

DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2020.08.14

MALDI-TOF MS 对醋酸钙鲍曼不动杆菌复合群菌种鉴定效果的分析

蔡壬辛, 蓝锴, 屈平华, 罗强, 陈茶, 张伟铮(广东省中医院/广州中医药大学附属第二医院检验科, 广州 510006)

摘要:目的 评估基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术对醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群内菌种的鉴定能力。方法 收集 2018 年 1 月至 2020 年 3 月经 Vitek 2 全自动微生物鉴定仪鉴定为醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群的菌株 280 株,用 Vitek MALDI-TOF MS(V3.2)鉴定并用 *gyrB* 基因测序验证,比较复合群内不同种间的耐药性差异。结果 280 株醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群经 Vitek MALDI-TOF MS 鉴定,结果为鲍曼不动杆菌 251 株、医院不动杆菌 15 株和皮特不动杆菌 14 株。质谱鉴定结果与基因测序结果符合率为 100%。鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物均表现为高度耐药,耐药率多在 60%以上,医院不动杆菌和皮特不动杆菌对多种抗菌药物呈现高度敏感。除了对阿米卡星、米诺环素、复方磺胺甲噁唑外,鲍曼不动杆菌对各种检测药物的耐药性显著高于医院不动杆菌和皮特不动杆菌,差异有统计学意义($P < 0.05$);医院不动杆菌和皮特不动杆菌在各种检测药物耐药率上差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 Vitek MALDI-TOF MS 3.2 版本可实现醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群不同种的鉴定;醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群不同种的药敏结果存在差异性。

关键词:醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群;基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱;菌种鉴定

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群(*Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex)又称为鲍曼不动杆菌复合群,包括鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)、医院不动杆菌(*Acinetobacter nosocomialis*)、塞弗特不动杆菌和戴克肖不动杆菌,各菌种因表型相似,生化试验无法区分。研究发现,鲍曼不动杆菌复合群不同菌种对抗菌药物的耐药性存在差异^[1],因此将该复合群准确鉴定至种对临床用药有指导意义。Vitek MALDI-TOF MS 升级至 3.2 版本后可鉴定鲍曼不动杆菌、医院不动杆菌和皮特不动杆菌。本研究旨在验证该版本对临床分离鲍曼不动杆菌复合群鉴定的准确性以及评估各种间的药敏结果差异性。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集广东省中医院 2018 年 1 月至 2020 年 3 月临床分离非重复鲍曼不动杆菌复合群菌株 280 株,样本分布包括痰液 207 株、尿液 28 株、引流液 16 株、分泌物 13 株、血液 6 株、脓液 4 株和其他 6 株。所有菌株经 Vitek 2 全自动细菌鉴定/药敏分析仪鉴定。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 来源于广东省临床检验中心。

1.2 主要仪器和试剂 Vitek MALDI-TOF MS 仪(V3.2)、Vitek 2 全自动细菌鉴定药敏分析仪及配套 GN335 药敏卡、质谱基质液(Vitek MS CHCA Matrix)、大肠埃希菌 ATCC 8739(法国生物梅里埃公司),96 孔基因扩增仪(美国 ABI 公司),金属浴仪(杭州博日公司),电泳仪及凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);血平板、M-H 平板(江门凯林公司),抗菌药物药敏纸片(英国 Oxoid 公司),PCR 试剂(日本 TaKaRa 公司),引物合成及测序(上海生工广州公司)。

