

## 研究报告

## 上海 5 家宠物医院环境不动杆菌的耐药性检测及一株皮特不动杆菌的测序分析

张玉杰, 王晓旭, 徐锋, 沈莉萍, 鞠龚讷, 唐聪圣, 齐新永, 徐平, 王建\*

上海市动物疫病预防控制中心, 上海 201103

张玉杰, 王晓旭, 徐锋, 沈莉萍, 鞠龚讷, 唐聪圣, 齐新永, 徐平, 王建. 上海 5 家宠物医院环境不动杆菌的耐药性检测及一株皮特不动杆菌的测序分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 725-735.

ZHANG Yujie, WANG Xiaoxu, XU Feng, SHEN Liping, JU Gongne, TANG Congsheng, QI Xinyong, XU Ping, WANG Jian. Drug resistance of *Acinetobacter* spp. in the environments of five pet hospitals in Shanghai and sequencing of an *Acinetobacter pittii* strain[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 725-735.

**摘要:** 【背景】不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌是医院感染常见的条件致病菌, 其耐药菌株的出现对公众的健康构成了严重的威胁。【目的】了解上海市宠物医院环境中不动杆菌属的流行现状及耐药性。【方法】从上海市 5 个区的 5 家宠物医院采集环境样品, 经细菌分离、纯化后利用细菌鉴定质谱仪鉴定分离株种属, 并通过微量肉汤稀释法检测不动杆菌属分离株的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 并对其中 1 株耐碳青霉烯类分离菌进行基因组测序及遗传特征分析。【结果】730 份环境样品共分离获得 124 株革兰氏阴性菌, 经鉴定 14 株属于不动杆菌属, 其中 9 株为鲁氏不动杆菌(*A. lwoffii*)。14 株不动杆菌均对米诺环素敏感, 但其中 2 株皮特不动杆菌(*A. pittii*)和 2 株鲁氏不动杆菌为碳青霉烯类多重耐药不动杆菌, 5 株鲁氏不动杆菌对复方新诺明耐药, 1 株约氏不动杆菌(*A. johnsonii*)对环丙沙星耐药。基因组测序结果表明, 碳青霉烯类多重耐药皮特不动杆菌携带 *NDM-1*、*OXA-500* 和 *OXA-727* 等相关耐药基因, 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)结果表明分离株为 ST1037 型, 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析该菌株与来源于浙江省的临床尿液分离株 *A. pittii* AP43 的进化距离最近。【结论】上海市 5 家宠物医院环境中的不动杆菌分离株耐药率较低(<40%), 存在多重耐药现象(5 株不动杆菌分别耐 $\geq 3$  种药物)且皮特不动杆菌携带多种耐药基因。

**关键词:** 宠物医院; 不动杆菌属; 碳青霉烯; 耐药性; 测序

资助项目: 上海市科技兴农项目(2022-02-08-00-12-F01175)

This work was supported by the Research Program of Science and Technology Revitalize Agriculture in Shanghai (2022-02-08-00-12-F01175).

\*Corresponding author. E-mail: jianwhlj@163.com

Received: 2024-07-22; Accepted: 2024-08-16; Published online: 2024-09-12

## Drug resistance of *Acinetobacter* spp. in the environments of five pet hospitals in Shanghai and sequencing of an *Acinetobacter pittii* strain

ZHANG Yujie, WANG Xiaoxu, XU Feng, SHEN Liping, JU Gongne, TANG Congsheng, QI Xinyong, XU Ping, WANG Jian\*

Shanghai Animal Disease Control Center, Shanghai 201103, China

**Abstract:** [Background] *Acinetobacter* spp. are common opportunistic pathogens of hospital infection, and the emergence of drug-resistant strains of *Acinetobacter* poses a serious threat to public health. [Objective] To understand the prevalence and drug resistance of *Acinetobacter* spp. in the pet hospital environments in Shanghai. [Methods] Environmental samples were collected from pet hospitals in Shanghai, and the isolated strains were identified by a mass spectrometer for bacterial identification. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth dilution method, and then the genome sequence and genetic characteristics of a carbapenem-resistant isolate were analyzed. [Results] A total of 124 strains of Gram-negative bacteria were isolated from 730 environmental samples, and 14 strains were identified as *Acinetobacter* spp., of which 9 strains were *A. lwoffii*. All the 14 *Acinetobacter* strains were sensitive to minocycline. Two *A. pittii* strains and two *A. lwoffii* strains demonstrated multidrug resistance to carbapenems. Five *A. lwoffii* strains were resistant to sulfamethoxazole trimethoprim, and one *A. johnsonii* strain was resistant to ciprofloxacin. The results of genome sequencing showed that the *A. pittii* strain with multidrug resistance to carbapenems carried drug resistance genes such as *NDM-1*, *OXA-500*, and *OXA-727*. The multilocus sequence typing (MLST) results showed that the isolate was of ST1037 and the single nucleotide polymorphism (SNP) analysis revealed that the isolate was close to *A. pittii* AP43 isolated from clinical urine in Zhejiang. [Conclusion] The drug resistance rate of *Acinetobacter* spp. in the environments of five pet hospitals in Shanghai was <40%, and there was multi-drug resistance (Five *Acinetobacter* strains were resistant to  $\geq 3$  drugs). *A. pittii* carried multiple drug resistance genes.

