

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.05.001

建立 ERIC-PCR 技术快速分析不同耐药性鲍曼不动杆菌的同源性*

陈浩宁¹, 王茹冰², 史厚珍², 狄逸凡², 熊御云¹, 夏琳¹, 朱丽华¹, 张慧¹,Dinsh Kumar K², 吴亮², 阴晴^{1△}, 陈盛霞², 许化溪²

(1. 江苏大学附属医院检验科, 江苏镇江 212001; 2. 江苏大学医学院, 江苏镇江 212013)

摘要:目的 建立肠杆菌科基因间重复序列引物 PCR 技术(ERIC-PCR 技术)用于分析亚胺培南耐药和亚胺培南敏感鲍曼不动杆菌同源性,为判断医院内感染发生提供一种简便的新方法。**方法** 收集 2018 年 3—6 月江苏大学附属医院重症监护室患者痰液中分离的非重复鲍曼不动杆菌 80 株,其中包含 50 株亚胺培南耐药菌株,30 株亚胺培南敏感菌株。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA,PCR 扩增菌株 ERIC 序列,Quantity One 软件分析不同耐药性菌株电泳条带以判断菌株同源性。**结果** 50 株亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌可分为 6 种基因型,其中最多的一种基因型有 24 株;30 株亚胺培南敏感的鲍曼不动杆菌可分为 20 种基因型,其中最多的一种基因型仅有 3 株。**结论** 该院 ICU 来源的亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌的基因型较少,提示该菌株可能发生了医院内感染。ERIC-PCR 技术简单、方便,可以快速分析鲍曼不动杆菌同源性,适合于在各级医院中推广。

关键词:鲍曼不动杆菌; 肠杆菌科基因间重复序列引物 PCR 技术; 同源性分析; 院内感染

中图法分类号:R378

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)05-0577-05

Establishment of ERIC-PCR for rapidly analyzing homology of *Acinetobacter baumannii* with different drug resistances*CHEN Haoning¹, WANG Rubing², SHI Houzhen², DI Yifan², XIONG Yuyun¹, XIA Lin¹, ZHU Lihua¹, ZHANG Hui¹, DINSH Kumar K², WU Liang², YIN Qing^{1△}, CHEN Shengxia², XU Huaxi²

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China; 2. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: Objective To establish the ERIC-PCR technique for analyzing the homology of *Acinetobacter baumannii* with imipenem-resistant and imipenem-sensitive activity so as to provide a simple and convenient method for judging the occurrence of nosocomial infection. **Methods** Eighty strains of non-repeated *Acinetobacter baumannii* isolated from the sputum in ICU of this hospital during March to June 2018 were collected, including 50 strains were imipenem resistant and 30 strains were imipenem sensitive. The bacterial genomic DNA extraction kit was used to extract the bacterial genomic DNA. The bacterial strain ERIC gene sequence was amplified by PCR. The Quantity One software was used to analyze the electrophoresis bands in different drug-resistant bacterial strains for judging its homology. **Results** Fifty strains of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* could be classified into 6 genotypes, in which the maximum genotype had 24 strains; thirty strains of imipenem-sensitive *Acinetobacter baumannii* could be classified into 20 genotypes, in which the maximum genotypes only had 3 strains. **Conclusion** The imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* derived from ICU has fewer genotypes, suggesting that the strain may develop the nosocomial infection. The ERIC-PCR method is simple and convenient, can rapidly analyze the homology of *Acinetobacter baumannii* and is suitable for promotion in various levels of hospital.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; ERIC-PCR; homologous analysis; nosocomial infection

鲍曼不动杆菌是临床常见的非发酵型革兰阴性杆菌,广泛分布于自然环境中,是引起医院内感染的重要条件致病菌^[1-3]。2016 年中国细菌耐药监测网

(CHINET)细菌耐药性监测数据显示,鲍曼不动杆菌的临床分离率在非发酵型革兰阴性杆菌中最高^[4]。碳青霉烯类抗生素(包括亚胺培南和美罗培南等)对

* 基金项目:江苏省镇江市社会发展项目(SH2017024);国家寄生虫种质资源共享服务平台(平台-TDRC-22);江苏省博士后科研基金资助项目(1601002C);江苏大学大学生实践创新训练项目(201810299598W)。