1.3 *gyrB* 序列扩增及测序分析 煮沸法提取细菌 DNA:用接种环挑取血平板上单个菌落接种于 3 mL LB 肉汤中,37 °C 180 r/min 过夜;取 1.5 mL 菌液 12 000 r/min 5 min,弃上清液;加入 1 mL 生理盐水洗涤后 12 000 r/min 5 min,弃上清液。加双蒸水 500 μL,混匀后于 95 °C 10 min,12 000 r/min 5 min,上清液即为细菌 DNA 模板。参考文献^[2]方法进行 *gyrB* 序列扩增及测序分析。*gyrB* 引物序列包括 F:5'-CCAACHGATATWCAYCCWGAAG-3'和 R:5'-TCTTTTTCYTGACAGTCNGCCA-3'。PCR 反应体系为 25 μL:2 × premix Taq 12.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,DNA 模板 2 μL,ddH₂O 8.5 μL。PCR 反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,52 °C 40 s,72 °C 90 s,32 个循环;72 °C 5 min。扩增

作者简介:蔡壬辛,1985 年生,男,主管技师,硕士,从事细菌耐药机制方向研究。

通信作者:张伟铮,副主任技师,E-mail:zwzww83@163.com。

产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察。扩增产物送上海生工广州公司进行单向测序,测序结果在 NCBI 网站 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 进行 BLAST 分析。序列比对用 DNAMAN 软件进行。

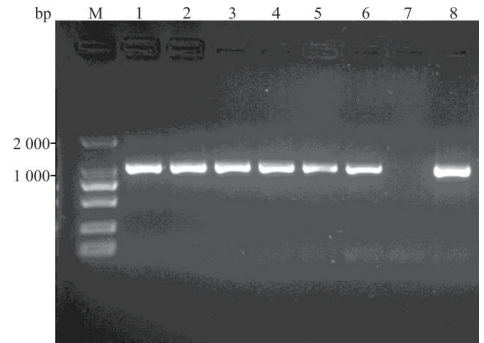
1.4 Vitek MALDI-TOF MS 鉴定 将鲍曼不动杆菌复合群保存菌株转种于血平板,35 ℃ 培养 18~24 h;挑取单个菌落,均匀涂布于靶板上,随即在每个靶板孔中加入 1 μL 质谱基质液,待自然风干后上机鉴定。用 3.2 版本数据库进行结果判读,当鉴定结果选项仅有 1 个且可信度在 60%~99.9%时为可接受的鉴定结果。大肠埃希菌 ATCC 8739 为质控菌株。

1.5 药敏试验 用 Vitek 2 全自动微生物分析系统进行药敏试验,K-B 法进行头孢哌酮/舒巴坦、美罗培南药敏试验。大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 为质控菌株。参照美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 2020 版判读标准^[3]。

1.6 统计学分析 用 WHONET 5.6 进行药敏数据统计,用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计数资料用率表示,率的比较用卡方检验和 Fisher 精确概率检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 gyrB 序列扩增及测序结果 280 株鲍曼不动杆菌复合群菌株经 *gyrB* 基因序列分析,可分为鲍曼不动杆菌 251 株、医院不动杆菌 15 株和皮特不动杆菌 14 株。*gyrB* 可变区序列间差异采用 DNAMAN 软件比对,379~1 019 bp 是 *gyrB* 基因高度可变区,可实现 3 种菌种鉴别。电泳图谱和序列分析分别见图 1 和图 2。