**Keywords:** pet hospital; *Acinetobacter* spp.; carbapenem; drug resistance; sequencing

不动杆菌(*Acinetobacter* spp.)是一种广泛分布于自然界中的革兰氏阴性菌,可存在于动物、人类和各种环境中。其中,鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是院内感染的病原体,可引起肺炎、菌血症、尿路感染及动物感染<sup>[1]</sup>。近年发现皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)也成为一种重要的院内病原体<sup>[2]</sup>。碳青霉烯类药物是治疗多重耐药不动杆菌感染的首选药物,

但由于不动杆菌碳青霉烯类耐药菌株的出现,耐碳青霉烯类不动杆菌成为造成公共卫生严重威胁的细菌<sup>[1-2]</sup>。

近年来医学领域对碳青霉烯类耐药皮特不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter pittii*, CRAP)进行了广泛的研究,并且已经确定了不同的碳青霉烯酶耐药基因,包括 OXA-58 型、OXA-500 型、OXA-357 型和 NDM-1 型<sup>[2-4]</sup>等,

但在兽医领域和环境卫生领域报道极少。为了解上海地区宠物医院环境中不动杆菌的流行及耐药情况,本研究采集上海地区宠物医院的环境样本进行不动杆菌的分离鉴定,对 14 株分离菌进行常规药物敏感性试验,并对其中 1 株 CRAP 进行基因组测序分析,以期确定宠物环境中皮特不动杆菌的耐药基因及毒力基因,为上海地区宠物诊疗环境中耐药不动杆菌的流行现状研究提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品

于 2023 年 5 月、7 月、9 月、11 月及 2024 年 1 月利用 eSwab 采样拭子采集上海市闵行区、长宁区、宝山区、浦东新区和徐汇区等 5 家宠物医院的环境样本,每家医院至少采集 20 份样本,记录相关详细信息,于采集 24 h 内进行细菌分离。质控菌株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.2 培养基和主要试剂、仪器

哥伦比亚羊血培养基(g/L):特殊蛋白胨 23.0,可溶性淀粉 1.0,氯化钠 5.0,琼脂 10.0,脱纤维羊血 5%。哥伦比亚培养基, Oxoid 公司。MH 琼脂,北京陆桥技术股份有限公司。药敏检测板,珠海美华医疗科技有限公司。细菌鉴定质谱仪和比浊仪,生物梅里埃公司。

### 1.3 菌株的分离、纯化及鉴定

将采集的样本作为细菌分离材料,接种于哥伦比亚羊血固体培养基,于(35±2) °C 培养 24–48 h,挑取单菌落进一步纯化,将纯化的细菌直接涂布并固定在含基质的靶板上,使用默认参数和默认数据库用细菌鉴定质谱仪快速鉴定。纯化后的菌株使用 25%的甘油肉汤–80 °C 保存。

### 1.4 药物敏感性检测

采用药敏板检测分离株对米诺环素(MIN)、哌拉西林/他唑巴坦(P/T)、氨苄西林/舒巴坦(AMS)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MRP)、阿米卡星(AMK)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LEV)、复方新诺明(SXT)等 12 种抗生素的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。将不动杆菌分离株使用 MH 琼脂培养,使用生理盐水配制到麦氏浊度 0.5,吸取 50 μL 菌悬液,加至 10 mL MH 肉汤培养基混匀,每孔 100 μL,盖上盖子,(35±2) °C 培养 20–24 h,肉眼观察结果,记录 MIC 值。以美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的标准判读结果<sup>[5]</sup>。药敏质控菌株为 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853。

### 1.5 基因组测序

将 1.4 中分离到的 CRAP 接种于 MH 肉汤中,(35±2) °C、220 r/min 培养 24 h,将培养物委托生工生物工程(上海)股份有限公司使用 Illumina 二代测序平台进行框架基因组测序,使用 SPAdes 拼接二代测序数据,组装后进行后续分析。

### 1.6 测序结果分析

使用 NCBI BLAST+把基因蛋白序列与 VFDB 数据库(<https://www.mgc.ac.cn/VFs/>)、CARD 数据库(<https://card.mcmaster.ca>)及非冗余蛋白序列(non-redundant protein sequence, NR)数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)进行比对,得到毒力因子、耐药基因和 NR 功能注释等相关信息。

采用 Oxford 法选取皮特不动杆菌的 7 个管家基因序列,在 PubMLST 网站上进行比对,获得相应的序列型(sequence type, ST)。

使用 NCBI BLAST+将拼接得到的基因组与核酸序列数据库(Nucleotide Sequence Database,

NT)进行比对, 匹配得分得到其同源菌株信息, 根据突变的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)信息构建系统发育树。