作者简介:陈浩宁,男,主管技师,主要从事细菌耐药性方面的研究。△ 通信作者,E-mail: yinqingyinqing@aliyun.com。

鲍曼不动杆菌具有良好的抗菌活性,是目前治疗鲍曼不动杆菌感染的首选药物。但近年来随着碳青霉烯类抗生素大量使用,鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的耐药性显著升高,并且临床重症监护室(ICU)和脑外科等常发生耐碳青霉烯类抗生素的鲍曼不动杆菌暴发流行,对患者生命造成严重威胁^[5-7]。在此基础上,甚至出现了多黏菌素耐药的鲍曼不动杆菌^[8]。

比较同一时期内分离菌株的同源性是判断医院内感染发生的重要方法。凝胶脉冲场电泳技术(PFGE)是目前分析细菌同源性的主要方法^[9],但该方法过于繁琐而无法在临床工作中常规开展^[10]。肠杆菌科基因间重复序列引物 PCR 技术(ERIC-PCR 技术)是近年来出现的一种新型细菌同源性分析技术,该技术依靠肠杆菌科细菌所特有的 ERIC 序列^[11]。肠杆菌科细菌的 ERIC 序列中心均有一段高度保守的重复序列^[12],通过针对其设计的引物可将该重复序列进行扩增并获得不同同源性菌株之间显著差异的电泳图结果,进而判断不同菌株的同源性^[13-14]。本研究应用 ERIC-PCR 技术检测江苏大学附属医院近期分离的对亚胺培南耐药和敏感的鲍曼不动杆菌,分析上述两组鲍曼不动杆菌同源性差异,并判断感染来源。同时建立快速、简便的医院内感染判断方法,为医院内感染的防控提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 菌株来源于 2018 年 3—6 月从江苏大学附属医院 ICU 患者痰液中分离留存的鲍曼不动杆菌共 80 株,均为非重复菌株,其中亚胺培南耐药菌 50 株,亚胺培南敏感菌 30 株。所有菌株实验前都已使用 VITEK-II 全自动细菌分析系统重新鉴定,质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)和铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。

1.2 仪器和试剂 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),VITEK-II 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司),PCR 扩增试剂盒(南京 Vazyme 公司),细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工公司)。采用 Versalovic 设计的 ERIC-PCR 引物序列^[13],序列如下:ERIC-F 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' 和 ERIC-R 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3',由苏州泓迅生物公司合成。

1.3 鲍曼不动杆菌 ERIC-PCR 检测 鲍曼不动杆菌基因组 DNA 抽提严格按照试剂盒说明书进行。ERIC-PCR 扩增体系包括 2×PCR 预混液 12.5 μL,上下游引物(100 pmol/L)各 1 μL,模板 DNA 1 μL(DNA 模板量不超过 100 ng),以灭菌双蒸水补足体系至 25 μL。PCR 循环参数:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,40 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 10 min,

循环 35 次;72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增完毕后取 10 μL 扩增产物以 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,并在凝胶成像系统成像得到相应的指纹图谱。

1.4 细菌同源性分析方法 按钟海波等^[15]报道的方法,采用 Quantity One 软件对图像进行聚类分析,选择 UPGMA 方法,条带位置差异容许度选择 1.7%,优化值选择 0.5%,凡相似度值大于 80% 者为同一基因型,代表同一种克隆型;小于 80% 者为不同基因型,代表不同种的克隆株。