注:M,DL2000 marker;1、2,鲍曼不动杆菌;3、4,医院不动杆菌;5、6,皮特不动杆菌;7,阴性对照;8,阳性对照。

图 1 *gyrB* 基因扩增产物电泳分析

A.baumannii	GTGGTTTCACCGGCTAGGGCTTCTGGTGGTAAAGGCGCT	120	A.baumannii	GGTTTATCTGAGTTTGTAAATACATCAACGAAGGTAAAA	440
A.nosocomialis	GTGGTTTCACCGGCTAGGGCTTCTGGTGGTAAAGGCGCT	116	A.nosocomialis	GGTTTATCTGAGTTTGTAAATACATCAACGAAGGTAAAA	436
A.pittii	GTGGTTTCACCGGCTAGGGCTTCTGGTGGTAAAGGCGCT	115	A.pittii	GGTTTATCTGAGTTTGTAAATACATCAACGAAGGTAAAA	435
Consensus	gtgg tt cacgg gtagg gt ct gt gt aa gc ct		Consensus	ggtttatctgagtttgt aaatcat aacgaaggtaaaa	
A.baumannii	TTCAGTAAATTCATTTAAATTATTAACGGCTGGCCAA	160	A.baumannii	CCATCTCAACGATTCCTCATTCCAGCTGATCCGGA	480
A.nosocomialis	TTCAGTAAATTCATTTAAATTATTAACGGCTGGCCAA	156	A.nosocomialis	CCATCTCAACGATTCCTCATTCCAGCTGATCCGGA	476
A.pittii	TTCAGTAAATTCATTTAAATTATTAACGGCTGGCCAA	155	A.pittii	CCATCTCAACGATTCCTCATTCCAGCTGATCCGGA	475
Consensus	tc agtaaat cat taa att a cg gctgg caa		Consensus	catct aacga at tccatttccac gctgat c ga	
A.baumannii	ATCCAGGCAAGGATACCAACGGGATCCGCAATATC	200	A.baumannii	CAACGGATTGCTGAGAAGTGCATTCCATGGAAAGAT	520
A.nosocomialis	ATCCAGGCAAGGATACCAACGGGATCCGCAATATC	196	A.nosocomialis	CAACGGATTGCTGAGAAGTGCATTCCATGGAAAGAT	516
A.pittii	ATCCAGGCAAGGATACCAACGGGATCCGCAATATC	195	A.pittii	CAACGGATTGCTGAGAAGTGCATTCCATGGAAAGAT	515
Consensus	t ca ga caaga ta ca ca ga ggtatccgcaatattc		Consensus	aacgg attg tgtagaagt gcaatt ca tggaa ga	
A.baumannii	CATTGCGTGTGATTTGGTAAACGGATATCCGGCAACAC	240	A.baumannii	AGTTTCAAGAAAAGTCCCTGTTTACAAACATTC	560
A.nosocomialis	CATTGCGTGTGATTTGGTAAACGGATATCCGGCAACAC	236	A.nosocomialis	AGTTTCAAGAAAAGTCCCTGTTTACAAACATTC	556
A.pittii	CATTGCGTGTGATTTGGTAAACGGATATCCGGCAACAC	235	A.pittii	AGTTTCAAGAAAAGTCCCTGTTTACAAACATTC	555
Consensus	catt cgtgtgatttgggtaaacggata a gg ac a		Consensus	agtta caagaaaa gt cg tggtt ac acaaa attc	
A.baumannii	TGTACGTTTGGCCAAGTGGAGAAAGTTCAGTCAAACC	280	A.baumannii	CCAAAAGATGGGTGACCACTTAGCAGGTTTCCGGC	600
A.nosocomialis	TGTACGTTTGGCCAAGTGGAGAAAGTTCAGTCAAACC	276	A.nosocomialis	CCAAAAGATGGGTGACCACTTAGCAGGTTTCCGGC	596
A.pittii	TGTACGTTTGGCCAAGTGGAGAAAGTTCAGTCAAACC	275	A.pittii	CCAAAAGATGGGTGACCACTTAGCAGGTTTCCGGC	595
Consensus	tgtacg tt tggccaagtg a aac tt agtcaaacc		Consensus	c caaaa gatgg ggtac ca ttacaggtttccggc	
A.baumannii	ATTTTAAAGTTGAAATTTAGGCGCGGTTACGGGAC	320	A.baumannii	GCCTTAAACCGTGGTCAACCAATTCITGAAAATGAA	640
A.nosocomialis	ATTTTAAAGTTGAAATTTAGGCGCGGTTACGGGAC	316	A.nosocomialis	GCCTTAAACCGTGGTCAACCAATTCITGAAAATGAA	636
A.pittii	ATTTTAAAGTTGAAATTTAGGCGCGGTTACGGGAC	315	A.pittii	GCCTTAAACCGTGGTCAACCAATTCITGAAAATGAA	635
Consensus	atttttaa gttgaaatt tagc cg cg ttacg gaaatga		Consensus	gc ttaac cgtgg t accca tatcttgaatgaa	
A.baumannii	TTTCTTTTCAAGCGGGGTTCGTATGTTTTACGTGA	360	A.baumannii	AAATTTCTCAAGAAAGAAAAGTCAATGTGAGGGGATG	680
A.nosocomialis	TTTCTTTTCAAGCGGGGTTCGTATGTTTTACGTGA	356	A.nosocomialis	AAATTTCTCAAGAAAGAAAAGTCAATGTGAGGGGATG	676
A.pittii	TTTCTTTTCAAGCGGGGTTCGTATGTTTTACGTGA	355	A.pittii	AAATTTCTCAAGAAAGAAAAGTCAATGTGAGGGGATG	675
Consensus	tttc tt tt aa gc gg gt cgat gttttacgtga		Consensus	aa atttctcaagaaagaaaagt aatgtgac gg gatg	
A.baumannii	TGACCGTATTATCTTGACCAAGTCTATGACTAAGAAGT	400	A.baumannii	ATGCCGCGTGAAGGTTTACGGCATTATTTCTGTTAAGGT	720
A.nosocomialis	TGACCGTATTATCTTGACCAAGTCTATGACTAAGAAGT	396	A.nosocomialis	ATGCCGCGTGAAGGTTTACGGCATTATTTCTGTTAAGGT	716
A.pittii	TGACCGTATTATCTTGACCAAGTCTATGACTAAGAAGT	395	A.pittii	ATGCCGCGTGAAGGTTTACGGCATTATTTCTGTTAAGGT	715
Consensus	tga cgtattaa ctga ca gt tatgacta gaaggt		Consensus	atgc cgtgaaggttt ac gc attatttc gtttaaggt	