## 1.7 数据统计及分析

本研究获得的数据利用 Excel 进行初步统计分析, 利用 SPSS 中的 Fischer's 精确检验进行分析,  $P < 0.05$  具有统计学意义。系统发育树用 Snippy 软件进行绘制。其余图片使用 GraphPad Prism 9 绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 来源分布

本次试验共收集 5 个区的 5 家宠物医院环境样本 730 份, 每个区选择一家宠物医院进行定点采样, 每家宠物医院每次收集的样本数量不低于 20 份(表 1)。

经细菌分离鉴定, 共有 124 株革兰氏阴性菌(16.99%), 浦东新区的分离率最高, 占比 4.80%。而革兰氏阴性菌中共有不动杆菌 14 株, 浦东新区分离率最高, 为 4.84% (6/124), 其次为长宁区 2.42% (3/124)、闵行区 1.61% (2/124)、宝山区 1.61% (2/124)、徐汇区 0.81% (1/124) (表 2)。

### 2.2 药敏试验结果

经药敏板鉴定, 在 14 株不动杆菌样本中, 不动杆菌对 12 种抗生素的耐药率均小于 40%,

并且所有不动杆菌均对米诺环素敏感, 耐药率 0%; 5 株不动杆菌对 12 种抗生素均敏感(表 3); 5 株不动杆菌表现为多重耐药(表 3 中加粗), 其中 3 株为碳青霉烯类耐药不动杆菌, 耐药率 21.43% (QT5-2024:IPM 与 MRP 的 MIC 均为  $8 \mu\text{g/mL}$ , QT52-2023:IPM 与 MRP 的 MIC 均  $>32 \mu\text{g/mL}$ , QT51-2023:IPM 与 MRP 的 MIC 均  $>32 \mu\text{g/mL}$ ); 1 株为碳青霉烯类中介耐药, 耐药率 7.14% (QT30-2023:IPM 与 MRP 的 MIC 均为  $4 \mu\text{g/mL}$ ) (图 1)。

此外, 碳青霉烯类耐药(carbapenem-resistant, CR)分离株和非 CR 分离株之间的耐药率存在差异(表 4), CR 不动杆菌对所有的抗生素耐药率都高于非 CR 分离株(MIN 除外, 2 组抗生素的耐药率均为 0), 而 CTX 和 CAZ 的耐药率存在显著差异( $P < 0.01$ )。

### 2.3 框架基因组测序结果

经测序显示, 测序深度为  $100\times$ , 共获得原始数据量 0.943 Gb, 经质控过滤后获得 0.941 Gb 的 clean data 用于后续数据组装。组装获得基因组大小为 4.29 Mb 的基因组框架图, 包括 103 个 contigs, N50 为 99 882 bp, G+C 含量为 39%。注释后获得 4 061 个编码序列, 64 个 tRNA, 4 个 5S rRNA, 2 个 16S rRNA, 5 个 23S rRNA, 1 个 LncRNA。

表 1 730 份环境样本的相关信息

Table 1 Information of 730 environment samples

采样地点 Area	样本数量 Number of samples				
	2023.05	2023.07	2023.09	2023.11	2024.01
宠物医院 A (闵行区) Pet hospital A (Minhang)	25	25	25	25	25
宠物医院 B (徐汇区) Pet hospital B (Xuhui)	25	25	25	25	25
宠物医院 C (浦东新区) Pet hospital C (Pudong New Area)	25	25	25	25	25
宠物医院 D (长宁区) Pet hospital D (Changning)	50	50	30	50	50
宠物医院 E (宝山区) Pet hospital E (Baoshan)	25	25	25	25	25
合计 Total	150	150	130	150	150

表 2 14 株不动杆菌的相关信息

Table 2 Information of 14 strains of *Acinetobacter* spp.

来源 Source	样本数量 Number of samples	革兰氏阴性菌 数量(分离率) Number of Gram-negative bacteria (rate of separation)	不动杆菌数量(分离率) Number of <i>Acinetobacter</i> spp. (rate of separation)	菌株编号 Strain No.	地点 Area
闵行区 Minhang	125	30 (4.11%)	2 (1.61%) Both strains were <i>A. pittii</i>	QT52-2023	免疫室 Laboratory of immunology
				QT51-2023	狗笼把手 Dog cage handle
徐汇区 Xuhui	125	22 (3.01%)	1 (0.81%) One strain was <i>A. lwoffii</i>	QT6-2024	/
浦东新区 Pudong New Area	125	35 (4.80%)	6 (4.84%) All of six strains were <i>A. lwoffii</i>	QT5-2024	狗笼凳子 Dog cage stool
				QT4-2024	狗笼地面 Dog cage floor
				QT30-2023	免疫室 Laboratory of immunology
				QT28-2023	免疫室 Laboratory of immunology
				QT3-2024	免疫室 Laboratory of immunology
长宁区 Changning	230	25 (3.42%)	3 (2.42%) One strain was <i>A. johnsonii</i> Two strains were <i>A. lwoffii</i>	QT15-2023	/
				CN_11_B17	手术室 Operating room
				CN_11_B11	手术室 Operating room
宝山区 Baoshan	125	12 (1.64%)	2 (1.61%) One strain was <i>A. junii</i> One strain was <i>A. schindler</i>	QT45-2023	手术台 Operating table
				QT31-2023	手术台 Operating table
总数 Total	730	12 (16.99%)	14 (11.29%)		

/: No data.