2 结 果

2.1 ERIC-PCR 扩增分析结果 50 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌和 30 株亚胺培南敏感鲍曼不动杆菌经过 ERIC-PCR 扩增后,产物经过琼脂糖凝胶电泳,分别用 Quantity One 软件分析菌株同源性(图 1 与图 2)。图 1 中可见亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌的 ERIC-PCR 产物多呈 3~5 个条带,50 株鲍曼不动杆菌可分为 6 种基因型,其中最多的基因型有 24 株。图 2 中可见亚胺培南敏感鲍曼不动杆菌的 ERIC-PCR 产物可呈 1~6 个条带,30 株鲍曼不动杆菌可分为 20 种基因型,其中最多的基因型仅有 3 株。由此可见,亚胺培南敏感菌株的同源性远低于耐药菌株。



图 1 50 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌同源性分析结果

2.2 医院感染流行的判定 基于上述实验结果,本院分离的 50 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌通过聚类分析仅获得 6 种基因型,其中最多的两种基因型分别包含细菌 24 株和 17 株。疑似耐药菌株存在医院内感染传播。

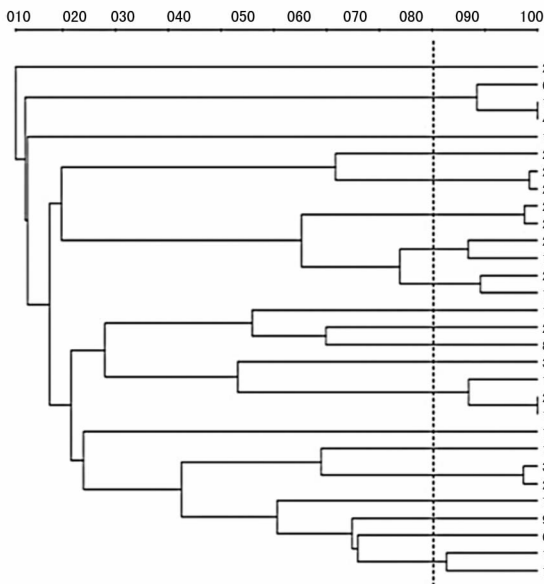


图 2 30 株亚胺培南敏感鲍曼不动杆菌同源性分析结果

3 讨 论

鲍曼不动杆菌能天然抵抗多种抗生素,耐药性极强,已成为引起医院内感染暴发的主要病原菌^[16]。长期住 ICU,更换静脉置管以及导尿管,长期使用抗生素治疗等因素均可让患者更易感染鲍曼不动杆菌^[17-18]。因此,及时进行临床分离菌株的同源性分析,可以尽早判断是否有医院内感染发生,并及早采取对应措施,避免医院内感染在更大范围内暴发。

目前细菌同源性分析主要依靠 PCR 扩增和核酸电泳相结合的技术。其中 PFGE 法是细菌分型鉴定的金标准^[19],但该方法使用的设备硬件要求较高,实验流程较长,对操作人员技术水平要求更为严格,需在专业化实验室中才能获得稳定重复结果,难以在医院检验科中开展。ERIC-PCR 技术具有成本低、周期短、操作简单和重复性好等诸多优点^[20],可以在医院中开展。该方法主要是通过 PCR 扩增肠杆菌科细菌基因组中所特有的一段基因间重复序列(ERIC 序列),产物通过核酸电泳获得条带,再通过同源性分析软件对电泳图谱进行分类^[21]。大量实验结果表明,该方法非常适用于大批量标本的流行病学调查。SILBERT 等^[22]通过自动化核糖体分型法、ERIC-PCR 分型法、PFGE 分型法分别对革兰阴性非发酵菌进行聚类分析,发现这 3 种检测方法中 PFGE 具有最强的分型能力。自动化核糖体分型法和 ERIC-PCR 分型法都拥有较快的检测速度,但 ERIC-PCR 的操作成本更低。YING 等^[23]使用 ERIC-PCR 和 PFGE 对鲍曼不动杆菌进行流行病学分析时,发现两者结果呈现高度相关性。王晓辉等^[24]也发现用 ERIC-PCR 和 PFGE 分别对含耐药基因 blaOXA-58 的鲍曼不动杆菌进行分型时,结果非常相似。