注:序列右侧的数值,碱基在测序序列中的位置;consensus,比对碱基的一致性。

图 2 3 种菌种 *gyrB* 基因可变区测序结果的比对

2.2 鲍曼不动杆菌复合群质谱鉴定结果 280 株鲍曼不动杆菌复合群菌株经质谱鉴定,分别为鲍曼不动杆菌 251 株、医院不动杆菌 15 株和皮特不动杆菌 14 株。与测序鉴定结果一致。

2.3 药敏结果 鲍曼不动杆菌对多种临床常用抗菌药物的耐药率在 60% 以上,对复方磺胺甲噁唑、

阿米卡星和米诺环素的耐药率较低,分别为 49.4%、19.8% 和 11.1%。医院不动杆菌和皮特不动杆菌对常用抗菌药物均保持较高的敏感性,其耐药率明显低于鲍曼不动杆菌,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。医院不动杆菌与皮特不动杆菌对常用抗菌药物耐药率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 常见抗菌药物耐药情况

抗菌药物	耐药率 (%)			耐药率比较分析				
	鲍曼不动杆菌	医院不动杆菌	皮特不动杆菌	鲍曼 vs 医院		鲍曼 vs 皮特		医院 vs 皮特
	(n=251)	(n=15)	(n=14)	χ^2	P	χ^2	P	P
哌拉西林/他唑巴坦	78.6	6.6	0	35.74	<0.01	39.92	0.01	1
头孢他啶	72.7	6.6	21.5	25.75	<0.01	14.21	0.01	0.33
头孢曲松	64.3	6.6	35.7	17.17	<0.01	3.44	0.064	0.08
头孢吡肟	71.5	6.6	21.5	24.34	<0.01	13.23	0.01	0.33
头孢哌酮/舒巴坦	61.9	6.6	0	15.57	<0.01	18.41	0.01	1
亚胺培南	74.4	6.6	0	27.69	<0.01	31.34	0.01	1
美罗培南	80.9	6.6	0	38.29	<0.01	17.77	0.01	1
环丙沙星	80.6	13.2	28.6	30.56	<0.01	17.10	0.01	0.39
左氧氟沙星	69.9	6.6	21.5	22.54	<0.01	12.02	0.01	0.33
多西环素	78.9	0	0	38.66	<0.01	36.40	0.01	—
妥布霉素	71.7	13.3	0	18.90	<0.01	26.96	0.01	0.48
复方磺胺甲噁唑	49.4	6.6	21.5	8.71	<0.05	3.10	0.078	0.33
阿米卡星	19.8	0	0	2.46	0.12	2.23	0.14	—
米诺环素	11.1	0	0	0.84	0.36	0.73	0.39	—