### 2.3.1 NR 数据库注释分析

通过 NR 数据库比对, 可查看相近物种的相似情况。本研究中, 共有 4 057 条基因序列注释到 NR 数据库, 其中有 2 427 条基因序列与皮特不动杆菌基因组具有同源性, 占总 NR 注

释的 59.82% (图 2), 其次占比较多的为鲍曼不动杆菌(6.46%)。

### 2.3.2 耐药基因鉴定结果

耐药基因鉴定结果显示, QT51-2023 携带氨基糖苷类耐药基因[*AAC(3)-IIIa*, *APH(3')-IVa*],

表3 14株不动杆菌对12种抗生素的MIC值

Table 3 MIC of 14 strains of *Acinetobacter* to 12 antibiotics

菌株编号 Strain No.	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )											
	MIN	P/T	AMS	CTX	CAZ	FEP	IPM	MRP	AMK	CIP	LEV	SXT
QT5-2024	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	<b>R (128)</b>	<b>R (&gt;128)</b>	S ( $\leq 4$ )	<b>R (8)</b>	<b>R (8)</b>	S ( $\leq 8$ )	S ( $\leq 0.5$ )	S ( $\leq 1$ )	<b>R (8/152)</b>
QT52-2023	S ( $\leq 1$ )	<b>R (128/4)</b>	<b>R (64/32)</b>	<b>R (&gt;128)</b>	<b>R (&gt;128)</b>	<b>R (&gt;128)</b>	<b>R (&gt;32)</b>	<b>R (&gt;32)</b>	<b>R (64)</b>	<b>R (&gt;16)</b>	<b>R (8)</b>	S ( $\leq 1/19$ )
QT51-2023	S ( $\leq 1$ )	<b>R (128/4)</b>	<b>R (64/32)</b>	<b>R (&gt;128)</b>	<b>R (&gt;128)</b>	<b>R (128)</b>	<b>R (&gt;32)</b>	<b>R (&gt;32)</b>	<b>R (128)</b>	<b>R (16)</b>	<b>R (8)</b>	S ( $\leq 1/19$ )
QT6-2024	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	<b>I (32)</b>	<b>R (8)</b>	S (2)	<b>R (16/304)</b>
QT4-2024	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	R (>128)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8$ )	S ( $\leq 0.5$ )	S ( $\leq 1$ )	R (8/152)
QT30-2023	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	<b>R (64)</b>	<b>R (&gt;128)</b>	S ( $\leq 4$ )	<b>I (4)</b>	<b>I (4)</b>	S ( $\leq 8$ )	S ( $\leq 0.5$ )	S ( $\leq 1$ )	<b>R (16/304)</b>
QT28-2023	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S ( $\leq 4$ )	R (32)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8$ )	S (1)	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1/19$ )
QT3-2024	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	R (64)	S (1)	S ( $\leq 1$ )	R (32/608)
QT15-2023	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S (8)	S (8)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8$ )	R (4)	S (2)	S ( $\leq 1/19$ )
QT33-2023	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8$ )	S ( $\leq 0.5$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1/19$ )
CN_11_B17	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8$ )	S ( $\leq 0.5$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1/19$ )
CN_11_B11	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8$ )	S ( $\leq 0.5$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1/19$ )
QT45-2023	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8$ )	S ( $\leq 0.5$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1/19$ )
QT31-2023	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8/4$ )	S (4/2)	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 4$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 8$ )	S ( $\leq 0.5$ )	S ( $\leq 1$ )	S ( $\leq 1/19$ )

R: 耐药; I: 中介; S: 敏感。加粗表示多重耐药。

R: Resistance; I: Intermediary; S: Sensitivity. Bold indicates multidrug resistance.