1991 年,VERSALOVIC 等^[13]根据 ERIC 序列高度保守的核心序列,设计了一组反向引物 5'-ATGTA-

AGCTCCTGGGGATTAC -3'和 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3',建立了 ERIC-PCR 扩增技术并得到广泛应用^[25-27]。GILLINGS 等^[28]发现 ERIC-PCR 的扩增对象并不限于肠杆菌科细菌,甚至可以从真菌、噬菌体、植物、动物等生物的基因组中扩增出稳定多态的图谱。GILLINGS 等^[29]由此判断 ERIC-PCR 本质上是一种随机扩增性 PCR。所以 ERIC-PCR 技术不但可以应用于非发酵菌等非肠杆菌科的革兰阴性杆菌的流行病学分析^[30-33],甚至可以用于革兰阳性球菌的分型^[34-36]。本研究结果表明,江苏大学附属医院 ICU 连续 3 个月分离的鲍曼不动杆菌菌株中,对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌可以分为 6 种基因型,而对亚胺培南敏感的鲍曼不动杆菌可以分为 20 种基因型,上述结果提示同种亚胺培南耐药型鲍曼不动杆菌的克隆株可在 ICU 内相互传播。本研究发现,部分临床分离菌株的同源性可达 90% 以上,提示所收集的部分标本可能来源于同一克隆株,存在医院内克隆传播。但上述同一克隆株对部分抗生素(庆大霉素、四环素等)的耐药程度存在差异,推测可能与该克隆株在不同患者体内所受的不同抗生素选择压力有关。

综上所述,在临床微生物学检测中,如果同一时期内大多数菌株(特别是多重耐药菌株)出现同一耐药模式,应高度警惕是否存在相同克隆来源的细菌,需进一步进行分子流行病学调查。因此,目前在临床微生物室建立 ERIC-PCR 技术,定期进行细菌同源性分析,可以及早发现细菌流行暴发的趋势,有利于尽早对疑似患者进行隔离以控制多重耐药菌和泛耐药菌在医院内的传播流行。

参 考 文 献

- [1] JUNG J, PARK W. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(6): 2533-2548.
- [2] ANTUNES L C, VISCA P, TOWNER K J. Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen[J]. Pathog Dis, 2014, 71(3): 292-301.
- [3] ZHANG H Z, ZHANG J S, QIAO L. The Acinetobacter baumannii group: a systemic review[J]. World J Emerg Med, 2013, 4(3): 169-174.
- [4] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481-491.
- [5] 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.
- [6] RAHMAN M, PRASAD K N, GUPTA S, et al. Preva-

