果评估

| 抗菌药物 | PCR 与微量肉汤<br>稀释法符合率 (%) | 灵敏度 (%) | 特异性 (%) | 阳性预测值 (%) | 阴性预测 (%) | Youden 指数 |
|------|-------------------------|---------|---------|-----------|----------|-----------|
| GEN  | 96.83                   | 95.56   | 100.00  | 100.00    | 90.00    | 0.96      |
| SCF  | 90.48                   | 86.67   | 93.94   | 92.86     | 88.57    | 0.81      |
| MINO | 92.06                   | 77.78   | 97.78   | 93.33     | 91.67    | 0.76      |
| MEM  | 96.83                   | 97.50   | 95.65   | 97.50     | 95.65    | 0.93      |

续表 3 荧光定量 PCR 快速检测鲍曼不动杆菌耐药性效果评估

| 抗菌药物 | PCR 与微量肉汤<br>稀释法符合率(%) | 灵敏度(%) | 特异性(%) | 阳性预测值(%) | 阴性预测(%) | Youden 指数 |
|------|------------------------|--------|--------|----------|---------|-----------|
| LEV  | 93.65                  | 95.12  | 90.91  | 95.12    | 90.91   | 0.86      |
| 合计   | 93.97                  | 92.53  | 95.74  | 96.41    | 91.22   | 0.88      |

3 讨 论

随着医学技术的发展、各种侵入性操作不断增多及医院规模不断扩大,院内感染已成为临床工作中越来越棘手的问题,特别是多重耐药菌株的出现,使医疗费用大幅度增加。多重耐药的鲍曼不动杆菌便是其中常见的一种,一旦感染,将会导致病死率上升、住院时间延长<sup>[1,4]</sup>。

多重耐药鲍曼不动杆菌的控制在于预防与监测,快速检测鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物的耐药性,可以减少临床医生经验性用药时间,从而阻止多重耐药菌株的产生与传播。然而,鲍曼不动杆菌耐药机制复杂,涉及的耐药基因众多,近年来,有大量研究报道检测细菌耐药相关基因,但携带耐药基因的菌株并不一定都表现出耐药性,即基因型与耐药表型不一致<sup>[5-9]</sup>。

本研究所使用实时荧光定量 PCR 快速检测鲍曼不动杆菌耐药性,不依赖细菌耐药机制,与细菌耐药基因无关,而是基于细菌生长过程基因组 DNA 拷贝数的变化,通过比较鲍曼不动杆菌在一定浓度抗菌药物孵育一定时间后菌株量变化来区分鲍曼不动杆菌的耐药菌株与非耐药菌株。此法虽然也需经过一定时间培养,但整个抗菌药物耐药性检测过程(去除细菌分离复苏时间)仅需 7 h 左右,与常规方法相比,实时荧光定量 PCR 所需要的样品量少,试验时间短。

本研究结果显示,实时荧光定量 PCR 与微量肉汤稀释法相比,Kappa 值为 0.879,一致性较强,总符合率达 93.97%,灵敏度(92.53%)与特异性(95.74%)均较高,Youden 指数 0.88。Beuving 等<sup>[10]</sup>用定量 PCR 检测 114 例血培养阳性标本中细菌生长过程基因组 DNA 水平变化的原理定量检测细菌耐药性,符合率达 95.00% 以上,且给出相应的计算公式。Beuving 等<sup>[10]</sup>的研究仅针对血培养阳性报警的标本,未对其他标本类型进行探索。Hansen 等<sup>[11]</sup>也利用 PCR 定量检测细菌生长情况来区分大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的耐药性,但其仅针对此两种细菌对常用药物的灵敏度检测,未与 CLSI 推荐方法比较。李坚等<sup>[12]</sup>也有利用定量 PCR 建立葡萄球菌快速药敏试验的方法,但其用 SYBR Green 染料法,特异性较探针法低,且其研究结果仅与纸片法对比做初步探索,并未给出明确的关系式。此次研究结果表明,荧光定量 PCR 快速检测鲍曼不动杆菌耐药性可通过基因组 DNA 水平(6 h/0 h)比值进行初步判断,尽快筛选出耐药菌株。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术已经逐渐用于临床微生物室细菌的鉴定,若结合实时荧光定量 PCR 检测细菌耐药性,有望在分离出单菌落的当天获得药敏试验结果,这有利于临床医生尽早合理选择抗菌药物治疗。