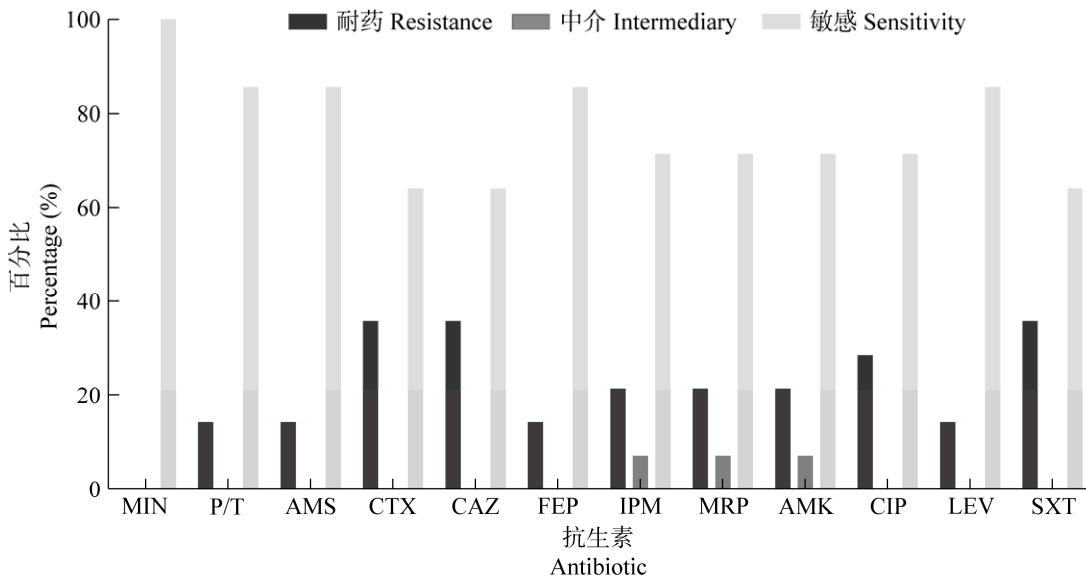


图1 14株不动杆菌对12种抗生素的耐药情况

Figure 1 Resistance analysis of 14 strains of *Acinetobacter* to 12 antibiotics.

碳青霉烯类耐药基因(*NDM-1*, *OXA-500*, *OXA-727*), 磺胺类耐药基因(*sul4*), 四环素类耐药基因[*tet(39)*, *tetA(60)*, *tet(48)*, *tet(32)*, *tet(36)*]和头孢菌素类耐药基因(*ADC-18*), 以上均与耐药

表型相匹配。此外, 还携带耐药-结节-细胞分裂(resistance-nodulation-cell division, RND)抗生素外排泵基因(*adeL*, *adeN*, *adeIJK*, *adeGH*, *adeN*), 主要促进剂超家族(major facilitator superfamily,

表 4 碳青霉烯类耐药菌和非耐药菌的耐药率  
Table 4 Resistant rates in carbapenem-resistant and non-resistant bacteria

抗生素 Antibiotic	CR 分离株耐 药率 Resistant rates of CR bacteria (%)	非 CR 分离株 耐药率 Resistant rates of non-CR bacteria (%)	P 值 P value
MIN	0	0	1.000
P/T+AMS+FEP	50	0	0.066
CTX	100	10	0.005
CAZ	100	10	0.005
AMK	50	20	0.520
CIP	50	20	0.520
LEV	50	0	0.066
SXT	50	30	0.580

CR: 碳青霉烯类耐药。

CR: Carbapenem-resistant.

MFS) 抗生素外排泵基因(*floR*, *tap*), 小多药耐药 (small multidrug resistance, SMR) 抗生素外排泵基因(*abeS*), 这些泵负责喹诺酮类、大环内酯类、氨基糖苷类、四环素类和苯酚外排。

### 2.3.3 毒力基因鉴定结果

毒力基因鉴定结果显示, 菌株 QT51-2023 携带与生物膜形成相关的基因(菌毛相关基因 *csuA*、*csuC*、*csuD*、*csuE*), 外膜蛋白 *ompA* 基因(*pgaA* 操纵子), 防御性毒力因子(压力蛋白基因 *katA*), 非特异性毒力因子(铁摄取相关的 *bauA*、*bauD*、*bauE*、*barA*、*feoB* 等), 以及毒力相关的调节基因 *phoP* 和双组分调控系统基因 *BfmRS*。

### 2.3.4 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)及 SNP 分析

采用 Oxford scheme, 选取菌株 QT51-2023 的 7 个管家基因, 通过比较 MLST 数据库 (<https://pubmlst.org/>) 中的等位基因序列鉴定其为 ST1037 (*gltA*-56, *gyrB*-104, *gdhB*-137, *recA*-7, *cpn60*-51, *rpoD*-74, *gpi*-247)。

SNP 构建的系统发育树显示, 菌株 QT51-2023 与 *A. pittii* AP43 的进化距离最近(图 3), 该菌株为来源于浙江省的临床尿液分离株。根据 PubMLST