- lence and molecular characterization of new delhi metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from India[J]. *Microb Drug Resist*, 2018, 24(6):792-798.
- [7] SINGKHAM-IN U, CHATSUWAN T. In vitro activities of carbapenems in combination with amikacin, colistin, or fosfomicin against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 91(2):169-174.
- [8] QURESHI Z A, HITTLE L E, O'HARA J A, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*; beyond carbapenem resistance[J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 60(9):1295-1303.
- [9] GOSIEWSKI T, BRZYCHCZY-WLOCH M. The use of PFGE method in genotyping of selected bacteria species of the *Lactobacillus* genus [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1301:225-240.
- [10] FENDRI I, BEN HASSENA A, GROSSET N, et al. Genetic diversity of food-isolated *Salmonella* strains through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e81315.
- [11] SHARPLES G J, LLOYD R G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22):6503-6508.
- [12] HULTON C S, HIGGINS C F, SHARP P M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria[J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5(4):825-834.
- [13] VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(24):6823-6831.
- [14] 陈迎春, 曹又方, 赵立平. 大肠杆菌 MG1655 菌株 ERIC-PCR 图谱主带序列组成分析[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(6):28-32.
- [15] 钟海波, 伍晓锋, 曾瑜, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 ERIC-PCR 的分子流行病学研究[J]. *现代医院*, 2013, 13(12):19-22.
- [16] MOLTER G, SEIFERT H, MANDRAKA F, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit: a multi-level strategic management approach[J]. *J Hosp Infect*, 2016, 92(2):194-198.
- [17] LOWINGS M, EHLERS M M, DREYER A W, et al. High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa: an update[J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15:521-524.
- [18] ELLIS D, COHEN B, LIU J, et al. Risk factors for hospital-acquired antimicrobial-resistant infection caused by *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2015, 4:40-43.
- [19] SOUZA A V, MOREIRA C R, PASTERNAK J, et al. Characterizing uncommon *Burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit[J]. *J Med Microbiol*, 2004, 53(Pt 10):999-1005.
- [20] PETTIGREW M M, FOXMAN B, ECEVIT Z, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of non-typeable *Haemophilus influenzae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(2):660-662.
- [21] M'ZALI F H, HERITAGE J, GASCOYNE-BINZI D M, et al. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum beta-lactamase and to identify different SHV genes within the same strain[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1998, 41(1):123-125.
- [22] SILBERT S, PFALLER M A, HOLLIS R J, et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004, 25(10):847-851.
- [23] YING C, LI Y, WANG Y, et al. Investigation of the molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients and environmental contamination[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2015, 68(9):562-567.
- [24] 王晓辉, 宗志勇, 吕晓菊. 携带 bla_(OXA-58) 的鲍曼不动杆菌的克隆相关性分析[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2013, 44(3):405-409.
- [25] TSAI H C, CHOU M Y, WU C C, et al. Seasonal Distribution and genotyping of antibiotic resistant strains of *Listeria innocua* isolated from a river basin categorized by ERIC-PCR[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(7):E1559.
- [26] DORNELES E M, SANTANA J A, RIBEIRO D, et al. Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e98758.
- [27] MO Q H, WANG H B, TAN H, et al. Optimization and head-to-head comparison of MISSR-PCR, ERIC-PCR, RAPD and 16S rRNA evolutionary clock for the genotyping of *Vibrio cholerae* isolated in China[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2015, 33(4):516-523.
- [28] GILLINGS M, HOLLEY M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 25(1):17-21.
- [29] GILLINGS M, HOLLEY M. Amplification of anonymous DNA fragments using pairs of long primers generates reproducible DNA fingerprints that are sensitive to genetic variation[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(9):1512-1518.
- [30] ZOWAWI H M, SYRMIS M W, KIDD T J, et al. Identification of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in selected hospitals of the Gulf Cooperation Council States: dominance of high-risk clones in(下转第 584 页)

会影响临床结局判读或疾病诊断,因此本实验按照世界卫生组织要求,也是取第 5.0 个百分位数单侧作为其生物参考区间^[5]。

本研究发现,本实验室的精子活动率、精子前向活动率、正常精子形态率均低于第 5 版《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》的参考值^[2]。而精液体积和精子浓度及前向运动精子总数略高于第 5 版《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》中的参考值^[2]。分析其原因可能是由于存在地域或种族差异,有毒物质、放射性物质、杀虫剂、激素使用等环境因素,吸烟、饮酒、饮用咖啡、久坐、精神紧张等不良习惯的影响,以及分析样本量不够大等所导致的^[6-10]。因此,可以通过更长时间研究、增大样本量及改进统计方法或通过多中心科研协作的方法从而建立起更适宜本地人群的实验室(或地区)精液分析生物参考区间。