然而,此研究也有不足之处,即对 MINO 和 SCF 耐药菌株的灵敏度低于 90.00%,特别是 MINO,这可能与试验所选用的部分鲍曼不动杆菌生长过于缓慢有关,且耐 MINO 的鲍曼不动杆菌菌株数相对较少,可能导致误差过大。因此,还需扩大试验标本量,减少因菌株间差异而导致的结果偏差。另外,本研究选用的 GEN、MEM、LEV 及与多重耐药鲍曼不动杆菌治疗相关的 MINO 和 SCF 等临床常用抗菌药物作为试验用药,但临床治疗鲍曼不动杆菌感染常用的头孢菌素类并未纳入此次研究,且试验仅能筛选出耐药菌株,不能区分敏感与中介

的菌株。试验所选的探针与引物仅针对鲍曼不动杆菌的外膜蛋白,导致该方法目前仅能检测鲍曼不动杆菌的耐药性,不能提供具体的 MIC 值。因此,实时荧光定量 PCR 快速检测鲍曼不动杆菌耐药性试验仍需完善。

参考文献

[1] 陈佰义,何礼贤,胡必杰,等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J]. 中国医药科学,2012,2(8):3-8.

[2] Antunes LC,Visca P,Towner KJ. Acinetobacter baumannii:evolution of a global pathogen[J]. Pathog Dis,2014,71(3):292-301.

[3] 张辉,张小江,徐英春,等. 2012 年中国 CHINET 不动杆菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):392-397.

[4] Boyle DP,Zembower TR. Epidemiology and management of emerging Drug-Resistant Gram-Negative bacteria: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and beyond[J]. Urol Clin North Am,2015,42(4):493-505.

[5] Lepointeur M,Delattre S,Cozza S,et al. Comparative evaluation of two PCR-Based methods for detection of Methicillin-Resistant staphylococcus aureus (MRSA): xpert MRSA gen 3 and BD-Max MRSA XT[J]. J Clin Microbiol,2015,53(6):1955-1958.

[6] Trung NT,Thu Hien TT,Huyen TT,et al. Simple multiplex PCR assays to detect common pathogens and associated genes encoding for acquired extended spectrum beta-lactamases (ESBL) or carbapenemases from surgical site specimens in Vietnam[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob,2015,14(12):23-29.

[7] Frickmann H,Masanta WO,Zautner AE. Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management[J]. Biomed Res Int,2014,17(9):375681-375689.

[8] Koeser CU,Ellington MJ,Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance[J]. Trends Genetics,2014,30(9):401-407.

[9] 师志云,赵志军,李刚,等. 临床分离肠球菌属耐药性及耐药基因的研究[J]. 中华检验医学杂志,2011,34(5):442-444.

[10] Beuving J,Verbon A,Gronthoud FA,et al. Antibiotic susceptibility testing of grown blood cultures by combining culture and real-time polymerase chain reaction is rapid and effective[J]. PLoS One,2011,6(12):e27689.

[11] Hansen WL,Beuving J,Verbon A,et al. One-day workflow scheme for bacterial pathogen detection and antimicrobial resistance testing from blood cultures[J]. J Vis Exp,2012,9(65):3254-3258.

[12] 李坚,王艾琳,徐蕾. 葡萄球菌快速药敏试验方法的建立[J]. 现代预防医学,2012,39(14):3617-3619.