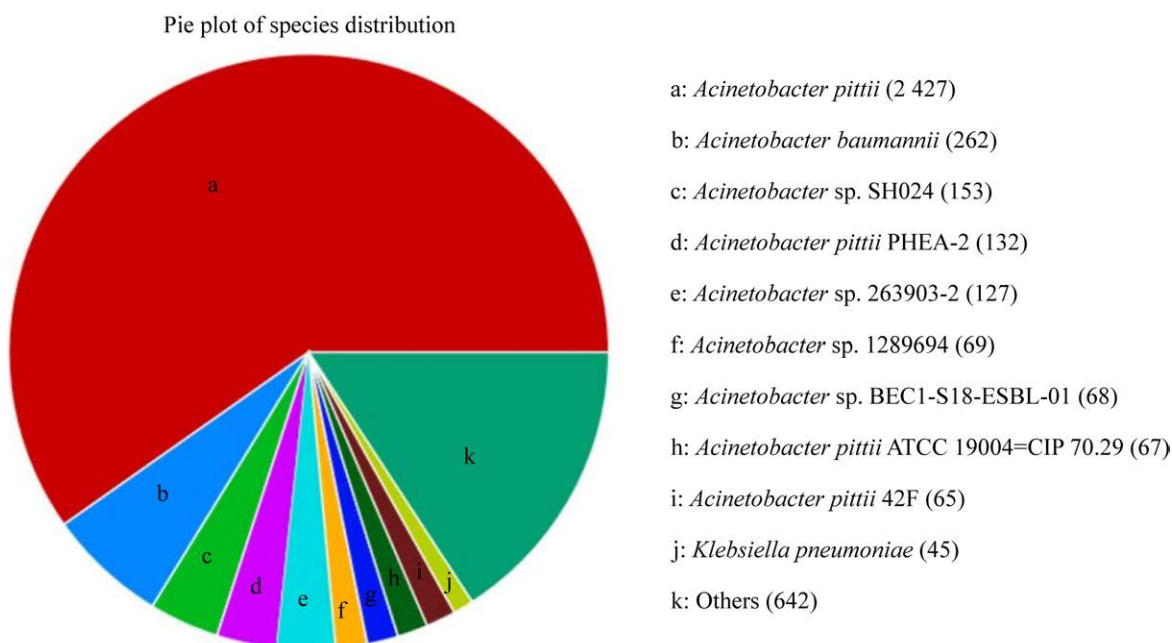


图 2 皮特不动杆菌菌株 NR 数据库的注释结果统计

Figure 2 NR database annotation result statistical chart of *Acinetobacter pittii* strain.





这是因为米诺环素能够克服降低其他几种四环素类药物活性的耐药机制,使得它能够广泛地用于对抗多重耐药不动杆菌<sup>[12]</sup>。磺胺类复方新诺明在兽医学中可用于治疗不动杆菌感染,然而本研究中多于三分之一的分离株(5/14)具有耐药性,这在以往的兽医分离的鲍曼不动杆菌-钙乙酸菌复合物的研究中也出现了类似的情况,特别是在 CR 分离株中<sup>[12-13]</sup>。此外,本研究中携带 *NDM-1* 基因的 CRAP 分离株表现为多重耐药且耐药种类要高于其他不动杆菌。这是因为携带 NDM 酶的细菌对碳青霉烯类和许多其他抗生素产生体外耐药表型,虽然 *NDM-1* 基因的传播主要来源于肠杆菌科结合的质粒,但该类碳青霉烯酶已经在不动杆菌中鉴定出来,目前研究认为,不动杆菌属可能在 *NDM* 基因从其天然宿主传播到肠杆菌科中发挥重要的作用<sup>[7,14]</sup>。

耐药基因检测显示该 CRAP 菌株还携带 *ADC-18*、*OXA-500*、*OXA-727* 和抗生素外排基因等。*ADC* 为不动杆菌衍生的头孢菌素酶,可介导头孢西丁、头孢菌素、青霉素和  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂联合用药的耐药性<sup>[15]</sup>,皮特不动杆菌的 *ADC-18* 于 2014 年在脑脊液分离株中鉴定出来<sup>[16]</sup>;有报道称,在不动杆菌对碳青霉烯类药物的耐药机制中,*OXA* 水解酶的活性起到至关重要的作用<sup>[17]</sup>,其中 *OXA-58* 基因是临床上发现最广泛的碳青霉烯类耐药基因,而本研究中检测出的为 *OXA-500* 和 *OXA-727* 基因,*OXA-500* 属于碳青霉烯类水解 D- $\beta$ -内酰胺酶,是皮特不动杆菌中主要流行的 *OXA* 变体,已在泰国、中国和美国的众多皮特不动杆菌中检测到,而 *OXA-727* 变体主要存在于中华不动杆菌 (*Acinetobacter chinensis*)、污水不动杆菌 (*Acinetobacter defluvii*)、根特不动杆菌 (*Acinetobacter gandensis*) 中,是否具有碳青霉