由于不同医疗机构医疗资源的差异造成国内精液分析存在多种不同的检测方法。比如,对于精子浓度的检测有牛鲍氏计数板手工法、Malker 板计数法、计算机自动分析(配相差显微镜)等,因此在将来的研究中有必要根据不同检测系统建立不同的精液分析生物参考区间,以满足不同实验室的需求,避免引起临床的误判。在本实验中将影响生物参考区间的因素去除,但部分处于灰区的患者也可能被筛除,而这部分应试者也可能拥有正常生育能力。因此,在以后研究中将这部分患者每年进行 1 次电话追踪,如果发现患者已生育,将继续纳入研究对象中。建立本区域人群的精液分析的生物参考区间将有利于临床医生根据精液分析结果更准确地评价患者精液质量及生育能力,提高临床不育症诊断的准确性^[11];同时为辅助生殖技术提供更准确的实验室诊断和技术支持,更好地为患者服务,有效减少医疗资源的浪费及辅助

生殖技术的滥用。

参考文献

- [1] 黄春妍,姚陈均,王春,等. 1985—2008 年间我国正常男性精液质量变化分析[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(8): 684-688.
- [2] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2011:2.
- [3] 世界卫生组织. WHO 人类精液及精子-宫颈黏液相互作用试验检验手册[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2001: 51.
- [4] 潘福达,郑红丽. 精液分析的质量控制[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(2): 72-73.
- [5] 陆金春,黄宇烽,吕年青. 《世界卫生组织人类精液分析实验室技术手册》与我国男科实验室现状[J]. 中华男科杂志, 2010, 16(10): 867-871.
- [6] 黄莉萍,李亚斐,熊鸿燕,等. 近 25 年中国正常男性精液质量的变化趋势分析[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(2): 122-128.
- [7] 宋向林. 生活习惯对男性精液质量的影响分析[J]. 中国卫生产业, 2014, 11(10): 141-142.
- [8] 张树成,贺斌,王弘毅,等. 有关环境与男性精液质量变化的几个问题[J]. 中国计划生育学杂志, 2003, 11(3): 189-191.
- [9] 武俊青,高尔生,杨秋英,等. 中国年轻男性精液质量与吸烟、饮酒等行为因素的关系[J]. 生殖医学杂志, 2004, 13(2): 87-90.
- [10] 甘燕玲,孙朝晖,全静雯,等. 3 527 例男性不育患者精液检查分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 153-154.
- [11] 唐亮,彭亮,侯彦强,等. 松江地区男性不育患者精液常规分析[J]. 医学检验与临床杂志, 2015, 7(4): 64-65.

(收稿日期:2018-08-29 修回日期:2018-11-23)

(上接第 580 页)

- the region[J/OL]. J Med Microbiol, 2018, 67(6): 846-853.
- [31] SILVA JUNIOR V V D, FERREIRA L D, ALVES L R, et al. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring bla GES-1 and bla GES-11 in Recife, Brazil[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2017, 50(6): 764-768.
 - [32] DAVANDEH I, ERAC B, AYDEMIR S S. Investigation of class-d beta-lactamases causing carbapenem resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates[J]. Turk J Med Sci, 2017, 47(5): 1661-1666.
 - [33] CARTELLE GESTAL M, ZURITA J, GUALPA G, et al. Early detection and control of an *Acinetobacter baumannii* multi-resistant outbreak in a hospital in Quito, Ecuador[J]. J Infect Dev Ctries, 2016, 10(12): 1294-

1298.

- [34] MAMISHI S, MAHMOUDI S, SADEGHI R H, et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* strains among healthcare workers and patients in the tertiary referral children's medical hospital in Tehran, Iran[J]. Br J Biomed Sci, 2012, 69(4): 173-177.
- [35] HETSA B A, KUMAR A, ATEBA C N. Characterization of multiple antibiotic resistant clinical strains of *Staphylococcus* isolated from pregnant women vagina[J]. Folia Microbiol (Praha), 2018, 63(5): 607-617.
- [36] ABDOLLAHI S, RAMAZANZADEH R, KHIABANI Z D, et al. Epidemiological and Inducible Resistance in Coagulase Negative *Staphylococci*[J]. Glob J Health Sci, 2015, 8(4): 109-119.

(收稿日期:2018-07-29 修回日期:2018-11-20)