注：—,无数据。

3 讨论

本研究结果显示, Vitek MS (V3.2) 对鲍曼不动杆菌、医院不动杆菌和皮特不动杆菌的鉴定准确率为 100%, 提示 Vitek MS 可快速准确将鲍曼不动杆菌复合群鉴定至种。本研究未检出醋酸钙不动杆菌、塞弗特不动杆菌和戴克肖不动杆菌, 可能与纳入菌株数量偏少有关。有研究显示, 醋酸钙不动杆菌多为环境菌株, 塞弗特不动杆菌和戴克肖不动杆菌在临床亦偶见报道^[4-5], 目前尚未见运用质谱技术对塞弗特不动杆菌和戴克肖不动杆菌鉴定的研究。因此, 质谱对群内其他种的鉴定能力还有待评估。

本研究中皮特不动杆菌和医院不动杆菌的检出率约为 5%, 与国内报道相一致^[6], 而欧美国家血流感染鲍曼不动杆菌复合群菌种构成中皮特不动杆菌和医院不动杆菌分离率超过 50%^[7]。由此可见, 皮特不动杆菌和医院不动杆菌的临床检出存在地区差异。本研究中 251 株鲍曼不动杆菌对绝大多数药物均具有较高耐药性, 仅对阿米卡星和米诺环素有一定的敏感性。而医院不动杆菌与皮特不动杆菌对大部分检测药物呈现敏感。虽然二者对头孢曲松、复方磺胺甲噁唑、阿米卡星、米诺环素的耐药率与鲍曼不动杆菌相差较大, 但差异无统计学意义, 后续研究将扩大菌株数量进一步验证。鲍曼不动杆菌复合群不同菌种间的耐药谱存在较大差异, 质谱技术可实现鲍曼不动杆菌复合群内种的鉴定, 对临床经验性用药具有较好的指导作用。

4 参考文献

- [1] Lu C, Juxiang Y, Yingjun X, 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.
- [2] Nemeč A, Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, et al. Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* (genomic species 14 sensu Bouvet & Jeanjean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter modestus* sp. nov. *Acinetobacter proteolyticus* sp. nov. and *Acinetobacter vivianii* sp. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(4): 1673-1685.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2020.
- [4] Yang Y, Wang J, Fu Y, et al. *Acinetobacter seifertii* isolated from China: genomic sequence and molecular epidemiology analyses [J]. Medicine, 2016, 95(9): e2937.
- [5] Cosgaya C, Marta Mari-Almirall, Assche AV, et al. *Acinetobacter dikshoorniae* sp. nov. a new member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(10): 4105-4111.
- [6] 邓德耀, 袁文丽, 张唤, 等. 皮特不动杆菌、医院不动杆菌感染的临床特点及同源性 [J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(1): 6-11.
- [7] Pailhoriès H, Tiry C, Eveillard M, et al. *Acinetobacter pittii*, more frequently isolated than, *Acinetobacter baumannii*, in blood cultures: the experience of a French hospital [J]. J Hosp Infect, 2018, 99(3): 360-363.

(收稿日期: 2020-05-06)

(本文编辑: 周万青, 刘群)