烯类水解活性,目前还未得到证实<sup>[7,18]</sup>。菌株 QT51-2023 基因组中存在的 RND 外排泵基因 (*adeIJK*, *adeGH*) 和 SMR 外排泵基因 (*abeS*) 等是菌株中一致鉴定的最普遍的抗性基因,分别靶向氟喹诺酮类和大环内酯类药物,其中 RND 具有广泛的底物特异性,能够在抗生素完全进入细胞之前从周质中排出多种抗生素<sup>[19-20]</sup>,这也是导致该菌株产生耐药性的原因之一;该菌株还含有调节因子 *adeL* 和 *adeN*,分别负责 *adeGH* 和 *adeIJK* 的过表达<sup>[21]</sup>,使菌株含有的抗性基因过度表达,从而增加菌株的耐药性。除此之外,该 CRAP 菌株与 SNP 系统发育树上亲缘关系最近的 *A. pittii* AP43 含有相同的 *APH(3')-IVa* 耐药基因,*APH(3')-IVa* 属于氨基糖苷磷酸转移酶 (aminoglycoside phosphotransferases, APHs),有报道称高水平的氨基糖苷类抗生素的耐药性与 APHs 有着密切的关系,通过降低羟基与 RNA 残基的氢键电位来降低与靶标物的亲和力,导致细菌耐药性的产生,与耐药表型相一致<sup>[22]</sup>。

毒力基因检测显示该菌株含有多个与菌毛形成和铁载体相关的基因。菌毛形成有助于生物膜的形成,可促进细菌稳定地黏附在非生物膜表面,同时获得铁的能力对细菌的生长和复制至关重要,从而增强细菌的致病力<sup>[10,23]</sup>,毒力因子菌毛基因 (*csuA*, *csuC*, *csuD*, *csuE*) 和铁载体基因 (*feoB*) 的存在,很大程度上使得该菌株可能具有毒力。此外皮特不动杆菌中还发现 *ompA* 基因,该基因可编码一个关键的抗原因子 (*OmpA*),使细菌免疫逃避成为可能<sup>[24]</sup>,从而使该菌株的毒力进一步增强。

## 4 结论

本研究通过对上海地区宠物医院环境中的不动杆菌进行流行和耐药性分析,确定了上海地区 5 家宠物医院目前存在的 5 种不动杆菌的

流行和耐药表型。结果显示,上海地区宠物医院环境中的不动杆菌整体耐药水平较低,存在多重耐药现象,出现了碳青霉烯类耐药与中介耐药不动杆菌。本研究还发现了携带多种耐药基因的皮特不动杆菌菌株,应对其相关耐药情况进行长期监测。

## REFERENCES

- [1] McKAY SL, VLACHOS N, DANIELS JB, ALBRECHT VS, STEVENS VA, RASHEED JK, JOHNSON JK, LUTGRING JD, SJÖLUND-KARLSSON M, HALPIN AL. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the United States, 2013–2017[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2022, 28(6): 645-653.
- [2] TIAN CM, SONG JQ, HUANG DL, WANG SW, ZHAO YP, FU LP, FAN XY, MA TH, BAI YF. Emergence of a ST248<sub>Pasteur</sub>-ST1068<sub>Oxford</sub> carbapenem resistance *Acinetobacter pittii* clinical isolate in China, co-harboring OXA-58 and OXA-500 carbapenemases[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2023, 16: 5681-5684.
- [3] WUNDERLICH A, XANTHOPOULOU K, WILLE J, WOHLFARTH E, GERSON S, KAASE M, SEIFERT H, HIGGINS PG. Carbapenem resistance in *Acinetobacter pittii* isolates mediated by metallo- $\beta$ -lactamases[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2023, 78(2): 488-496.
- [4] WANG JF, CHEN Y, WU LY, CHEN Y, XU LQ. Draft genome sequence of a multidrug-resistant beta-lactamase OXA-357-producing *Acinetobacter pittii* ST865 clinical isolate from China[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017, 48(2): 196-197.
- [5] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement[S]. CLSI document M100: Wayne, PA, 2017.
- [6] PAILHORIÈS H, TIRY C, EVEILLARD M, KEMPF M. *Acinetobacter pittii* isolated more frequently than *Acinetobacter baumannii* in blood cultures: the experience of a French hospital[J]. *Journal of Hospital Infection*, 2018, 99(3): 360-363.
- [7] CHOPJITT P, PUTTHANACHOTE N, UNGCHAROEN R, HATRONGJIT R, BOUEROY P, AKEDA Y, TOMONO K, HAMADA S, KERDSIN A. Genomic characterization of clinical extensively drug-resistant *Acinetobacter pittii* isolates[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 242.
- [8] 樊利虹, 王之盛, 左之才, 才冬杰, 易军, 马晓平, 苟丽萍, 王巍. 肉牛呼吸道皮特不动杆菌的生物学特性分析[J]. *浙江农业学报*, 2022, 34(2): 300-309. FAN LH, WANG ZS, ZUO ZC, CAI DJ, YI J, MA XP, GOU LP, WANG W. Analysis of biological characteristics of *Acinetobacter pittii* from respiratory tract of beef cattle[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2022, 34(2): 300-309 (in Chinese).
- [9] 樊利虹, 郭红瑞, 吴江, 易军, 马晓平, 苟丽萍, 谢跃, 叶刚, 左之才. 牛源皮特不动杆菌对小鼠的致病性分析[J]. *浙江农业学报*, 2021, 33(2): 230-238. FAN LH, GUO HR, WU J, YI J, MA XP, GOU LP, XIE Y, YE G, ZUO ZC. Pathogenicity of *Acinetobacter pittii* from beef cattle in mice[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2021, 33(2): 230-238 (in Chinese).
- [10] 王超杰, 黎洁, 王旭, 王至诚, 王卫民, 罗毅. 鱼源致病菌皮特不动杆菌 Ap-W20 的全基因组序列及其毒力特征分析[J]. *水产学报*, 2020, 44(9): 1488-1501. WANG CJ, LI J, WANG X, WANG ZC, WANG WM, LUO Y. Complete genome sequence of an emerging fish pathogen *Acinetobacter pittii* strain Ap-W20 and its virulence characteristics[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(9): 1488-1501 (in Chinese).
- [11] WANG X, LI J, CAO XJ, WANG WM, LUO Y. Isolation, identification and characterisation of an emerging fish pathogen, *Acinetobacter pittii*, from diseased loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in China[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(1): 21-32.
- [12] LYSITSAS M, TRIANTAFILLOU E, CHATZIPANAGIOTIDOU I, ANTONIOU K, VALIAKOS G. Antimicrobial susceptibility profiles of *Acinetobacter baumannii* strains, isolated from clinical cases of companion animals in Greece[J]. *Veterinary Sciences*, 2023, 10(11): 635.
- [13] LEELAPSAWAS C, YINDEE J, NITTAYASUT N, CHUEAHIRAN S, BOONKHAM P, SUANPAIRINTR N, CHANCHAITHONG P. Emergence and multi-lineages of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex from canine and feline origins[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2022, 84(10): 1377-1384.
- [14] 张雨晨. 临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学研究及一例皮特不动杆菌全基因组分析[D]. 合肥: 安徽医科大学硕士学位论文, 2019. ZHANG YC. Molecular epidemiological study on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical practice and genome-wide analysis of a case of *Acinetobacter pittii* [D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Medical University, 2019 (in Chinese).
- [15] AYOUB MOUBARECK C, HAMMOUDI HALAT D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(3): 119.
- [16] PÉRICHON B, GOUSSARD S, WALEWSKI V, KRIZOVA L, CERQUEIRA G, MURPHY C, FELDGARDEN M, WORTMAN J, CLERMONT D, NEMEC A, COURVALIN P. Identification of 50 class D  $\beta$ -lactamases and 65 *Acinetobacter*-derived cephalosporinases in *Acinetobacter* spp.[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(2): 936-949.
- [17] 胡金树, 刘伟, 贾汝福, 宋宇琴, 王超, 唐娜, 冯婕.

- 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的临床分布及基因组流行病学分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 270-282.
- HU JS, LIU W, JIA RF, SONG YQ, WANG C, TANG N, FENG J. Analysis on the clinical distribution and genomic epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 270-282 (in Chinese).
- [18] LI J, LI Y, CAO XL, ZHENG J, ZHANG Y, XIE H, LI CC, LIU C, SHEN H. Genome-wide identification and oxacillinase OXA distribution characteristics of *Acinetobacter* spp. based on a global database[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1174200.
- [19] SINGH RP, SINHA A, DEB S, KUMARI K. First report on in-depth genome and comparative genome analysis of a metal-resistant bacterium *Acinetobacter pittii* S-30, isolated from environmental sample[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1351161.
- [20] KORNELSEN V, KUMAR A. Update on multidrug resistance efflux pumps in *Acinetobacter* spp.[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2021, 65(7): e0051421.
- [21] CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ I, LÁZARO-DÍEZ M, RAMOS-VIVAS J. Genetic resistance determinants in clinical *Acinetobacter pittii* genomes[J]. Antibiotics, 2022, 11(5): 676.
- [22] 刘可欣, 周焱洪, 雍燕, 方炳虎. 氨基糖苷类抗生素耐药机制及其对抗策略的研究进展[J]. 动物医学进展, 2020, 41(10): 102-106.
- LIU KX, ZHOU YH, YONG Y, FANG BH. Progress on aminoglycoside antibiotic resistance mechanism and its countermeasures[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(10): 102-106 (in Chinese).
- [23] WANG GY, ZHAO G, CHAO XY, XIE LX, WANG HJ. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(17): 6278.
- [24] TOBIN LA, JAROCKI VM, KENYON J, DRIGO B, DONNER E, DJORDJEVIC SP, HAMIDIAN M. Genomic analysis of diverse environmental *Acinetobacter* isolates identifies plasmids, antibiotic resistance genes, and capsular polysaccharides shared with clinical strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2024, 90(2): e0165423.